



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Identificación de un aislamiento de  
*Fusarium oxysporum* f. sp.  
*lycopersici* y respuesta fisiológica en  
tomate durante la infección frente a  
dos elicitores fúngicos**

**Sandra Lorena Carmona Gutiérrez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Bogotá, Colombia  
2019



# **Identificación de un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y respuesta fisiológica en tomate durante la infección frente a dos elicitores fúngicos**

**Sandra Lorena Carmona Gutiérrez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Agrarias**

Director: Ph.D. Mauricio Soto Suárez

Codirectora: Ph.D. Esperanza Torres Rojas

Línea de Investigación: Fisiología de Cultivos

Grupos de Investigación: Genética Molecular Vegetal, Biología Computacional y  
Bioinformática - Agrobiodiversidad y Biotecnología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2019



*A mis padres y hermanos, mis fuentes de  
inspiración.*

*A Santiago, Daniela, Mariaclara y Sofía, mis  
grandes motivadores.*

*A Freddy, mi compañero, mi soporte y amor.*



## Agradecimientos

A Mauricio Soto Suárez, mi director y a Esperanza Torres Rojas, mi codirectora de tesis por su apoyo, direccionamiento y orientación constante. Por su paciencia y dedicación en este proceso.

A Magda Gómez y Diana Burbano, investigadoras de AGROSAVIA por su apoyo y acompañamiento en los montajes y en la realización de esta tesis.

A Andrea del Pilar Villarreal, Rommel Igor Pacheco y Jaime Simbaqueba, investigadores de AGROSAVIA por su asesoría y recomendaciones.

A Alba Marina Cotes y Mónica Betancourt, investigadoras de AGROSAVIA, por orientar mi formación como profesional en la investigación, por su apoyo y asesorías.

A los investigadores Walter López y Nelson Ceballos del grupo de investigación GIPPA de la Universidad de Caldas por proporcionar una cepa patogénica de *Fol* y facilitar los espacios para las colectas de aislamientos y permitir el intercambio de experiencias.

Al investigador David Jones de la escuela de Investigación en Biología en la Australian National University por proporcionar los ADN de referencia para la identificación molecular de *Fol*.

A Germán Estrada investigador de AGROSAVIA y Liz Patricia Moreno profesora de la Universidad Nacional, por facilitarme el uso de equipos necesarios para las mediciones fisiológicas durante la realización de este trabajo.

A Sandra Lucía Cortés, investigadora de AGROSAVIA por su valiosa ayuda en proporcionar protocolos y equipos para la realización de este trabajo.

A Carlos Espinel y Fernando Rivera investigadores de AGROSAVIA, por concederme tiempo, apoyo y ánimo durante este proceso.

VIII Identificación de un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y respuesta fisiológica en tomate durante la infección, frente a dos elicitores fúngicos.

---

A Adriana Santos, líder de laboratorio e investigadora de AGROSAVIA y a todo el personal del laboratorio de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA: Estela Mendieta, David Triana, Inés Roldán, José Neuta, Luz Marina Mesa, Yina Jiménez, Lissette Torres e Ivonn Gelvez por su apoyo y diligente facilitación de espacios, materiales y reactivos; y colaboración en la realización de montajes para este trabajo.



## Resumen

*Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* (*Fol*) es el agente causal de la marchitez vascular del tomate, una enfermedad que ocasiona graves desórdenes fisiológicos en la planta, del cual no se conocen las razas presentes en Colombia. Su manejo se basa principalmente en el uso de fumigantes químicos, con un alto impacto sobre el ambiente y la salud humana; por lo que el tratamiento con inductores de resistencia como quitosán y *Trichoderma* spp., es una alternativa con alto potencial en agricultura porque actúan directamente sobre el patógeno e inducen la defensa en la planta. El objetivo de este trabajo fue identificar un aislamiento de *Fol* para evaluar la respuesta fisiológica de plantas de tomate infectadas y tratadas con quitosán y *Trichoderma* spp., como alternativas de manejo de la enfermedad. Se caracterizó un aislamiento patogénico y altamente virulento de *Fol* raza 2. Se evaluó la actividad controladora *in vitro* e *in planta* de quitosán y *Trichoderma* spp. El quitosán de bajo peso molecular a 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, redujo la marchitez vascular en un 70% en plantas y disminuyó el daño que ocasiona *Fol* sobre Fv/Fm, Y(II) y el contenido de clorofila a, en 22%, 35% y 39% respectivamente; y activó la respuesta de defensa de la planta a través del gen *PR1a*. Este estudio aporta al conocimiento de las alteraciones ocasionadas por *Fol* y el efecto del tratamiento con quitosán sobre los procesos fisiológicos y moleculares en la planta de tomate, como una alternativa confiable para mitigar el daño en la planta. Este es uno de los primeros esfuerzos en Colombia para identificar y caracterizar molecularmente un aislamiento virulento de *Fol*.

**Palabras clave:** Quitosán, *Trichoderma* spp., *SIX*, estrés biótico, *priming*.

## Abstract

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is the causal agent of tomato wilt disease, a high importance disease causing severe physiological disorders in the plant. Its presence has not been completely described in Colombia and its control is mainly based on chemical management that is hazardous for the environment and human health. Plant resistance induction by treatment with elicitors such as Chitosan and *Trichoderma* spp., that improve the plant physiology, is a promising management strategy. The aim of this work was to identify an isolate of *Fol* and to evaluate the physiological response of tomato plants infected with *Fol* and treated with chitosan and *Trichoderma* spp., as alternatives for the management of the disease. A highly virulent Colombian isolate of *Fol* (pathogenic race 2) was obtained and morphologically and molecularly characterized. The control activity *in vitro* and *in planta* of chitosan and *Trichoderma* spp. was also evaluated. Chitosan at low molecular weight ( $2.5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), reduced vascular wilt by 70% in plants and decreased damage caused by *Fol* on Fv/Fm, Y(II) and chlorophyll a content, in 22%, 35% and 39% respectively; and activated the defense response of the plant through the *PR1a* gene. This study offers knowledge of the alterations caused by *Fol* and the effect of treatment with elicitors on the physiological and molecular processes in the tomato plant. Chitosan is a reliable and consistent alternative for the mitigation of the damage caused by this disease. In addition, it is one of the first efforts in Colombia to identify and molecularly characterize a virulent isolation of *Fol*.

**Keywords:** Chitosan, *Trichoderma* spp., SIX, biotic stress, priming.

# Contenido

<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
El cultivo del tomate .....	1
Marchitamiento vascular del tomate .....	1
Respuestas fisiológicas de la planta a la infección por un patógeno vascular .....	2
Mecanismos de resistencia a enfermedades en plantas.....	2
Estrategias de manejo de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	4
Estrategias alternativas al uso de agroquímicos para el control de enfermedades .....	4
Uso de elicitores a partir de <i>Trichoderma</i> y quitosán para la inducción de resistencia en plantas .....	6
<b>Objetivos.....</b>	<b>1</b>
<b>1.    Capítulo 1. Caracterización morfológica, molecular y análisis de patogenicidad de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> (Sacc.) Snyder y Hansen que infectan cultivos comerciales de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) en Colombia.....</b>	<b>3</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1    Estado del arte .....</b>	<b>4</b>
1.1.1 Características morfológicas, ciclo de vida del patógeno y sintomatología de la enfermedad.....	4
1.1.2 Especificidad patogénica y virulencia de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	5
1.1.3 Mecanismos de virulencia de <i>F. oxysporum</i> .....	6
1.1.4 Identificación de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y discriminación de otras formas especiales .....	10
<b>1.2    Materiales y métodos.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Colecta y aislamiento de <i>F. oxysporum</i> en cultivos de tomate .....	10
1.2.2 Caracterización morfológica de <i>F. oxysporum</i> .....	11
1.2.3 Caracterización molecular de <i>F. oxysporum</i> .....	11

1.2.4 Pruebas de patogenicidad de los aislamientos de <i>F. oxysporum</i> .....	13
<b>1.3 Resultados y discusión</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 Colecta y aislamiento de <i>Fusarium</i> .....	16
1.3.2 Caracterización morfológica .....	18
1.3.3 Identificación de formas especiales de <i>F. oxysporum</i> y razas de <i>Fol</i> .....	20
1.3.4 Pruebas de patogenicidad de aislamientos de <i>Fol</i> .....	24
<b>1.4 Conclusiones</b> .....	<b>29</b>
<b>1.5 Recomendaciones</b> .....	<b>30</b>
<b>2. Capítulo 2. Evaluación de la capacidad de reducción de la marchitez vascular causada por <i>F. oxysporum</i> en tomate por parte de <i>Trichoderma</i> spp. y quitosán</b>	<b>31</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1 Estado del arte</b> .....	<b>32</b>
2.1.1 Disminución en el uso de plaguicidas químicos: una alternativa necesaria ...	32
2.1.2 Uso de <i>Trichoderma</i> spp. como biocontrolador de enfermedades del suelo..	32
2.1.3 Quitosán como alternativa de uso en la agricultura .....	35
<b>2.2 Materiales y métodos</b> .....	<b>41</b>
2.2.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> spp. sobre el crecimiento de <i>Fol</i> .....	41
2.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> de la inhibición de crecimiento de <i>Fol</i> por parte de quitosán 43	
2.2.3 Evaluación de la reducción de la marchitez vascular ocasionada por <i>Fol</i> en plantas de tomate, por parte de <i>Trichoderma</i> spp y quitosán .....	44
<b>2.3 Resultados y discusión</b> .....	<b>45</b>
2.3.1 <i>Trichoderma</i> spp. reduce significativamente el crecimiento de <i>Fol in vitro</i> .....	45
2.3.2 Quitosán reduce significativamente el crecimiento de <i>Fol in vitro</i> .....	49
2.3.3 <i>Trichoderma</i> spp. y quitosán aplicados individualmente reducen en diferentes niveles la marchitez vascular por <i>Fol</i> en plantas de tomate .....	51
<b>2.4 Conclusiones</b> .....	<b>58</b>
<b>2.5 Recomendaciones</b> .....	<b>59</b>
<b>3. Capítulo 3. Respuesta fisiológica de plantas de tomate tratadas con quitosán en la protección frente a <i>F. oxysporum</i></b> .....	<b>61</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>61</b>
<b>3.1 Estado del arte</b> .....	<b>62</b>
3.1.1 El papel de las fitohormonas en la regulación de las interacciones bióticas y abióticas .....	62
3.1.2 La fisiología de las plantas en la respuesta de defensa a patógenos .....	66
3.1.3 Desórdenes fisiológicos de la planta en interacción con <i>Fusarium</i> spp. ....	69
3.1.4 El quitosán y la activación de defensa en las plantas .....	70
<b>3.2 Materiales y métodos</b> .....	<b>73</b>
3.2.1 Evaluación de la respuesta fisiológica de plantas de tomate tratadas con quitosán frente a infección con <i>Fol</i> .....	73
3.2.2 Evaluación de la respuesta molecular de plantas de tomate tratadas con quitosán, en interacción con <i>Fol</i> .....	76
<b>3.3 Resultados y discusión</b> .....	<b>78</b>

3.3.1 Respuesta fisiológica de plantas de tomate tratadas con quitosán frente a infección con <i>Fol</i> .....	78
3.3.2 Respuesta molecular de plantas de tomate tratadas con quitosán, en interacción con <i>Fol</i> .....	89
<b>3.4 Conclusiones.....</b>	<b>92</b>
<b>3.5 Recomendaciones.....</b>	<b>93</b>
<b>4. Modelo de la infección por <i>Fol</i> y de la respuesta fisiológica de plantas de tomate infectadas y tratadas con quitosán .....</b>	<b>94</b>
<b>Anexo 1: Protocolo para la obtención de <i>Fusarium</i> sp. endófito a partir de material vegetal de tomate .....</b>	<b>95</b>
<b>Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN a partir de cultivos de <i>F. oxysporum</i>.....</b>	<b>98</b>
<b>Anexo 3. Condiciones de amplificación de marcadores para la identificación de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y sus razas .....</b>	<b>100</b>
<b>Anexo 4. Identificación molecular de aislamientos de <i>Fol</i> afectando cultivos en Colombia.....</b>	<b>102</b>
<b>Anexo 5. Identificación molecular de aislamientos de <i>Fol</i> afectando cultivos en Colombia.....</b>	<b>103</b>
<b>Anexo 6. Alineamientos de secuencias del gen <i>SIX3</i> de aislamientos de <i>Fol</i> colombianos .....</b>	<b>104</b>
<b>Anexo 7. Resultado del análisis de suelo usado para bioensayos con <i>Fol</i> en plantas de tomate .....</b>	<b>106</b>
<b>Anexo 8. Resultados de estandarización de un protocolo de infección de <i>Fol</i> en plantas de tomate.....</b>	<b>107</b>
<b>Anexo 9. Pruebas <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de quitosán sobre <i>Fol</i>...108</b>	
<b>Anexo 10. Pruebas <i>in planta</i> de la actividad biocontroladora de <i>Trichoderma</i> spp. y quitosán sobre <i>Fol</i> .....</b>	<b>109</b>
<b>Anexo 11. Curva patrón de prolina para la determinación de concentración en plantas .....</b>	<b>111</b>

**Anexo 12. Respuesta fisiológica de plantas de tomate tratadas con quitosán en  
interacción con *Fol*..... 112**

**Anexo 13. Respuesta molecular de plantas de tomate tratadas con quitosán, en  
interacción con *Fol*..... 113**

**Anexo 14. Variables fisiológicas en interacción tomate - *Fol59*..... 115**

**Bibliografía ..... 117**

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Estructura de las moléculas de quitina (arriba) y el quitosán (abajo) resultante de la deacetilación parcial de la quitina (Orzali <i>et al.</i> , 2017). .....	9
<b>Figura 1-1.</b> Ciclo de la enfermedad marchitez vascular del tomate causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Agris, 2005). .....	4
<b>Figura 1-2.</b> Zonas de colecta de aislamientos de <i>F. oxysporum</i> en cultivos de tomate bajo invernadero. ....	16
<b>Figura 1-3.</b> Plantas de tomate con síntomas típicos de <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	17
<b>Figura 1-4.</b> Estructuras propagativas de <i>Fol</i> producidas en medio de cultivo CLA observadas por microscopía óptica. ....	19
<b>Figura 1-5.</b> Análisis morfológico de <i>F. oxysporum</i> . ....	20
<b>Figura 1-6.</b> Electroforesis en gel de agarosa con bandas del tamaño esperado, a partir de la amplificación de cada uno de los marcadores de virulencia <i>SIX</i> que permiten la identificación de <i>Fol</i> y la identificación de razas. ....	21
<b>Figura 1-7.</b> Determinación de razas en aislamientos colombianos patogénicos de <i>Fol</i> . ...	23
<b>Figura 1-8.</b> A) Porcentaje de severidad de síntomas de la marchitez vascular a través del tiempo. B) Área bajo la curva del progreso de la enfermedad a los 18 ddi .....	25
<b>Figura 1-9.</b> Síntomas de marchitez vascular expresados en plantulas de tomate. A) Escala visual de severidad con niveles de enfermedad de 1 a 5 ajustada B) Síntoma de necrosis vascular visualizado por corte longitudinal en raíz; C) Síntoma de necrosis vascular visualizado por corte longitudinal del tallo (observado en estereoscopio a 10 aumentos). ....	27
<b>Figura 1-10.</b> Progreso de la severidad de la marchitez vascular en plantas de tomate inoculadas a diferentes edades. ....	28
<b>Figura 2-1.</b> Mecanismos de acción antimicrobiana directa de quitosán sobre hongos patogénicos. ....	39
<b>Figura 2-2.</b> Tipos de interacción observados en enfrentamientos duales <i>in vitro</i> entre <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Fol</i> , a los siete ddi. ....	47
<b>Figura 2-3.</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Fol59</i> después de 7 días de crecimiento <i>in vitro</i> . ....	48
<b>Figura 2-4.</b> Inhibición de crecimiento de <i>Fol in vitro</i> por chitosán en diferentes concentraciones de diferentes pesos moleculares. LMW= bajo peso molecular, MMW: mediano peso molecular, HMW: alto peso molecular. ....	49

<b>Figura 2-5.</b> Síntomas de la marchitez vascular en plantas de tomate 12 ddi, tratadas con diferentes aislamientos de <i>Trichoderma</i> e inoculadas con <i>FoI59</i> .....	51
<b>Figura 2-6.</b> Eficacia en la disminución del porcentaje de la incidencia.....	52
<b>Figura 2-7.</b> Eficacia calculada sobre la incidencia. ....	54
<b>Figura 2-8.</b> Expresión de síntomas de la marchitez vascular en plantas de tomate tratadas con quitosán e inoculadas con <i>FoI59</i> , 14 ddi.....	56
<b>Figura 3-1.</b> Modelo de la intercomunicación hormonal en la activación de respuestas de defensa en las <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	65
<b>Figura 0-1.</b> Cambios en el metabolismo de los carbohidratos de las plantas ocasionados por patógenos biótrofos.....	67
<b>Figura 3-3.</b> Respuesta oxidativa de las plantas frente a estrés biótico y abiótico. El sistema antioxidante de la planta posibilita la regulación de los niveles de ROS, e influyen también la inducción de señales por ROS.....	69
<b>Figura 3-4.</b> Modelo del mecanismo molecular de activación de defensa de quitosán en las plantas mediado por señalización del AJ, ROS, ABA y NO para la activación de genes de defensa y de respuesta a estrés biótico.. ....	71
<b>Figura 0-2.</b> Eficiencia cuántica fotoquímica máxima potencial del PSII (Fv/Fm) a través del tiempo en plantas de tomate tratadas con quitosán e inoculadas con <i>FoI59</i> .....	79
<b>Figura 0-3.</b> Disipación fotoquímica (qP) de la energía a través del tiempo en plantas de tomate tratadas con quitosán e inoculadas con <i>FoI59</i> .....	80
<b>Figura 0-4.</b> Eficiencia fotoquímica del PSII (Y(II)) a través del tiempo en plantas de tomate tratadas con quitosán e inoculadas con <i>FoI59</i> .....	82
<b>Figura 3-8.</b> Muerte celular localizada en hojas de plantas de tomate infectadas con <i>FoI59</i> y tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL <sup>-1</sup> .. ....	87
<b>Figura 3-10.</b> Expresión diferencial de genes relacionados con las vías de señalización de A) ET/JA ( <i>ERF1</i> ), B) JA ( <i>LOXA</i> ) y AS: C) <i>PR1a</i> y D) <i>PAL</i> en tejidos de la parte aérea de la planta (hojas y tallo) 72 horas después del tratamiento con quitosán y 48 horas después de inoculación.....	90



## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Hongos fitopatógenos que han sido evaluados frente a quitosán por su actividad antimicrobiana.....	14
<b>Tabla 1-1.</b> Mecanismos generales que contribuyen en la virulencia de <i>F. oxysporum</i> frente a tomate.....	9
<b>Tabla 1-2.</b> Primers usados para la identificación de aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	12
<b>Tabla 1-3.</b> Escalas de severidad usadas para medir el avance de la enfermedad en diferentes tejidos de plantas de tomate, para el ajuste de una prueba de patogenicidad.	14
<b>Tabla 1-4.</b> Descripción de cultivares de tomate colectados en las zonas productoras visitadas, para la obtención de aislamientos de <i>F. oxysporum</i> . .....	18
<b>Tabla 2-1.</b> Fuentes para la extracción de quitina y quitosán a partir de diferentes organismos.....	36
<b>Tabla 2-2.</b> Productos comerciales a base de quitosán disponibles en el mundo .....	38
<b>Tabla 2-3.</b> Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. usados para la determinación <i>in vitro</i> de la capacidad biocontroladora sobre <i>Fol</i> .....	41
<b>Tabla 2-4.</b> Características de los tipos de interacciones evaluados en enfrentamientos duales entre <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Fol59</i> .....	42
<b>Tabla 2-5.</b> Propiedades de los productos a base de quitosán usados en los ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , para determinar la capacidad inhibidora de <i>Fol</i> .....	43
<b>Tabla 2-6.</b> Índice del antagonismo (IA) <i>in vitro</i> de aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp. frente a <i>Fol</i> . .....	46
<b>Tabla 2-7.</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) por tres moléculas de quitosán a diferentes concentraciones, 7 ddi.....	50
<b>Tabla 2-8.</b> ABCPE de la severidad de la marchitez vascular de plantas de tomate tratadas con quitosán 14 ddi.....	55
<b>Tabla 3-1.</b> Cebadores usados para la determinación de la expresión diferencial de genes relacionados con vías de respuesta de resistencia en plantas de tomate, mediante qRT-PCR. ....	77
<b>Tabla 3-2.</b> Conductancia estomática; contenido relativo de agua (CRA); contenido de clorofila a, clorofila b, carotenoides y prolina en plantas de tomate inoculadas con <i>Fol59</i> y tratadas con quitosán, .....	83

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
°C	Grados centígrados
Cm	Centímetros
G	Gramos
Ha	Hectáreas
con.ml <sup>-1</sup>	Conidias por mililitro
Kg	Kilogramo
Oz	Onzas
mm.día <sup>-1</sup>	Milímetros por día
Da	Daltons
et al.	et alii (y otros)

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
Α	Alfa

### Superíndices

Superíndice	Término
®	Marca registrada

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
Ton	Toneladas
Ha	Hectáreas
Fol	<i>Fusarium oxysorum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Forl	<i>Fusarium oxysorum</i> f. sp. <i>radicis lycopersici</i>
SIX	<i>Secreted in Xylem</i>
msnm	Metros sobre el nivel del mar
Pb	Pares de bases
Kb	Kilobases
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II

**Abreviatura Término**

---

Fv/Fm	Eficiencia cuántica fotoquímica máxima potencial del PSII
Y(II)	Eficiencia fotoquímica del PSII
qP	Disipación fotoquímica de la energía
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>



# Introducción

## El cultivo del tomate

En la actualidad, el tomate es una de las hortalizas de mayor producción a nivel mundial, que año tras año ha incrementado su producción siendo la mayor en el año 2017, con 182 millones de toneladas (ton) en un área de 4'782,753 hectáreas (ha) alrededor del mundo (FAO, 2019). Para el año 2017, en Colombia se produjeron 347 mil ton, de las cuales 244 mil provinieron de invernadero, alcanzando rendimientos promedio de 78 ton.ha<sup>-1</sup> posicionando al tomate como el primer producto hortícola nacional (AGRONET, 2018). Adicionalmente, el cultivo de tomate es altamente intensivo en el uso de mano de obra, por lo que representa una importante fuente de empleo en el país. El sector hortofrutícola es uno de los mayores aportantes, generando 527 mil empleos directos (21% del empleo en sector agrícola) para el año 2016 (Corferias, 2017; Burbano-Erazo, 2016).

## Marchitamiento vascular del tomate

El carácter cosmopolita de la planta de tomate hace que se encuentre expuesta a una gran cantidad de agentes patógenos, muchos de los cuales se hospedan en el suelo y causan importantes limitaciones en la producción del cultivo. Algunos de los patógenos del suelo más importantes que afectan el cultivo de tomate son *Verticillium dahliae* (Liu *et al.*, 2013; Klosterman *et al.*, 2011a), *Rhizoctonia solani* (Makolepsza *et al.*, 2017; Goudjal *et al.*, 2014; Misawa y Kuninaga, 2010; Kuramae *et al.*, 2003), *Ralstonia solanacearum* (Tans-Kersten *et al.*, 2004), los nemátodos: *Meloidogyne* spp. (Desaeger *et al.*, 2017) y *Fusarium oxysporum* que se considera uno de los diez patógenos fúngicos más importantes en la agricultura a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012).

*Fusarium oxysporum* es un hongo ampliamente distribuido en el mundo, formando un complejo de especies que agrupa variantes (*formae speciales*) de acuerdo con su capacidad de infectar determinados hospederos. En plantas, más de 120 *formae speciales* (ff. spp.) han sido descritas ocasionando marchitez vascular y pudriciones en las raíces (Dean *et al.*, 2012). En tomate, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) y *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* (Forl), causan marchitez vascular y pudrición de la corona respectivamente, ocasionando importantes pérdidas económicas en los cultivos (Solanki

*et al.*, 2015). El patógeno permanece en el suelo de forma latente mediante sus estructuras de supervivencia (clamidosporas) hasta por 20 años, y germinan en cercanía de la raíz del hospedero (Dean *et al.*, 2012; Michielse y Rep, 2009; Di Pietro *et al.*, 2003). En *Fol* se ha estudiado ampliamente la interacción molecular entre el patógeno y su hospedero y se revisan en este documento en el capítulo 1.

## **Respuestas fisiológicas de la planta a la infección por un patógeno vascular**

Las plantas sometidas a estrés biótico por un patógeno vascular, se ven afectadas en procesos fisiológicos, como aquellos relacionados con el crecimiento por la disminución en la toma de agua y nutrientes, pero también en procesos, como la respiración y la fotosíntesis (Yadeta y Thomma, 2013). El estado hídrico de la planta es afectado por la obstrucción de los elementos del xilema (por las estructuras del microorganismo y la formación de gomas y tilosas), lo que aumenta la resistencia en los haces vasculares para la translocación de agua y disminuye el potencial hídrico en las hojas (Duniway, 1971). Esta situación induce la disminución de la conductancia estomática, reduciendo la toma de CO<sub>2</sub> del ambiente, causando limitaciones en la actividad fotosintética y un decrecimiento en la eficiencia cuántica del fotosistema II (PSII), en la captura de radiación fotosintéticamente activa y finalmente, afecta la acumulación de biomasa en las hojas. Estas respuestas son similares a la relacionadas con el estrés hídrico (Pinheiro y Chaves, 2011; Chaves *et al.*, 2009; Nogués *et al.*, 2002; Lorenzini., 1997).

## **Mecanismos de resistencia a enfermedades en plantas**

La interacción planta-patógeno involucra procesos de comunicación en los cuales la planta puede reconocer al patógeno e inducir estrategias de defensa, mientras el patógeno puede en coevolución puede causar cambios en la fisiología de la planta. Frente a esto, las plantas han desarrollado un sofisticado mecanismo de defensa para contrarrestar el ataque de los patógenos (Silva *et al.*, 2018).

Dos mecanismos principales operan frente al estrés biótico en plantas: la primera línea de defensa es el reconocimiento de moléculas altamente conservadas entre ciertos grupos de patógenos, llamadas MAMPs o PAMPs (*Microbial or Pathogen Associated Molecular Patterns*). Este reconocimiento inicial está mediado por PRRs (*Pattern Recognition*

*Receptors*) de la planta, los cuales se encargan de transmitir las señales para desencadenar la PTI (*PAMP Triggered Immunity*) y detener el progreso del patógeno (Ádám *et al.*, 2018; Vidhyasekaran, 2016; Jones y Dangl, 2006). El uso de elicitors de origen biótico y abiótico como desencadenantes de respuestas asociadas a la PTI, es usado como una estrategia de inducción de resistencia para hacer uso de la capacidad de respuesta basal de la planta (Felipini *et al.*, 2016).

Algunos patógenos tienen la capacidad de suprimir la PTI, desplegando efectores que son proteínas inyectadas en los tejidos del hospedero, que interfieren con la PTI facilitando la infección y desencadenando la ETS (*Effector Triggered Susceptibility*). En respuesta a esto, la planta puede desplegar una segunda línea de defensa mediada por genes de resistencia (genes *R*) que pueden reconocer de forma específica, directa o indirectamente, los efectores inyectados por el patógeno, iniciando la ETI (*Effector Triggered Immunity*) (Andersen *et al.*, 2018; Giraldo *et al.*, 2013; Pitzschke *et al.*, 2009; Shah, 2009).

Tanto la PTI como la ETI, pueden activar vías de señalización mediadas, entre otras por, MAPKs (*Mitogen-activated protein kinase*), proteínas-G, ubiquitinas, calcio, vías de señalización hormonal (Ácido Salicílico: AS, Ácido Jasmónico: AJ y Etileno: ET), activación de factores de transcripción y modificaciones epigenéticas que desencadenan la expresión de genes PR (*Pathogenesis-related*); muchos de los cuales codifican proteínas con actividad antimicrobiana (Andersen *et al.*, 2018; Pitzschke *et al.*, 2009; Shah, 2009). Sin embargo, la ETI produce una respuesta más fuerte y rápida que la PTI y frecuentemente involucra muerte celular ocasionada por una respuesta hipersensible (HR) en la planta para restringir el avance del patógeno (Walters, 2015; Wiesel *et al.*, 2014; Henry *et al.*, 2012; Jones y Dangl, 2006).

En tomate se han identificado al menos 65 genes *R* que reconocen patógenos virulentos. Los productos de estos genes *R* poseen frecuentemente motivos estructurales extracelulares, citoplasmáticos y transmembranales; y son proteínas con dominios tipo NB-LRR (*Nucleotide binding – Leucine-rich repeat*) (Chaudhary y Atamian, 2017). En la interacción entre tomate y *Fol*, muchos genes *R – AVR* han sido identificados. Los genes de Resistencia *I* (*Immunity*), *I-2* e *I-3*, confieren protección contra *Fol* raza 1 (que posee *AVR1*, *AVR2* y *AVR3*, originalmente conocidos como *SIX4*, *SIX3* y *SIX*, respectivamente), *Fol* raza 2 (pérdida de *AVR1*, posee *AVR2* y *AVR3*) y *Fol* raza 3 (pérdida de *AVR1*, *AVR2*

mutado y *AVR3*) (Catanzariti *et al.*, 2017; Takken y Rep, 2010). Además de los genes mencionados de resistencia, se han identificado el *I-1* que también reconoce *AVR1* y el *I-7* cuyo *AVR* no ha sido aún descrito (van der Does *et al.*, 2018).

## **Estrategias de manejo de *Fusarium oxysporum***

El control de los patógenos del suelo tiene implicaciones complejas, por lo cual, el uso de fumigantes y fungicidas de síntesis química es la principal estrategia utilizada por los productores en Colombia; cuyo promedio de uso de plaguicidas químicos para el año 2015 fue de 14.7 kg.ha<sup>-1</sup>. Esta cifra posiciona a Colombia como el tercer país del mundo en consumo de plaguicidas, con un uso varias veces mayor al del promedio mundial para la producción agrícola, que se encuentra en 3.9 kg.ha<sup>-1</sup> (FAO, 2018).

La falta de implementación de prácticas integradas de manejo de enfermedades y plagas del cultivo, hace que el uso de los plaguicidas de síntesis química como único recurso, desencadene la presencia de residuos de sustancias nocivas para la salud de los consumidores en el fruto de tomate (USDA, 2014) y favorezca la aparición de microorganismos resistentes por el uso continuo de las mismas moléculas activas, haciendo más difícil su manejo (Rubio-Reque *et al.*, 2008; Gisi y Cohen, 1996). En Colombia se ha reportado la presencia de residuos de 30 sustancias activas de plaguicidas en tomates frescos, colectados en mercados para consumo, de las cuales tres están prohibidas por las autoridades reguladoras (Gutiérrez y Londoño, 2009; Castro *et al.*, 2004). Así mismo, Arias *et al.*, (2014) encontraron trazas de 15 plaguicidas en suelos de cultivos de tomate en invernadero y a campo abierto. En este contexto, los riesgos asociados a la salud, contaminación ambiental y costos en aplicaciones, disminuyen la viabilidad de los métodos químicos de control (USDA, 2014; Mandal *et al.*, 2009).

## **Estrategias alternativas al uso de agroquímicos para el control de enfermedades**

Una de las estrategias más extendida por su economía y bajo impacto ambiental, es el uso de variedades resistentes de tomate, que se basa en la interacción gen por gen entre el patógeno y el hospedero, donde por cada gen que condiciona una respuesta en el hospedero, existe un correspondiente gen en el patógeno que condiciona la patogenicidad (Flor, 1971). Sin embargo, al tratarse de resistencia vertical o monogénica, tiene una durabilidad relativa por la alta presión de selección sobre las poblaciones del patógeno



para evadir el reconocimiento por las proteínas receptoras del hospedero, lo que ha favorecido el surgimiento de nuevas razas (Bai *et al.*, 2018; Biju *et al.*, 2017; González *et al.*, 2012; Takken y Rep, 2010; Scott y Jones, 1989).

Dadas las características reproductivas del tomate (flor hermafrodita), las poblaciones de tomate cultivadas generalmente se autofecundan, por lo que es poco probable que se den cruzamientos naturales; además, esto favorece la pérdida de diversidad y la endogamia. Con el fin de contrarrestar estas dificultades, en el mejoramiento de tomate la estrategia más utilizada es la hibridación, proceso por el cual se introducen los genes dominantes que codifican rasgos deseables presentes en materiales silvestres, a través de cruces, generando mayor variabilidad genética en una progenie (Vallejo-Cabrera, 2000). El uso de híbridos contribuye a la obtención de materiales más consistentes en productividad y calidad, dado que la semilla híbrida proviene de parentales puros que poseen características altamente deseables, tales como alta productividad, uniformidad en tamaño y forma de fruto, propiedades organolépticas o nutricionales, resiliencia en condiciones ambientales variadas y resistencia a plagas o enfermedades (Carbonell *et al.*, 2018; Peña-Lomelí *et al.*, 2013).

En Colombia para el año 2013, se usaban 37 genotipos de tomate tipo milano, 22 tipo chonto y 4 genotipos tipo cherry en las zonas de mayor producción, los cuales, según sus distribuidores presentan resistencia a los patógenos: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), razas 1 y 2, *Verticillium dahliae* razas 1 y 2, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl), *Cladosporium* sp., *Stemphylium* sp., *Alternaria* sp., virus del mosaico del tomate (ToMV), virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del enrollamiento o de la cuchara (TYLCV), virus del torrado del tomate (ToTV), virus del bronceado o peste negra del tomate (TSWV), y nemátodos (*Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*) (Jaramillo *et al.*, 2013). No obstante, año tras año las casas comerciales liberan nuevos materiales con diferentes características, manteniendo un mercado de semillas dinámico y diverso en el campo, por sus propiedades de producción, adaptación y resistencia (Jaramillo *et al.*, 2013). Otra de las técnicas que ha tomado fuerza en los últimos años para la generación de nuevos materiales es la injertación, un proceso en el que se usa un patrón resistente y una copa con características deseables de producción (Sen *et al.*, 2018).

El uso de microorganismos controladores es una opción que se ha adoptado desde hace varias décadas, dada la capacidad antagónica, efecto de antibiosis, parasitismo y competición que pueden ejercer los microorganismos benéficos como hongos o bacterias contra fitopatógenos, incluyendo *F. oxysporum* (McGovern, 2015). La supresión de la enfermedad en suelos ricos en microbiota por la combinación de los diferentes mecanismos, ha potenciado el uso de compostajes maduros para la disminución de la enfermedad (Hacquard *et al.*, 2017; Akhter *et al.*, 2015).

## **Uso de elicitors a partir de *Trichoderma* y quitosán para la inducción de resistencia en plantas**

Varios autores definen a los bioplaguicidas como productos naturales (sustancias derivadas de microorganismos, de plantas superiores y de animales), microorganismos (bacterias, hongos, nemátodos y protozoos) y virus, que podrían ayudar a reducir el impacto negativo de los agentes sintéticos utilizados para el manejo de las enfermedades y plagas que atacan un cultivo. Estos bioplaguicidas no generan residuos tóxicos, tampoco favorecen el desarrollo de resistencia por parte de los fitófagos y fitopatógenos y no producen contaminación ambiental por ser biodegradables y menos tóxicos para el ambiente (Yoon *et al.*, 2013; Copping y Menn, 2000). Otros autores usan la palabra elicitor, para referirse a componentes de origen biológico, derivados de plantas o microorganismos e incluyen también algunas sustancias que pueden ser generadas sintéticamente y que inducen un tipo de respuesta principalmente de resistencia (Walters *et al.*, 2013).

Entre los bioplaguicidas más ampliamente usados se encuentran especies del género *Trichoderma*, los cuales son habitantes del suelo. El uso frecuente de este hongo se relaciona con su capacidad antagónica que implica mecanismos como micoparasitismo, competición, antibiosis, producción de metabolitos inhibidores de crecimiento de patógenos y promoción de crecimiento de la planta. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado su uso al demostrarse la capacidad de inducción de resistencia sobre diversas especies de plantas cultivadas (Howell, 2003; Van Wees *et al.*, 2008; Walters *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2015). Se considera que *Trichoderma* spp., liberan al menos tres tipos de elicitors que interactúan con las plantas en el proceso de colonización: enzimas o péptidos, proteínas Avr y oligosacáridos de bajo peso molecular que son secretados por acción enzimática sobre las paredes celulares del hongo o de las plantas (Woo *et al.*, 2006).

Algunos de los elicitores de *Trichoderma*, reconocidos en su interacción con plantas, son: una *ET-inducing xylanase* (Xyn2/Eix), celulasas, una proteína TasSwo (*swollenin*), endopoligalacturonasa (ThPG1), alamectina (ALA), peptaiboles y una proteína rica en cisteína (Sm1); los cuales activan vías de señalización celular en la planta como modulación del calcio citosólico ( $Ca^{2+}$ ), producción de ROS (*Reactive Oxygen Species*) y activación de señalización por MAPK. A través de esta señalización, se activan vías hormonales como AS, AJ y ET, que desencadenan la síntesis de PR (Proteínas relacionadas con patogenicidad) y confieren resistencia a estrés de tipo biótico o abiótico (Contreras-Cornejo *et al.*, 2014; Mastouri *et al.*, 2010).

Dentro de los enfoques que han tomado fuerza para ser usados en inducción de resistencia, está el uso de derivados de componentes de la pared celular de plantas, como los oligogalacturónidos; moléculas proteínicas de patógenos como la flagelina, elicitinas derivadas de oomicetes, y moléculas no proteínicas como lipopolisacáridos y quitosán (Silva *et al.*, 2018; Wiesel *et al.*, 2014; Walters *et al.*, 2013).

El quitosán es un polímero lineal presente en la naturaleza, en la pared celular fúngica, algunas algas verdes, levaduras, insectos y en crustáceos como derivado de la quitina. El quitosán es la segunda fuente de carbono renovable más abundante en el mundo después de la lignocelulosa (Orzali *et al.*, 2017). Este biopolímero posee actividad antimicrobiana, la cual ha sido comprobada frente a diferentes hongos fitopatógenos (Tabla 2), mediante varios mecanismos: (i) inhibición de crecimiento micelial, (ii) inhibición de la esporulación, e (iii) inhibición de la germinación de conidios. Además, se ha demostrado su capacidad reguladora de crecimiento en plantas, biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad a humanos; por lo que se viene usando para áreas como salud, nutrición humana, cosmetología y agricultura, entre otras (Divya *et al.*, 2018; Kumaraswamy *et al.*, 2018).

**Tabla 1** Hongos fitopatógenos que han sido evaluados frente a quitosán por su actividad antimicrobiana

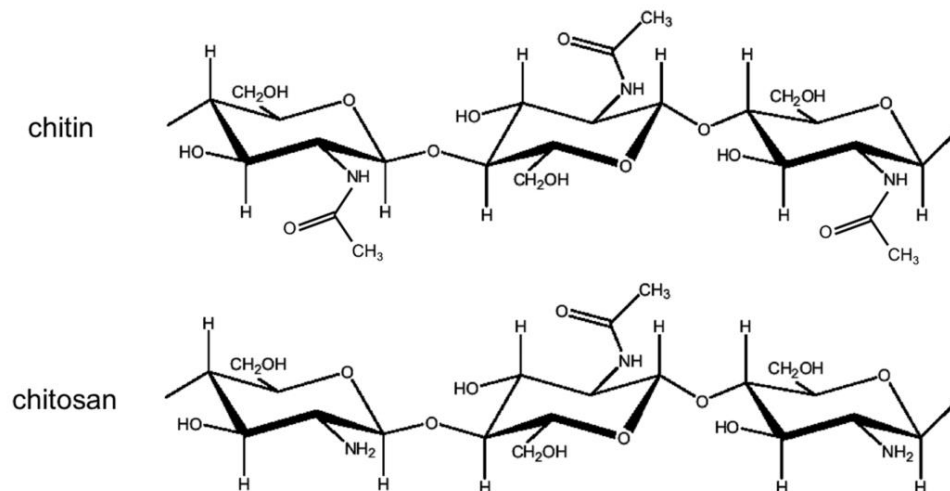
Microorganismo patógeno	Mecanismo	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>		
<i>Verticillium dahliae</i>	Inhibición de crecimiento <i>in vitro</i>	(Khiareddine y El-Mohamedy, 2015)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Inducción de resistencia	
<i>Botrytis cinerea</i>		
<i>Alternaria solani</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>		
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Inhibición de crecimiento <i>in vitro</i>	(Palma-Guerrero et al., 2008)
<i>Pythium ultimum</i>	Inhibición de la germinación <i>in vitro</i>	
<i>Verticillium dahliae</i>		
<i>Didymella bryoniae</i>		
<i>Fusarium graminearum</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i>		
<i>Monosporascus canonballus</i>	Inhibición de crecimiento <i>in vitro</i>	(Park et al., 2002)
<i>Pythium irregulare</i>		
<i>Rhizoctonia solani</i>		
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Inhibición de crecimiento, esporulación y germinación <i>in vitro</i>	(Hernández-Lauzardo et al., 2008)
<i>Colletotrichum</i> spp.	Inhibición de crecimiento <i>in vitro</i>	(Ramos Berger et al., 2018)

A nivel industrial, el quitosán es un derivado de la quitina extraída del exoesqueleto de los crustáceos, a partir de la remoción ácida del carbonato de calcio (desmineralización), generalmente por una reacción exotérmica con HCl, seguida de la remoción de proteínas por tratamientos alcalinos (Goy et al., 2009). Luego, la deacetilación parcial de las subunidades de N-acetil-glucosamina da lugar al quitosán (Figura 1).

La deacetilación a nivel industrial se produce a partir de procesos de hidrólisis enzimática o alcalina (usando NaOH- 40/50%), que actúa sobre los grupos acetamido de la cadena polimérica y convierte la N-acetil-D-glucosamina en  $\beta$ -1,4-D-glucosamina (Orzali et al., 2017). La deacetilación casi nunca es completa, por lo que por definición, se dice que

cuando más del 50% de las unidades monoméricas están acetiladas (menor grado de deacetilación – DDA por sus siglas en inglés), el copolímero es quitina; pero cuando la acetilación es menor a 50%, se denomina quitosán (Tachaboonyakiat, 2016; Badawy y Rabea, 2011; Rabea *et al.*, 2003).

La eficacia en la actividad antifúngica del quitosán es dependiente de sus propiedades físicas como la solubilidad y grado de deacetilación, siendo mayor el control, a medida que es mayor la deacetilación (Park *et al.*, 2002). El peso molecular es otro de los factores determinantes en la actividad controladora de quitosán (Goy *et al.*, 2009; Sekiguchi *et al.*, 1994), siendo variable entre microorganismos (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Estructura de las moléculas de quitina (arriba) y el quitosán (abajo) resultante de la deacetilación parcial de la quitina (Orzali *et al.*, 2017).

El quitosán es insoluble en agua ya que es un polisacárido policatiónico en condiciones de pH neutral o básico y contiene grupos amino libres en el segundo carbono de las unidades de acetil glucosamina (GlcN); pero generalmente se solubiliza en soluciones acuosas acidificadas (2-3%), por la protonación de los grupos amino que permite la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos polares del quitosán y el agua (Badawy y Rabea, 2011).

El quitosán como parte de un programa de manejo integrado de enfermedades puede inducir resistencia y generar un efecto en los procesos fisiológicos desencadenados en la

planta de tomate en presencia de *Fol*, cuya comprensión es clave para el planteamiento de estrategias de manejo. Por lo tanto, esta alternativa representa una forma de reducción del uso de plaguicidas de síntesis química y de potencialización del sistema de defensa innato de las plantas; posicionando a la fisiología vegetal con una importancia de tipo transversal, dentro de la investigación interdisciplinar para fortalecer el desarrollo agrícola (Wiesel *et al.*, 2014; Pastor *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2013; Van Wees *et al.*, 2008; Walters *et al.*, 2005).

Para la caracterización de la respuesta fisiológica de la planta de tomate por el tratamiento con los elicitors fúngicos *Trichoderma* spp. y quitosán frente a *Fusarium oxysporum*, se realizó el presente trabajo que se divide en tres secciones principales. En el primer capítulo, se presenta la caracterización biológica y molecular de un aislamiento patogénico y de alta virulencia de *Fol* proveniente de un cultivo productivo de tomate y se realiza una breve aproximación al estado del patógeno en el país. En la segunda sección del trabajo, se determina la capacidad de reducción de la enfermedad marchitez vascular en plántulas de tomate, por parte de dos elicitors microbianos: *Trichoderma* spp. y quitosán, a través de ensayos de selección, que permitieron identificar los mejores tratamientos para favorecer la respuesta de la planta de tomate. Finalmente, la tercera parte del trabajo ofrece una aproximación a los mecanismos fisiológicos y moleculares que son desencadenados por parte del tratamiento elicitor seleccionado previamente, en la respuesta de defensa de plantas de tomate infectadas con *Fol*.

# Objetivos

**Objetivo general.** Identificar un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y caracterizar la respuesta fisiológica de plantas de tomate tratadas con los elicitores fúngicos *Trichoderma* spp. y quitosán como métodos alternativos de manejo de la infección.

## Objetivos específicos:

- Identificar un aislamiento de *F. oxysporum* altamente virulento y caracterizado molecularmente para realizar las inoculaciones en plantas de tomate.
- Determinar la capacidad de reducción de la severidad de la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* en el tratamiento con *Trichoderma* spp. y quitosán en plantas de tomate.
- Caracterizar parámetros fisiológicos en plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum* y tratadas con el mejor elicitor fúngico evaluado.





# 1. Caracterización morfológica, molecular y análisis de patogenicidad de aislamientos de *Fusarium oxysporum* (Sacc.) Snyder y Hansen que infectan cultivos comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Colombia

## Resumen

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen (*Fol*) es la forma especial causante de la marchitez vascular que afecta únicamente plantas de tomate. Con base en sus genes efectores secretados en el xilema (*SIX*), se agrupa en razas que causan enfermedad en diferentes genotipos de tomate. En Colombia aún no se conocen las razas que infectan los cultivos de tomate y su patogenicidad no ha sido bien estudiada. Para obtener un aislamiento de *Fol* patogénico y caracterizado molecularmente, 119 aislamientos con características morfológicas de *F. oxysporum* se obtuvieron de plantas de tomate expresando síntomas de marchitez vascular en cultivos comerciales de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Caldas. Se analizaron genéticamente para su identificación a nivel de raza, usando como marcadores, los genes *SIX* que permiten discriminar entre las tres razas de *Fol*. En un análisis por PCR realizado a todos los aislamientos; dos de ellos (*UDCFOL10* y *Fol59*) resultaron positivos para la presencia del gen *SIX1*, indicando que corresponden a *Fol*. Se realizó un análisis por PCR con el resto de los genes marcadores (*SIX2* - *SIX5*) sobre estos dos aislamientos y las secuencias resultantes de los amplificados indicaron que pertenecen a la raza 2. Se comprobó su patogenicidad sobre plantas de tomate de una variedad susceptible alcanzando una incidencia y severidad de 100% y 94.5%, respectivamente. Adicionalmente, se estandarizó un protocolo de infección replicable. Este estudio es el primer reporte de la identificación de *Fol* raza 2 afectando cultivos de tomate en Colombia y presenta una prueba confiable de patogenicidad sobre plantas de tomate.

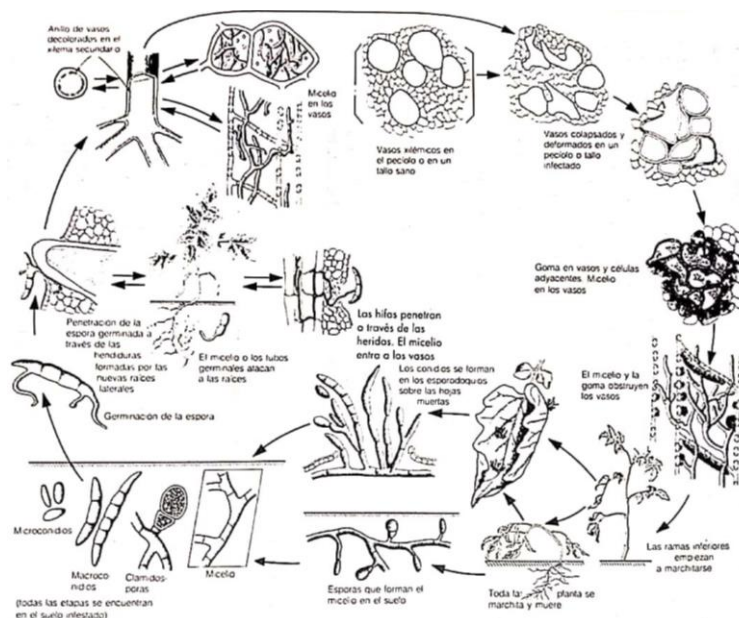
**Palabras claves:** genes *SIX*, razas de *Fol*, *PCR*, metodología de infección.

## 1.1 Estado del arte

### 1.1.1 Características morfológicas, ciclo de vida del patógeno y sintomatología de la enfermedad

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen (*Fol*), es un hongo habitante del suelo que afecta plantas de tomate en cualquier estado fenológico. Pertenece al complejo de especies de *F. oxysporum* (*Fusarium oxysporum species complex* - *FOSC* por sus siglas en inglés), las cuales pueden causar marchitez vascular en un amplio número de especies vegetales cultivadas (Dean *et al.*, 2014). *Fol* se caracteriza por formar los tres tipos de estructuras propagativas conocidas para las formas asexuales de *Fusarium*: microconidas, macroconidias y clamidosporas (Leslie y Summerell, 2006; Nelson, 1981).

Uno de los mecanismos de persistencia del patógeno en el suelo son las clamidosporas, esporas de resistencia que pueden mantenerse latentes por varios años, posiblemente por acción fungistática de otros microorganismos del suelo (Dean *et al.*, 2014; Lockwood, 1977), y germinar ante el reconocimiento de azúcares y aminoácidos presentes en los exudados de las plantas (McGovern, 2015), penetrando las raíces a través de aberturas naturales entre las células de la epidermis, puntos de crecimiento o a través de heridas (Figura 1-1).



**Figura 1-1.** Ciclo de la enfermedad marchitez vascular del tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Agris, 2005).

El hongo penetra directamente a través una hifa infectiva, usando enzimas que degradan la pared celular, como poligalacturonasas (PGs), pectato liasas (PLs), xilanasas y proteasas que pueden contribuir a la infección (Michielse y Rep, 2009; Di Pietro *et al.*, 2003;). En una primera fase biótrofa, para la mayoría de los aislamientos, el patógeno atraviesa el espacio intra e intercelular de los tejidos corticales hasta el xilema por donde asciende (Gordon, 2017; Lagopodi *et al.*, 2002) comprometiendo el estado hídrico de la planta (Michielse y Rep, 2009), causando amarillamiento, marchitez en las hojas y necrosis en los haces vasculares y finalmente, muerte de las células circundantes (Di Pietro *et al.*, 2003; Nelson, 1981). Esto resulta en la expresión de la etapa necrotrófica del patógeno.

Las estructuras sobrevivientes del hongo, pueden persistir sobre el tejido muerto de forma saprofitica; sin embargo, su persistencia y viabilidad a través del tiempo está sujeta tanto a condiciones climáticas, como a la competencia y fungistasis ocasionada por otros saprófitos y microorganismos habitantes del entorno (Lockwood, 1977). Tanto las macro y microconidias de *Fol*, como las hifas del micelio son infectivas, constituyendo así, la fuente primaria de la infección que puede ser transmitida a través del suelo, aire o agua. La esporulación en el xilema provoca que el movimiento de la corriente de transpiración disemine las microconidias a través de los haces vasculares, donde las mismas pueden germinar y a su vez producir más microconidias (Gordon, 2017; Michielse y Rep, 2009).

### **1.1.2 Especificidad patogénica y virulencia de *Fusarium oxysporum***

El complejo de especies *F. oxysporum*, comprende más de 120 formas patogénicas distribuidas por el mundo, afectando más de 130 especies de plantas de importancia agronómica, sin haberse registrado hasta el momento una forma sexual (Gordon, 2017; Aoki *et al.*, 2014). Las cepas patogénicas pueden ser agrupadas en *formae speciales* (ff. spp.), en función de las especies de plantas que puede infectar (i.e. especificidad frente al hospedero). La mayoría de las ff. spp. de *F. oxysporum* tienen un origen polifilético pero convergen en puntos evolutivos (Ma *et al.*, 2013; Fravel *et al.*, 2003); e.g. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), agrupa los aislamientos patogénicos específicos de plantas de tomate (Houterman *et al.*, 2007),

*Fol* se ha agrupado en tres razas, de acuerdo con su capacidad de infectar diferentes cultivares que contienen ciertos genes de resistencia. Los genes *SIX* (Secreted In Xylem)

de *Fol* son factores de virulencia que determinan la especificidad con el hospedero y promueven el proceso de infección, ya que *SIX1*, *SIX3* y *SIX5* son requeridos para la virulencia completa en el hospedero (de Sain y Rep, 2015). La mayoría de los genes *SIX* de *Fol* se encuentran localizados en una región linaje específica, concentrados en el cromosoma 14, denominado: “cromosoma de patogenicidad” (Dean *et al.*, 2014). En 1885, se describió la enfermedad de la “dormidera del tomate” (Masse, 1885 citado por Carrillo-Fasio *et al.*, 2003) cuyo agente causal se determinó como *Fusarium lycopersici*. En 1940, Bohn y Tucker describieron la resistencia al patógeno por parte de un cultivar de tomate (*Solanum pimpinellifolium* L.) mediada por el gen *I* (*Immunity*), y más adelante, se encontraron aislamientos del patógeno que no son reconocidos por el gen *I*, los cuales se agruparon dentro de la raza 2 (Alexander y Tucker, 1945). Posteriormente, se descubrieron accesiones de tomate conteniendo un gen *I-2*, capaz de generar resistencia a la raza 2 de *Fol* (Alexander y Hoover, 1955). La raza 3, ha sido la última descrita, con la capacidad de generar enfermedad en cultivares que contienen los genes *I* e *I-2*, para el cual también se encontró un gen de resistencia *I-3* en *Solanum pennellii* Corr (Grattidge y O'Brien, 1982).

*Fol* tiene características genéticas particulares que le confieren patogenicidad específica hacia el hospedero con el cual ha establecido una relación gen por gen; donde los genes *SIX*, pueden interactuar y ser reconocidos por los genes de resistencia *I* de algunos cultivares de tomate (Ma *et al.*, 2013). De acuerdo con esto, se conocen tres razas (R1, R2 y R3), diferenciadas por su virulencia en materiales que contienen genes de resistencia (*I-1*, *I-2* e *I-3*) que reconocen los *Avr1* (*SIX4*), *Avr2* (*SIX3*) y *Avr3* (*SIX1*), respectivamente (van der Does *et al.*, 2018; Carrillo-Fasio *et al.*, 2003).

### **1.1.3 Mecanismos de virulencia de *F. oxysporum***

En la interacción *Fol* – Tomate, algunos factores que contribuyen a la virulencia son específicos, ya que se encuentran únicamente en los aislamientos con virulencia específica hacia el hospedero y requieren de su interacción para desencadenar la enfermedad o la resistencia. Se han descrito los genes desde el *SIX1* hasta el *SIX14* y todos sus productos han sido encontrados en el sistema vascular de plantas de tomate infectadas, siendo en su mayoría específicos de *Fol* (van Dam *et al.*, 2016). Estos genes se encuentran en regiones del genoma ricas en elementos móviles y pueden ser transferidos horizontalmente, permitiendo al patógeno flexibilidad en la adaptación en características tales como patogenicidad y virulencia (Ma *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2010).

- SIX1: codifica la primera proteína de virulencia descrita para *Fol* siendo secretada *in vivo* al interior de los haces vasculares de plantas de tomate. Es una proteína de menos de 200 aminoácidos, rica en cisteínas, conocida también como Avr3 por ser reconocida por la proteína I-3 de cultivares resistentes de tomate (de Sain y Rep, 2015). El gen *SIX1* está presente en todos los aislamientos de *Fol*, con capacidad de infectar plantas de tomate y tiene una secuencia altamente conservada entre aislamientos por lo que su pérdida podría llevar a una reducida virulencia (Rep, 2005; Rep *et al.*, 2004). La presencia de *SIX1*, correlaciona directamente con la patogenicidad de *Fol* en tomate, aunque la presencia del gen por sí solo, no confiere virulencia a aislamientos no patogénicos (Van Der Does *et al.*, 2008). Se han identificado dos transposones (TE) tipo Helitron (transposones tipo II: replicativos) en esta región, como en muchas otras de los cromosomas asociados a la virulencia de *F. oxysporum*. Se presume que la alta frecuencia de TEs se relaciona con su versatilidad y amplia capacidad de adaptación a diferentes ambientes y variación poblacional (Biju *et al.*, 2017; Hua-Van *et al.*, 2000).
  
- SIX2: codifica una proteína de 23 kDa, con 8 cisteínas (Houterman *et al.*, 2007). Está presente en todos los aislamientos con capacidad de causar marchitez vascular en tomate (Van Der Does *et al.*, 2008). A pesar de que se sospecha que la mayoría de efectores *SIX* están presentes únicamente en *Fol*, se comprobó la presencia de genes homólogos a *SIX2* en *F. verticillioides*, y en 15 aislamientos del complejo de especies de *F. fujikuroi*; lo cual al contrario de lo que se ha demostrado para los demás genes *SIX*, sugiere una transferencia genética de tipo vertical, dada la abundancia en *mimps* (transposones: miniature impala en inglés) y su homología, lo que probablemente ocasionó un intercambio genético de tipo horizontal entre especies, tal y como se demostró entre un aislamiento patogénico y uno no patogénico de *Fol* (van Dam y Rep, 2017; Ma *et al.*, 2010; Takken y Rep, 2010) .
  
- SIX3: codifica una proteína de aproximadamente 16 kDa, sin la cual el hongo pierde su patogenicidad (Houterman *et al.*, 2007; Rep *et al.*, 2004). Corresponde a la proteína de avirulencia Avr2, reconocida por los cultivares de tomate que poseen el gen *I-2*, que desencadena la señalización y defensa por parte de la planta a los aislamientos de la raza 2 (Lievens *et al.*, 2009). El *SIX3* es imprescindible para la virulencia de *Fol*, por lo que, por medio de cambios nucleotídicos en su secuencia, codificó para una proteína que no es

reconocida por la proteína I-2, dando lugar a la emergencia de la raza 3 (Houterman *et al.*, 2009).

- SIX4: codifica una proteína que contiene 242 aminoácidos dentro de los cuales hay seis cisteínas. Tiene también función de avirulencia (*AVR1*), ya que es requerido para la resistencia en tomate mediada por los genes *I* e *I-1* pero además suprime la resistencia mediada por *I-2* e *I-3* (Houterman *et al.*, 2008). Se ha encontrado que el gen *SIX4* puede ser prescindible por *Fol* y esa fue la manera en la que emergió la raza 2, de tal manera que se evita el reconocimiento de las proteínas codificadas por los genes *I* en los cultivares resistentes a la raza 1 (Houterman *et al.*, 2008).

- SIX5: Codifica para la proteína SIX5 que tiene una masa molecular aparente de 12 kDa. Su secuencia es altamente conservada y es requerida para su virulencia sobre plantas susceptibles de tomate (Houterman *et al.*, 2007). Además, la detección de la proteína SIX5 es requerida para desencadenar la resistencia en cultivares con el gen *I-2*. Esta condición se relaciona con una interacción existente entre SIX5 y Avr2, evidenciada mediante la técnica de doble híbrido de levadura; ya que se ha comprobado que aunque ambas secuencias comparten el mismo promotor bidireccional que contiene un *mimp* para su expresión, la falta de expresión de uno no afecta la del otro, aunque sí es necesaria la interacción proteica SIX5-Avr2, para facilitar su tránsito por los plasmodesmos, ya sea para la distribución sistémica del efector, o para el reconocimiento por parte de la proteína I-2 en la planta de tomate (Cao *et al.*, 2018; Cao, 2017; Ma *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2013).

- SIX6 y SIX7: no son exclusivos de *Fol*, ya que genes homólogos a estos dos fueron encontrados en otras formas especiales diferentes, aunque en general se presume que contribuyen con la virulencia con el hospedero. Además, se han descrito hasta el *SIX14*, genes candidatos de efectores ubicados en el mismo cromosoma 14; sin embargo, sus funciones y mecanismos aún no son claros (Vlaardingerbroek *et al.*, 2016; Gawehns *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2013; Lievens *et al.*, 2009).

Existen además en *Fusarium oxysporum* otros mecanismos de virulencia que no implican una interacción con componentes específicos del hospedero y que pueden estar presentes en otros patógenos. Algunos de ellos están descritos en la tabla 1-1.

**Tabla 1-1.** Mecanismos generales que contribuyen en la virulencia de *F. oxysorum* frente a tomate.

Molécula	Características y mecanismos	En <i>F. oxysorum</i>	Referencias
MAPK ( <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> )	Morfogénesis, patogenicidad, formación de la hifa de penetración, transcripción pectato-liasas, hidrofobicidad y colonización	Fmk1	(Di Pietro <i>et al.</i> , 2001; Lengeler <i>et al.</i> , 2000; Xu, 2000)
Proteínas G	Heterodímeros (subunidades $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ ) transducción de señales, cambios morfológicos y metabólicos para el desarrollo de la enfermedad, formación de conidias, termoresistencia.	Subunidades $\alpha$ y $\beta$ de Fga1 y Fgb1	(Jain <i>et al.</i> , 2003; Jain <i>et al.</i> , 2002)
Proteínas con cajas-F (F-box)	Sitios de interacción proteína-proteína, funciones metabólicas, cambios de ciclo celular y degradación proteica (componente del complejo ubiquitin-ligasa SCF <i>Skp 1</i> , <i>Cullin</i> y <i>F-box protein</i> ), degradación o activación de proteínas de patogenicidad.	FRP1	(Kong <i>et al.</i> , 2016; Duyvesteijn <i>et al.</i> , 2005; Kipreos y Pagano, 2000;).
Ácido fusárico	Toxina no específica, secretado en el xilema, translocado a raíces y hojas. Daños a nivel celular: hiperpolarización de membrana celular, pérdida de electrolitos, disminución en síntesis de clorofilas, afectación a sistemas antioxidantes, peroxidación lipídica, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN y muerte celular	Presente en hongos del complejo FOSC	(López-Díaz <i>et al.</i> , 2017; Singh <i>et al.</i> , 2014; Jiao <i>et al.</i> , 2013; Samadi y Behboodi, 2006).
Velvet complex	Regulación del metabolismo secundario, diferenciación, desarrollo y esporulación regulación de expresión de genes de virulencia en tomate, crecimiento hifal y conidiación	FOXG_11273, FOXG_00016 y FOXG_02050 (interactúan entre sí)	(Gao <i>et al.</i> , 2017; López-Berges <i>et al.</i> , 2013).
<i>Tomatinasa</i> ,	Remueve un azúcar de la fracción tetrasacárida de la $\alpha$ -tomatina para inactivarla y detoxificarla.	Codificada por el gen <i>TOM1</i>	(Pareja-Jaime <i>et al.</i> , 2008; Di Pietro <i>et al.</i> , 2003).

### **1.1.4 Identificación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y discriminación de otras formas especiales**

La presencia o ausencia de los genes que codifican para las proteínas SIX y la variación en las secuencias dentro de estos genes, pueden ser utilizadas como marcadores moleculares en la identificación y diferenciación de razas y otras ff. spp (Lievens *et al.*, 2009; Van Der Does *et al.*, 2008). Los aislamientos de *Fol* raza 1, se caracterizan por la presencia de *Avr1* (*SIX4*) en su genoma. En los aislamientos de la raza 2 y la raza 3, el gen *Avr1* está ausente. Para diferenciar las razas 2 y 3, se han reportado previamente polimorfismos nucleotídicos en posiciones específicas dentro del gen *Avr2*, los cuales están presentes únicamente en la raza 3 (Biju *et al.*, 2017; Lievens *et al.*, 2009). Por lo tanto, en este trabajo que tiene entre sus objetivos, obtener un aislamiento de *Fol* altamente virulento y caracterizarlo molecularmente para realizar las inoculaciones en plantas de tomate, se utilizaron los genes *SIX1* a *SIX5*. El grado de virulencia se corroboró mediante pruebas de patogenicidad en plantas de tomate.

## **1.2 Materiales y métodos**

### **1.2.1 Colecta y aislamiento de *F. oxysporum* en cultivos de tomate**

Se realizaron colectas de plantas de tomate con síntomas de marchitez vascular en cultivos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Caldas, en 32 fincas de diferentes municipios. Cada uno de los cultivos se recorrió en su totalidad, en busca de plantas expresando síntomas de marchitez general, amarillamiento y necrosis vascular. Los detalles del muestreo se muestran en el Anexo 1. Las plantas se transportaron en neveras de poliestireno y se llevaron al laboratorio de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA. Los tejidos se desinfectaron superficialmente con el protocolo descrito en el anexo 1; se sembraron y se purificaron en medio de cultivo PDA e incubaron 25 °C ±2. Posteriormente se obtuvieron cultivos monospóricos usando la técnica de diluciones sucesivas (Anexo 1). Los aislamientos obtenidos se conservaron a largo plazo usando papel filtro (almacenados a -20 °C) y una solución de glicerol al 30% (almacenados a -80 °C). Adicionalmente, se incluyó el aislamiento Fu040 del banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y diez aislamientos provenientes del departamento de Caldas provistos por el grupo GIPPA (Grupo de Investigación de



Proyección y Producción Agropecuaria) liderado por el profesor Nelson Ceballos (Universidad de Caldas, Colombia).

### **1.2.2 Caracterización morfológica de *F. oxysporum***

Para la caracterización morfológica, los aislamientos fúngicos se sembraron en medio de cultivo Agar Hoja de Clavel (CLA) (Nelson, 1981) y se incubaron a  $25\text{ °C} \pm 2$  por cinco días para la observación de micro y macro conidias y diez días para la observación de clamidosporas. Las estructuras propagativas se observaron usando un microscopio óptico (Olympus CX31) y la longitud de las estructuras identificadas se midió por medio del software Zen 2 blue Edition<sup>®</sup> y se describieron de acuerdo con rangos específicos de tamaño para cada estructura como lo reportan Leslie y Summerell (2006). Se realizaron 25 mediciones de cada una de las tres estructuras de propagación, microconidias, macroconidias y clamidosporas presentes en cada aislamiento y se promediaron por estructura y por aislamiento.

### **1.2.3 Caracterización molecular de *F. oxysporum***

Para la extracción de ADN del hongo se tomaron 100 mg de micelio proveniente de un cultivo de 7 días en PDA, siguiendo el protocolo CTAB (Griffith y Shaw, 1998), ligeramente modificado (descrito en el Anexo 2). La cantidad y calidad de ADN fue verificada mediante un espectrofotómetro NanoDrop-ND-1000 (Thermo Scientific) y por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Las muestras de ADN se usaron para realizar una reacción en cadena de la polimerasa, PCR, usando los cebadores o primers descritos en la tabla 1-2 (Ma *et al.*, 2010; Hirano y Lievens *et al.*, 2009; Arie, 2006) amplificando regiones de diferentes genes efectores *SIX*, lo que permite discriminar entre formas especiales y razas de *F. oxysporum* (Anexo 3). Las reacciones se observaron en un gel de agarosa al 1,4%, usando un fotodocumentador de electroforesis (Biorad<sup>®</sup>).

**Tabla 1-2.** Primers usados para la identificación de aislamientos de *Fusarium oxysporum*

Nombre	Secuencia	Fuente
Uni F	ATCATCTTGTGCCAACTTCAG	Hirano y Arie, (2006)
Uni R	GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA	
P12-F2B	GTATCCCTCCGGATTTTGAGC	SIX1 (Van Der Does <i>et al.</i> , 2008)
P12-R1	AATAGAGCCTGCAAAGCATG	
SIX2-F2	CAACGCCGTTTGAATAAGCA	SIX2 (Van Der Does <i>et al.</i> , 2008)
SIX2-R2	TCTATCCGCTTTCTTCTCTC	
SIX3-F1	CCAGCCAGAAGGCCAGTTT	SIX3 (Van Der Does <i>et al.</i> , 2008)
SIX3-R2	GGCAATTAACCACTCTGCC	
SIX3-G121A-F2	ACGGGGTAACCCATATTGCA	SIX3 (Lievens <i>et al.</i> , 2009)
SIX3-G134A-F2	TTGCGTGTTCCTCCGGCCA	
SIX3-G137C-F1	GCGTGTTCCTCCGGCCGCC	
SIX4-F1	TCAGGCTTCACTTAGCATAC	SIX4 (Van Der Does <i>et al.</i> , 2008)
SIX4-R1	GCCGACCGAAAAACCCTAA	
SIX5-F1	ACACGCTCTACTACTCTTCA	SIX5 (Lievens <i>et al.</i> , 2009)
SIX5-R1	GAAAACCTCAACGCGGCAAA	

Como control positivo se usó ADN de tres aislamientos de referencia pertenecientes a cada una de las razas: *Fo*004 (raza 1); *Fo*007 (raza 2) y *Fo*3 (raza 3) proporcionados amablemente por el profesor David Jones de la escuela de Investigación en Biología en Australian National University (<http://biology.anu.edu.au/people/david-jones>).

Todos los amplicones obtenidos se secuenciaron usando la técnica Sanger en un equipo de electroforesis capilar ABI 3500 (Applied Biosystems 3500 - Hitachi®). Además, para confirmar la identidad de los aislamientos, la secuencia de los fragmentos obtenidos por PCR del gen *SIX3* se analizaron para determinar la presencia de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) específicos que permiten diferenciar entre *Fo*1 raza 2 y 3 (Lievens *et al.*, 2009) comparándolos con los ADN de referencia (Cepas FOL-MM10, 5397 e IPO3) *sequence type* (genotipos de las raza 3 que presentan diferentes SNPs) de la raza 3, proporcionados amablemente por el Dr. Martijn Rep de la Universidad de Amsterdam (<http://www.uva.nl/profiel/r/e/m.rep/m.rep.html>) y con las secuencias de *SIX3* anotadas en el Genbank.

### 1.2.4 Pruebas de patogenicidad de los aislamientos de *F. oxysporum*

Ajuste de un protocolo de patogenicidad y evaluación de la virulencia de *Fol* sobre plantas de tomate. Con el fin de llevar a cabo un bioensayo para evaluar la patogenicidad de los aislamientos de *Fol in vivo* sobre plántulas de tomate, se ajustó un protocolo a partir de diferentes modificaciones realizadas sobre las metodologías de Rongai *et al.* (2017) y van Dam *et al.* (2016). Semillas de tomate variedad Santa Cruz Kada, susceptibles a *Fol*, fueron desinfectadas superficialmente y sembradas en semilleros sobre sustrato turba estéril. Los semilleros se mantuvieron en condiciones controladas y se regaron diariamente. Quince días después de la siembra (dds), las plántulas se retiraron del sustrato y se inocularon comparando los siguientes métodos: (i) inmersión de raíz en una suspensión de  $5 \times 10^6$  con.mL<sup>-1</sup> durante 15 minutos (IR); (ii) aplicación de 40 mL de la suspensión al suelo del aislamiento más virulento de la colección (SS) (Modificado de: Jelinski *et al.*, 2017). (iii) combinación de ambos tratamientos (IR+SS), y (iv) plantas tratadas con agua estéril (testigo absoluto). El inóculo usado provino de cultivos en caja Petri crecidos en PDA suplementado con extracto de planta de tomate (6 g de tejido macerado en 1 L de cultivo).

Las plantas se trasplantaron a suelo estéril en recipientes plásticos de 16 oz de capacidad y un grupo de plantas se mantuvo en invernadero, mientras que el otro grupo se ubicó en un cuarto de crecimiento bajo condiciones controladas a una temperatura de 30/20 °C día/noche, una humedad relativa de 54% y fotoperiodo de 12 horas. Se realizó seguimiento de los síntomas para ajustar una escala de severidad modificada a partir de las escalas citadas en la tabla 1-3.

Los ensayos se establecieron en un arreglo de Bloques Completos al Azar, con dos réplicas en el tiempo (réplicas biológicas). El riego en las plantas se realizó con el método gravimétrico, manteniendo el suelo a capacidad de campo, con un porcentaje de humedad de 70% con respecto a su peso seco. La fertilización se realizó de acuerdo con las recomendaciones generadas a partir de un análisis químico de suelos (Anexo 7). Cada ensayo contó con cuatro réplicas técnicas y una unidad experimental de 5 plantas. Se evaluó incidencia entendida como el porcentaje de plantas enfermas con respecto al total de las plantas evaluadas y el porcentaje del índice de severidad de la enfermedad, de acuerdo con la siguiente ecuación (Chiang *et al.*, 2017):

$$IS(\%) = \frac{\sum(\text{frecuencia de cada nivel de enfermedad} * \text{nivel de enfermedad})}{(\# \text{ total de observaciones}) * (\text{nivel máximo de la enfermedad})} * 100$$

Además, se determinó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad, usando la siguiente ecuación:

$$ABCPE = \sum_i \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde Y es el % de la enfermedad (incidencia o severidad según sea el caso) y t el tiempo en días transcurrido (Pedroza y Samaniego, 2009).

**Tabla 1-3.** Escalas de severidad usadas para medir el avance de la enfermedad en diferentes tejidos de plantas de tomate, para el ajuste de una prueba de patogenicidad.

	Síntomas en raíz (Cakir <i>et al.</i> , 2014)	Síntomas en tallo (Akhter <i>et al.</i> , 2015)	Síntomas en parte aérea (Rongai <i>et al.</i> , 2017)
0	Planta sana	Planta sana	Planta sana
1	Pudrición suave en la raíz (< 10%)	1 – 5% necrosis vascular	Amarillamiento en las hojas basales
2	Lesiones oscuras en el 25% de las raíces	5 –15% necrosis en el tejido vascular	Amarillamiento de las hojas basales y tercio medio y marchitez en una o dos hojas
3	50% de la raíz infectada. Necrosis severa en la raíz principal	15 –35% necrosis en el tejido vascular	Amarillamiento severo en las hojas. 50% de las hojas marchitas y crecimiento inhibido.
4	75% de la raíz infectada. Lesiones en la corona y marchitez de las hojas viejas	35 – 67.5% necrosis en el tejido vascular	Síntomas generalizados, amarillamiento en toda la planta, raíz principal necrosada, necrosis vascular.
5	100% de la raíz infectada. Marchitez y muerte de las hojas basales.	67.5 – 100% necrosis en el tejido vascular	Planta muerta

Evaluación del progreso de la enfermedad marchitez vascular sobre plantas de tomate de diferentes edades. Una vez determinado un método óptimo de inoculación, se evaluaron diferentes edades de la planta en etapa de trasplante con el fin de hacer seguimiento a los síntomas asociados a la expresión de la enfermedad en cada momento de la planta. Usando el protocolo seleccionado se inocularon plántulas de 15 dds (cotiledones

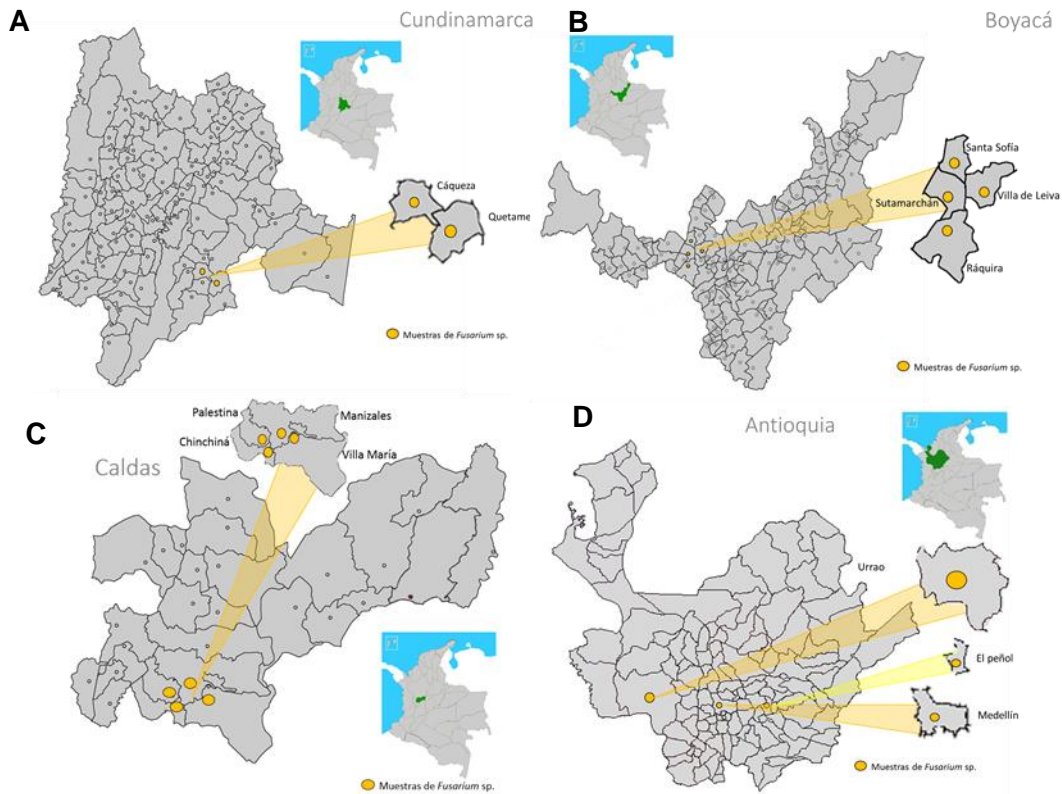
desplegados y dos hojas verdaderas emergiendo), 25 dds (dos hojas verdaderas completamente desplegadas y segundo par emergiendo) y 30 dds (cuatro hojas verdaderas desplegadas) y se evaluaron las mismas variables mencionadas en el proceso de ajuste. El protocolo y estado de desarrollo seleccionados se usaron en los ensayos posteriores para la evaluación de la enfermedad frente a los elicitores.

Análisis de datos. Los datos fueron analizados usando el paquete Statistix 8.0 para determinar la homogeneidad de varianzas de Barlett y comparación de medias de Tukey o prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con una significancia ( $\alpha$ ) de 0.05.

## 1.3 Resultados y discusión

### 1.3.1 Colecta y aislamiento de *Fusarium*

En total, se conformó una colección de 119 aislamientos de *Fusarium* a partir de los muestreos realizados en 32 fincas en 16 localidades de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Caldas, sumados a los aislamientos suministrados por parte del grupo de investigación GIPPA de la Universidad de Caldas (Figura 1-2).



**Figura 1-2.** Zonas de colecta de aislamientos de *F. oxysporum* en cultivos de tomate bajo invernadero. A) Municipios de Cáqueza y Quetame – Cundinamarca; B) Municipios de Santa Sofía, Villa de Leiva, Sutamarchán y Ráquira – Boyacá; C) Manizales, Palestina, Chinchiná, Villamaría – Caldas; D) Medellín, El peñol, Urrao – Antioquia.

Todos los aislamientos provienen de 15 cultivares diferentes de tomate, exhibiendo síntomas típicos de marchitez y amarillamiento en hojas y necrosis en el tejido vascular.



Las muestras se colectaron de cultivos en diferentes estados fenológicos: desde inicio de floración hasta final de cosecha (Figura 1-3).



**Figura 1-3.** Plantas de tomate con síntomas típicos de *Fusarium oxysporum*. A-B) amarillamiento, reducción de crecimiento y marchitez y C-F) necrosis vascular. Las flechas rojas indican los puntos sintomáticos en la planta. Fotografías tomadas por el grupo de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA.

El 16% de los aislamientos fueron obtenidos del híbrido comercial de tomate milano Nicolás, el 12,6% se obtuvo del híbrido de tomate chonto Libertador y chonto Aslam, 11,8% de chonto Roble y 10,1% provino de chonto Torrano. La mayoría de los materiales de los

cuales se aislaron los hongos, reportan resistencia a por lo menos dos de las razas patogénicas de *Fol* (Tabla 1-4).

**Tabla 1-4.** Descripción de cultivares de tomate colectados en las zonas productoras visitadas, para la obtención de aislamientos de *F. oxysporum*.

Cultivar	# Muestras	Distribuidor	Resistencia	Origen (Municipio)
Cherry Tropical	10	Nunhems	<i>Fol</i> R1 y R2	Rionegro
Chonto Aslam	15	Arroyave	<i>Fol</i> R1, R2 y R3	Villa de Leiva, El Peñol, Urrao
Chonto Bicentenario	1	Semillas Saenz	<i>Fol</i> R1 y R2	El Peñol
Chonto Calima	4	Impuslores internacionales S.A.S	<i>Fol</i> R1 y R2	Chinchiná
Chonto Ciénaga	1	Seminis	<i>Fol</i> R1 y R2	Palestina
Chonto Conquistador	2	Sakata	<i>Fol</i> R1 y R2	Santa Sofía
Chonto Gem 604	2	Agroindustrial de Semillas	<i>Fol</i> R1 y R2	El Peñol
Chonto Libertador	15	Sakata	<i>Fol</i> R1 y R2	Cáqueza, Villa de Leiva, Sutamarchán, Santa Sofía, Fómeque
Chonto Monterone	2	Agro seeds	<i>Fol</i> R2	Santa Sofía
Chonto Roble	14	Dupont	<i>Fol</i> R1, R2 y R3	Villa de Leiva, Urrao, Fómeque, Palestina, Villamaría
Chonto Santa Clara	1	Impulse semillas	No reporta	Mosquera
Chonto Torrano	12	Seminis	<i>Fol</i> R1 y R2	Urrao, El Peñol
Chonto Venanzio	5	Agro seeds	No reportado	Urrao, Manizales
Injerto Armada Carguero	2	Takii seed	<i>Fol</i> R1 y R2	Chinchiná
Milano Nicolás	19	Feltrin	<i>Fol</i> R1 y R2	Cáqueza, Quetame, Santa Sofía, Fómeque
No determinados	14			San Vicente, Guarne
<b>Total</b>	<b>119</b>			

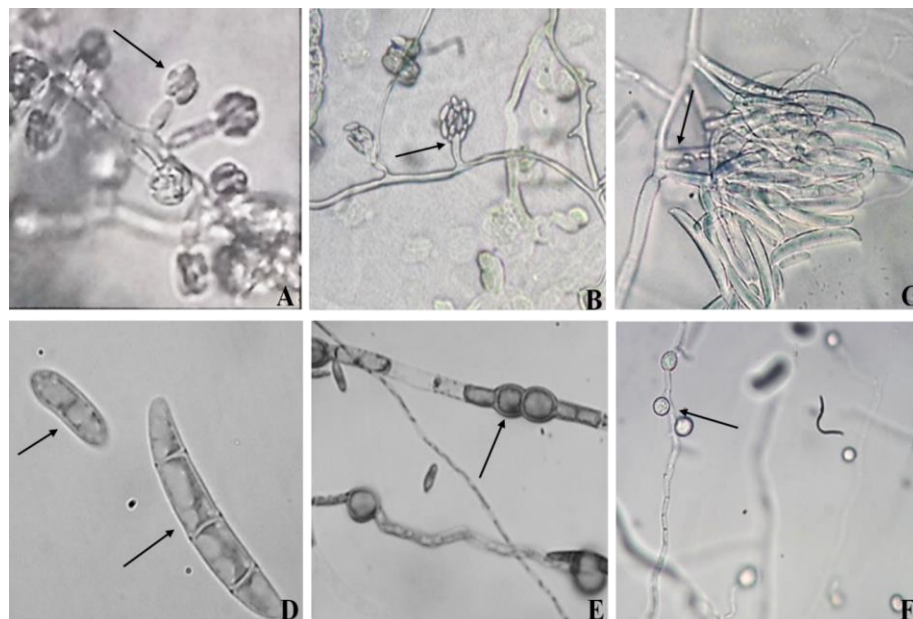
### 1.3.2 Caracterización morfológica

Los análisis morfológicos revelaron características típicas de *F. oxysporum* para todos los 119 aislamientos obtenidos; con base en la morfología de colonia a nivel macroscópico los aislamientos presentaron características altamente heterogéneas (Figura 1-5 D-F):



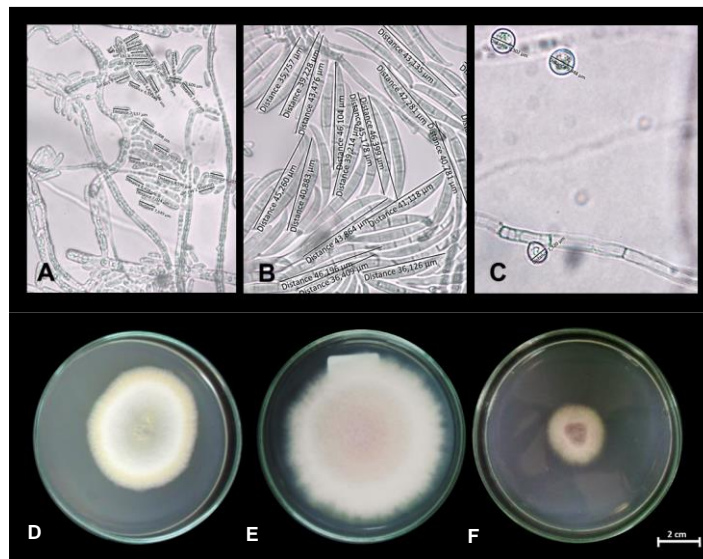
coloraciones en PDA que variaron entre rosa claro y violeta oscuro, y formación densa o dispersa de micelio, hecho que es común encontrar en aislamientos de poblaciones naturales de *F. oxysporum* (Manikandan *et al.*, 2018; Nirmaladevi *et al.*, 2016). Algunos de ellos presentaron crecimiento pionotal, lo que se considera una degeneración del cultivo, con coloraciones crema-amarillentas, apariencia cremosa y baja producción de micelio aéreo. Leslie y Summerell (2006) reportan que este crecimiento puede ocasionarse por los pases sucesivos realizados en el proceso de purificación usando medios de cultivo ricos en carbohidratos como el PDA, aunque los mecanismos que regulan estos cambios aún no se encuentran bien dilucidados. Al observar las estructuras en el microscopio óptico específicamente de estos aislamientos, se encontró una alta producción de macroconidias lo que es propio de este tipo de colonias como lo describieron Nelson *et al.*, (1983).

Cuando los aislamientos se crecieron en medio de cultivo CLA, a nivel microscópico se observaron las estructuras de propagación con características claves como microconidias agrupadas en falsas cabezas, que se forman sobre monofiálides cortas; macroconidias formadas sobre esporodoquios con conidióforos simples y cortos; y clamidosporas simples o en pares, formadas en hifas de forma intercalar o terminal (Figura 1-4).



**Figura 1-4.** Estructuras propagativas de *FoI* producidas en medio de cultivo CLA observadas por microscopía óptica. A-B) grupos de falsas cabezas (10X); C-D) macroconidias (10x y 100X respectivamente); E y F) clamidosporas (40X Y 10X respectivamente). Fotografías tomadas por el grupo de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA.

Los tamaños de microconidias variaron entre 6.14 – 9.75  $\mu\text{m}$ , las macroconidias midieron entre 18.7 – 48.9  $\mu\text{m}$  y las clamidosporas presentaron un diámetro de 7.5 – 8.4  $\mu\text{m}$  (Figura 1-5 A-C).



**Figura 1-5.** Análisis morfológico de *F. oxysporum*. A) Tamaño de las microconidias; B) macroconidias y C) clamidosporas, usando el software Zen blue (Zeiss®). Morfología de colonia de aislamientos de *F. oxysporum* a los 7 dds en cultivo PDA a 25 °C  $\pm$ 2: D) cultivo pionotal; E) cultivo con alta velocidad de crecimiento, abundante micelio y coloración rosa; F) colonia con micelio disperso, color púrpura oscuro y lenta velocidad de crecimiento.

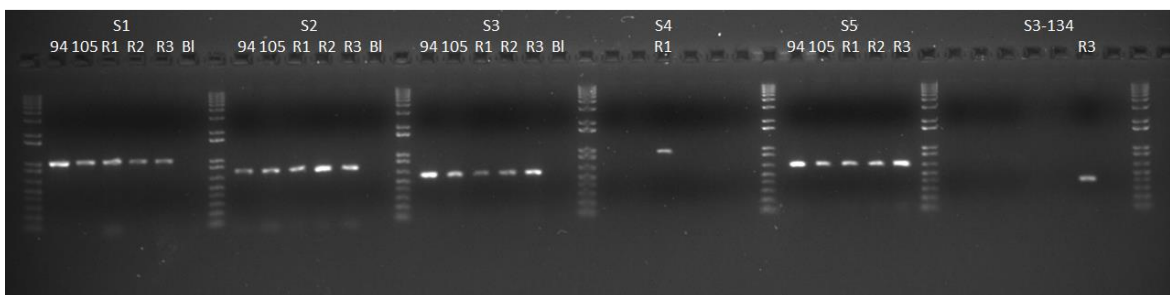
Estas claves son determinantes para la diferenciación morfológica de *F. oxysporum* de otras especies de *Fusarium*, según los manuales (Manikandan *et al.*, 2018; Nelson *et al.*, 1983; Leslie y Summerell, 2006). Con esto se puede confirmar que los aislamientos de *Fusarium* obtenidos durante las colectas corresponden por sus características morfológicas a *F. oxysporum*.

### 1.3.3 Identificación de formas especiales de *F. oxysporum* y razas de *Fol*

De los 119 aislamientos, 104 amplificaron un fragmento entre 670 a 672 pares de bases (pb) de una región del gen *pg1* de *F. oxysporum* que codifica la *endo*-poligalacturonasa *pg1* (Hirano y Arie, 2006), lo cual confirma a nivel molecular, que los aislamientos colectados se encuentran dentro de la especie *F. oxysporum* y que no corresponden a otras especies como *F. solani*.

Después de haber optimizado un protocolo de PCR para amplificar cada uno de los genes *SIX* usando los ADNs de referencia mencionados en el numeral 1.2.3., se realizó la amplificación por PCR del fragmento del gen *SIX1* sobre los 104 aislamientos que amplificaron anteriormente. El gen *SIX1* codifica la proteína Avr3 que está presente en todos los aislamientos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (van der Does y Rep, 2007).

Únicamente dos aislamientos (*Fo159* aislado por AGROSAVIA y *UDCFOL10* suministrado por el grupo GIPPA), amplificaron el fragmento de 992 pb correspondiente a *SIX1* (Anexos 4 y 5), por lo cual los siguientes análisis por PCR con los genes *SIX2*, *SIX3*, *SIX4* y *SIX5*, fueron realizados sobre estos dos aislamientos ya que estos genes permiten diferenciar a *FoI* de otras formas especiales (Figura 1-6). Ninguno de los dos aislamientos (*Fo159* y *UDCFOL10*) amplificó el marcador *SIX4* (967 pb), cuya presencia permite identificar aislamientos de la raza 1. Los demás genes probados amplificaron bandas en los tamaños esperados *SIX2* (749 pb), *SIX3* (608 pb), *SIX5* (667 pb); lo cual indica claramente que los aislamientos colombianos aislados en este estudio no corresponden a *FoI* raza 1, sino que pertenecen a la raza 2 o raza 3, ya que la ausencia de *SIX4* es el mecanismo por el cual surgió la raza 2 a través de la evasión del reconocimiento de Avr1 por parte del receptor I, presente en los cultivares resistentes (Kashiwa *et al.*, 2016; Inami *et al.*, 2012; Houterman *et al.*, 2008).



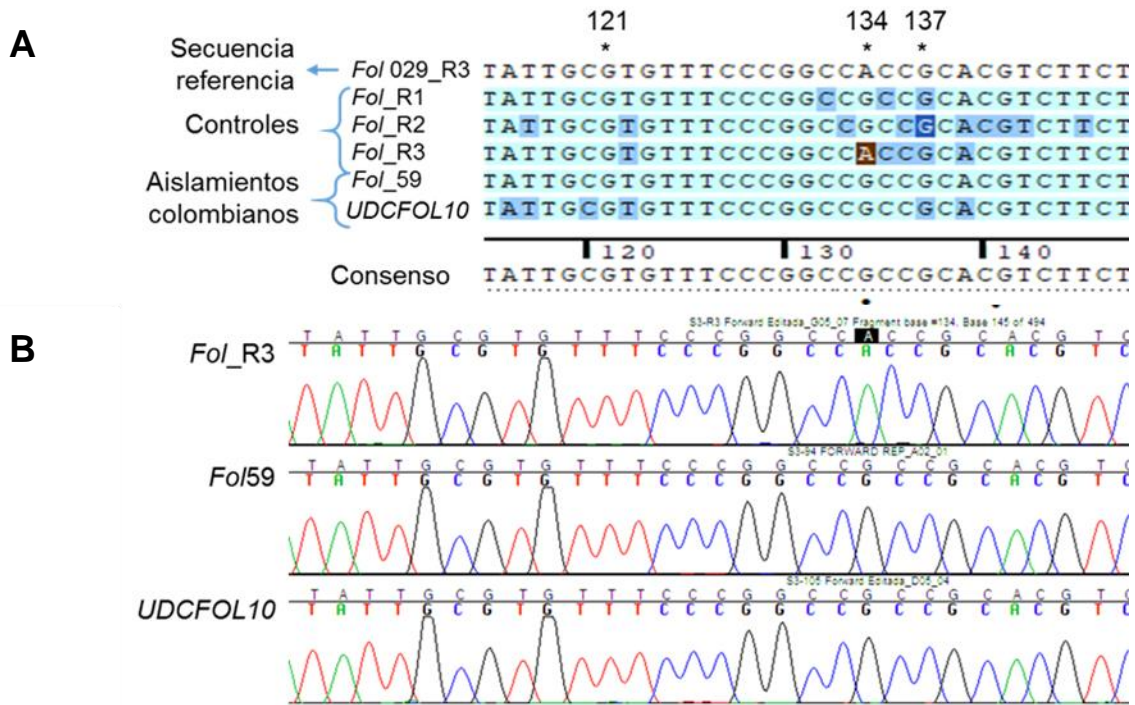
Código en gel	Nombre aislamiento	Gen amplificado	Tamaño del amplicón
94	<i>Fo159</i>	S1 ( <i>SIX1</i> )	992 pb
105	<i>UDCFOL10</i>	S2 ( <i>SIX2</i> )	749 pb
R1	<i>Fo1004</i> (raza1)	S3 ( <i>SIX3</i> )	608 pb
R2	<i>Fo1007</i> (raza 2)	S4 ( <i>SIX4</i> )	967 pb
R3	<i>Fo1003</i> (raza 3)	S5 ( <i>SIX5</i> )	667 pb
B	Blanco	S3-134 ( <i>SIX3-134</i> )	414 pb

**Figura 1-6.** Electroforesis en gel de agarosa con bandas del tamaño esperado, a partir de la amplificación de cada uno de los marcadores de virulencia *SIX* que permiten la identificación de *FoI* y la identificación de razas.

La ausencia de la raza 1 en los aislamientos obtenidos, es consistente con el uso de cultivares resistentes a esta raza en los cultivos de tomate de las zonas productoras colombianas. Además en México y Brasil, también se caracterizaron aislamientos de campo mediante evaluaciones con cultivares diferencialmente resistentes, encontrando a *Fol* raza 3 infectando cultivos comerciales (Reis *et al.*, 2005; Carrillo-Fasio *et al.*, 2003;). Por su parte en Chile, usando marcadores moleculares para la diferenciación de razas, se encontraron también aislamientos de *Fol* raza 3, afectando cultivares con resistencia a raza 1 y 2 (Sepúlveda-Chavera *et al.*, 2014), hecho que puede estar relacionado con la presión sometida sobre el patógeno a través del uso recurrente de materiales resistentes.

Adicionalmente, el gen *SIX3* en la raza 3 de *Fol* presenta SNPs en comparación con el gen *SIX3* en los aislamientos de la raza 2. Estos SNPs están probablemente relacionados con la evasión del reconocimiento por los genes de resistencia *I-2* en las plantas de tomate (Houterman *et al.*, 2009). Se han descrito tres tipos de secuencias pertenecientes a la raza 3, cada una con una única mutación nucleotídica (Lievens *et al.*, 2009). Para continuar con la identificación de los aislamientos *UDCFOL10* y *Fol59*, se usaron cebadores (*SIX3-G121A-F2*; *SIX3-G134A-F2*; *SIX3-G137C-F1*) que permiten amplificar específicamente estas regiones (Tabla 1-2). Como resultado, ninguno de los aislamientos amplificó para el gen *SIX3* que posee los polimorfismos que permiten identificar la raza 3 de *Fol*, indicando que ninguno de los aislamientos pertenece a la raza 3 o a las poblaciones con los tipos de secuencias descritos (Jelinski *et al.*, 2017; Kashiwa *et al.*, 2016).

Las secuencias del gen *SIX3* en los aislamientos *UDCFOL10* y *Fol59*, alinearon con una identidad de 100 y 99% y una cobertura del 99 y 100% respectivamente, con el gen *SIX3* del aislamiento *Fol4287* (Genoma de referencia raza 2), que se encuentra anotado en el Genbank (accesión # XM\_018396424.1) sin ningún cambio nucleotídico (Figura 1-7), confirmando que los dos aislamientos *UDCFOL10* y *Fol59* corresponden a *Fol* raza 2 (Anexo 6).



**Figura 1-7.** Determinación de razas en aislamientos colombianos patogénicos de *Fol*. A) alineamiento de secuencias de los aislamientos colombianos con aislamientos de referencia de las tres razas; B) Cromatogramas de las secuencias de los aislamientos colombianos *Fol59* y *UDCFOL10*.

Por otro lado, el hallazgo del predominio de aislamientos no patogénicos en las poblaciones obtenidas (117 no patogénicos de un total de 119), puede estar explicado por una eficiencia similar de colonización entre los aislamientos patogénicos y los no patogénicos (Nirmaladevi *et al.*, 2016); por lo que, teniendo en cuenta que el crecimiento de los aislamientos patogénicos y los no patogénicos es igualmente estimulado por los exudados radicales de la planta de tomate (Steinberg *et al.*, 1999), se asume que las poblaciones saprófitas de *F. oxysporum* en los suelos cultivados, son fuertes competidores por el espacio de colonización radical y disponibilidad de nutrientes (Olivain y Alabouvette, 1999). En el manual de laboratorio de *Fusarium*, Leslie y Summerell (2006) indican que existe una alta probabilidad de aislar varias especies de *Fusarium* endófitos de una sola muestra, principalmente saprófitos; y que este problema es particularmente severo en suelos de cultivos intensivos, tal y como es el caso de los cultivos de tomate de las regiones visitadas.

En el presente trabajo se evaluaron 8 aislamientos presumiblemente no patogénicos sobre plantas de tomate, sin que estos expresaran síntomas de la enfermedad en ninguno de los

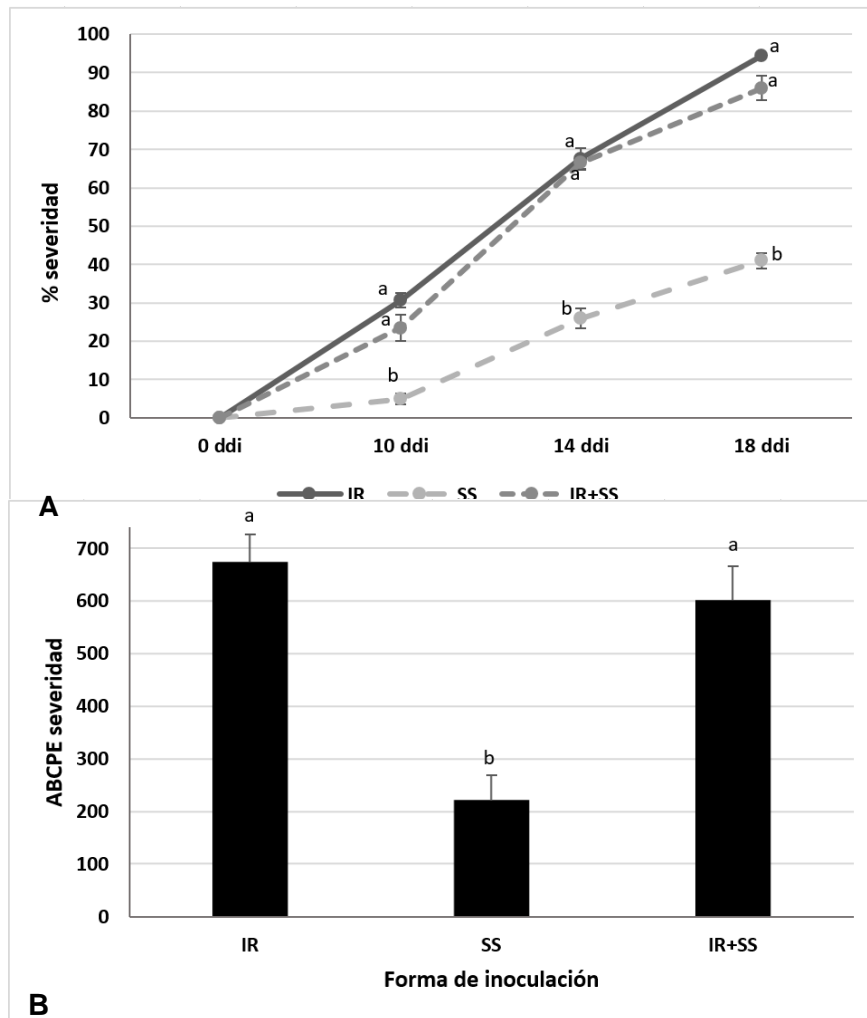
casos. Dado que la proporción de la región colonizada por uno u otro tipo de *Fusarium* depende de la densidad del inóculo presente en el suelo (Olivain *et al.*, 2006) y de acuerdo con la abundancia de aislamientos no patogénicos encontrados en los tejidos de las plantas de tomate, se puede deducir que a pesar de la presencia de *Fol* altamente virulentos en los suelos cultivados de las regiones descritas, predominan las poblaciones de *F. oxysporum* no patogénicas.

### **1.3.4 Pruebas de patogenicidad de aislamientos de *Fol***

Con el fin de determinar la patogenicidad de los aislamientos que presentan los genes *SIX1*, *SIX2*, *SIX3* y *SIX5*, en plantas de tomate, se realizaron pruebas de inoculación sobre plántulas en condiciones controladas. Van Der Does *et al.*, (2008) sugieren la existencia de una correlación directa entre la presencia de los genes *SIX* y la patogenicidad de los aislamientos de *Fol* que los poseen; por lo tanto, con los resultados de la identificación molecular, los dos aislamientos (*UDCFOL10* y *Fol59*) se seleccionaron para realizar las pruebas de patogenicidad.

Al evaluar tres diferentes métodos de inoculación en plantas de tomate: inmersión de raíz (IR); aplicación en suspensión al suelo (SS) y combinación de ambos tratamientos (IR+SS); los tratamientos IR e IR+SS, comenzaron a diferenciarse del tratamiento SS desde los 10 días después de inoculación (ddi) alcanzando 30 y 23% de severidad respectivamente, continuando con esta tendencia hasta el final del ensayo. Después de 30 días de inoculación se alcanzó hasta un 100% de incidencia (Anexo 8) y un 94.5% de severidad, sin presentar diferencias estadísticas entre los tratamientos en la variable incidencia, pero sí en la severidad. Sin embargo, en la inoculación usando únicamente suspensión al suelo (SS) el progreso de la enfermedad (ABCPE) de la incidencia y la severidad fueron significativamente menores (Figura 1-8).





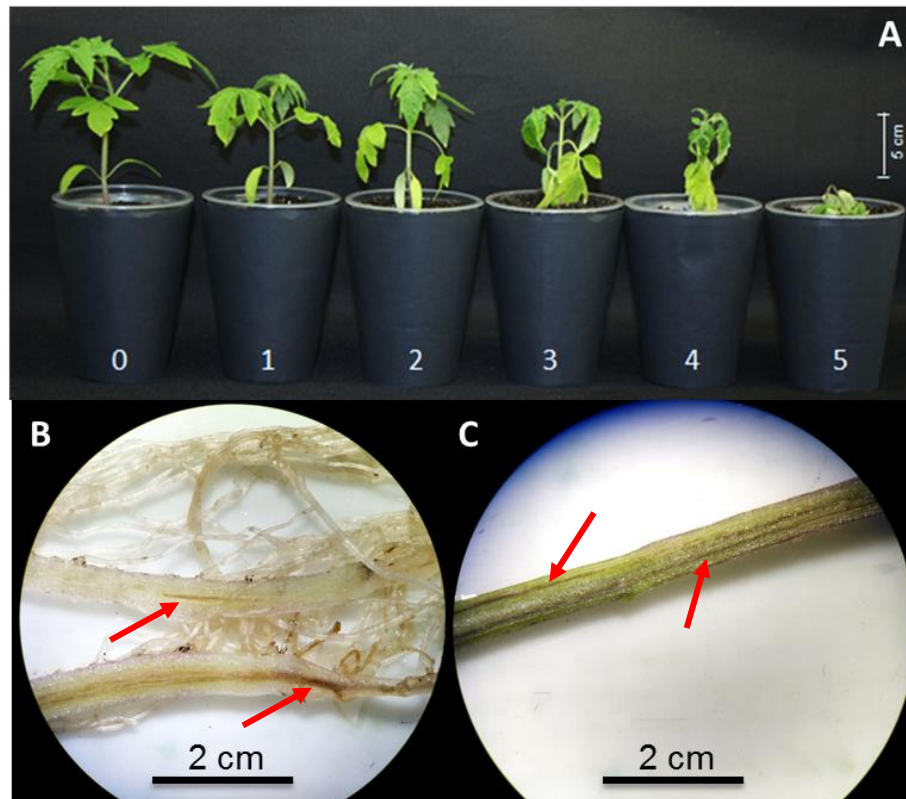
**Figura 1-8.** A) Porcentaje de severidad de síntomas de la marchitez vascular a través del tiempo ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0000$   $gl=23$ ;  $F=21.8$ ). B) Área bajo la curva del progreso de la enfermedad a los 18 ddi ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0000$   $gl=23$ ;  $F=27$ ) en los diferentes tratamientos: Inmersión de raíz (IR), Inmersión de raíz + suspensión al suelo (IR+SS), suspensión al suelo (SS). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas ( $n=40$ ).

El uso del método de inoculación por inmersión de raíz demostró ser más eficiente que el de suspensión al suelo. Esto probablemente porque se garantiza el establecimiento del inóculo en la zona rizosférica de la planta de tomate, ya que un mayor porcentaje de conidios podrían germinar y aumentar la probabilidad de hacer contacto más rápidamente con el tejido vegetal a través de sus hifas (Lagopodi *et al.*, 2002). A su vez, el protocolo en suspensión al suelo puede ser menos consistente, ya que en trabajos como los de Olivain *et al.*, (2006) y Steinberg *et al.*, (1999) demostraron que se requiere cercanía de la estructura infectiva con el tejido rizosférico, ya que no se presenta un tropismo o

crecimiento quimiotáctico de los tubos germinativos del hongo hacia la superficie de la raíz de la planta, por lo que la dirección de crecimiento de las hifas, en el suelo puede ser aleatorio.

En los ensayos de inoculación, las plantas infectadas comenzaron a exhibir síntomas de amarillamiento y marchitez iniciando en los cotiledones, con un período de incubación de 6 ddi *Fo/59* y de 10 ddi para el aislamiento *UDCFOL10*. Con el paso de los días los síntomas de amarillamiento y marchitez avanzaron hacia las hojas del tercio inferior y posteriormente hacia los tercios medio y superior, ocasionando una marchitez general a los 14 (*Fo/59*) y 21 ddi (*UDCFOL10*) respectivamente, causando finalmente la muerte de las plántulas (Figura 1-9A). Al realizar cortes longitudinales en el tallo de la planta, se evidenció la necrosis ocasionada en los haces vasculares como indicador del ascenso del patógeno por el xilema (Figura 1-9B). Con la finalidad de verificar la concordancia de los resultados del protocolo seleccionado se realizó re-aislamiento del patógeno a partir de las plantas infectadas, usando el protocolo descrito en el Anexo 1. El hongo obtenido (reactivado) de dichos re-aislamientos, se usó para los subsiguientes ensayos de infección, comprobando así los postulados de Koch; además se confirmó su identidad mediante PCR (descrita en el numeral 1.3.3) (Madigan *et al.*, 2009). En adelante, se seleccionó el aislamiento *Fo/59* para la continuidad de las evaluaciones.

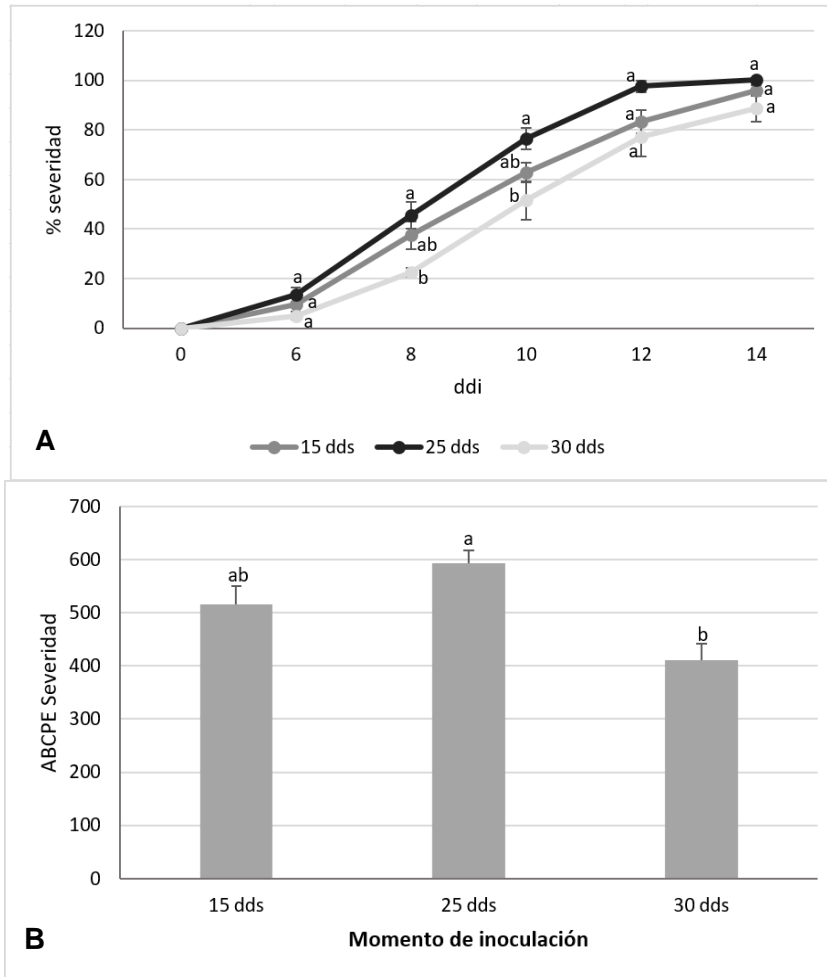




**Figura 1-9.** Síntomas de marchitez vascular expresados en plántulas de tomate. A) Escala visual de severidad con niveles de enfermedad de 1 a 5 (Descrita en Tabla 1-3) ajustada a partir de Rongai *et al.*, (2017); B) Síntoma de necrosis vascular visualizado por corte longitudinal en raíz; C) Síntoma de necrosis vascular visualizado por corte longitudinal del tallo (observado en estereoscopio a 10 aumentos).

Es importante anotar que, durante el desarrollo de las pruebas de patogenicidad, se detectó que uno de los componentes determinantes para lograr una infección exitosa de *Fol* en plantas de tomate, es la temperatura empleada en las etapas iniciales de la infección (colonización y penetración). Esto concuerda con las investigaciones realizadas en tomate, en donde se ha reportado que la temperatura óptima en suelo para el desarrollo de la marchitez causada por *Fol* es de 28 °C, tolerando un máximo de 33 °C y mínimo 20 °C y que la expresión de los síntomas se ve severamente afectada por la temperatura (Boix-Ruíz *et al.*, 2015; Abbashar, 2003; Clayton, 1923). En este trabajo, al realizar los ensayos en condiciones de invernadero en la sabana de Bogotá, con una temperatura ambiental promedio de 17 °C y del suelo de 15 °C, pero con alta variación entre temperatura diurna y nocturna, no se obtuvo expresión de síntomas de la enfermedad en plantas de tomate (datos no mostrados); mientras que, en condiciones controladas y manteniendo una temperatura promedio de 28 °C durante al menos los primeros 6 ddi, la enfermedad se expresó satisfactoriamente.

El aislamiento *Fo/59* mostró la capacidad de causar enfermedad en plantas de 15, 25 y 30 dds, presentando incidencias de 100, 100 y 95%, respectivamente, a los 14 ddi (Anexo 8) y alcanzando una severidad de hasta 100% en plantas de 25 días (Figura 1-10). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados en la variable porcentaje de severidad, sin embargo, el progreso de la enfermedad (ABCPE) fue menor y puede diferenciarse mejor sobre plantas de 30 días de edad (Figura 1-10).



**Figura 1-10.** Progreso de la severidad de la marchitez vascular en plantas de tomate inoculadas a diferentes edades A) Porcentaje de severidad a través del tiempo ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0143$   $gl=23$ ;  $F=5.23$ ). B) Área bajo la curva del progreso de la enfermedad de la severidad en plantas inoculadas a diferentes edades, 14 ddi ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0023$ ;  $gl=23$ ;  $F=8.24$ ). Las barras representan el error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas ( $n=40$ ).

Con estos resultados, se decidió emplear el aislamiento *Fo/59* sobre plantas de 30 días de edad para realizar las siguientes evaluaciones.

## 1.4 Conclusiones

- Se identificó y se caracterizó por primera vez para Colombia, un aislamiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 2 en cultivos comerciales de tomate.
- Se confirmó que para aislamientos colombianos de *Fol* existe una relación directa entre la presencia de los genes *SIX* y su patogenicidad.
- Se demostró mayor eficiencia y rapidez en el proceso de infección con *Fol* usando el método de inmersión de raíz en plantas de tomate, en comparación con otros métodos evaluados.

## 1.5 Recomendaciones

- Realizar más colectas de material infectado con *Fol* para confirmar el tipo de raza predominante en Colombia. Se sugiere una mayor presencia de *Fol* raza 2, lo cual es de gran interés ya que esta raza es menos patogénica que *Fol* raza 3.
- Realizar pruebas de patogenicidad de los aislamientos patogénicos, sobre los materiales más usados en las zonas productoras que en su mayoría reportan tener resistencia a las razas 1 y 2 de *Fol*, con el fin de determinar su resistencia contra las cepas caracterizadas.
- Replantear las estrategias de manejo de la marchitez vascular, teniendo en cuenta que en la actualidad la principal estrategia es el uso de materiales resistentes desarrollados en otros países. Los bancos de germoplasma de especies silvestres en Colombia son una fuente promisoría para buscar genes de resistencia estables contra los aislamientos colombianos de *Fol*, para el desarrollo de programas de mejoramiento.

## 2. Evaluación de la capacidad de reducción de la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* en tomate por parte de *Trichoderma* spp. y quitosán

### Resumen

El manejo de enfermedades como la marchitez vascular por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) en cultivos de Colombia, se basa casi exclusivamente en el uso de plaguicidas químicos, representando riesgos para la salud humana y el ambiente. Algunas prácticas alternativas como el control biológico y el uso de elicitores son promisorias para solventar estos riesgos. *Trichoderma* spp., tiene un gran potencial como biocontrolador por estar asociado a mecanismos como micoparasitismo, antibiosis, competencia por nutrientes, promoción de crecimiento e inducción de resistencia. Así mismo, el biopolímero quitosán es una sustancia biodegradable, no tóxica, con capacidad antifúngica y activador de defensa de la planta frente a patógenos. Para determinar la capacidad de reducción de la marchitez vascular, se evaluaron *in vitro* e *in planta* 16 aislamientos de *Trichoderma* spp., y tres moléculas de quitosán (bajo, medio y alto peso molecular) a diferentes concentraciones (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 mg.mL<sup>-1</sup>). Todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. y el quitosán en concentraciones mayores a 1 mg.mL<sup>-1</sup> inhibieron el crecimiento de *Fol*, alcanzando un 56% y 95.8% de inhibición con *T. koningiopsis* y quitosán de alto peso molecular (3 mg.mL<sup>-1</sup>), respectivamente. En plantas, las cepas de *Trichoderma* spp., redujeron entre 21% y 37% la incidencia de la enfermedad, aunque los resultados fueron altamente variables, por lo cual no son concluyentes. Sin embargo, el quitosán (bajo peso molecular 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>) redujo en 70% la incidencia y en 91% la severidad de la enfermedad. Los resultados comprueban los mecanismos directos de control de patógenos *in vitro* de *Trichoderma* spp., y quitosán; y demuestran que el quitosán de bajo peso molecular (2.5 mg.mL<sup>-1</sup>) aplicado en plantas, es un aditivo altamente eficaz contra *Fol*, representando una alternativa viable para el manejo de la marchitez vascular.

**Palabras claves:** control biológico, antagonismo, elicitores químicos.

## 2.1 Estado del arte

### 2.1.1 Disminución en el uso de plaguicidas químicos: una alternativa necesaria

Una de las principales preocupaciones en los diferentes sistemas productivos agrícolas, es el manejo fitosanitario. Por muchos años, el uso de plaguicidas de síntesis química ha representado una solución al manejo de plagas y enfermedades a medida que las áreas de cultivo en el mundo se han expandido, trayendo beneficios a los cultivadores tales como el incremento en la producción de los cultivos, fácil aplicación, reducción en el costo de mano de obra, amplio espectro, entre otros (Lamichhane *et al.*, 2016). Sin embargo, cada día son más evidentes las desventajas del uso continuo, excesivo y persistente de este tipo de sustancias, ya que se ha comprobado la afectación a largo plazo sobre la salud humana, la contaminación de los recursos no renovables como el agua y el suelo y la pérdida de efectividad por el desarrollo de resistencia de los patógenos (Curutiu *et al.*, 2017; Bass *et al.*, 2015; Sarwar, 2015; USDA, 2014), por lo que se hace necesario involucrar diferentes enfoques en el manejo integrado de los cultivos.

Múltiples esfuerzos se vienen realizando en el mundo, para diversificar las alternativas de manejo de plagas y enfermedades. Una de las más ampliamente usadas es el control biológico: el uso de agentes biológicos (hongos y bacterias) controladores que, mediante varios mecanismos, funcionan como antagonistas frente a agentes patógenos para el cultivo.

### 2.1.2 Uso de *Trichoderma* spp. como biocontrolador de enfermedades del suelo

Los hongos del género *Trichoderma* pertenecen a la división Ascomycota y al orden Hypocreales. Están abundantemente distribuidos en el mundo subsistiendo principalmente en el suelo como saprófitos sobre residuos orgánicos y son frecuentemente hallados en la región rizosférica de las plantas (Choudhary y Varma, 2016). Predominan en su mayoría en estado asexual, aunque para algunas de sus especies se conoce su estado teleomorfo, entre las que se encuentra *Hypocrea* sp., que en conjunto completan 153 especies de *Trichoderma/Hypocrea* (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009; Druzhinina y Kopchinskiy, 2008).

Dado que el control biológico es una de las alternativas de mayor uso en la agricultura para disminuir el consumo de plaguicidas químicos, *Trichoderma* se ha convertido en uno de los biocontroladores más usados y estudiados debido a su abundancia, amplia distribución, adaptabilidad y por sus diversos mecanismos de acción (Brotman *et al.*, 2010). Adicionalmente, existe suficiente evidencia que prueba que varias especies del género *Trichoderma*, tienen la capacidad de reducir la expresión de enfermedades del suelo en plantas (Yendyo *et al.*, 2017; El-Mohamedy *et al.*, 2014; Woo *et al.*, 2014; Sundaramoorthy y Balabaskar, 2013; Cotxarrera *et al.*, 2002) empleando diferentes mecanismos, tales como micoparasitismo, antibiosis, competición por nutrientes, competición por la colonización de las raíces, promoción de crecimiento e inducción de defensa en la planta (Choudhary y Varma, 2016). Sin embargo, los mecanismos moleculares de la interacción hongo-planta-patógeno no han sido completamente dilucidados y se encuentran bajo constante estudio. Algunos de los mecanismos de biocontrol descritos son:

*Micoparasitismo.* El primer proceso involucrado es el reconocimiento del hongo hospedero por parte del hongo que se da por medio de receptores transmembranales (Gpr1) acoplados a proteínas G, los cuales desencadenan la señalización mediante cascadas de fosforilación (MAPK) que terminan en la activación de factores de transcripción (Vel1, Lae1, ThCtf1, Xyr1, etc) relacionados con cambios morfológicos como la formación de estructuras de infección y estimulando la producción de enzimas líticas como quitinasas, glucanasas, proteasas, oxidasas, etc., para la degradación de la pared celular fúngica. El último paso del proceso de micoparasitismo es la penetración de la hifa en el hospedero, favorecida por la actividad enzimática (Choudhary y Varma, 2016; Daguerre *et al.*, 2014).

*Antibiosis.* La mayoría de las especies del género *Trichoderma* tienen la capacidad de producir metabolitos volátiles y no volátiles, por lo que puede o no ser necesario el contacto directo con las hifas del hongo hospedero (Papavizas, 1985). Algunos de los metabolitos secundarios mejor caracterizados en *Trichoderma* spp., son los poliketidos, terpenoides, pironas, isocianometabolitos, diketopiperazinas y peptaiboles (Benítez *et al.*, 2004), que pueden afectar propiedades en el hongo hospedero como la permeabilidad de membranas, actividad enzimática, producción de metabolitos primarios, entre otros. Además, todos estos componentes actúan de forma sinérgica con las enzimas degradadoras de pared celular, incrementando la actividad inhibidora contra varios agentes patógenos (Choudhary y Varma, 2016; Howell, 2003).

Competencia por nutrientes. La competencia por nutrientes regula las dinámicas poblacionales de los microorganismos en el suelo, donde la disponibilidad de nutrientes puede ser limitada cuando hay varias poblaciones con similares requerimientos fisiológicos (de Boer *et al.*, 2003). *Trichoderma* spp., es un hongo de rápido crecimiento y colonización sobre las plantas hospederas; además tiene una mayor capacidad de tomar y movilizar nutrientes del suelo, basado en su capacidad de producir sideróforos (quelantes de hierro) y metabolizar y obtener ATP a partir de diferentes azúcares como celulosa, glucano, quitina, y otros. Para *F. oxysporum*, algunos de los nutrientes limitantes son el carbono y el hierro, por lo que *Trichoderma* spp., restringe la disponibilidad de nutrientes, interfiriendo en el crecimiento y colonización del patógeno en la rizósfera de la planta (Li *et al.*, 2015; Alabouvette *et al.*, 2009; Chet *et al.*, 1997).

Promoción de crecimiento. *Trichoderma* es un simbiote oportunista, que establece una relación con la planta, en la que la producción de algunos metabolitos como el ácido harziánico, koningina, entre otros, pueden afectar el crecimiento de la planta de diferentes maneras, pero principalmente incrementando la toma de nutrientes, la eficiencia en el uso de nitrógeno y la solubilización de nutrientes del suelo (Singh *et al.*, 2018; Harman *et al.*, 2004).

Inducción de resistencia. Además de los mecanismos descritos, varias especies del género *Trichoderma* han sido usadas en diferentes patosistemas como inductores de resistencia (Fontenelle *et al.*, 2011; Moreno *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2005); y se ha comprobado que la respuesta de resistencia inducida (*Induced Systemic Resistance* - ISR) se relaciona con su capacidad de liberar moléculas que funcionan como PAMPs. Algunas de esas moléculas son las hidrofobinas (Sm1/Ep1), las xilanasas inductoras de ET, celulasas que inducen AS y ET (Xyn2/Eix), alamectina que induce AS y AJ, (Van Wees *et al.*, 2008; Djonović *et al.*, 2006); y otras respuestas como acumulación de fenoles, y activación de las enzimas peroxidasa (POX), polifenol oxidasa (PPO) y fenil alanina amonio liasa (PAL), involucradas en el metabolismo de fenilpropanoides y de proteínas PR ( $\beta$ -1,3-glucanase) que reducen el desarrollo de enfermedades en las plantas (Konappa *et al.*, 2018; Martínez-Medina *et al.*, 2013).

Las plantas reaccionan rápidamente ante la invasión de *Trichoderma*, a través del flujo rápido de iones, cascadas oxidativas y deposiciones de calosa, seguidas por la síntesis de polifenoles (Choudhary y Varma, 2016). Esta respuesta se asocia generalmente como ISR



mediada por AJ/ET, aunque se ha encontrado que en altas concentraciones de *Trichoderma*, se desencadena una respuesta mediada por AS, característica de la respuesta ante patógenos biótrofos (Contreras-Cornejo *et al.*, 2014).

En el banco de germoplasma de microorganismos de la nación con interés en control biológico, que se encuentra bajo la custodia de AGROSAVIA, existe una colección de aislamientos de *Trichoderma* spp., que han sido caracterizados previamente por su capacidad de reducción de enfermedades *in vitro* e *in vivo*, promoción de crecimiento e inducción de resistencia sistémica en plantas cultivadas como lechuga, arroz, tomate, brócoli, entre otros (Cotes *et al.*, 2018; Simbaqueba, 2015; Moreno *et al.*, 2009). Algunas de las cepas incluso presentan desarrollos tecnológicos avanzados como preformulaciones. Actualmente, se tiene desarrollado un bioproducto denominado Tricotec<sup>®</sup> formulado a partir del aislamiento Th003, que ya se encuentra registrado para diferentes cultivos. Tricotec<sup>®</sup> o su ingrediente activo, ha demostrado ser efectivo en reducir el complejo de la muerte descendente (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phyitium*) en tomate en estado de semillero, el moho blanco de la lechuga (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*), el camanduleo de la papa (*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*), tizón de la vaina del arroz (*R. solani*), la hernia de las crucíferas en repollo (*Plasmodiophora brassicae*), el moho gris (*Botrytis cinerea*), mildew polvoso (*Peronospora* sp.) y antracnosis en mora (*Colletotrichum* sp.), lo que demuestra un gran potencial de uso para el manejo alternativo de enfermedades en los cultivos ( Hincapié *et al.*, 2017; Mesa, 2016; Mesa *et al.*, 2014; Moreno *et al.*, 2010).

### 2.1.3 Quitosán como alternativa de uso en la agricultura

El quitosán es un biopolímero que ha tomado fuerza en las últimas décadas para uso medicinal, ambiental, nutracéutico, cosmético, industrial y para la agricultura por sus características físicas y químicas (Sharif *et al.*, 2018; Ahmad *et al.*, 2017; Ali Khan *et al.*, 2016; Zou *et al.*, 2016).

El quitosán es un producto derivado de la degradación de la quitina, que puede ser extraído por procesos de hidrólisis ácida, métodos enzimáticos, degradación ultrasónica o degradación oxidativa; los cuales ocasionan el rompimiento de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 de la N-acetylglucosamina (Saharan y Pal, 2016).

Fuentes de quitosán. La fuente más común para la extracción del quitosán son los residuos de la industria pesquera, como exoesqueletos de camarón, cangrejo, calamar y langosta (Kaur y Dhillon, 2013). Sin embargo, siendo un derivado de un componente esencial de estructuras de crustáceos, insectos y hongos (quitina), existen muchas fuentes para obtener este biopolímero. En la tabla 2-1 se describen diferentes organismos que han sido usados para su extracción, lo que resalta el potencial de los residuos industriales para su obtención.

**Tabla 2-1.** Fuentes para la extracción de quitina y quitosán a partir de diferentes organismos. Modificado de: Sharif *et al.*, (2018) y García *et al.*, (2016)

Fuentes acuáticas	Fuentes terrestres	Microorganismos
<b>Crustáceos:</b>	<b>Artrópodos</b>	<b>Hongos (Clase)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cangrejo</li> <li>○ Langosta</li> <li>○ Camarón</li> <li>○ Kril</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Arañas</li> <li>○ Escorpiones</li> <li>○ Escarabajo</li> <li>○ Cucarachas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ascomicetes</li> <li>○ Blastomicetes</li> <li>○ Citridiomycetes</li> </ul>
<b>Moluscos</b>	<b>Braquiópodos</b>	<b>Protistas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Calamar</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Algas pardas</li> </ul>
<b>Celentéreos</b>		<b>Planta</b>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Algas verdes</li> </ul>
<b>Vertebrados</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Peces</li> </ul>		

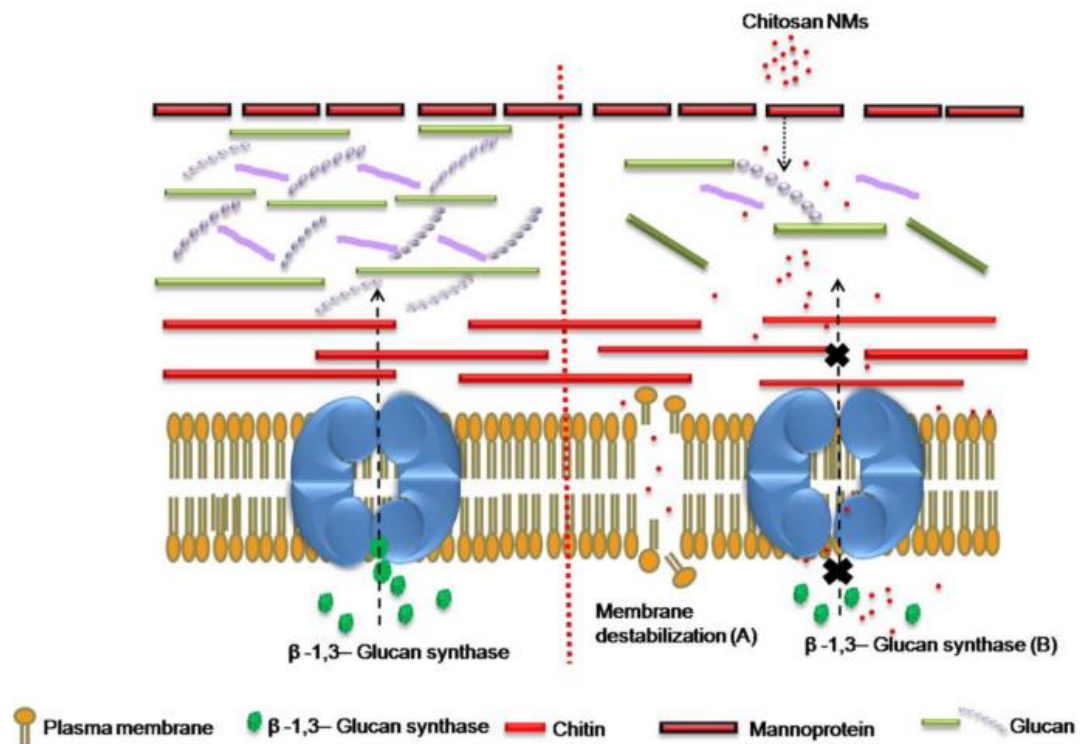
En Colombia existen escasos productores y distribuidores de quitosán, y esto dificulta su aplicación práctica para múltiples fines, sin embargo, la demanda para su uso en el país es creciente y dada la deficiente oferta, las iniciativas para su extracción a partir de diferentes subproductos incrementan cada vez más (Gómez, 2015). Es así como se ha investigado profundamente sobre métodos de extracción de quitina y producción de quitosán a partir de *Aspergillus niger* como desecho industrial de la fermentación de diferentes sustratos (Alzáte *et al.*, 2013; Paz *et al.*, 2012), del exoesqueleto de diferentes crustáceos resultantes de la industria pesquera nacional en las regiones del Atlántico y Pacífico (López, 2014; Pérez *et al.*, 2014; Escobar *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2011) e incluso a partir de escamas de tilapia en la industria pesquera de la zona Andina Colombiana (García *et al.*, 2016). También se han realizado análisis de viabilidad técnica

y económica para la instalación de plantas a escala industrial (Gómez, 2015; Cabarcas *et al.*, 2011). Esto evidencia de que la industria y agroindustria nacional se une a los esfuerzos a nivel mundial para la mitigación del impacto en la producción de residuos industriales, tanto como a la utilización de sustancias con potencial estimulante en las plantas, como componentes para el manejo fitosanitario de los cultivos, tendientes hacia la reducción del consumo de plaguicidas de síntesis química con alto impacto sobre el ambiente. De la misma manera que en Colombia, en el mundo existen múltiples productos formulados a base de quitosán con diferentes fines, sin embargo, un gran porcentaje de la oferta de estos productos se enfoca en su aplicación para uso agrícola (Tabla 2-2).

**Tabla 2-2.** Productos comerciales a base de quitosán disponibles en el mundo

Producto	Industria productora	Forma de uso	Tipo	País de origen	Fuente
Chitosan	Marshall Marine	Industrial-uso agrícola	Polvo, líquido	India	<a href="http://www.marshallmarine.in">www.marshallmarine.in</a>
Chitosan	Platerbio	Industrial-uso agrícola	Polvo-Chitosan hydrochloride	Reino Unido	<a href="http://www.platergroup.co.uk">www.platergroup.co.uk</a>
Biorend	Bioagro S.A.	Uso agrícola	Concentrado soluble	Chile	<a href="http://www.biorend.cl">www.biorend.cl</a>
Quitosán	G.T.C Bio Corporation	Industrial-Grado agrícola	Polvo	China	<a href="http://www.bestchitosan.com">www.bestchitosan.com</a>
Softguard	Canada Oceanic	Uso agrícola	Líquido, adicionado con Potasio	Canadá	<a href="http://www.canadaoceanic.com">www.canadaoceanic.com</a>
Chitoseen	Siveele	Uso agrícola-alimentario		Holanda	<a href="http://www.siveele.com">www.siveele.com</a>
Chitosan 6	Rumexo	Grado agrícola	Solución acuosa	Reino Unido	<a href="http://www.rumexo.com">www.rumexo.com</a>
Chitoplant	ChiPro	Uso agrícola	Polvo-Chitosan hydrochloride	Alemania	<a href="http://chipro.de/products/chitoplant/">chipro.de/products/chitoplant/</a>
Biovaccine	Viggi Agro Products	Uso agrícola	Líquido	India	<a href="http://viggiagro.com">viggiagro.com</a>
U-Lemei	HaiJingLing Group	Uso agrícola	Concentrado soluble	China	<a href="http://www.jlfert.com">www.jlfert.com</a>
Kendal cops	Valagro	Uso agrícola	Líquido-adicionado con cobre	Italia	<a href="https://www.mertens-groep.nl">https://www.mertens-groep.nl</a>
AltosanCu - B/Zn	Altinco	Uso agrícola	Líquido, adicionado con Cobre/Boro y Zinc	España	<a href="https://www.altinco.com/es">https://www.altinco.com/es</a>
BioHope	Tagrow	Uso agrícola	Polvo	China	<a href="http://www.tagrow.com">www.tagrow.com</a>
Chitosan	MBFi	Uso Agrícola	Líquido, suplementado con elementos mayores y menores	Sudáfrica	<a href="http://www.mbf.co.za">www.mbf.co.za</a>
Legacy	Kalo	Uso agrícola	Inoculante ( <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ) y bioestimulante	Estados Unidos	<a href="http://www.kalo.com">www.kalo.com</a>
Quitomax	Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)-Cuba	Uso agrícola	Solución acuosa	Cuba	<a href="http://www.inca.edu.cu">www.inca.edu.cu</a>

Mecanismos directos de la actividad antimicrobiana. El quitosán afecta de diferentes maneras el crecimiento, desarrollo y virulencia de los fitopatógenos (Figura 2-1). Uno de los mecanismos por los cuales el quitosán presenta actividad antimicrobiana es debido a la carga positiva del grupo amino presente en su estructura que interactúa con la carga negativa de las membranas biológicas de los microorganismos (fosfolípidos, proteínas, glicoproteínas) desestabilizándolas, induciendo una baja regulación en la biosíntesis de esfingolípidos y ergosterol, alterando su permeabilidad, afectando la entrada de materiales y liberando los constituyentes celulares. Además en hongos, el quitosán reprime la expresión de genes relacionados con la síntesis de  $\beta$ -1,3 glucano y la elongación de la pared celular, debilitándola (Xing *et al.*, 2018; Zou *et al.*, 2016).



**Figura 2-1.** Mecanismos de acción antimicrobiana directa de quitosán sobre hongos patogénicos. Izquierda: funcionamiento normal de la pared y membrana celular sin presencia de quitosán; derecha: en presencia de quitosán, se secuestran los contenidos aniónicos de la membrana fúngica desestabilizándola y se inhiben las enzimas involucradas en la biosíntesis de glucanos, debilitando la pared celular fúngica. (Modificado de: Kumaraswamy *et al.*, 2018).

El quitosán también puede desplazar iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , por la ocupación de sus sitios de unión, lo que afecta la formación de glucanos y quitina, componentes de la pared celular fúngica (Tachaboonyakiat, 2016). Por otro lado, existe evidencia de que el quitosán,

principalmente el de bajo peso molecular, puede penetrar las paredes celulares e interactuar con el ADN o mRNA, a través de los grupos fosfatos negativamente cargados de la cadena; bloqueando la transcripción y la síntesis de proteínas (Saharan y Pal, 2016; Galván Márquez *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2009). Finalmente, el quitosán al funcionar como agente quelante, secuestra algunos iones metálicos, nutrientes y elementos traza necesarios para el crecimiento fúngico o bacteriano (Orzali *et al.*, 2017).

Las características fisicoquímicas como la solubilidad, la degradación enzimática, la distribución de cargas, así como la actividad biológica del quitosán, pueden verse afectadas por el DDA (grado de deacetilación por sus siglas en inglés) y el peso molecular, ya que los grupos amino (-NH<sub>2</sub>) e hidroxilo (-OH), son considerados los sitios predominantemente reactivos; de manera que entre más grupos amino libre, mayor será la actividad antimicrobiana (Saharan y Pal, 2016; Goy *et al.*, 2009).

#### Mecanismos indirectos del quitosán contra enfermedades ocasionadas por patógenos.

Además de la afectación directa en parámetros de crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos y bacterias, el quitosán tiene un efecto sobre la planta por el mecanismo de inducción de resistencia, que a través de cambios fisiológicos inducidos en la planta, tales como la activación de genes PR, liberación de ROS, activación de enzimas antioxidantes, deposición de calosa, lignificación y suberización de tejidos reduce de la incidencia y severidad de diferentes enfermedades en plantas (Vidhyasekaran, 2016; Xing *et al.*, 2015; El Hadrami *et al.*, 2010). Los mecanismos implicados en estos procesos serán revisados a profundidad, en el capítulo 3.

Dadas las diferentes propiedades del quitosán,(Rabea *et al.*, 2003), en este trabajo se propone como un excelente candidato para el manejo de la marchitez vascular ocasionada por *Fol* en plantas de tomate. La validación de su eficacia y formas de uso en representa un primer paso hacia la generación y desarrollo de un potencial bioproducto de primera o segunda generación, para el control de enfermedades de difícil manejo como es *Fol* en Colombia.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Evaluación *in vitro* de la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento de *Fol*

Para determinar la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *Fol*, se evaluaron en total 16 diferentes aislamientos (Tabla 2-3), de los cuales 10 aislamientos pertenecen al Banco de Germoplasma con interés en control biológico de la nación, en custodia de AGROSAVIA. Adicionalmente, se usaron 4 aislamientos endófitos obtenidos de plantas de tomate en cultivos sin síntomas asociados a la marchitez vascular. Como controles positivos se usaron dos productos comerciales: Tricotec® cuyo ingrediente activo es *Trichoderma koningiopsis* desarrollado por AGROSAVIA y Tricho D compuesto por *Trichoderma harzianum*. El patógeno usado fue el aislamiento *Fol59*, caracterizado anteriormente (capítulo 1).

**Tabla 2-3.** Aislamientos de *Trichoderma* spp. usados para la determinación *in vitro* de la capacidad biocontroladora sobre *Fol*

Código aislamiento	Especie	Código aislamiento	Especie
Th003	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Th051	<i>Trichoderma harzianum</i>
Th004	<i>Hypocrea orientalis</i>	Th084	<i>Trichoderma atroviride</i>
Th007	<i>Trichoderma atroviride</i>	2R	<i>Trichoderma asperellum</i>
Th013	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	3T	<i>Trichoderma</i> sp.
Th019	<i>Trichoderma asperellum</i>	M44	Sin identificar
Th032	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	M45	Sin identificar
Th034	<i>Trichoderma asperellum</i>	Tricho D	<i>Trichoderma harzianum</i>
Th035	<i>Trichoderma atroviride</i>	Tricotec	<i>Trichoderma koningiopsis</i>

La evaluación se realizó usando la técnica de cultivos duales, para lo cual, fueron usados cultivos en PDA de 7 y 14 días de edad de *Trichoderma* spp. y *Fol* respectivamente. Con los productos comerciales, se preparó una suspensión concentrada a partir de la formulación (1g en 1 mL de agua), y se sembró una alícuota de 10 µL en el centro de una

caja petri con PDA. A partir de allí, se tomó para cada uno de los aislamientos un disco de 7 mm de la parte marginal del cultivo y se ubicó a 7 cm de distancia del disco de *Fol*. Este último se dejó crecer previamente durante 2 días antes de ser enfrentado con el biocontrolador por tener una menor tasa de crecimiento. Las cajas se incubaron durante 7 días a 25° C, se midieron las áreas de crecimiento de las colonias usando el software Image J y se determinaron los tipos de interacciones (Tabla 2-4) que se presentaron entre el biocontrolador y el patógeno, de acuerdo con Badalyan *et al*, (2004) y Molla *et al*, (2001):

**Tabla 2-4.** Características de los tipos de interacciones evaluados en enfrentamientos duales entre *Trichoderma* spp. y *Fol59*

Identificación	Descripción	Puntaje asignado
A	Inhibición en el punto de contacto (el crecimiento de ambos hongos se detiene en el punto de contacto)	1
B	Inhibición a la distancia (el crecimiento se detiene sin contacto micelial)	2
C	Reemplazo (uno de los hongos crece sobre el otro)	3
D	Entremezcla mutua (ninguno de los dos hongos detiene su crecimiento después del punto de contacto)	0

Con los puntajes asignados a cada interacción se calculó el índice de antagonismo usando la siguiente fórmula:

$$IA = \sum n * i$$

Donde *n* es la frecuencia de unidades experimentales en cada clase de interacción, e *i* es el puntaje correspondiente.

El ensayo se realizó con un diseño completamente al azar, con cinco réplicas técnicas, y tres réplicas biológicas; teniendo como unidad experimental una caja Petri. Se calculó el porcentaje de la inhibición de crecimiento radial (PICR) sobre *Fol*, usando la siguiente fórmula (You *et al.*, 2016):

$$\%PICR = \left( \frac{C2 - C1}{C2} \right) * 100$$

Donde *C2* corresponde al área de crecimiento de las colonias de *Fol* en el control y *C1* es el área de las colonias enfrentadas a *Trichoderma* spp. Se realizaron 3 réplicas biológicas a través del tiempo.



Los datos fueron analizados usando el paquete Statistix 8.0 para determinar la homogeneidad de varianzas de Barlett y comparación de medias de Tukey o prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con una significancia ( $\alpha$ ) de 0.05.

### 2.2.2 Evaluación *in vitro* de la inhibición de crecimiento de *Fol* por parte de quitosán

Para determinar la capacidad de inhibición de crecimiento que puede ejercer el quitosán sobre *Fol*; se utilizó quitosán grado reactivo (Sigma - Aldrich). Teniendo en cuenta que el peso molecular es una de las características que puede determinar la capacidad antimicrobiana de quitosán, para esta evaluación, se usaron tres tipos diferentes de quitosán (Tabla 2-5).

Se preparó una solución stock a  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de quitosán (2 g se solubilizaron en 200 mL de una solución acuosa de ácido acético al 1% en agitación constante por 24 horas). Posteriormente, el pH de la solución se ajustó a 5,6 usando KOH, y se esterilizó por 15 minutos. La solución stock se empleó para preparar los medios de cultivo PDA suplementados con quitosán, para alcanzar una concentración final de 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 y  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Los medios de cultivo se sirvieron en cajas Petri de vidrio. Se usó un producto comercial formulado a base de quitosán (Biorend®) a la dosis recomendada.

**Tabla 2-5.** Propiedades de los productos a base de quitosán usados en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, para determinar la capacidad inhibidora de *Fol*.

Producto	LMW (Low molecular weight)	HMW (High molecular weight)	HMW (High molecular weight)
Presentación	Polvo fino	Hojuelas pequeñas	Polvo fino
Viscosidad (cp-centipoise)	20 – 100	200 - 800	800 – 2000
Grado de deacetilación (%)	75 – 85	75 – 85	> 75
Peso molecular (kDa)	50 - 190	190 - 310	310 – 375
Marca	Sigma - Aldrich	Sigma - Aldrich	Sigma – Aldrich

Cultivos del aislamiento *Fol59* de 14 días de edad se usaron para extraer discos de la parte marginal y disponerlos en el centro de los medios de cultivo preparados a cada concentración y peso molecular de quitosán. Como control se usó PDA adicionado con

agua acidificada con ácido acético y ajustada con KOH a pH 5.6. Las cajas se incubaron por 7 días a 25 °C (hasta que los tratamientos control alcanzaron el 80% de crecimiento máximo en la caja Petri).

El ensayo se realizó con un diseño completamente al azar, con cinco réplicas técnicas, y tres réplicas biológicas; teniendo como unidad experimental una caja Petri. Se evaluó el PICR, usando la misma metodología, paquete estadístico, ecuación y análisis descritos en el numeral 2.2.1.

### **2.2.3 Evaluación de la reducción de la marchitez vascular ocasionada por *Fol* en plantas de tomate, por parte de *Trichoderma* spp y quitosán**

Con el fin de determinar la capacidad biocontroladora *in vivo* de *Trichoderma* spp. y quitosán sobre *Fol*, se diseñaron bioensayos sobre plantas de 30 días de edad, con base en el protocolo estandarizado descrito en el capítulo 1. Para esto, se sembraron semillas de tomate de la variedad Santa Cruz Kada (Impulse semillas®) sobre turba estéril, y se mantuvieron en semillero en condiciones controladas por 30 días. La determinación del control de *Trichoderma* spp. y quitosán, se realizó en dos ensayos diferentes:

Determinación de biocontrol por parte de *Trichoderma* spp. Durante la etapa de semillero, las plantas se trataron a los 23 días después de siembra (dds) (7 días antes del trasplante) con 10 mL de una suspensión de  $1.10^6$  con.mL<sup>-1</sup> de cada uno de los aislamientos descritos en la tabla 2-3. En el momento del trasplante, las plantas se removieron cuidadosamente del sustrato, se realizó una inmersión de las raíces en una suspensión de  $1.10^6$  con.mL<sup>-1</sup> de *Fol59* durante 15 minutos y se sembraron en suelo estéril en contenedores plásticos de 16 oz. Inmediatamente después del trasplante, las plantas se trataron de nuevo con 30 mL por vaso de una suspensión de  $1.10^6$  con.mL<sup>-1</sup> de cada uno de los tratamientos del biocontrolador.

Determinación de control por parte de quitosán. Para éste ensayo las plantas se trataron una única vez, aplicando 10 mL de la solución de quitosán a cada concentración, 24 horas antes del trasplante e inoculación. El proceso de inoculación se realizó 24 horas después de realizar el tratamiento con quitosán en el momento del trasplante, con el protocolo descrito anteriormente (apartado de determinación de biocontrol por *Trichoderma* spp.).

Los ensayos se establecieron en un arreglo de Bloques Completos al Azar, con dos réplicas biológicas. Cada ensayo contó con cuatro réplicas técnicas y una unidad experimental de 5 plantas para un total de 20 plantas por tratamiento en cada réplica. Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento con condiciones de temperatura de 30/20 °C día/noche, una humedad relativa de 54% y fotoperiodo de 12 horas. El riego en las plantas se realizó con el método gravimétrico, manteniendo el suelo a capacidad de campo, con un porcentaje de humedad de 70% con respecto a su peso seco. La fertilización se realizó de acuerdo al análisis químico de suelos (anexo 7). Se evaluaron y analizaron las variables incidencia, severidad y ABCPE de acuerdo con lo descrito en el capítulo 1.

Análisis de datos. Los datos fueron analizados usando el paquete Statistix 8.0 para determinar la homogeneidad de varianzas de Barlett y comparación de medias de Tukey o prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con una significancia ( $\alpha$ ) de 0.05.

## 2.3 Resultados y discusión

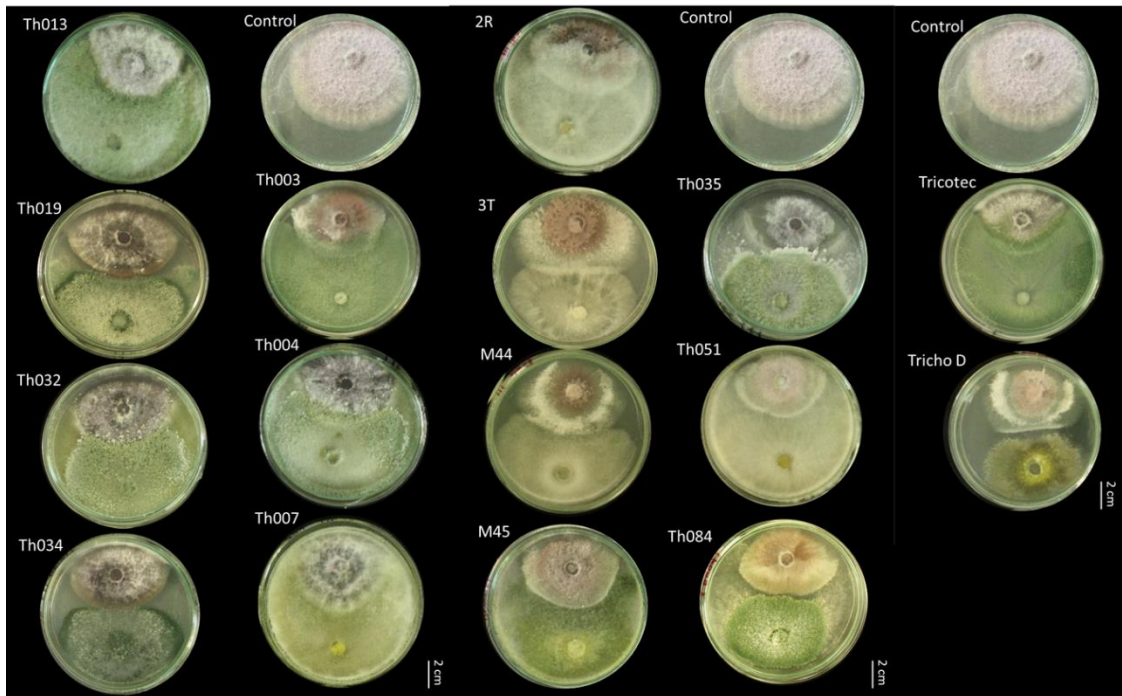
### 2.3.1 *Trichoderma* spp. reduce significativamente el crecimiento de *Fol* in vitro

En la determinación de la actividad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *Fol*, se identificaron todos los tipos de interacción descritos por Badalyan *et al.* (2004) y Molla *et al.* (2001), predominando el tipo C reemplazo (Figura 2-2). Del total de los aislamientos 44% mostraron una interacción tipo C (reemplazo) con *Fol*; 44% de las interacciones correspondieron al tipo B (inhibición a distancia), el 6% de las interacciones fueron A (inhibición en el punto de contacto) y el 6 % fueron tipo D (entre mezcla mutua) (Tabla 2-6 y Figura 2-2). El tipo de interacción predominante (C), se asocia con el rápido crecimiento de las especies de *Trichoderma* y con mecanismos de micoparasitismo y antibiosis, en los cuales principalmente mediante la producción de enzimas líticas, *Trichoderma* tiene la capacidad de usar al patógeno como sustrato de crecimiento, creciendo inicialmente sobre su micelio y finalmente reemplazándolo progresivamente gracias a la degradación de este (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009).

**Tabla 2-6.** Índice del antagonismo (IA) *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Fol*.

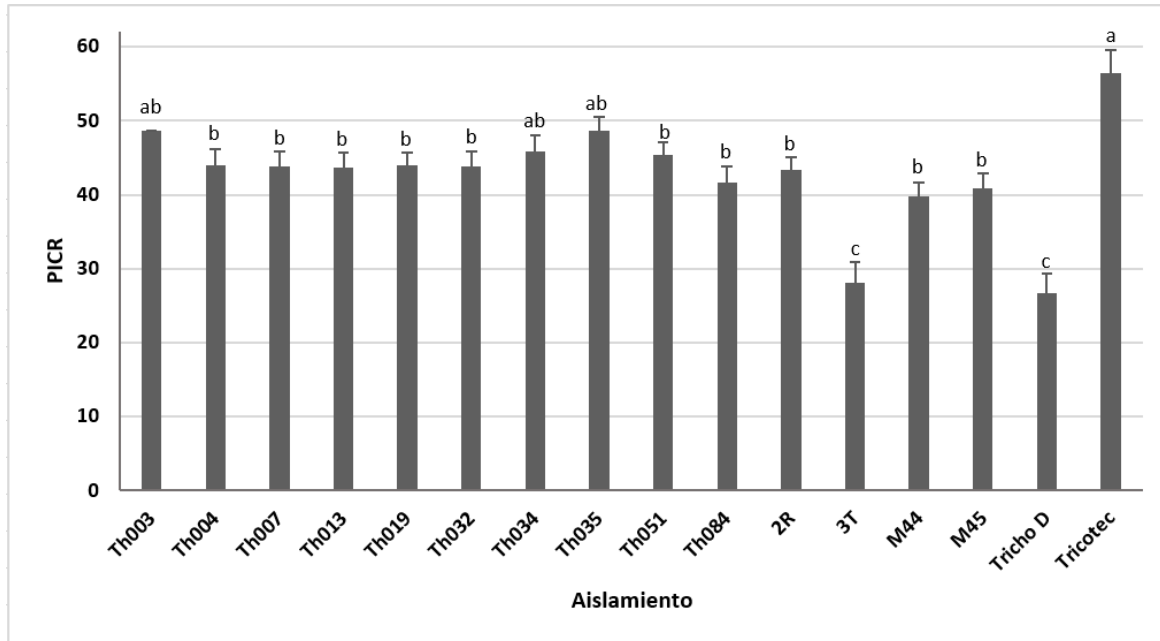
Aislamiento	Tipo de interacción	Valor de antagonismo asignado	IA
Th003	C	2.87 ± 0.49	43
Th004	C	2.87 ± 0.49	43
Th007	C	2.87 ± 0.49	43
Th013	C	2.53 ± 0.49	38
Th019	B	2.47 ± 0.88	37
Th032	C	2.60 ± 0.8	39
Th034	A	0.93 ± 0.92	14
Th035	C	3.00 ± 0	45
Th051	B	2.47 ± 0.88	37
Th084	B	2.27 ± 0.92	34
2R	C	2.73 ± 0.68	41
3T	D	0.40 ± 0.8	6
M44	B	2.33 ± 0.94	35
M45	B	1.666 ± 0.94	25
Tricho D	B	1.73 ± 0.68	26
Tricotec	B	2.47 ± 0.88	37

La interacción tipo B, donde se da un antagonismo a la distancia, es usualmente atribuido a la producción de metabolitos secundarios volátiles de bajo peso molecular, que de acuerdo con la presión de vapor en el aire, se pueden movilizar en el espacio, afectando la fisiología y competitividad de microorganismos vecinos (Reino *et al.*, 2008; Boddy, 2000). El aislamiento 3T no presentó ningún tipo de antagonismo, lo que se evidenció con el crecimiento mutuo de los dos microorganismos, después del punto de contacto, mientras que, con el aislamiento Th034, se detuvo el crecimiento de ambos en el punto de contacto.



**Figura 2-2.** Tipos de interacción observados en enfrentamientos duales *in vitro* entre *Trichoderma* spp. y *Fol*, a los siete ddi. Se pueden diferenciar interacciones como inhibición en el punto de contacto (Th034); inhibición a la distancia (Tricho D); reemplazo (Th003), y entre mezcla mutua (3T). Los controles son cultivos de *Fol*59 crecidos en PDA sin ningún tipo de enfrentamiento. La fotografía corresponde a una unidad representativa de cada tratamiento en ensayos con cinco réplicas técnicas y tres réplicas biológicas.

En concordancia con los resultados de las interacciones visualizados, todos los aislamientos de *Trichoderma* tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *Fol*; alcanzando hasta un 56% de inhibición de crecimiento radial de *Fol* con el producto Tricotec, el cual produjo una mayor inhibición, seguido por un 48% por el Th003 y Th035. Los aislamientos que presentaron menor inhibición, fueron el producto Tricho D y 3T, con 26 y 28% de inhibición, respectivamente (Figura 2-3). Th003 y Th035 presentaron altos índices de antagonismo (43 y 45 puntos, respectivamente), ratificando su agresividad *in vitro*, con una mayor velocidad de crecimiento y posible micoparasitismo, creciendo sobre el patógeno.

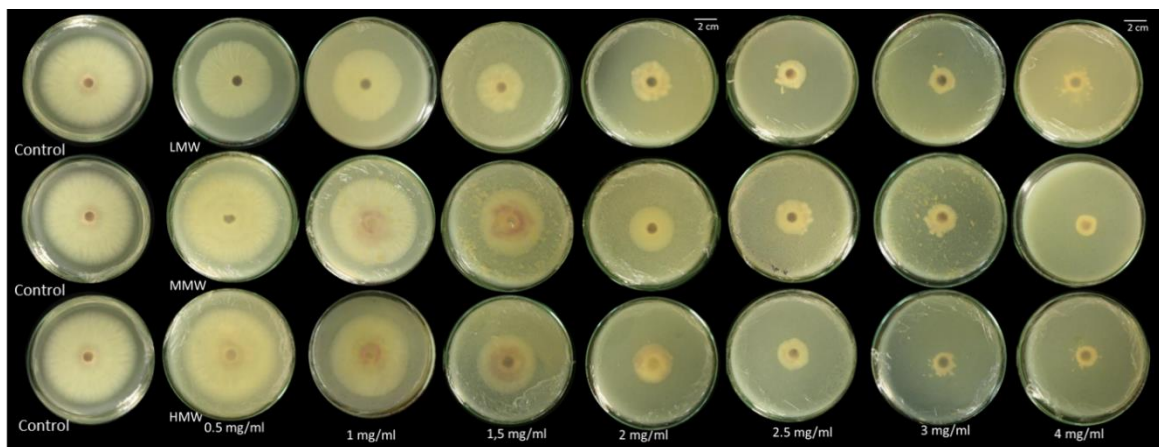


**Figura 2-3.** Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Trichoderma* spp. sobre Fol59 después de 7 días de crecimiento *in vitro* ( $\alpha = 0.05$ ; valor de  $p=0.0000$ ;  $gl= 254$ ;  $F= 13$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Las barras representan el error estándar. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas ( $n=15$ ).

Estos resultados ratifican lo encontrado en trabajos anteriores donde se demuestra la destacada capacidad biocontroladora de la cepa Th003 (*T. koningiopsis*) y su producto formulado Tricotec que alcanzó un 96% de biocontrol sobre patógenos causantes de muerte descendente en frijol, esto debido posiblemente a la alta actividad quitinasa y glucanasa de la cepa; y la capacidad de parasitismo de la cepa Th035 sobre esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Smith *et al.*, 2013; Cotes *et al.*, 1994; Cotes, 1993). La producción de enzimas relacionadas con el parasitismo de varias especies de *Trichoderma* ha sido reportada previamente como uno de los principales mecanismos en el biocontrol de hongos fitopatogénicos (You *et al.*, 2016; Hermosa *et al.*, 2012; Harman y Kubicek, 2002), por lo que son uno de los microorganismos más usados en bioproductos agrícolas. Debido a la capacidad que tuvieron todos los aislamientos de *Trichoderma* spp. de inhibir en condiciones *in vitro* el crecimiento micelial de *Fol*, todos estos se usaron para realizar una evaluación de su capacidad para reducir de la enfermedad *in planta*.

### 2.3.2 Quitosán reduce significativamente el crecimiento de *Fol* *in vitro*

Las tres moléculas de quitosán presentaron una importante reducción en el crecimiento radial de *Fol* a partir de 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 2-4), con un incremento en la inhibición de acuerdo con el aumento de la concentración del producto (Tabla 2-6). El quitosán de bajo peso molecular presentó mayor inhibición de crecimiento con respecto a los otros, a las concentraciones más bajas (hasta 2 mg.mL<sup>-1</sup>). El PICR en el quitosán de bajo peso molecular se estabilizó con valores mayores a 90% a partir de 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 2-4.** Inhibición de crecimiento de *Fol in vitro* por quitosán en diferentes concentraciones de diferentes pesos moleculares. LMW: bajo peso molecular, MMW: mediano peso molecular, HMW: alto peso molecular. La fotografía corresponde a una unidad representativa de cada tratamiento en ensayos con cinco réplicas técnicas y tres réplicas biológicas.

Los resultados son consistentes en demostrar la dependencia de la concentración del quitosán con su capacidad antimicrobiana (Anexo 9). Algunas concentraciones bajas de quitosán promovieron el crecimiento de *Fol* (Tabla 2-7), y se presenta como valores negativos de PICR, donde los tratamientos crecieron más que el control de *Fol*. Este comportamiento puede estar relacionado con el fenómeno de hormesis que se define como la respuesta que presentan los organismos frente a un componente tóxico, que en bajas concentraciones produce un efecto benéfico. Esta respuesta se relaciona con una sobrecompensación metabólica, desencadenada por una respuesta adaptativa frente al estrés inducido por dicha sustancia (Vargas-Hernandez *et al.*, 2017).

**Tabla 2-7.** Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) por tres moléculas de quitosán a diferentes concentraciones, 7 ddi. ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0000$ ;  $gl= 59$ ;  $F=66.4$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas entre las concentraciones de cada peso molecular en donde el símbolo  $\pm$  representa el error estándar. Los resultados corresponden al promedio obtenido entre las réplicas biológicas ( $n=15$ ).

Concentración (mg.mL <sup>-1</sup> )	LMW	MMW	HMW
0.5	22.7 $\pm$ 3.1 <sup>de</sup>	-21.3 $\pm$ 5.3 <sup>d</sup>	-20.4 $\pm$ 3.8 <sup>e</sup>
1	24.8 $\pm$ 3.4 <sup>de</sup>	11.4 $\pm$ 4.8 <sup>cd</sup>	5.6 $\pm$ 3.9 <sup>de</sup>
1.5	65.5 $\pm$ 1.5 <sup>cd</sup>	45.6 $\pm$ 2.3 <sup>bcd</sup>	53.6 $\pm$ 1.6 <sup>cde</sup>
2	81.5 $\pm$ 0.7 <sup>bcd</sup>	72.1 $\pm$ 1.9 <sup>abc</sup>	76.6 $\pm$ 1.9 <sup>bcd</sup>
2.5	89.9 $\pm$ 0.6 <sup>abc</sup>	83.8 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>	90.1 $\pm$ 0.5 <sup>abc</sup>
3	92.4 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>	90.7 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	95.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
4	94.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	92.5 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	94.9 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>
<b>Biorend</b>	-24.5 $\pm$ 5.1 <sup>e</sup>	-24.5 $\pm$ 5.1 <sup>d</sup>	-24.5 $\pm$ 5.1 <sup>e</sup>

Los mecanismos antimicrobianos de quitosán se encuentran ilustrados en la figura 2-1, sin embargo y según lo reportado, las principales afectaciones en los hongos se producen sobre las paredes celulares, ya que el quitosán tiene la capacidad de inhibir la biosíntesis de glucano así como sobre la desestabilización de las membranas celulares por parte de sus cargas positivas y el secuestro de aniones (Kumaraswamy *et al.*, 2018). Estos mecanismos han sido comprobados por Xing *et al.*, (2015), quienes afirman que el flujo de iones de potasio es una respuesta temprana de las células microbianas a la presencia de quitosán y que la rapidez de esta pérdida de electrolitos es dependiente de la concentración del quitosán.

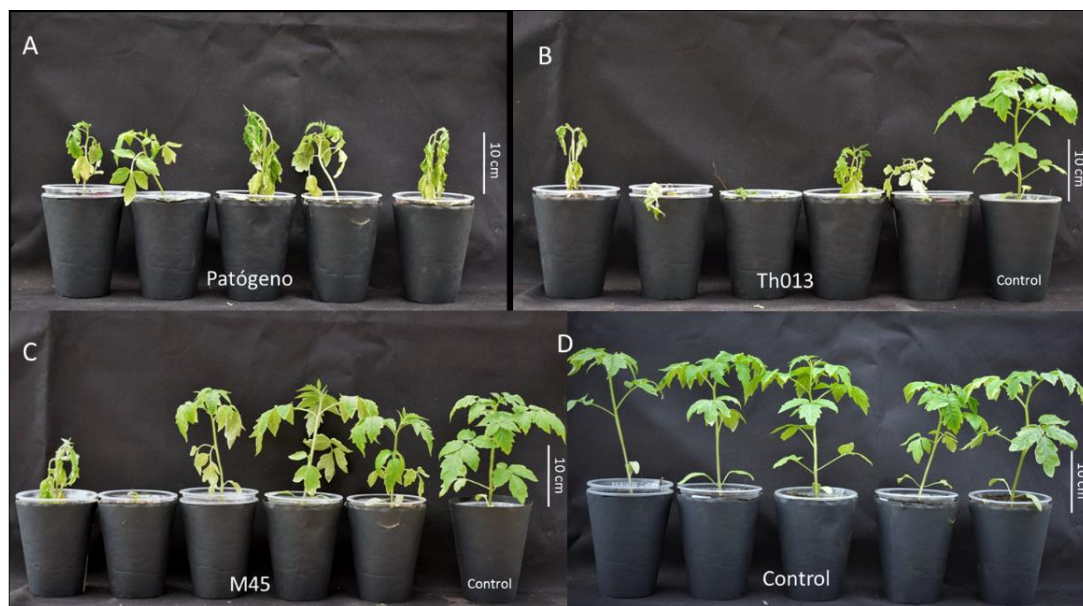
Debido a que en general, la mayoría de las concentraciones de quitosán (excepto las menores concentraciones de 0.5 mg.mL<sup>-1</sup>) presentaron una reducción en el crecimiento de *Fol in vitro*, y con la finalidad de comprobar si existe capacidad de reducción de la enfermedad por inducción de resistencia por las diferentes concentraciones evaluadas; los ensayos *in planta* se realizaron usando todas las concentraciones, exceptuando la de 4 mg.mL<sup>-1</sup>; por ser poco viable técnicamente, ya que se requeriría un volumen muy alto de producto para la aplicación en las plantas.



### 2.3.3 *Trichoderma* spp. y quitosán aplicados individualmente reducen en diferentes niveles la marchitez vascular por *Fol* en plantas de tomate

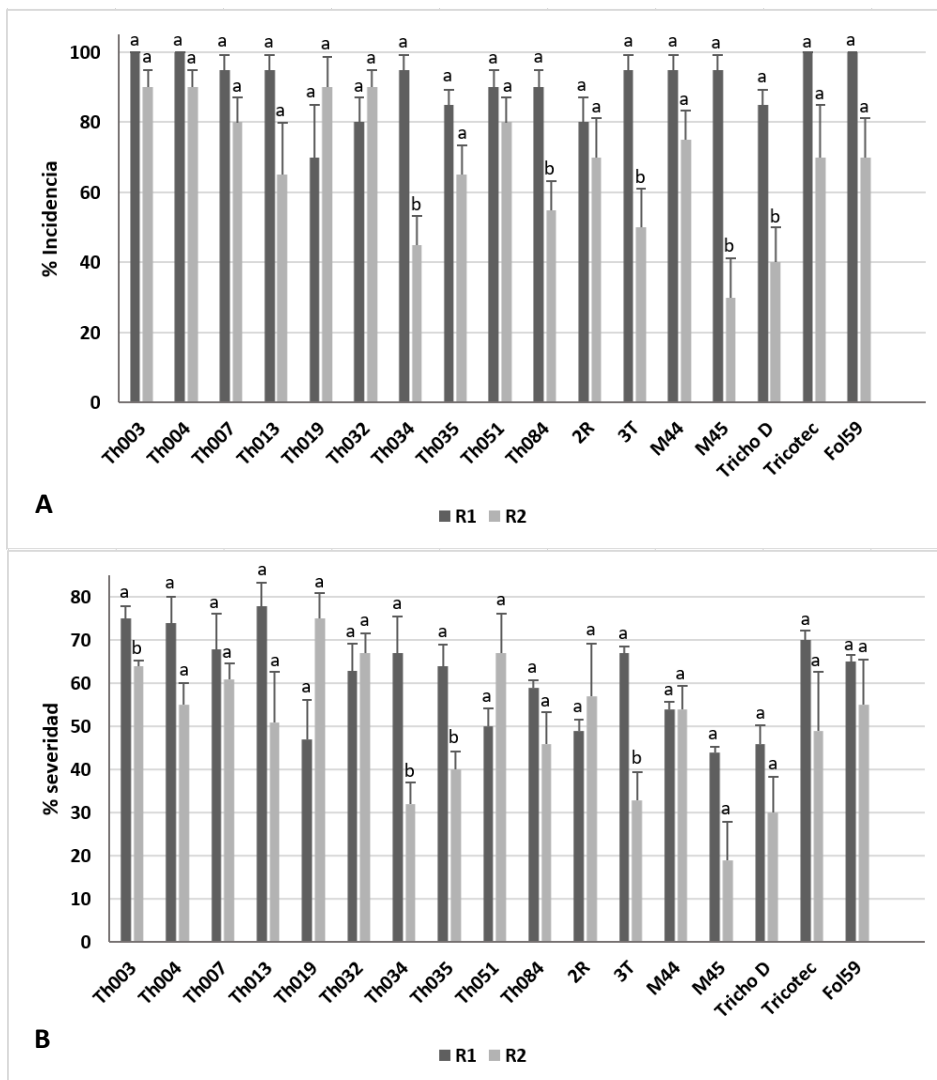
Diferentes aislamientos y productos comerciales de *Trichoderma* spp. (Tabla 2-3) y diferentes concentraciones de quitosán de tres pesos moleculares (Tabla 2-4), fueron evaluados en ensayos individuales contra la marchitez vascular en plantas de tomate.

Actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp. sobre *Fol* en plantas de tomate. Al menos tres aislamientos de *Trichoderma* spp. (Th034, Th084 y M45) presentaron la capacidad de reducir la incidencia de la marchitez vascular del tomate, oscilando en valores desde 21% hasta 57% en la eficacia sobre la incidencia de la enfermedad, mientras otros aislamientos (Th003, Th004, Th007, Th013) parecen haber promovido la infección (Figura 2-5, Anexo 10) en al menos una de las réplicas biológicas realizadas.



**Figura 2-5.** Síntomas de la marchitez vascular en plantas de tomate 12 ddi, tratadas con diferentes aislamientos de *Trichoderma* e inoculadas con *Fol59*. A) Plantas infectadas con *Fol59* (Testigo patógeno); B) plantas tratadas con el aislamiento Th013, el cual parece promover los síntomas de la enfermedad; C) plantas tratadas con el aislamiento M45 con capacidad de reducir los síntomas de la enfermedad y D) plantas control (Testigo absoluto).

A pesar de haberse observado una reducción de la enfermedad con algunas de las cepas (i.e. M45 y Tricho D para la variable % severidad), no se encontró concordancia entre los resultados de las dos réplicas biológicas (Figura 2-6). Al comparar los resultados entre réplicas, surgen diferencias significativas entre una y otra para algunos tratamientos.



**Figura 2-6.** Eficacia en la disminución del porcentaje de la incidencia (A) ( $\alpha= 0.05$ ;  $p=0.0000$ ;  $gl=7$ ;  $F=4.60$ ) y la severidad (B) ( $\alpha= 0.05$ ;  $p=0.0000$ ;  $gl=7$ ;  $F=3.38$ ) de la enfermedad marchitez vascular en plantas de tomate tratadas con aislamientos de *Trichoderma* spp. Las figuras presentan los resultados promediados de cada una de las réplicas biológicas realizadas y comparadas entre sí. Letras diferentes representan diferencias significativas entre aislamientos. Las barras representan el error estándar.

Como se observa en la figura 2-6, aislamientos como Th084, Th034, M45 y Tricho D, redujeron el porcentaje de incidencia durante la segunda réplica biológica, no siendo así para la primera.

La efectividad de *Trichoderma* como biocontrolador ha sido comprobada en diferentes trabajos donde se registran reducciones de la enfermedad de hasta 85% (Patel y Saraf, 2017; Ghazalibiglar *et al.*, 2016; Taghdi *et al.*, 2015) frente a *Fol* y frente a otras enfermedades vasculares como la producida por *Ralstonia solanacearum* con un 92% de

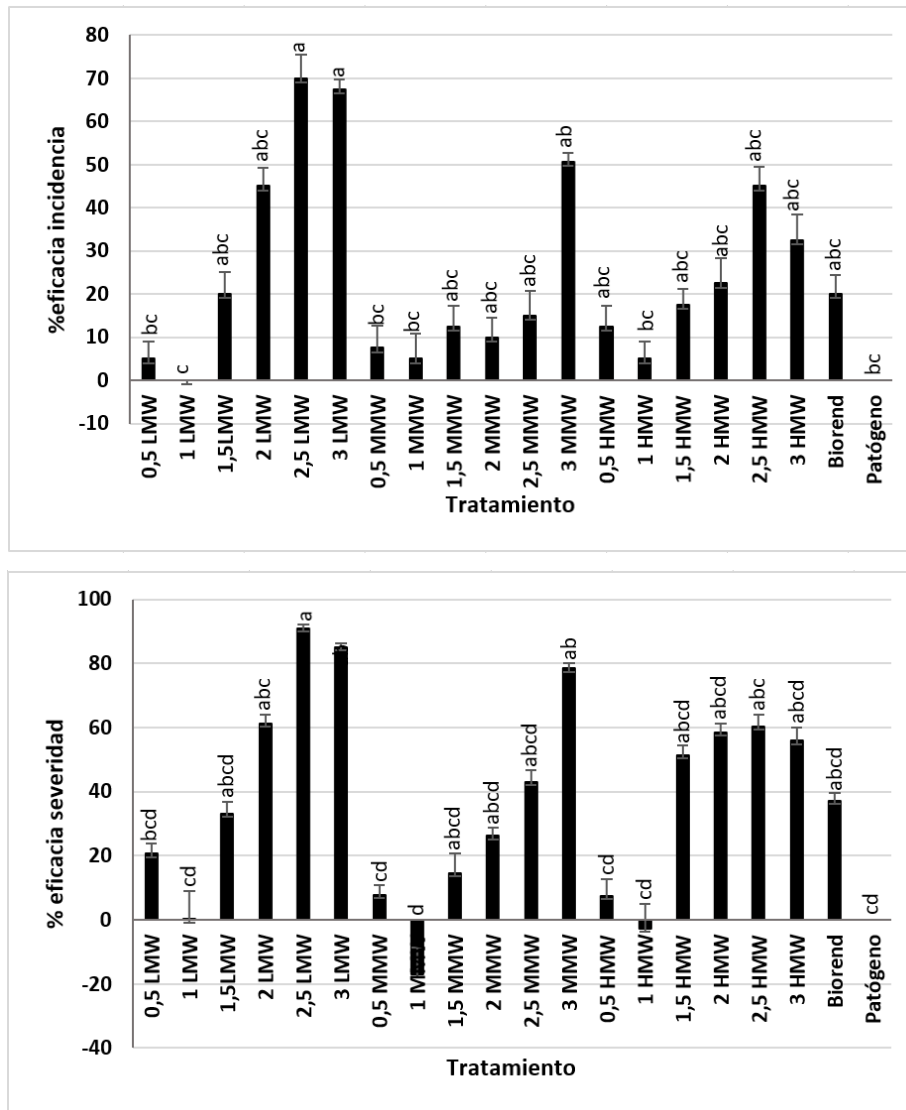
biocontrol (Yendyo *et al.*, 2017). La capacidad de reducción de la enfermedad por parte de *Trichoderma* frente a diferentes fitopatógenos del suelo, se relaciona con su competitividad por nutrientes y su fuerte micoparasitismo, el cual se ha expuesto como una característica adaptativa proveniente de un ancestro común (Kubicek *et al.*, 2011).

Además, su capacidad de establecerse en la rizósfera, tomando nutrientes a partir de los exudados de las plantas le confiere una ventaja competitiva en el suelo que limita el crecimiento de los patógenos (Hermosa *et al.*, 2012). Adicionalmente, se considera que induce una respuesta sistémica en la planta promoviendo deposiciones de calosa, inducción de genes de defensa, activación de vías de señalización dependientes de AJ/AS (Jogaiah *et al.*, 2018; Tucci *et al.*, 2011), entre otras. Todas estas características hacen que *Trichoderma* pueda reducir la capacidad de *Fol* de causar enfermedad en plantas de tomate.

De acuerdo con la variabilidad en los resultados presentados, no se puede concluir sobre la efectividad de las cepas evaluadas para controlar la marchitez vascular en tomate. Otros autores (Marzano *et al.*, 2013; Tucci *et al.*, 2011; Brotman *et al.*, 2010) han reportado variabilidad en los resultados experimentales cuando se usan controladores biológicos; por ejemplo uno de los productos comerciales más estudiados a nivel mundial, a base de *Trichoderma harzianum* (cepa T39), ha presentado alta eficacia de control contra *Botrytis cinerea* en tomate y pepino en el 70% de los estudios, mientras en el 20% de ellos se ha presentado menor eficacia que los fungicidas, y en el 10% no se ha diferenciado de las plantas no tratadas (Guetsky *et al.*, 2001). Por eso en el presente estudio es necesario tener en cuenta que las condiciones experimentales usadas son altamente exigentes con el biocontrolador y favorecedoras para el patógeno (densidad de inóculo, condiciones de incubación y humedad de suelo, entre otras); por lo que se requiere realizar más estudios que permitan determinar el comportamiento de las cepas en diferentes tipos de análisis y bajo diferentes condiciones.

Actividad controladora de quitosán sobre *Fol* en plantas de tomate. Las moléculas de quitosán de bajo y medio peso molecular en concentraciones de 2.5 y 3 mg.mL<sup>-1</sup> redujeron significativamente tanto la incidencia y severidad de la enfermedad como el progreso de ésta. El quitosán de bajo peso molecular (LMW) presentó la mayor capacidad de reducción de la incidencia de la enfermedad con las concentraciones de 2,5 y 3 mg.mL<sup>-1</sup>, presentando eficacias de 70% y 67,5% respectivamente. Mientras que la eficacia sobre la severidad de

la enfermedad alcanzó el 91% para LMW 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, 85% para LMW 3 mg.mL<sup>-1</sup>, y 78% para MMW 3 mg.mL<sup>-1</sup>, siendo estos los tratamientos más destacados (Anexo 10). Las concentraciones bajas de todos los tratamientos presentaron valores bajos de control de la enfermedad, consistentemente con los resultados de control obtenidos *in vitro* (Figura 2-7), e incluso algunas dosis bajas en los tres pesos moleculares, presentaron lo que aparentemente es un efecto de hormesis similar al descrito en las pruebas *in vitro*; con valores de eficacia negativos, es decir, promoviendo la enfermedad en las plantas.



**Figura 2-7.** Eficacia calculada sobre la incidencia ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0000$   $gl=167$ ;  $F=10.9$ ) y la severidad ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0000$   $gl=167$ ;  $F=14.1$ ) de la marchitez vascular por *Fol* en plantas de tomate tratadas con diferentes pesos moleculares y concentraciones de quitosán. Resultados 14 ddi. Letras diferentes representan diferencias

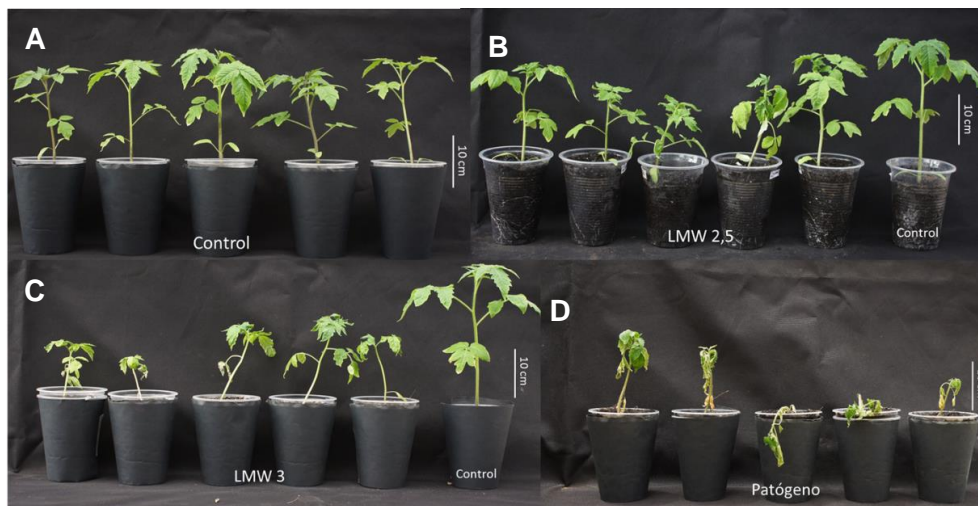
significativas entre tratamientos. Las barras representan el error estándar. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas (n=40).

Como se refleja en el ABCPE (Tabla 2-8), en los tratamientos destacados la expresión de síntomas de la enfermedad se vieron retrasados en 2 días, con respecto al tratamiento testigo patógeno (Anexo 10). El efecto protector del quitosán es más evidente sobre la variable severidad que sobre la variable incidencia, esto posiblemente por la alta presión de inóculo usada y la agresividad de la cepa.

**Tabla 2-8.** ABCPE de la severidad de la marchitez vascular de plantas de tomate tratadas con quitosán 14 ddi ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.000$ ;  $F=20.1$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos.  $\pm$  representa el error estándar. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas (n=40).

Concentración (mg.mL <sup>-1</sup> )	LMW	MMW	HMW
<b>0,5</b>	196 $\pm$ 3.5 abcdef	284 $\pm$ 5.7 abcd	295.5 $\pm$ 6.5 abcd
<b>1</b>	318 $\pm$ 4.2 abc	371 $\pm$ 2.9 ab	352.5 $\pm$ 4.3 abc
<b>1,5</b>	181 $\pm$ 3.8 abcdef	223 $\pm$ 11.1 abcdef	154.5 $\pm$ 5.6 bcdef
<b>2</b>	83.5 $\pm$ 3.7 def	237 $\pm$ 3.3 abcde	132 $\pm$ 9.1 bcdef
<b>2,5</b>	28 $\pm$ 3.7 f	155.25 $\pm$ 6.2 bcdef	119.5 $\pm$ 5.0 cdef
<b>3</b>	44.5 $\pm$ 7.0 ef	79.125 $\pm$ 8.0 def	179.5 $\pm$ 6.0 abcdef
<b>Biorend</b>		163.5 $\pm$ 5.7 abcdef	
<b>Patógeno</b>		503.5 $\pm$ 3.8 a	

A pesar de que las dosis más altas de los tratamientos con quitosán de bajo y mediano peso molecular, presentaron valores representativos de reducción de la enfermedad, se observó un fenotipo de plantas de menor tamaño que las demás en el tratamiento de LMW 3 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 2-8). Sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento, no existen reportes sobre fitotoxicidad provocada sobre plantas de tomate por parte de quitosán (Xing *et al.*, 2015); contrario a esto se han reportado efectos positivos en procesos de germinación y en el crecimiento de plantas de tomate, aunque estos aspectos no fueron evaluados en el presente trabajo (Teixeira, 2017; Pichyangkura y Chadchawan, 2015; Sathiyabama *et al.*, 2014).



**Figura 2-8.** Expresión de síntomas de la marchitez vascular en plantas de tomate tratadas con quitosán e inoculadas con *Fo159*, 14 ddi. A) plantas control (Testigo absoluto); B) plantas tratadas con  $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$  de quitosán de bajo peso molecular (LMW); C) plantas tratadas con  $3 \text{ mg.ml}^{-1}$  de quitosán de bajo peso molecular; D) plantas infectadas con *Fo159* (Testigo patógeno).

Los resultados presentados indican claramente que existe protección de quitosán en plantas de tomate contra *Fo1*, en concordancia con trabajos como el de Sathiyabama y Charles (2015) y Saharan *et al.* (2015), quienes observaron un 81% y 61% en la reducción de la misma enfermedad en plantas de tomate con aplicaciones foliares semanales de quitosán, y Lafontaine y Benhamou, (1996) que alcanzaron valores de 90% de reducción de la enfermedad pudrición de la corona (*For1*).

Resultados de otros trabajos son contrastantes con respecto a la relación eficacia-peso molecular del quitosán, ya que, según los resultados presentados en este trabajo, el bajo peso molecular (LMW) demostró ser más eficaz tanto *in vitro* como *in planta*, lo que es consistente con varios reportes para hongos e incluso para *F. oxysporum* (Zhang *et al.*, 2017; Albuquerque *et al.*, 2010; Tikhonov *et al.*, 2006). Sin embargo, Younes *et al.* (2014), encontraron una mayor actividad antimicrobiana contra *F. oxysporum* usando chitosán con pesos moleculares mayores a 100 kDA, lo que ellos definen como alto peso molecular; aunque para otros hongos fue más eficiente el de bajo peso molecular. No obstante, se considera que, con respecto al efecto de inducción de resistencia en plantas, el quitosán de bajo peso molecular es más potente en desencadenar respuestas de defensa contra patógenos (Orzali *et al.*, 2017).

Es de esperarse que los resultados presentados contrasten con otros reportados y esto puede relacionarse con las fuentes de las cuales se extrajo el quitosán para cada estudio y con las propiedades de los quitosán usados en este estudio, ya que como se señala en la tabla 2-4, sus rangos de peso molecular son amplios y esto tiene que ver con la heterogeneidad en la extracción industrial, durante la deacetilación de la quitina para la obtención de quitosán (Tachaboonyakiat, 2016; Rabea *et al.*, 2003).

De acuerdo con los resultados presentados se sugiere continuar con la realización de estudios que permitan optimizar las condiciones para biocontroladores como *Trichoderma* spp. Por otro lado, dada la contundencia en el control de la enfermedad y la concordancia presentada en las diferentes réplicas realizadas (Anexo 10), se seleccionó únicamente para los ensayos de la evaluación de respuesta fisiológica, el quitosán de bajo peso molecular en dosis de 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>.

## 2.4 Conclusiones

- *Trichoderma* spp. y quitosán son eficientes controladores de *Fol* en condiciones *in vitro*. El quitosán demostró mayores valores de inhibición de crecimiento *in vitro* con una relación directa entre la capacidad de reducir el crecimiento de *Fol*, y la concentración a la que se aplicó en el medio de cultivo.
- El control de la enfermedad en los ensayos en plantas demostró que quitosán en los tratamientos de bajo peso molecular ( $2.5 \text{ mg.mL}^{-1}$  y  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) y mediano peso molecular ( $3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) es más eficaz para el control de la enfermedad.



## 2.5 Recomendaciones

- Optimizar las condiciones para evaluar *in planta* del potencial biocontrolador de *Trichoderma* spp.
- Profundizar en el estudio de la respuesta de las plantas tratadas con quitosán en condiciones de campo, para evaluar su influencia sobre variables agronómicas del cultivo como rendimiento y otras relacionadas en presencia y en ausencia de la enfermedad.
- Realizar estudios para evaluar una posible formulación o integración de quitosán en un bioproducto con el fin de usarse en esquemas de manejo integrado de enfermedades.



### 3. Respuesta fisiológica de plantas de tomate tratadas con quitosán en la protección frente a *F. oxysporum*

#### Resumen

Las plantas infectadas por *Fol*, se afectan severamente en varios procesos fisiológicos. La obstrucción de los haces vasculares, limitaciones en la toma de agua, nutrientes y CO<sub>2</sub>, afectan el metabolismo, aumentan producción de ROS y causan daños en el PSII. Se ha demostrado que el quitosán protege las plantas de enfermedades por la activación de vías de señalización y expresión de genes de defensa, preparando a la planta para un ataque por patógenos. Para determinar si quitosán (bajo peso molecular 2.5 mg.ml<sup>-1</sup>) mitiga el daño fisiológico ocasionado durante la infección, se evaluó el efecto de su aplicación en plantas inoculadas con *Fol*, sobre la eficiencia cuántica fotoquímica máxima potencial del PSII, eficiencia fotoquímica del PSII, disipación fotoquímica, conductancia estomática, contenido relativo de agua, contenido de prolina, clorofilas, acumulación de masa seca y expresión de genes de defensa (*PR1*, *ERF1*, *LOXA* y *PAL*). El tratamiento con quitosán en plantas inoculadas redujo significativamente en 23%, 36% y 47% el impacto negativo del patógeno sobre la Fv/Fm, Y(II) y contenido de clorofila a respectivamente. La disminución del qP, conductancia estomática, CRA y acumulación de masa seca, se mitigó en 16%, 55%, 11% y 26% respectivamente, aunque sin diferencias significativas. Las plantas infectadas y tratadas con quitosán expresaron diferencialmente todos los genes. El *PR1a* se indujo por 3.6 veces por la sola aplicación del quitosán indicando una activación de la resistencia de la planta. En una determinación cualitativa de la muerte celular, se observó que en las plantas inoculadas tratadas con quitosán, se reduce visualmente la muerte celular provocada por *Fol*, lo que podría indicar la activación del sistema antioxidante de la planta por parte del quitosán. Esto indica que el quitosán confiere resistencia a las plantas de tomate frente a *Fol*, a través de un efecto protector sobre varios procesos fisiológicos.

**Palabras claves:** fotosíntesis, contenido de agua, expresión diferencial de genes, muerte celular.

## 3.1 Estado del arte

### 3.1.1 El papel de las fitohormonas en la regulación de las interacciones bióticas y abióticas

La respuesta de las plantas a diferentes condiciones bióticas y abióticas comprende mecanismos complejos que comprometen su estado molecular, bioquímico y fisiológico a nivel general. Así, cambios a nivel molecular y bioquímico, desencadenan respuestas fisiológicas en la planta que le permiten superar de forma simultánea uno o varios tipos de estrés (Atkinson y Urwin, 2012). Cuando la planta se encuentra frente a diferentes estreses, el sistema de defensa es regulado, en principio, por una intrincada red de señalización donde las hormonas juegan un papel preponderante actuando inmediatamente después de la detección del estrés y modulando la respuesta inmune. En este contexto, las hormonas actúan como un sistema flexible y robusto que se retroalimenta positiva o negativamente para responder a los retos ambientales (bióticos o abióticos), para mantener una homeostasis en la planta (Couto y Zipfel, 2016).

Una compleja interconexión hormonal modula la respuesta de defensa de la planta durante el estrés biótico. Una intercomunicación hormonal conformada principalmente por las fitohormonas Ácido Abscísico (ABA), Ácido Salicílico (AS), Ácido Jasmónico (AJ) y Etileno (ET), le confieren a la planta la capacidad de regular la activación de los sistemas de defensa ante diferentes agentes estresantes (Pieterse *et al.*, 2009). En general, se entienden como fitohormonas las pequeñas moléculas orgánicas que son requeridas en las plantas en bajas concentraciones, para regular funciones como crecimiento, desarrollo, reproducción y respuesta inmune. Funcionan como moléculas señal que, de acuerdo con su cantidad y composición, facilitan la respuesta a cambios ambientales tanto bióticos como abióticos (Huot *et al.*, 2014).

El ácido abscísico (ABA) es un sesquiterpenoide involucrado en procesos de desarrollo como la dormancia de las semillas, germinación y floración; pero también participa en la respuesta a diferentes estreses abióticos (déficit hídrico, anegamiento, salinidad, congelamiento), regulando principalmente el cierre estomático y la transcripción de algunos genes (Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2013). Aunque generalmente ABA se asocia a la respuesta a estrés abiótico; también está involucrado en procesos de respuesta a estrés biótico ya que, al inducir el cierre estomático, bloquea la entrada de ciertos patógenos (i.e. bacterias) y mejora la eficiencia en el uso del agua. ABA interactúa de forma

sinérgica o antagónica con otras hormonas como ET, AJ y AS para responder al ataque de patógenos, siendo inducida en estados iniciales de infección, luego de lo cual sus niveles disminuyen y se aumentan los niveles de ET, AJ o AS (Atkinson y Urwin, 2012).

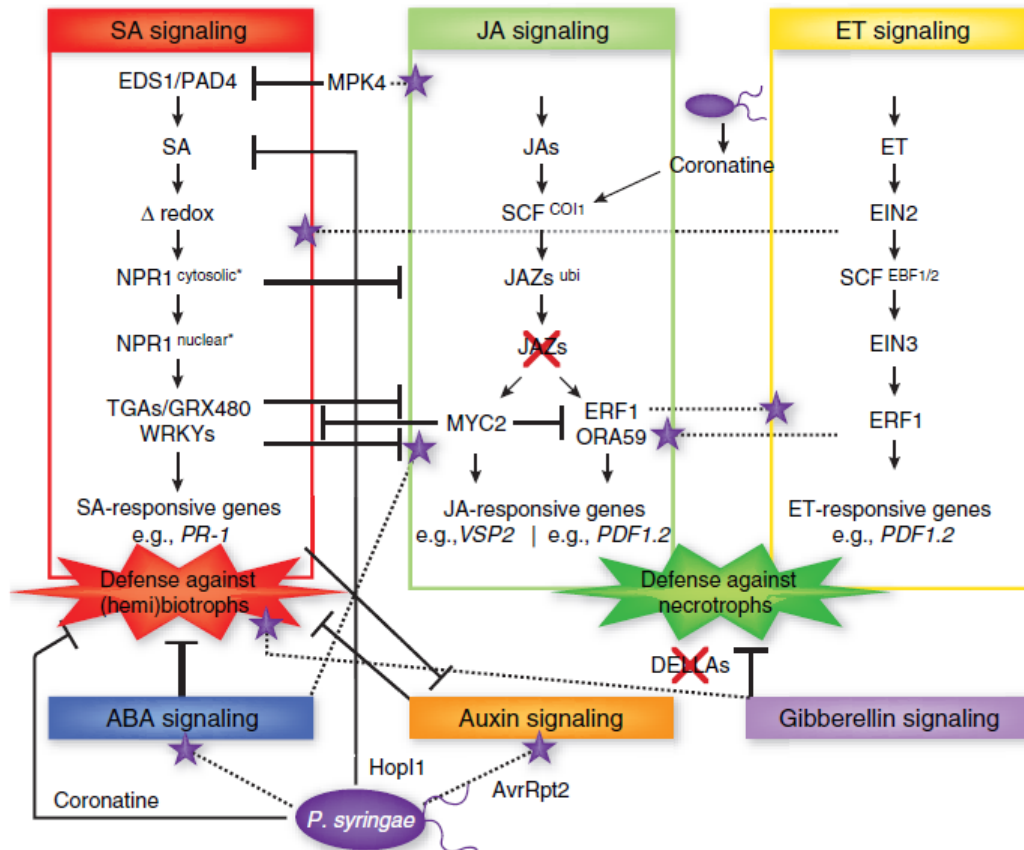
El ácido salicílico (AS) es una hormona involucrada principalmente en procesos de defensa local y sistémica frente a patógenos biótrosos y hemibiótrofos en la inducción de SAR (*Systemic Acquired Resistance*), aunque también participa en el crecimiento, desarrollo y senescencia vegetal (Huot *et al.*, 2014). La defensa mediada por AS puede activar o ser activada por MAPKs y finaliza en la activación de factores de transcripción para promover la expresión de genes PR (Andersen *et al.*, 2018). *PR1 (PATHOGEN RESPONSE1)* es uno de los genes *PR* más ampliamente estudiados que se expresa como respuesta a la síntesis y señalización por AS y la activación de factores de transcripción (Nobori *et al.*, 2018; Saharan y Pal, 2016). Otro gen que se activa por la vía del AS es *PAL (PHENYLALANINE AMMONIA LYASE)*, que codifica una enzima clave en la síntesis de AS a través del metabolismo de los fenilpropanoides y el incremento de contenidos fenólicos, para una respuesta de resistencia a enfermedades. También se ha reportado su participación en la resistencia inducida por el quitosán a través de vías señalizadas por AS (Sharif *et al.*, 2018; Pusztahelyi, 2018; Kiirika *et al.*, 2013).

El ácido jasmónico (AJ) es una hormona derivada de ácidos grasos, conocida por regular la defensa de la planta contra patógenos necrótrofos y daño por insectos; y es una vía antagónica a las mediadas por AS, lo que es usado por algunos patógenos biótrosos que pueden activar las vías del AJ/ET y así alterar la vía del AS, disminuyendo la capacidad de respuesta de la planta (Carvalhais *et al.*, 2013; Martínez-Medina *et al.*, 2013; Pieterse *et al.*, 2012). El AJ y su versión metilada (Metil jasmonato - MeJA), son sintetizados por enzimas como lipooxigenasas, alene-oxido-sintasas, alene-oxido-ciclasas, entre otras, y funcionan como molécula señal a nivel sistémico (Vidhyasekaran, 2016). El gen *LOXA (LIPOXYGENASE A)* codifica una enzima de la familia de las lipooxigenasas, involucrada en la síntesis de AJ, la cual activa señales de defensa en hojas de tomate por quitosán, por medio de la vía de los octadecanoides, siendo parte de la cascada de señalización que media la defensa frente a patógenos e insectos (Doares *et al.*, 1995). Esta señalización puede converger con vías del ET para activar factores de transcripción como *ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR1)*, un elemento clave en la estimulación de los genes de respuesta a patógenos necrótrofos (C. Jia *et al.*, 2013). El AJ también participa en las

respuestas a estreses abióticos y regula negativamente algunos aspectos de desarrollo (Huang *et al.*, 2017).

El etileno (ET) es una hormona gaseosa volátil y es otro importante componente de la respuesta de las plantas, que desencadena además de la señalización sistémica para la respuesta inmune, la expresión de genes de defensa (Pieterse *et al.*, 2012). ET actúa de forma sinérgica principalmente con AJ, pero también se ha descrito su interacción con AS de forma sinérgica y en otras como antagonista dependiendo del patosistema (Dmitriev, 2003).

Cada señal hormonal es percibida y transmitida por diferentes componentes de las vías de señalización y respuesta (Figura 3-1). Cuando se activa la vía del ácido salicílico, el gen *NPR1* (*NON EXPRESSOR OF PR GENES1*) es un importante regulador que, tras el aumento de AS, funciona como coactivador transcripcional de genes *PR* que regula la transcripción de proteínas antimicrobianas desencadenando una respuesta de defensa frente a patógenos biótropos (Pieterse *et al.*, 2012). Se ha planteado que la activación de *NPR1*, regula negativamente la vía de señalización del ácido jasmónico, siendo el AS y el AJ vías fuertemente antagónicas (Thaler *et al.*, 2012). Sin embargo, recientes estudios encontraron una vía en la cual las concentraciones de AS activan los receptores NPR3 y NPR4 que a su vez interactúan con JAZ, que hace parte del complejo represor de la síntesis de AJ, para inducir la síntesis de esta molécula. Este puede ser un mecanismo de vías asociadas a la defensa tanto para microorganismos biótropos como para necrótrofos (Liu *et al.*, 2016).



**Figura 3-1.** Modelo de la intercomunicación hormonal en la activación de respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana* L frente a *Pseudomonas syringae*. Las barras truncadas representan regulación negativa; las estrellas representan activación. Tomado de: Pieterse *et al.* (2009).

Por otro lado, la vía del AJ que se asocia principalmente con daño mecánico o por insectos, activa, por medio del factor de transcripción MYC2 (originalmente llamado *JIN1*, por *JASMONATE INSENSITIVE1*), la transcripción del gen *VSP2* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN2*). Las vías de señalización del ET y AJ son sinérgicas y se requiere de la activación de ambas para la transcripción de algunos genes *PR* como *PDF1.2* (*PLANT DEFENSINE 1.2*) y *VSP2* por medio de factores de transcripción como *ERF1* y *ORA59* (Andersen *et al.*, 2018). Adicionalmente, aunque ABA se ha asociado principalmente con la regulación en algunas fases de desarrollo y respuestas al estrés abiótico, juega un rol regulatorio al reprimir algunos de los genes involucrados en las vías de ET y AJ y antagonizar con la vía del AS (Pieterse *et al.*, 2009).

### 3.1.2 La fisiología de las plantas en la respuesta de defensa a patógenos

Todos los cambios a nivel molecular y bioquímico inducidos por el estrés biótico, desencadenan respuestas a nivel fisiológico en las plantas durante el ataque por patógenos. Algunos de los procesos fisiológicos que se ven afectados en las plantas por el ataque de patógenos son:

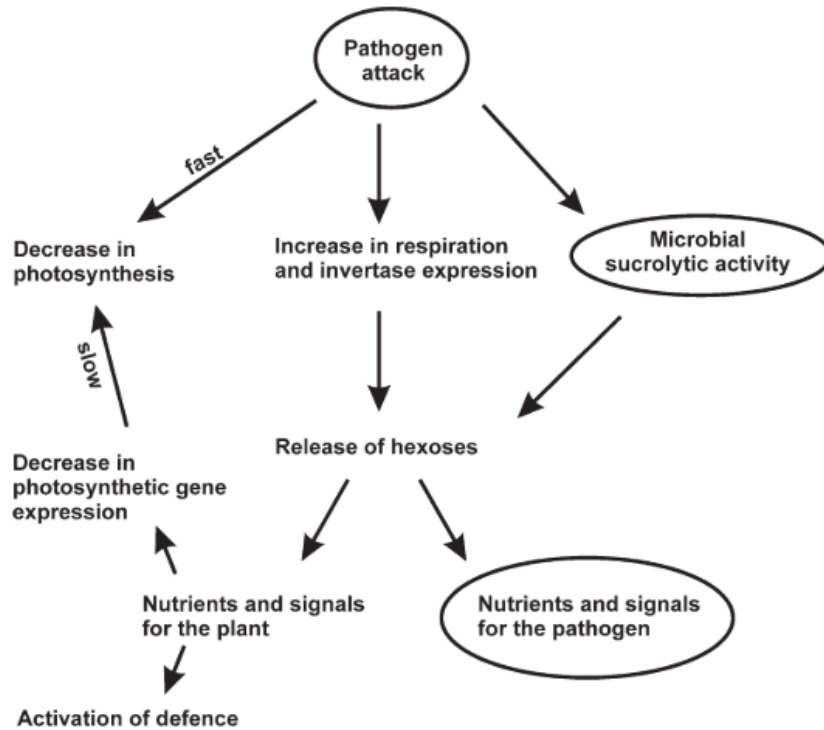
Fotosíntesis: la disminución en la conductancia estomática y concentración de clorofilas, afectan la tasa fotosintética de las plantas a través de alteraciones en procesos lumínicos de la fotosíntesis, el metabolismo del carbono y a su vez reducciones en la actividad y cantidad de enzimas relacionadas con el ciclo de Calvin (Walters, 2015). Estas alteraciones pueden originarse como respuesta a estreses abióticos y bióticos. Algunos patógenos alteran la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis e inducen la reducción de componentes esenciales en el complejo captador de luz y de fijación de carbono (Huot *et al.*, 2014). A pesar del costo metabólico que se genera en la respuesta de defensa, en ocasiones se observa un efecto compensatorio en células circundantes a zonas infectadas, donde la actividad fotosintética aumenta probablemente por el aumento en la demanda de fotoasimilados que deben ser traslocados para la respuesta en el tejido afectado (Berger *et al.*, 2007).

Conductancia estomática: el cierre estomático como respuesta a patógenos foliares, impide la entrada del microorganismo a través de los estomas, siendo ésta una de las primeras respuestas de la planta. Sin embargo, la inducción de apertura estomática es un mecanismo de virulencia usado por algunos patógenos como *Pseudomonas syringae* (Zeng *et al.*, 2010). Las vías de señalización para el cierre estomático están mediadas por la hormona ABA, MAPKs, la producción de ROS y de óxido nítrico (NO); las cuales son compartidas entre estreses bióticos y abióticos (Qi *et al.*, 2018). Por otro lado, en presencia de un patógeno vascular se presentan restricciones de movimiento de agua, por lo que, con el fin de mantener un equilibrio hídrico, la planta induce cierre estomático para evitar la pérdida de agua (Nankishore y Farrell, 2016).

Crecimiento: el crecimiento de las plantas frente a un estrés biótico, se ve principalmente afectado por la interferencia existente entre las vías de señalización del AS y AJ con hormonas de crecimiento como las auxinas, giberelinas y brasinosteroides, ya que el aumento en la síntesis de las hormonas de defensa, reprime la expresión de las hormonas



de crecimiento, resultado en la reducción de crecimiento en las plantas (Huot *et al.*, 2014). Adicionalmente, se presenta una alteración en el metabolismo de los carbohidratos (Figura 3-2), principalmente por los microorganismos biótrofos que pueden inducir al hospedero para aumentar la circulación apoplástica de hexosas que serán consumidas por el patógeno (Berger *et al.*, 2004).



**Figura 3-2.** Cambios en el metabolismo de los carbohidratos de las plantas ocasionados por patógenos biótrofos. Algunos patógenos pueden manipular el desdoblamiento de sacarosa en glucosa o fructosa por la planta para su alimentación y otros pueden afectar la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis. Algunos de estos cambios pueden ser detectados por las plantas para desencadenar una señal de respuesta (Berger *et al.*, 2007).

Fluorescencia de la clorofila: la clorofila en la hoja conforma un complejo pigmento-proteína en el fotosistema II (PSII), el fotosistema I (PSI) y en el complejo captador de luz (LHC por sus siglas en inglés). La energía lumínica en las longitudes de onda de 400 nm a 700 nm, es absorbida por las clorofilas y puede tomar tres vías: ser usada para la fotosíntesis (procesos fotoquímicos o *quenching* fotoquímico-PQ), disiparse en forma de calor (*quenching* no fotoquímico-NPQ) y ser reemitida como disipación de luz (fluorescencia) (Baker, 2008; Maxwell y Johnson, 2000). Cuando la planta se encuentra bajo condiciones de estrés, la fluorescencia de la clorofila es un buen indicador ya que proporciona

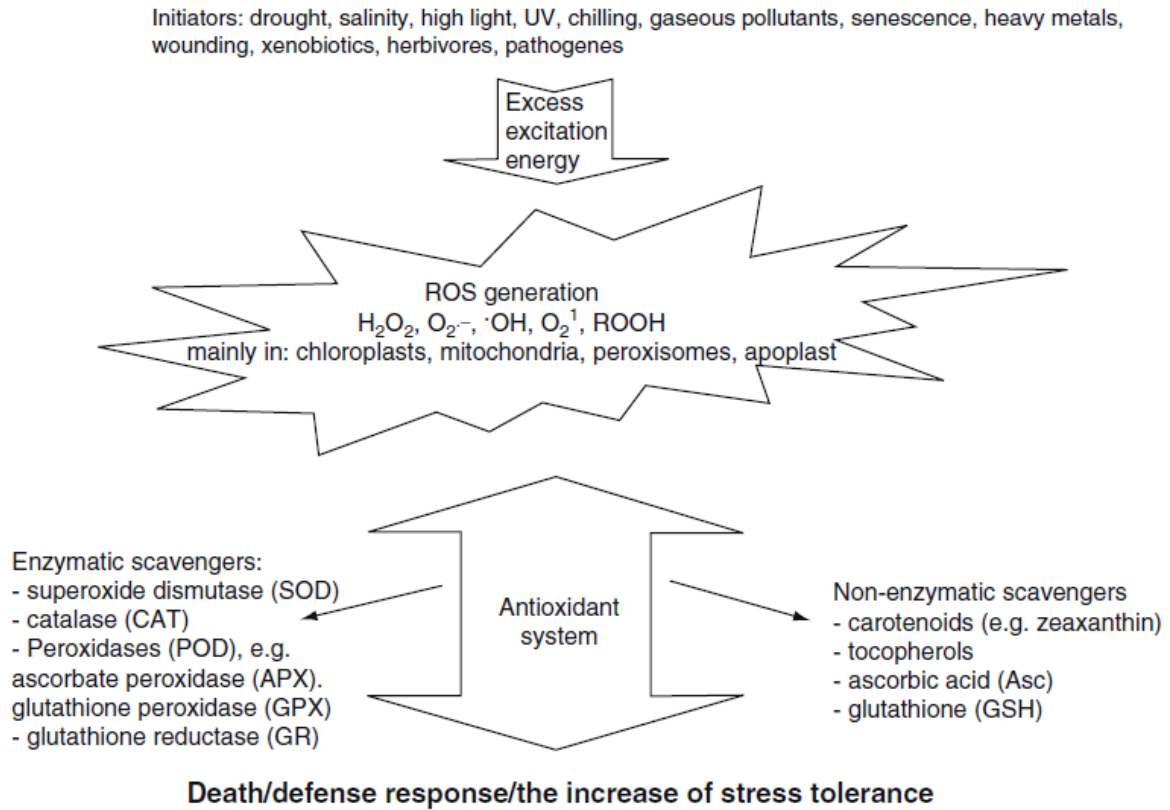
información sobre los cambios en la eficiencia de la fase fotoquímica y el estado del PSII (Melgarejo *et al.*, 2010).

La fluorescencia de la clorofila a constituye una variable sensible para evaluar los cambios en el estado fotosintético de la planta, que están directa o indirectamente relacionados con todos los estados de la fase lumínica de la fotosíntesis: fotólisis del agua, transporte de electrones, generación del gradiente de pH a través de las membranas del tilacoide y síntesis de ATP (Goltsev *et al.*, 2016).

*Respuesta oxidativa:* Las ROS como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^-$ ), y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) se producen de forma constante en la célula vegetal (en cloroplastos, mitocondria y peroxisomas) como resultado de procesos metabólicos que requieren transporte de electrones, pero esta producción es relativamente baja, es rápidamente reducida por el sistema antioxidante conformado por pigmentos, moléculas y enzimas antioxidantes (Tripathy y Oelmüller, 2012). En condiciones de estrés, el equilibrio oxidativo depende del sistema antioxidante (Figura 3-3). ROS también funcionan como respuesta de resistencia local para biótros, terminando generalmente en muerte celular; pero además es un mensajero secundario que señala el estrés de forma sistémica, induciendo cascadas de señalización que terminan en expresión de genes de defensa (Tripathy y Oelmüller, 2012; Fraire-Velázquez *et al.*, 2011).

Una de las moléculas que protege y estabiliza el ADN, las membranas y las proteínas de los daños por ROS en respuestas oxidativas es la prolina; un aminoácido conocido como chaperona química que se acumula como respuesta a estrés biótico y abiótico (Choudhary y Varma, 2016; Ben Rejeb *et al.*, 2014). Ante un evento de estrés hídrico, uno de los mecanismos usados por las plantas es ajustar el potencial osmótico celular para mantener su turgencia y volumen, con el fin de conseguir un continuo funcionamiento del aparato fotosintético, a través de la síntesis de solutos. La prolina es uno de los principales metabolitos que funciona como agente osmótico u osmoprotectante junto con la glicin-betaína, ectoína y los azúcares (fructosa, sacarosa, mioinositol, trehalosa y fructanos) que se acumulan en mayor cantidad en respuesta a estrés abiótico como sequía, salinidad, temperaturas extremas, radiación UV y metales pesados (Yang *et al.*, 2011; Ashraf y Foolad, 2007). El aumento en el contenido de prolina está asociado a la capacidad de tolerar eventos de estrés abiótico, tales como sequía, salinidad, altas temperaturas e inundación (Freitas de Campos *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Arbona *et al.*, 2010), y esta tolerancia

puede ser debida a su función como osmolito compatible y agente antioxidante protegiendo contra ROS (Freitas de Campos *et al.*, 2011).



**Figura 3-3.** Respuesta oxidativa de las plantas frente a estrés biótico y abiótico. El sistema antioxidante de la planta posibilita la regulación de los niveles de ROS, e influyen también la inducción de señales por ROS (Latowski *et al.*, 2010).

### 3.1.3 Desórdenes fisiológicos de la planta en interacción con *Fusarium spp.*

Las formas patogénicas de *F. oxysporum* afectan a la planta ingresando por las raíces, hasta alcanzar las células corticales y finalmente los haces vasculares, bloqueándolos con sus estructuras propagativas (Yadeta y Thomma, 2013). Junto con la secreción de efectores que bloquean la defensa de la planta y de toxinas que generan daño en las células vasculares, el bloqueo de los haces vasculares (por estructuras propagativas y formación de gomas, mucílago y tilosas) es una de las principales alteraciones fisiológicas que sufre la planta (Nogués *et al.*, 2002). Estas obstrucciones pueden resultar en una reducción en el flujo de agua de hasta el 95%, causando déficit hídrico, cierre estomático y reducción en la tasa de transpiración (Walters, 2015). En algunos casos, las heridas

generadas por el patógeno en su ingreso hasta el xilema, pueden causar cavitación en los haces vasculares, empeorando la obstrucción de los mismos (Brodersen y McElrone, 2013).

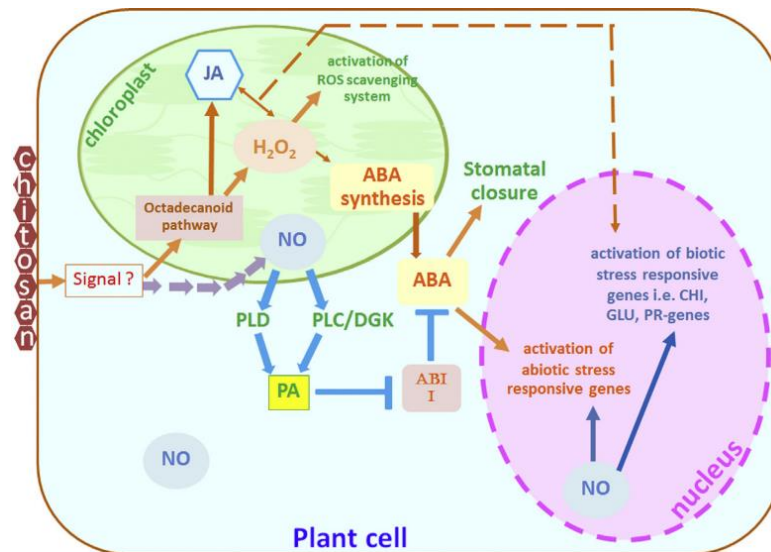
Se ha observado que el efecto de *F. oxysporum* en el desarrollo de síntomas de clorosis, se relaciona con la reducción de la fotosíntesis, debido al avance del patógeno por los tercios de la planta y a la producción del ácido fusárico (una de las principales toxinas producidas por el patógeno) que circula hacia las hojas, aunque estos efectos no se han reportado en tejidos distantes (hojas superiores) al punto de avance de la infección (Dong *et al.*, 2014; Maina *et al.*, 2008).

Varios estudios han demostrado los efectos negativos que causa *F. oxysporum* sobre la actividad fotosintética de la planta de tomate, reduciendo parámetros como la tasa de asimilación neta en 83-85%,  $Y(II)$  en 50%,  $F_v'/F_m'$  en 27% y  $qP$  en 28%. El estado hídrico de la planta también se afectó, con reducciones del 18% en el contenido relativo de agua (CRA), 65% en la conductancia estomática y una reducción significativa en el uso eficiente del agua (Pshibytko *et al.*, 2006; Nogués *et al.*, 2002; Lorenzini., 1997).

### **3.1.4 El quitosán y la activación de defensa en las plantas**

Todas las plantas, tienen un sistema de señalización que les permite responder en diferente medida a los ataques de patógenos. Las plantas pueden mejorar su capacidad defensiva contra futuros ataques de patógenos después de una “activación” inicial de su sistema inmune, por ejemplo, a través de los llamados elicitores o inductores de resistencia como el quitosán. Este fenómeno de pre-activación de la defensa se llama resistencia inducida y lleva a la planta a un estado de alarma. La resistencia inducida es de tipo general y confiere protección contra una amplia gama de patógenos. Esta protección de amplio espectro se basa en una activación más rápida y más fuerte de los mecanismos de defensa basales después de que la planta en estado de alerta (previamente tratada con inductores de resistencia) es expuesta al ataque de un patógeno. Dicha capacidad mejorada para expresar mecanismos de defensa basales durante el estado de alarma se denomina efecto “priming” (Beckers y Conrath, 2007). El quitosán es una de las moléculas más extensamente estudiada como un componente con capacidad de inducir dicha respuesta por diferentes vías (Orzali *et al.*, 2017).

Basados en múltiples estudios realizados usando quitosán en diferentes patosistemas, Pichyangkura y Chadchawan (2015), diseñaron un modelo general para describir el modo de acción del quitosán en la activación de la defensa de las plantas (Figura 3-4), donde la molécula se une a la membrana celular, iniciando una transducción de señales y generando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la vía de los octadecanoides y el óxido nítrico (NO) en los cloroplastos (Kauss *et al.*, 1989). El  $H_2O_2$  desencadena vías de síntesis para activar el sistema antioxidante y ABA, mientras NO regula la síntesis de ácido fosfatídico (PA) por medio de la fosfolipasa C (PLC) y las diacilglicerol kinasas (DGK) (Raho *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2005). PA aumenta la acción de ABA inhibiendo ABI1 (regulador negativo de ABA), y por su parte ABA induce cierre estomático y otras respuestas relacionadas con estrés biótico.  $H_2O_2$  coordina la actividad con el AJ para regular la expresión de genes de respuesta al estrés biótico (Zhang *et al.*, 2004).



**Figura 3-4.** Modelo del mecanismo molecular de activación de defensa de quitosán en las plantas mediado por señalización del AJ, ROS, ABA y NO para la activación de genes de defensa y de respuesta a estrés biótico. Las líneas gruesas muestran señales fuertes. Las líneas punteadas representan vías que aún no se han comprobado en detalle (ver texto) (Tomado de: Pichyangkura y Chadchawan, 2015).

El denominado efecto “*priming*” es un mecanismo por el cual la defensa de la planta es activada por un estímulo (físico, químico o biológico), de tal manera que cuando la planta se enfrenta al ataque por patógenos la respuesta es más rápida y fuerte que una respuesta de inducción de defensa por sí sola (Henry *et al.*, 2012). No obstante, el *priming* también se considera una parte intrínseca de la inducción de defensa, ya que los mecanismos de respuesta son similares, pero en el *priming*, la respuesta será más fuerte y más rápida, y

la preparación de la planta perdurará para estreses futuros (Mauch-Mani *et al.*, 2017). Este mecanismo implica un menor costo metabólico en la planta que la inducción de defensa directa y además le confiere capacidad de respuesta ante diferentes tipos de estrés, ya sean bióticos o abióticos (Walters *et al.*, 2013).

El mecanismo de *priming* ofrece la ventaja de la velocidad de respuesta, ya que un reconocimiento y activación de respuestas tardías, no evitarán el avance de la enfermedad (Conrath, 2011).

## 3.2 Materiales y métodos.

### 3.2.1 Evaluación de la respuesta fisiológica de plantas de tomate tratadas con quitosán frente a infección con *Fol*

Con la finalidad de conocer los efectos del tratamiento con quitosán (Qtsn) sobre la fisiología de la planta de tomate en la búsqueda de alternativas de manejo de la marchitez vascular, se establecieron bioensayos usando plantas de tomate variedad Santa Cruz Kada (Impulse semillas) de 30 días de edad, con el modelo de ensayo descrito en el numeral 2.2.3 (Determinación de control por parte de quitosán). Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas en cuarto de crecimiento con una temperatura promedio de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , humedad relativa de 70%, una luminosidad de  $90\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  y un fotoperiodo de 12 horas.

Los ensayos se establecieron en un arreglo completamente al azar con dos repeticiones en el tiempo. Se realizaron medidas repetidas a los 3, 6, 9, 12 y 15 ddi. Para los parámetros no destructivos se evaluaron 10 repeticiones en cada ensayo. Estas plantas fueron usadas al final de cada ensayo para determinar su masa seca. Para las evaluaciones destructivas se evaluaron 5 repeticiones para cada punto de muestreo y cada ensayo. La unidad experimental fue de 1 planta.

Los tratamientos evaluados fueron: (i) Control (testigo absoluto), (ii) Quitosán (Plantas tratadas con quitosán LMW  $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sin inoculación con *Fol59*), (iii) Qtsn+Fol (plantas tratadas con quitosán LMW  $2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e inoculadas con *Fol59*) y (iv) Patógeno (Plantas inoculadas con *Fol59*). Se evaluaron las siguientes variables fisiológicas:

Fluorescencia de la clorofila a: para la determinación de la respuesta de las variables eficiencia cuántica fotoquímica máxima potencial del PSII ( $F_v/F_m$ ), eficiencia fotoquímica del PSII ( $Y(II)$ ) y la disipación fotoquímica de la energía ( $qP$ ); relacionadas con la fluorescencia de la clorofila se usó un fluorómetro modulado miniPAM II (Walz Germany®) sobre el foliolo terminal de la tercera hoja completamente expandida de cada planta. Todas las mediciones se iniciaron a las ocho de la mañana terminando a las 10 de la mañana, sobre la sección media del mismo foliolo.

Conductancia estomática: para medir la conductancia estomática y tener un acercamiento al estado hídrico de las plantas tratadas, se utilizó un porómetro de hoja SC-1 (Decagon® - USA) y se midió en el segmento medio del foliolo terminal de la tercera hoja completamente expandida de cada planta. Todas las mediciones se realizaron a las ocho de la mañana sobre la sección media del mismo foliolo.

Contenido relativo de agua (CRA): con el fin de calcular el CRA en las plantas de tomate, se tomó un foliolo de la tercera hoja y se determinó su masa fresca a los 3, 6, 9, 12 y 15 ddi. Seguidamente, cada foliolo fue ubicado en condiciones de saturación de agua con agua destilada estéril, por ocho horas a 4 °C, y luego se determinó su masa a plena turgencia. Después, el tejido se llevó a un horno de secado a 60 °C por 48 horas hasta obtener peso constante y así determinar su masa seca. El CRA se calculó a partir de la siguiente ecuación (Melgarejo *et al.*, 2010):

$$CRA = \frac{mf - ms}{mt - ms}$$

Donde *mf* es masa fresca; *ms* es masa seca y *mt* es masa a plena turgencia.

Contenido de prolina: para determinar el contenido de prolina en hojas de tomate bajo los diferentes tratamientos, se usó el método de Bates *et al.*, (1973) modificado por Ábrahám *et al.*, en (Walker, 2010). Se tomaron 100 mg de tejido fresco de hoja, se depositaron en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se maceraron en nitrógeno líquido. Se les adicionó 500 µL de ácido sulfosalicílico al 3% y se centrifugó por 5 minutos a 15.000 g. Se recuperó el sobrenadante y en un tubo nuevo se preparó una reacción de 100 µL de ácido sulfosalicílico al 3%, 200 µL de ácido acético glacial, 200 µL de ninhidrina ácida y 100 µL del sobrenadante del paso anterior. Esta mezcla se incubó al baño maría a 96 °C por una hora, luego de la cual los tubos se transfirieron a hielo.

Las muestras se extrajeron adicionando 1 mL de tolueno a la reacción, se agitó por 20 segundos y se dejó reposar por cinco minutos. El sobrenadante fue recuperado para realizar las lecturas de absorbancia a 520 nm usando tolueno como blanco, en un lector de microplacas por espectrofotometría (Biotek® - USA). El contenido de prolina se calculó en mg.g<sup>-1</sup> de peso fresco usando como fórmula de ajuste la resultante de una curva patrón realizada previamente (Anexo 11).



Contenido de clorofilas y carotenoides: para determinar el contenido de clorofila a, b, y carotenoides se utilizó el método de Wellburn (1994) modificado por Rojas-Tapias *et al.*, (2012). Se tomaron 10 mg de tejido fresco y se almacenaron en un tubo de microcentrífuga de 2 mL de capacidad. A cada muestra se le adicionó 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) y se incubó durante dos horas al baño maría a 96 °C hasta que el tejido quedó completamente blanco. El contenido de clorofilas se calculó en  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a partir de las lecturas de la absorbancia a 649 nm, 665 nm para clorofilas y 480 nm para carotenoides, en un lector de microplacas por espectrofotometría (Biotek® - USA); para ello se usaron las siguientes fórmulas (Wellburn, 1994):

$$C_a = 12.19A_{665} - 3.45A_{649} \quad C_b = 21.99A_{649} - 5.32A_{665}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{480} - 2.14C_a - 70.16C_b}{220}$$

Donde  $C_a$  son las clorofilas a;  $C_b$  con las clorofilas b y  $C_{x+c}$  son los carotenoides.

Determinación cualitativa de muerte celular: Para visualizar si ocurrió muerte celular en los tejidos de hojas, se usó el protocolo descrito por Soto-Suárez *et al.*, (2017) con algunas modificaciones. Se tomaron folíolos de 5 plantas de cada tratamiento a los 6 ddi y se sumergieron en una solución al 25% de azul de tripán. Las muestras se tiñeron durante 20 minutos en un baño serológico a 95 °C. Posteriormente las hojas fueron retiradas de la tinción y decoloradas en etanol absoluto durante toda la noche en agitación constante. Las muestras se observaron en el microscopio óptico a 10X.

Masa seca: A los 15 ddi, se tomaron plantas completas, se retiraron del sustrato, se lavaron con agua corriente y se secaron a 60 °C durante 48 horas y se determinó su masa seca, con el fin de observar si existen diferencias en la acumulación de fotoasimilados en plantas con los diferentes tratamientos.

Análisis de los datos: Todos los datos se sometieron a prueba de homogeneidad de varianzas de Barlett y de acuerdo con la normalidad de los datos, se realizó una comparación de medias de Tukey o prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con una significancia ( $\alpha$ ) de 0.05, usando el software Statistix versión 8.0.

### 3.2.2 Evaluación de la respuesta molecular de plantas de tomate tratadas con quitosán, en interacción con *Fol*

Debido a que el quitosán se ha reportado como inductor de resistencia en plantas, se utilizó un análisis de expresión diferencial de genes de defensa con el objetivo de determinar si la reducción de la marchitez vascular en plantas de tomate tratadas con quitosán, está asociado al mecanismo de *priming* en la planta.

Condiciones del bioensayo: plantas de tomate de 30 días de edad de la variedad Santa Cruz Kada, se trataron con 10 mL por planta de quitosán de bajo peso molecular a una concentración de 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>. Después de 24 horas de la aplicación del producto, las plantas fueron inoculadas con la cepa *Fol59*, usando el método de inmersión de raíz descrito en el numeral 2.3.3. Las plantas inoculadas con *Fol59* se incubaron en las condiciones descritas en el capítulo 2 (numeral 2.3.3) durante 48 horas. Cumplido este tiempo, las plantas se colectaron, las raíces se lavaron con agua corriente hasta retirar las partículas de suelo adheridas y finalmente se lavaron con agua destilada estéril. Rápidamente se separó la parte aérea (tallo y hojas) de la parte radical y se congelaron en nitrógeno líquido para detener cualquier proceso enzimático en la planta y evitar la degradación de los ácidos nucleicos. La parte aérea y radical de cada planta se almacenó por separado a -80 °C hasta su procesamiento.

Los tratamientos evaluados fueron: (i) Control (testigo absoluto), (ii) Quitosán (Plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> sin inoculación con *Fol59*), (iii) Qtsn+Fol (plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> e inoculadas con *Fol59*) y (iv) Patógeno (Plantas inoculadas con *Fol59*). Todos los tratamientos se evaluaron por triplicado y se realizaron tres repeticiones en el tiempo.

Extracción de ARN total de tejido de tomate: Para obtener el ARN total de las plantas de tomate se usó el protocolo de (Yockteng *et al.*, 2013). Se procesaron por separado el tejido aéreo (tallo y hojas) y tejido de raíz. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se depositaron 100 mg de tejido macerado en nitrógeno líquido y se añadieron 600 µL de *Plant RNA Reagent* (Invitrogen®) enfriado a 4 °C y se centrifugó a 12,000 g (gravedades) por 15 minutos a 4 °C. Se mezcló el sobrenadante con 100 µL de NaCl y 300 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4 °C. Luego, el sobrenadante fue precipitado con ¾ de volumen de LiCl y ¼ de volumen de alcohol isopropílico a -80 °C durante 1 hora. Finalmente, las muestras se centrifugaron a

12,000 g por 30 minutos y el precipitado se lavó una vez con etanol frío al 75% y se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua con DEPC. La calidad del ARN fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y usando espectrofotometría a una relación de 260/280 y 260/230 para determinar su concentración y pureza con un equipo NanoDrop-ND-1,000.

PCR cuantitativa en tiempo real qRT-PCR: con el ARN total extraído se sintetizó el ADN complementario usando el kit comercial iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad®) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Seguidamente, se realizó la qRT-PCR usando 1  $\mu$ g de la concentración inicial del ARN, en una dilución 1:16 del cDNA con el kit comercial iScript™ One-Step RT-PCR Kit con SYBR® Green (Bio-Rad). Cada reacción fue realizada por triplicado y la expresión relativa se calculó usando como normalizador el gen *EF1a* de tomate, con el cual se compararon los valores promedio de  $\Delta$ CT siguiendo la metodología usada por Soto-Suárez *et al.*, (2017). Los cebadores usados se citan en la tabla 3.1.

**Tabla 3-1.** Cebadores usados para la determinación de la expresión diferencial de genes relacionados con vías de respuesta de resistencia en plantas de tomate, mediante qRT-PCR.

Nombre cebador	Secuencia	Gen y ruta de señalización	Fuente
LeEF1aqF	GATTGGTGGTATTGGAAGTCTC	<i>EF1a</i> , gen normalizador. Factor de elongación tomate	(Martínez-Medina <i>et al.</i> , 2013)
LeEF1aqR	AGCTTCGTGGTGCATCTC		
LeERF1qF	GAGGGGTCCTTGGTCTCTACTC	<i>ERF1</i> , Factor de respuesta a etileno y ácido jasmónico	(Huang <i>et al.</i> , 2004)
LeERF1qR	ACAGCAGCTGGAGATAATCCAT		
LeLOXAqF	GAAAAACCCCGATAAGGCAT	<i>LOXA</i> , Lipooxigenasa A, inducida por MeJA (Metil jasmonato)	(León, 2013)
LeLOXAqR	AGGAGACTCTCGTTGTCCGA		
LePALqF	CGTTATGCTCTCCGAACATC	<i>PAL</i> , Fenil alanina amonio liasa, biosíntesis de SA	(Martínez-Medina <i>et al.</i> , 2013)
LePALqFR	GAAGTTGCCACCATGTAAGG		
LePR1aqF	GTGGGATCGGATTGATATCCT	<i>PR1a</i> , Inducible por ácido salicílico	(Martínez-Medina <i>et al.</i> , 2013)
LePR1aqR	CCTAAGCCACGATACCATGAA		

Análisis de datos. Los datos fueron analizados usando el paquete Statistix 8.0 para determinar la homogeneidad de varianzas de Barlett y comparación de medias de Tukey o prueba no paramétrica Kruskal-Wallis con una significancia ( $\alpha$ ) de 0.05.

Con el fin de determinar a nivel histológico la capacidad protectora de quitosán sobre las plantas de tomate infectadas con *Fo/59*, se tomaron folíolos de las plantas de los bioensayos, y se trataron con azul de tripán para visualizar la muerte celular. Los folíolos se tomaron 3 ddi y se sumergieron en una solución de azul de tripán y luego durante 10 minutos en un baño serológico a 95 °C. Las hojas se decoloraron durante toda la noche en etanol al 96% en agitación y las muestras fueron visualizadas en microscopio óptico a 10X en busca de las células muertas que quedan teñidas de color azul intenso.

### 3.3 Resultados y discusión

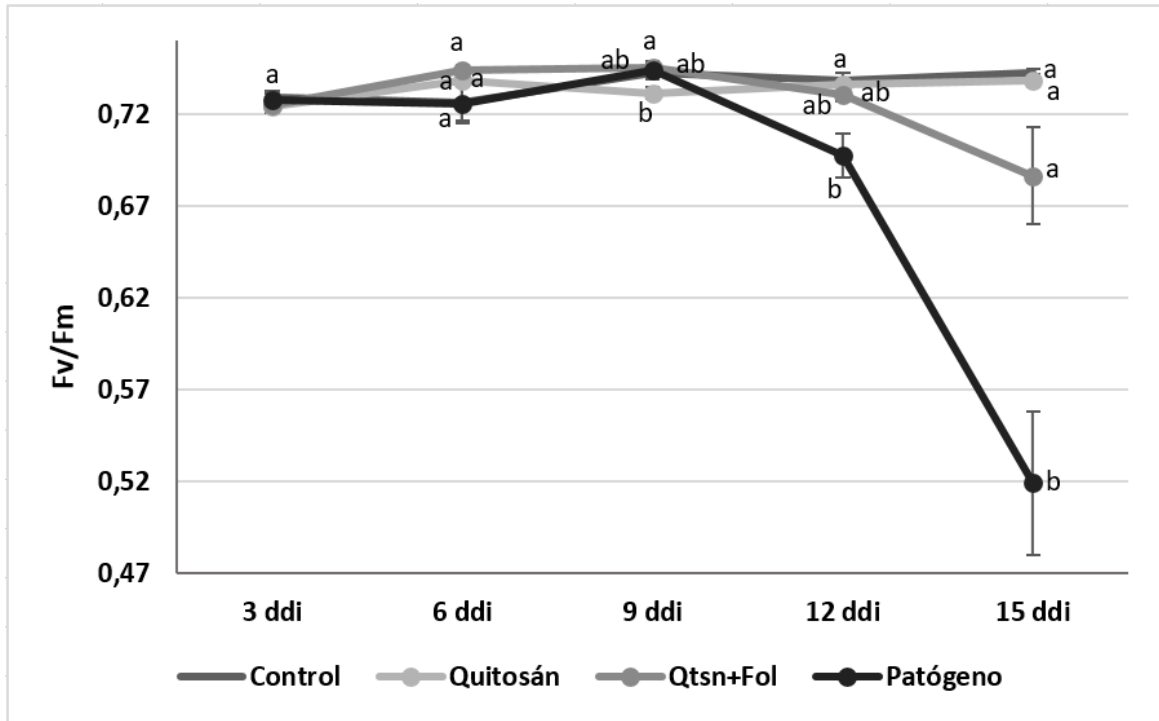
#### 3.3.1 Respuesta fisiológica de plantas de tomate tratadas con quitosán frente a infección con *FoI*

La medición de variables relacionadas con la fluorescencia de la clorofila a, como Fv/Fm, Y(II) y qP permite indicar si existe inhibición o disminución en alguno de los procesos fotosintéticos por el estrés generado en la planta de tomate por parte de *Fo/59* y además evaluar si la aplicación de quitosán mitiga el daño causado.

En la figura 3-5, puede observar la disminución en el Fv/Fm en los tratamientos inoculados con *Fo/59* (Qtsn+Fol y Patógeno) después de 9 ddi. Durante los primeros 9 ddi el Fv/Fm se mantuvo estable en todos los tratamientos, por encima de 0.72 y a partir del día 9 se observó una disminución que alcanzó el 70% a los 15 ddi en las plantas inoculadas, con respecto al control. En las plantas del tratamiento Qtsn+Fol, el Fv/Fm se redujo un 7.5% con respecto al control y presentó diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento patógeno (*Fo/59*).

El Fv/Fm, representa la cantidad de luz absorbida por el PSII para la reducción de la plastoquinona A y se ha reportado su disminución en condiciones de estrés en plantas, incluyendo tomate (Zhou *et al.*, 2015; Kalaji *et al.*, 2012). Esto que demuestra que el quitosán mitiga los daños ocasionados en el PSII como consecuencia de las alteraciones por la infección. Wagner *et al.* (2006) reportaron valores de 0.343 en la Fv/Fm en plantas de tomate infectadas por *F. oxysporum* en relación con los niveles de severidad de la enfermedad (92% de severidad), señalando esta variable como un indicador adecuado del estrés ocasionado por la infección.

Por otra parte, valores estables en los tratamientos control y quitosán (sin inoculación), sugieren el potencial de uso de quitosán en plantas sin que el aditivo ocasione efectos fitotóxicos.

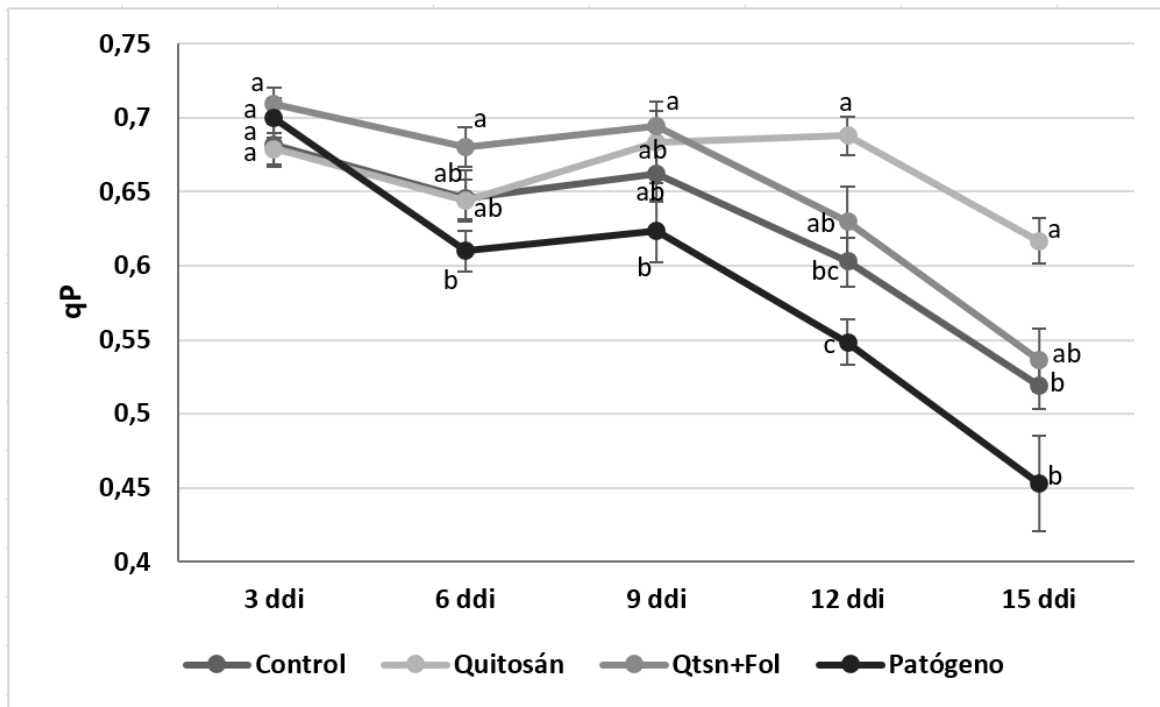


**Figura 3-5.** Eficiencia cuántica fotoquímica máxima potencial del PSII ( $F_v/F_m$ ) a través del tiempo en plantas de tomate tratadas con quitosán e inoculadas con *FoI59*. Control: testigo absoluto, Quitosán: Plantas tratadas con quitosán LMW  $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  sin inoculación con *FoI59*, Qtsn+Fol: plantas tratadas con quitosán LMW  $2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e inoculadas con *FoI59* y Patógeno: Plantas inoculadas con *FoI59* ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.000$ ;  $F=15.3$ ;  $gl=79$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Las barras de error representan el error estándar. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas ( $n=20$ ).

Los cambios en  $F_v/F_m$  se consideran el indicador más sensible de la fotoinhibición como consecuencia de un estrés severo y del daño en el aparato fotosintético (Goltsev *et al.*, 2016); en este caso, dichos cambios se detectaron simultáneamente con la aparición de síntomas en las hojas evaluadas, lo cual indica que antes de los primeros 12 ddi, no ocurren daños en el PSII, ligados a la infección temprana de *FoI59* en tejidos distantes (hojas) al sitio de infección (raíz). En este contexto, se puede decir que la supresión en la fotosíntesis por daños en el PSII, está ligada a la aparición de los síntomas. La disminución en  $F_v/F_m$  se relaciona teóricamente con la disminución en la disponibilidad de centros de reacción del PSII, lo que indica daños fotoquímicos como consecuencia de una

disminución en la capacidad de captar o aprovechar los fotones que inciden en el complejo captador de luz por alteraciones provocadas por el patógeno.

La disipación fotoquímica (qP) es un indicador del estado de los centros de reacción del PSII. De esta manera, permite conocer cómo se distribuye la energía fotónica una vez percibida por el complejo antena y cuánto de esa energía se dirige a las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis. En la figura 3-6, se observa que este parámetro es más sensible que el Fv/Fm, disminuyendo significativamente de forma temprana en el tratamiento patógeno 6 ddi. En general, se observó una disminución constante del qP a través del tiempo, lo cual puede estar relacionado con el proceso de maduración de la hoja evaluada (Sobrado, 1994). El tratamiento patógeno presentó una disminución del 15.5% en qP (0.45) con respecto al tratamiento Qtsn+Fol, que presentó un valor de 0.51 aunque esta diferencia no fue significativa.



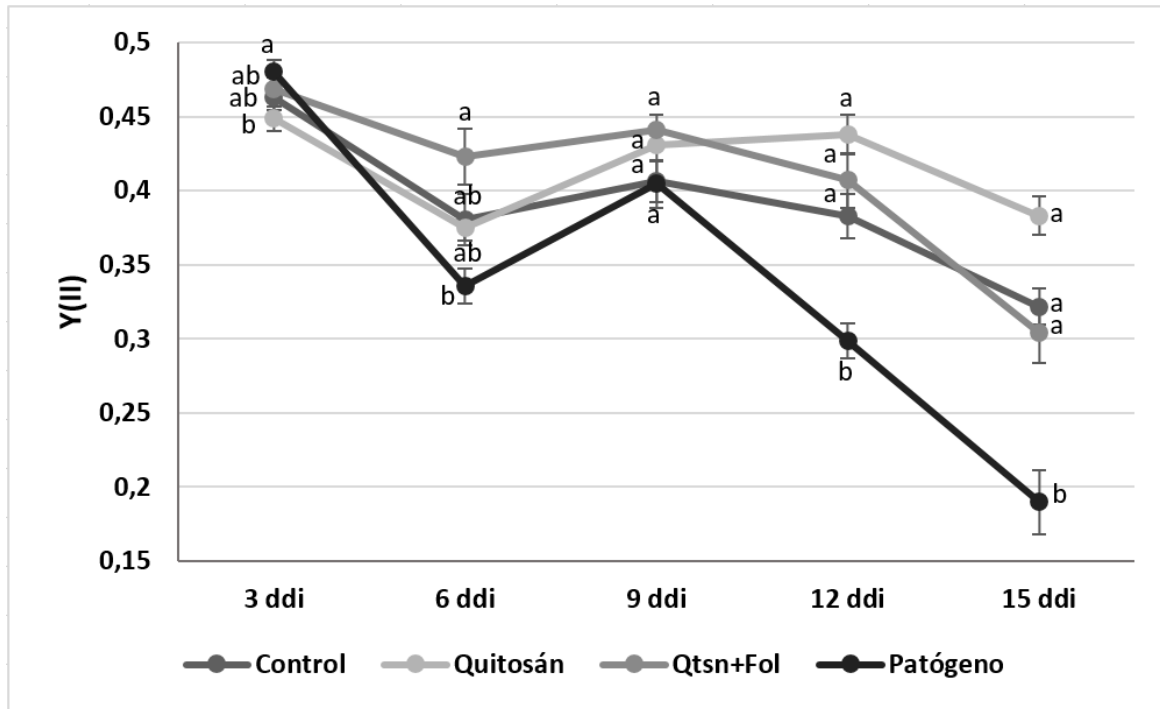
**Figura 3-6.** Disipación fotoquímica (qP) de la energía a través del tiempo en plantas de tomate tratadas con quitosán e inoculadas con *Fo/59*. Control (testigo absoluto), Quitosán (Plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> sin inoculación con *Fo/59*), Qtsn+Fol (plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> e inoculadas con *Fo/59*) y Patógeno (Plantas inoculadas con *Fo/59*) ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.0001$ ;  $F=8.55$ ;  $gl=79$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Las barras de error representan el error estándar. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas (n=20).

Estos valores indican que una parte de los centros de reacción del PSII de las plantas en el tratamiento patógeno fueron afectados y se encuentran en su mayoría cerrados, lo que ocurre en menor medida en los demás tratamientos. Este estado de oxidoreducción en las plastoquinonas induce la incapacidad de transmitir los electrones desde el PSII hacia el PSI y esto puede ser el resultado de daños en las membranas y las proteínas (plastocianinas, ferredoxinas, citocromo  $b_6/f$ ), tal y como se ha evidenciado en los resultados de la  $F_v/F_m$ . El hecho de que el  $qP$  se haya visto afectado más tempranamente (a los 6 ddi) que la tasa  $F_v/F_m$ , sugiere que la disipación de la energía no absorbida para procesos fotoquímicos, provocada por el estrés podría estar ocurriendo por un mecanismo diferente a la fluorescencia, como la disipación por calor.

En otros trabajos se observaron reducciones de 27% en  $F_v/F_m$  y 28% en  $qP$  (Nogués *et al.*, 2002) y de 24% en  $F_v'/F_m'$  y 58% en  $qP$  (Segarra *et al.*, 2010) en plantas de tomate infectadas con *Fol* a los 31 ddi. En este trabajo las reducciones en esas variables se presentaron a los 15 ddi y en todos los estudios los parámetros evaluados no se afectaron en los estados iniciales de la infección (desde los 6 hasta los 12 ddi) en las hojas del tercio superior, lo que sugiere que el daño en el PSII puede ser la consecuencia de alteraciones causadas por las limitaciones en la toma de agua y cierre estomático que produce la invasión del patógeno en el xilema.

Así como en el  $qP$ , la variable  $Y(II)$  se redujo considerablemente en las plantas infectadas 6 ddi (Figura 3-7), con una recuperación temporal 9 ddi, luego de la cual el tratamiento patógeno se diferenció de los demás. La reducción en el  $Y(II)$  refleja una disminución en la capacidad del PSII de dirigir la energía absorbida hacia la producción de moléculas energéticas (ATP y NADPH).

El tratamiento Qtsn+Fol mitigó en un 36% la disminución en  $Y(II)$  provocada por *Fol59* en el tratamiento patógeno presentando diferencias significativas. En las plantas sin infectar tratadas con quitosán, los valores de  $Y(II)$  son visualmente (aunque no estadísticamente) mayores a los de plantas del control absoluto, sugiriendo una sutil mejora en el desempeño fotoquímico del aparato fotosintético. Junto con los resultados en  $F_v/F_m$ , se observó que el quitosán ofrece una reducción de los efectos negativos que ejerce el patógeno sobre la fase fotoquímica de la fotosíntesis en el PSII de la planta de tomate.



**Figura 3-7.** Eficiencia fotoquímica del PSII (Y(II)) a través del tiempo en plantas de tomate tratadas con quitosán e inoculadas con *Fol59*. Control (testigo absoluto), Quitosán (Plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> sin inoculación con *Fol59*), Qtsn+Fol (plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> e inoculadas con *Fol59*) y Patógeno (Plantas inoculadas con *Fol59*) ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.000$ ;  $F=18$ ;  $gl=79$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Las barras de error representan el error estándar. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas ( $n=20$ ).

Los resultados presentados sugieren que la infección por *Fol* tiene un efecto negativo sobre la efectividad en el complejo captador de luz en los centros de reacción del PSII. Resultados similares reportaron Nogués *et al.* (2002) que observaron una disminución del 50% en Y(II) en las plantas infectadas con *Fol* con respecto al control; y Pshibytko *et al.* (2006) quienes además encontraron una reducción en la actividad de la Rubisco, argumentando que el decrecimiento en la tasa de transporte de electrones, se debe principalmente a la inhibición del flujo de aceptores en la quinona A (Q<sub>A</sub>) del lado aceptor del PSII. Los mismos resultados son sugeridos por los datos obtenidos en las mediciones de la Fv/Fm y tasa de transferencia de electrones (ETR) (Anexo 12) en este trabajo.

Conductancia estomática: dado que *Fol* es un patógeno vascular, la obstrucción los haces vasculares puede alterar la toma de agua del suelo (Yadeta y Thomma, 2013). En relación a esto, a los 9 ddi con *Fol59*, las plantas presentaron una reducción de 64% en la conductancia estomática (Anexo 14) con respecto a las plantas no infectadas indicando



una repuesta a la limitación hídrica por el aumento en la resistencia del flujo de agua en el xilema.

La gs sufrió una disminución significativa, como efecto de la invasión del patógeno en los haces vasculares, lo que se observó en los tratamientos inoculados comparados con los no inoculados. Aunque la conductancia estomática en las plantas del tratamiento Qts+Fol 9 ddi, fue 40% mayor al tratamiento patógeno, no se presentaron diferencias significativas entre estos tratamientos. De la misma manera, a los 15 ddi el tratamiento patógeno redujo la gs en 87%, mientras en el tratamiento Qtsn+Fol la gs se redujo en un 57% con respecto al control (Tabla 3-2). Esto indica que las plantas infectadas y tratadas con quitosán no presentaron las mismas limitaciones hídricas que las plantas infectadas sin tratar, por lo que no cerraron la misma proporción de estomas, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas.

**Tabla 3-2.** Conductancia estomática (gs) ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.000$ ;  $F=35.2$ ;  $gl=39$ ); contenido relativo de agua (CRA) ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.0376$ ;  $F=3.13$ ;  $gl=39$ ); contenido de clorofila a, clorofila b, carotenoides ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.0008$ ;  $F=6.94$ ;  $gl=39$ ) y prolina ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.000$ ;  $F=10.4$ ;  $gl=39$ ) en plantas de tomate inoculadas con *Fol59* y tratadas con quitosán, 15 ddi. Absoluto (control), Quitosán (Plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> sin inoculación con *Fol59*), Qtsn+Fol (plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> e inoculadas con *Fol59*) y Patógeno (Plantas inoculadas con *Fol59*). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas (n=10)

Tratamiento	gs	CRA	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides	Prolina
<b>Absoluto</b>	272.57±30.97 <sup>a</sup>	0.746±0.051 <sup>ab</sup>	6.002±0.154 <sup>a</sup>	2.182±0.055 <sup>a</sup>	0.661±0.020 <sup>a</sup>	0.040 ±0.0002 <sup>c</sup>
<b>Quitosán</b>	290.84±28.00 <sup>a</sup>	0.810±0.045 <sup>a</sup>	6.880±0.147 <sup>a</sup>	2.479±0.048 <sup>a</sup>	0.827±0.031 <sup>a</sup>	0.040±0.0003 <sup>bc</sup>
<b>Quitosán+Fol</b>	131.91±20.54 <sup>ab</sup>	0.671±0.055 <sup>ab</sup>	6.500±0.150 <sup>a</sup>	2.264±0.050 <sup>a</sup>	0.884±0.027 <sup>a</sup>	0.043 ±0.003 <sup>ab</sup>
<b>Patógeno</b>	33.09±3.56 <sup>b</sup>	0.592±0.051 <sup>b</sup>	3.674±0.199 <sup>b</sup>	1.332±0.061 <sup>b</sup>	0.594±0.039 <sup>a</sup>	0.045 ±0.003 <sup>a</sup>

La marchitez vascular por *Fusarium* se ha asemejado con un estrés hídrico (Duniway, 1971); incluso algunos estudios han confirmado que la reducción en la actividad fotosintética ocasionada por *Fol*, se relaciona fuertemente con el estado hídrico de la planta y las limitaciones en la toma de CO<sub>2</sub> como consecuencia del cierre estomático (Nogués *et al.*, 2002; Lorenzini *et al.*, 1997). Esto podría explicar en parte el daño causado al PSII, evidenciado en el FV/Fm y Y(II).

La conductancia estomática es una variable que permite determinar las relaciones hídricas en la planta y su capacidad de mantener un balance en diferentes condiciones; y es una de las primeras variables afectadas durante el progreso de la enfermedad (Segarra *et al.*, 2010). En este caso el cierre estomático en las plantas infectadas permite disminuir la pérdida excesiva de agua en condiciones de escasez, situación que puede darse ya que *Fol59* aumenta la resistencia del agua para ascender por el xilema, causando una respuesta similar a la del estrés hídrico.

Uno de los principales roles del quitosán al ser aplicado en las plantas en aspersión a las hojas, es la inducción de cierre estomático principalmente mediado por ABA para conducir a una baja transpiración y disminuir la pérdida de agua (Iriti *et al.*, 2009); sin embargo los resultados de este trabajo son contrastantes en las plantas tratadas con quitosán sin inoculación, ya que en este tratamiento la conductancia estomática es mayor a la presentada en el tratamiento control, pero esto probablemente se deba a que en este caso, la aplicación del quitosán se realizó dirigida al suelo. Con esta información, es válido asegurar que el cierre estomático en las plantas infectadas es una respuesta a un desbalance hídrico por la dificultad de toma de agua del suelo, lo que reduce el potencial hídrico de la planta.

Contenido relativo de agua (CRA): durante los primeros 6 ddi (momento en el que aparecen los primeros síntomas de la enfermedad), el CRA no varió en ninguna de las plantas evaluadas. Después del día 9, el CRA comenzó a disminuir significativamente en las plantas inoculadas con *Fol59* (Tabla 3-2). Es de resaltar que, en adelante CRA fue 10% mayor en el tratamiento con las plantas tratadas con el quitosán no infectadas (Anexo 14), lo que puede indicar que el quitosán mejora el uso eficiente del agua de la planta en condiciones sin estrés, aunque este efecto no es suficiente para mitigar la pérdida de agua cuando la planta se encuentra frente al estrés por *Fol*, ya que los valores de CRA no se diferencian significativamente entre las plantas inoculadas tratadas y no tratadas con quitosán.

Contenido de prolina: el contenido de prolina en las plantas tratadas comenzó a variar a los 6 ddi, siendo significativamente mayor en los tratamientos donde las plantas fueron inoculadas (Anexo 14). Hacia el día 9 las plantas tratadas con quitosán, pero sin inoculación con *Fol59*, presentaron mayor concentración de prolina que las plantas control. Hacia el día 12 no se presentaron diferencias significativas y 15 ddi se presentaron valores

significativamente mayores en las concentraciones de prolina de las plantas inoculadas con *Fo/59* y tratadas con quitosán (Tabla 3-2). Estos resultados indican que el aumento en el contenido de prolina hacia el día 15, es una respuesta frente al estrés osmótico generado por el patógeno en las plantas, pero no fue una respuesta debida a la aplicación de quitosán por sí solo.

De acuerdo con los resultados previos en gs y CRA (indicadores de limitaciones a nivel hídrico en la planta), la prolina aumentó en las plantas de tomate inoculadas para mantener el ajuste osmótico de las células de las hojas, al reducir su contenido de agua.

La disminución en la conductancia estomática y en el contenido relativo de agua también pueden explicar las razones fundamentales por las que suceden las limitaciones a nivel de transporte de electrones visualizados en los resultados de los parámetros de fluorescencia en los tratamientos inoculados con *Fo/59*. Así, la conductancia hidráulica del xilema se reduce, induciendo cierre estomático y siendo una de las causas aparentes de la reducción en la tasa de fotosíntesis, como resultado de la escasez de agua en las hojas y la disminución en la toma de CO<sub>2</sub> (Nankishore y Farrell, 2016; Walters, 2015; Pshibytko *et al.*, 2006).

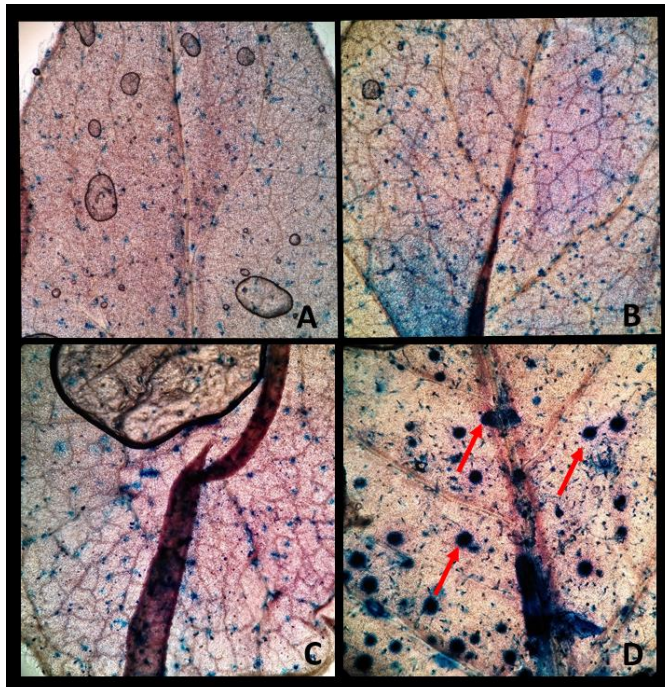
La reducción del CRA en las plantas inoculadas con y sin quitosán, se puede relacionar con una posible disminución en el potencial hídrico de la planta, como resultado del cierre estomático, a la vez que el aumento de prolina en estas plantas es una respuesta para mantener el ajuste osmótico durante la infección siendo un indicador del estrés por la colonización del patógeno y la obstrucción de los haces vasculares.

Contenido de clorofilas: durante los primeros 12 ddi, no se observaron diferencias significativas en el contenido de clorofila (Anexo 14). Como se observa en la tabla 3-2, a los 15 ddi, las plantas que fueron tratadas con quitosán, a pesar de estar inoculadas con el patógeno, no presentaron reducciones significativas en el contenido de clorofilas, mientras que en el tratamiento patógeno se presentó una disminución de 38% en el contenido de clorofila a y 38% en la clorofila b. Por su parte, el contenido de carotenoides permaneció constante en todos los tratamientos. La reducción en pigmentos fotosintéticos se detectó en el tratamiento patógeno con síntomas de clorosis, lo cual es un directo indicador de la degradación de clorofilas.

La reducción en el contenido de clorofilas después de los 12 ddi en las plantas infectadas obedece a la respuesta oxidativa ocasionada por el estrés biótico, por lo cual un exceso de ROS provocado por la fotorrespiración luego de cierre estomático produce peroxidación lipídica en las membranas de los cloroplastos con el consecuente daño en los fotosistemas y en la fase fotoquímica de la fotosíntesis. Se ha reportado que el ácido fusárico producido por *Fol* degrada moléculas y genera daño oxidativo, que termina en la disrupción de membranas celulares y cloroplásticas (Singh *et al.*, 2017) por lo que ésta puede ser otra posible causa de los daños visualizados en las plantas infectadas. Las alteraciones causadas por el patógeno fueron corroboradas por los resultados en los parámetros de fluorescencia descritos anteriormente, adicionalmente, el aumento en el contenido de prolina además de ser una respuesta a estrés osmótico pudo producirse como mecanismo de protección ante el estrés oxidativo.

El quitosán mitigó completamente la reducción en el contenido de clorofilas en plantas infectadas, lo cual indica que induce mecanismos por los cuales se protegen los pigmentos. En otros estudios, plantas tratadas con quitosán presentaron aumentos en el contenido de clorofilas y carotenoides de 30-74%, así como un desempeño fotosintético mayor en 30-60% (Van *et al.*, 2013; Dzung, 2011), lo cual está de acuerdo con los resultados aquí presentados (Tabla 3-2). La protección sobre el aparato fotosintético por parte del quitosán ha sido explicada gracias a la producción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa (SOD, CAT y POD), que funcionan como mitigadoras del daño oxidativo por ROS en las membranas, manteniendo la integridad de los cloroplastos. En este caso, según los resultados, la protección es conferida por la acumulación de prolina y su función como sustancia protectora de membranas y proteínas (Saharan y Pal, 2016).

En la figura 3-8 se pueden observar los tejidos de folíolos de tomate con los diferentes tratamientos, teñidos con azul de tripán para visualizar la muerte celular. Las plantas de los controles se encuentran libres de muerte celular, como se observa en la imagen (3-8A), presentando tejidos sanos (de color claro); mientras que las plantas inoculadas con *Fol59*, presentan intensas manchas azules en los tejidos, reflejando puntos locales de muerte celular. La intensidad de la coloración es un indicador de la extensión del daño, así como la amplitud de la mancha. Los tejidos de las plantas que fueron tratadas con quitosán e inoculadas, presentan una reducción visible en la muerte celular de los tejidos.

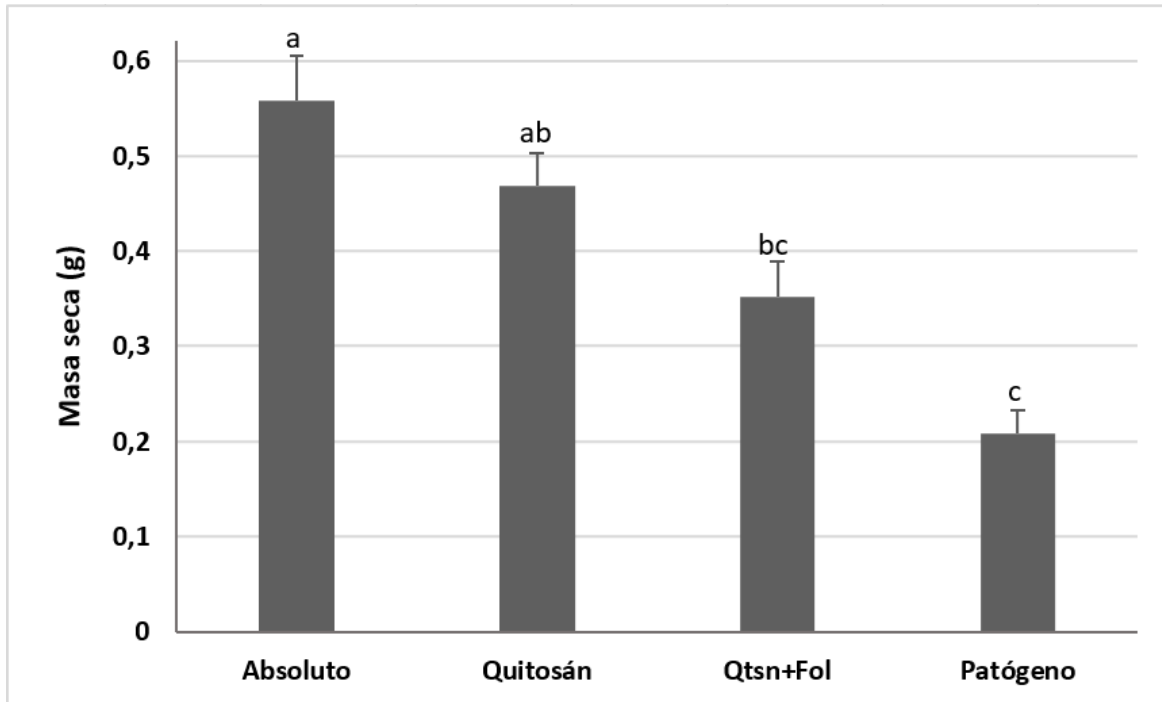


**Figura 3-8.** Muerte celular localizada en hojas de plantas de tomate infectadas con *FoI59* y tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>. A) planta control; B) planta tratada con quitosán; C) planta tratada con quitosán e inoculada con *FoI59*; D) planta inoculada con *FoI59*. Las flechas rojas indican los sitios de muerte celular.

Otros trabajos han demostrado que *FoI* puede desencadenar la muerte celular en hojas de plantas de tomate, 96 horas ddi, como consecuencia de la acumulación de ROS y el efecto del ácido fusárico el cual puede ser mitigado por la aplicación de elicitors que desencadenan respuestas antioxidantes (Zehra *et al.*, 2017; Singh y Upadhyay, 2014). Estos resultados indican claramente que el quitosán desencadena respuestas que permiten proteger las células en tejidos distantes a la infección y esto puede estar explicado por la acumulación de prolina que actúa como protector frente a daño oxidativo, sin embargo, este efecto puede ser aditivo entre la prolina y la acumulación de enzimas antioxidantes inducidas por el quitosán, como se ha reportado en trabajos anteriores (Luan *et al.*, 2018; Soliman y El-Mohamedy, 2017). En este trabajo no se evaluaron variables relacionadas con actividad de enzimas antioxidantes, por lo que no es conveniente hipotetizar al respecto, sin embargo, los resultados ofrecen una buena perspectiva para la orientación de trabajos relacionados en el futuro.

Masa seca: Cada uno de los procesos metabólicos de la planta, y principalmente los asociados con la fotosíntesis conducen a la acumulación de biomasa; por lo que esta

variable es un buen indicador del aprovechamiento energético de la planta en condiciones de estrés (Figura 3-9).



**Figura 3-9.** Masa seca de plantas de tomate inoculadas con *Fol59* y tratadas con quitosán ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.000$ ;  $F=20$ ;  $gl=79$ ), 15 ddi. Absoluto (control), Quitosán (Plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> sin inoculación con *Fol59*), Qtsn+Fol (plantas tratadas con quitosán LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> e inoculadas con *Fol59*) y Patógeno (Plantas inoculadas con *Fol59*). Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Las barras de error representan el error estándar. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas (n=20).

Las plantas inoculadas con *Fol59*, tratadas y sin tratar con quitosán, presentaron una reducción significativa (36% y 62% respectivamente) en la acumulación de biomasa seca con respecto al control 15 ddi, sin presentar diferencias significativas entre ellas.

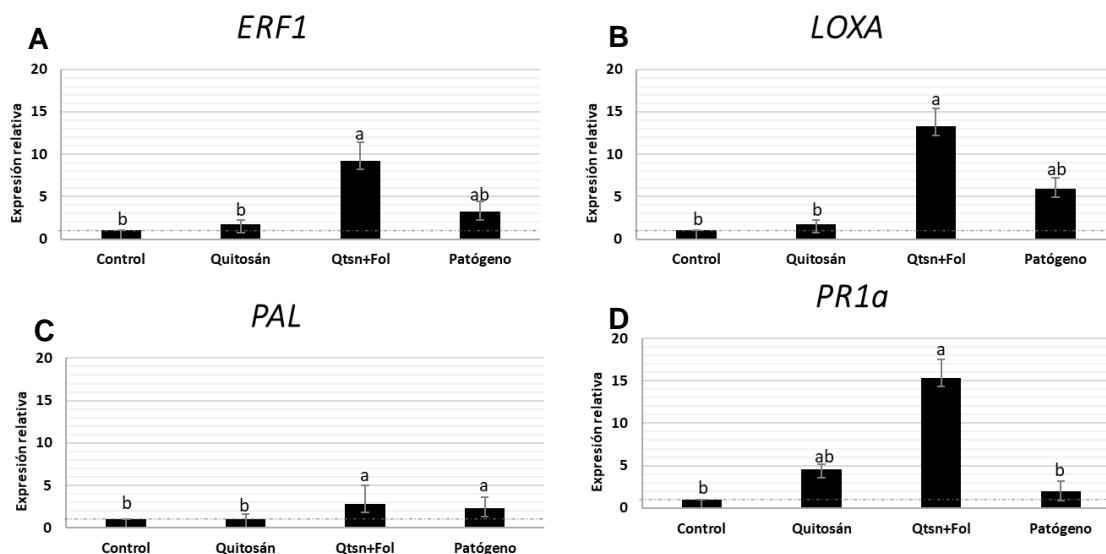
Además de la influencia negativa del patógeno sobre la toma de agua y nutrientes (Yadeta y Thomma, 2013), el intercambio gaseoso, el estrés oxidativo y el PSII, otra de las razones por las cuales puede decrecer la masa seca en plantas infectadas, es la activación de la señalización durante la defensa, la cual implica un costo metabólico para la planta como resultado de la desviación de recursos requeridos para la transcripción, traducción y secreción de proteínas, así como para la síntesis de componentes de defensa. Incluso, algunas fitohormonas relacionadas con el crecimiento (Giberelinas, auxinas) presentan antagonismo con las hormonas de defensa (AS, AJ y ET), priorizando procesos de acuerdo con las condiciones externas de la planta (Huot *et al.*, 2014).

En conjunto, los resultados de la respuesta fisiológica de plantas de tomate inoculadas con *Fol59*, tratadas con quitosán, indican que la infección por *Fol59* afecta directamente el contenido de agua de la planta, lo que se ve reflejado en los resultados de las variables CRA, gs y prolina, las cuales son indicadores de que las plantas infectadas con el patógeno se encuentran bajo limitaciones hídricas severas. Como consecuencia de esto, variables como Fv/Fm, Y(II), y el contenido de clorofilas también se afectaron durante la infección. Por su parte, el tratamiento con quitosán demostró conferir a la planta, la capacidad de contrarrestar algunos de los efectos negativos ocasionados por el patógeno; específicamente sobre las variables Fv/Fm, Y(II) y contenidos de clorofilas, protegiendo procesos fotosintéticos en la planta de tomate y mitigando los efectos negativos de la enfermedad.

### **3.3.2 Respuesta molecular de plantas de tomate tratadas con quitosán, en interacción con *Fol***

Con el fin de estudiar el efecto que tiene el tratamiento con quitosán sobre la activación de respuestas de defensa inducida en la planta, se evaluaron por PCR en tiempo real (RT-qPCR) la expresión de genes marcadores de defensa relacionados con la vía de señalización del ácido salicílico (genes *PAL* y *PR1a*), la vía de señalización del ácido jasmónico (*LOXA*) y uno relacionado con una vía común entre el ácido jasmónico y el etileno (*ERF1*). Los resultados de la verificación de calidad del ARN obtenido de las plantas tratadas se encuentran en el anexo 13.

La figura 3-10, muestra el análisis de expresión diferencial de los genes evaluados por RT-qPCR a partir de muestras de tejidos aéreos (hojas y tallo), 72 horas después del tratamiento con quitosán y 48 horas después de inoculación con *Fol59*. Para los genes *ERF1*, *LOXA* y *PAL* en plantas tratadas con quitosán, pero no inoculadas con el patógeno, la expresión relativa no superó el valor de 0.7 con respecto al control (plantas no tratadas con quitosán y no inoculadas con el patógeno), mientras que para el gen *PR1a*, la expresión fue 3.6 veces mayor con relación a las plantas control. En otros estudios, Kiirika *et al.*, (2013) y Zehra *et al.*, (2017) encontraron que la aplicación de quitosán y otros elicitors, ejercen un efecto *priming* en plantas de tomate activando la expresión de varios genes de defensa después de 72 horas del tratamiento, los autores encontraron un efecto directo con la reducción de la marchitez ocasionada por *R. solanacearum* y *Fol* respectivamente.



**Figura 3-10.** Expresión diferencial de genes relacionados con las vías de señalización de A) ET/JA (*ERF1*) ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.0002$ ;  $F=16.1$ ;  $gl=17$ ), B) JA (*LOXA*) ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.0000$ ;  $F=30.3$ ;  $gl=17$ ), y AS: C) *PAL* ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.0002$ ;  $F=16.1$ ;  $gl=17$ ) y D) *PR1a* ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0.0221$ ;  $F=4.96$ ;  $gl=17$ ) en tejidos de la parte aérea de la planta (hojas y tallo) 72 horas después del tratamiento con quitosán y 48 horas después de inoculación. Los niveles de expresión están normalizados en relación al control, siendo el nivel de expresión para el control igual a 1. Letras diferentes representan diferencias significativas según Kruskal-Wallis.

En este estudio, en las plantas que fueron tratadas con quitosán y 24 horas después inoculadas con *FoI59*, se presentó una expresión 14.2 veces mayor para *PR1a* con respecto a las plantas control y 1.8 veces mayor para *PAL*. Los genes *ERF1* y *LOXA*, se expresaron 8.2 y 12.2 veces más, respectivamente. Todos los genes evaluados en las plantas tratadas con quitosán y luego inoculadas con *FoI59*, se activaron de forma significativa en las hojas; lo que implica que después del tratamiento con quitosán y la inoculación con *FoI59*, las plantas desencadenaron una respuesta de defensa a nivel sistémico. En las plantas que fueron únicamente inoculadas con *FoI59* (no tratadas con quitosán) los genes *ERF1*, *LOXA* y *PAL*, se expresaron 2.2, 4.9 y 1.3 veces más que en las plantas control, respectivamente; por su parte, el gen *PR1a* se expresó 0.9 veces más que en las plantas control.

Se ha reportado que la proteína *PR1a* posee propiedades antimicrobianas contra diferentes patógenos y que se sintetiza como parte de la respuesta SAR en plantas, asociada a la acumulación de AS (Jia *et al.*, 2016; Iriti y Faoro, 2009). Quitosán fue



reportado como inductor de *PR1* en plantas de kiwi, induciendo una expresión 3.5 veces mayor al control en plantas pre-tratadas con quitosán y posteriormente inoculadas con *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Por otro lado, Chun y Chandrasekaran, (2019) comprobaron la capacidad de inducción de resistencia contra *Fusarium andiyazi* en plantas de tomate provocada por la aplicación de quitosán, donde además de inducir el gen *PR1*, se indujo el gen *SOD*, el cual está asociado con la respuesta antioxidante de la planta.

Teniendo en cuenta que *Fol* es un patógeno hemibiótrofo, la respuesta de defensa de la planta está dirigida inicialmente hacia la fase biótrofa del patógeno (mediada por la vía del AS) (Chowdhury *et al.*, 2017). La expresión diferencial del gen *PR1a* en plantas únicamente tratadas con quitosán sugiere un papel importante del quitosán en el reforzamiento de la respuesta de defensa activada por la planta frente a patógenos biótrofos. Sin embargo, para validar esta hipótesis es necesario evaluar más genes marcadores de respuesta de defensa de la planta asociados a las vías de señalización hormonal AS, ET y AJ.

El quitosán mejora el uso eficiente del agua en las plantas a través de su actividad antitranspirante según Iriti *et al.*, (2009). En este trabajo, la función protectora del quitosán tiene un impacto positivo sobre el aparato fotosintético de la planta, más que sobre su estado hídrico lo que podría relacionarse con un menor daño oxidativo, de acuerdo con el mayor contenido de pigmentos fotosintéticos, la acumulación de prolina y la reducción en la muerte celular en las hojas (Bittelli *et al.*, 2001).

De acuerdo con todos los resultados obtenidos, se puede afirmar que la aplicación del quitosán 24 horas antes de la inoculación con *Fol59*, reduce la expresión de síntomas de la enfermedad, ejerce un efecto protector sobre algunos parámetros fisiológicos de la planta, reduce muerte celular e induce la expresión de *PR1a*. Estos dos últimos fenómenos, sugieren una activación de estado de alarma o *priming* sobre las plantas de tomate asociado a la vía hormonal del AS después del tratamiento con quitosán.

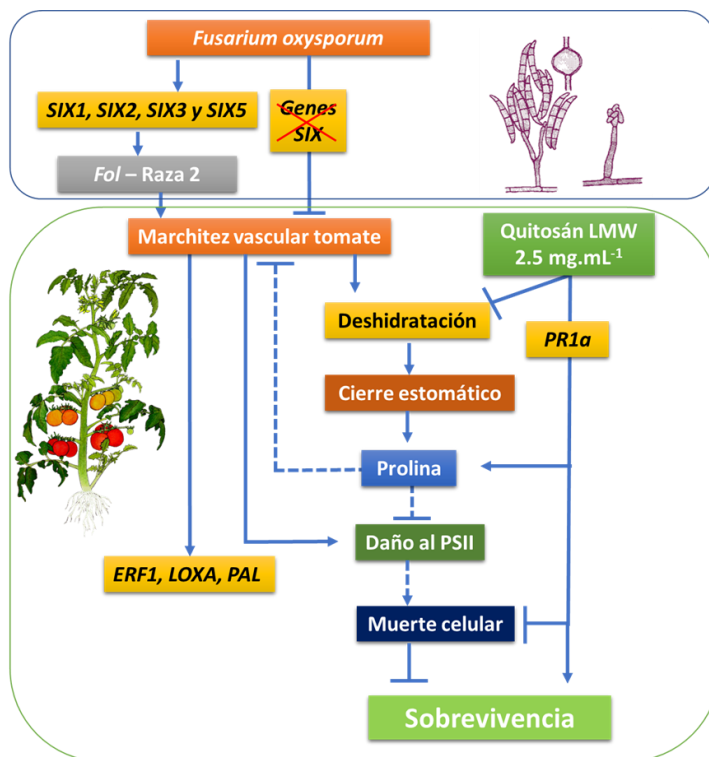
### 3.4 Conclusiones

- El primer efecto de la planta luego de la invasión del *Fol*, es la limitación estomática para evitar la pérdida de agua y esto afecta la toma de CO<sub>2</sub> causando daños en el PSII. Como respuesta la planta aumenta el contenido prolina como mecanismo de protección y ajuste osmótico.
- El quitosán mejora el efecto del PSII (Fv/Fm, Y(II) y qP), lo que parece estar relacionado con el mecanismo de protección generado por la prolina disminuyendo el daño oxidativo y manteniendo la integridad del cloroplasto y por tanto del aparato fotosintético.
- El quitosán actúa como un agente antimicrobiano y como agente protector frente a las alteraciones fisiológicas en la planta, ocasionadas por el patógeno.
- El quitosán por sí solo no induce la defensa de tomate en infección por *Fol*, mediada por los genes *LOXA*, *PAL* y *ERF1*, pero sí por medio del *PR1a*, sugiriendo una activación de *priming* asociada a SAR.

### 3.5 Recomendaciones

- Caracterizar el papel del ácido fusárico durante el proceso de infección y su relación con la respuesta oxidativa y consecuente reducción del contenido de clorofilas.
- Evaluar la respuesta molecular de la planta frente a *Fol* tratada con quitosán en diferentes tiempos después de la aplicación del producto, para determinar el momento preciso en el que se desencadena el *priming* con el fin de seleccionar un momento óptimo de aplicación. Adicionalmente, evaluar más genes asociados con vías de señalización y respuestas de defensa que nos permitan verificar si existe un efecto *priming* por parte del quitosán
- Para profundizar en los mecanismos de inducción de resistencia del quitosán en plantas, se recomienda realizar análisis de variables como la respuesta oxidativa y los mecanismos de detoxificación desencadenados durante la infección y respuesta a la enfermedad.

#### 4. Modelo de la infección por *Fol* y de la respuesta fisiológica de plantas de tomate infectadas y tratadas con quitosán



Los aislamientos de *F. oxysporum* que no poseen los genes *SIX* no producen infección en plantas de tomate, mientras los que tienen el *SIX1, SIX2, SIX3 y SIX5*, son *Fol* raza 2. *Fol* causa marchitez vascular, la cual ocasiona disminución en la toma de agua y deshidratación en las plantas, induciendo cierre estomático. *Fol* induce en la planta una respuesta mediada por los genes *ERF1, LOXA y PAL*, cuyos efectos no parecen ser suficientes para resistir la enfermedad. El quitosán (LMW 2.5 mg.mL<sup>-1</sup>) induce la expresión del gen *PR1a*, mitiga la pérdida de agua y mantiene la conductancia estomática para la toma de CO<sub>2</sub> y evitar la fotorrespiración en la planta de tomate. Como respuesta ante el desbalance osmótico se produce prolina, que en las plantas tratadas con quitosán es suficiente para disminuir el impacto de la infección sobre la degradación de clorofilas, el daño al PSII y la muerte celular, permitiendo una mayor sobrevivencia de las plantas infectadas. Las líneas continuas representan resultados confirmados por variables estudiadas en este trabajo. Las líneas discontinuas representan hipótesis realizadas a partir de la evidencia recolectada.

## **Anexo 1: Protocolo para la obtención de *Fusarium* sp. endófito a partir de material vegetal de tomate**

**Colectas.** Para las colectas se visitaron diferentes predios de zonas productoras de tomate en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Caldas. Durante las visitas se identificaron y seleccionaron las áreas del cultivo a muestrear.

Se realizó una inspección visual total del cultivo recorriéndolo e identificando las plantas sintomáticas con amarillamiento y marchitez. Las plantas identificadas fueron cortadas transversalmente en el tallo, a 30 cm de la corona y se verificó la coloración marrón característica de la marchitez vascular.

Las herramientas usadas fueron desinfectadas luego de cada muestreo, usando etanol al 70%. Cada planta fue extraída cuidadosamente con tallo y raíz; y depositada en bolsas de papel y luego en bolsas plásticas debidamente rotuladas.

Las muestras se almacenaron y trasladaron en refrigeración, hasta el laboratorio de microbiología agrícola de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA; para su procesamiento.

**Desinfección.** El material vegetal obtenido en campo y trasladado hasta el laboratorio, fue agitado cuidadosamente para descartar la mayor cantidad posible de suelo adherido a las raíces. Posteriormente, las raíces y tallos fueron lavados superficialmente con agua corriente.

Usando unas tijeras podadoras limpias y desinfectadas con etanol al 70%, se recortaron y descartaron todas las raíces secundarias de la planta, dejando únicamente el tallo y la raíz principal.

Se usó una solución de tween 80 al 0,1% para lavar el tejido, con el fin de terminar de remover cualquier partícula de suciedad adherida en él, para proceder con la desinfección superficial.

En condiciones asépticas, en una cámara de flujo laminar, el tejido fue lavado durante 20 minutos en agitación constante, con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, y luego fue sumergido durante 1 minuto en etanol al 70%.

Finalmente, se realizaron tres lavados sucesivos con agua estéril y se dejó secar sobre servilletas estériles dentro de la cámara de flujo.

**Aislamiento y purificación.** Previamente, se elaboró medio de cultivo PDA adicionado con 0.01% de cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias y 0.1% de tritón para restringir la velocidad de crecimiento de las colonias de hongos endófitos.

Después de la desinfección de material traído de campo, se separaron a la altura de la corona de la planta, una sección de tallo de la sección de raíz. Cada sección se procesó de forma independiente, ya que la abundancia de formas de *Fusarium* presentes en el suelo puede arrojar ciertas poblaciones en la raíz y otras poblaciones diferentes en lo alto del interior del tallo. Las secciones fueron cortadas de forma transversal, en segmentos de 1 cm de longitud.

Con el uso de una pinza estéril, se sembraron los segmentos en el medio de cultivo en orden ascendente en el caso del tallo y descendente en el caso de la raíz (cada sección en cajas separadas) con el fin de determinar la altura a la cual se encontraba avanzando la infección. Las cajas fueron selladas y rotuladas, y se incubaron a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  en condiciones de luz constante.

Aproximadamente tres días después del proceso de aislamiento, se tomó una muestra de micelio aéreo en crecimiento sobre el tejido y se sembró en una nueva caja de Petri conteniendo medio de cultivo PDA + cloranfenicol. Las nuevas cajas fueron incubadas en iguales condiciones a las anteriormente descritas. En caso de presencia de otros hongos contaminantes, se realizaron sucesivos pases hasta obtener un cultivo purificado.

**Obtención de un cultivo monospórico de *F. oxysporum*.** A partir de un cultivo puro de *Fusarium* sp. de siete días de crecimiento, se tomó una mínima muestra de micelio aéreo esporulado con un asa recta y se sumergió dentro de la solución de tween 80 al 0.1%. Se agitó en vórtex por 30 segundos y se transfirió la suspensión a un tubo nuevo pasándola a través de una doble capa de muselina estéril, con el fin de filtrar y eliminar el micelio presente en la suspensión. Se agitó en vórtex a máxima velocidad durante un minuto para desagregar las células que pudieran estar agrupadas.

A partir de la suspensión inicial filtrada, se realizaron tres diluciones poniendo 100 µL de suspensión en un nuevo tubo con 900 µL de tween y se tomó una alícuota de 20 µL de suspensión adicionada con 5 µL de azul de lactofenol, para verificar en microscopio la ausencia de micelio y la ausencia de cualquier tipo de contaminación. Se sembró por superficie con el uso de un rastrillo 100 µL por triplicado en cajas Petri conteniendo medio de cultivo PDA adicionado con tritón y cloranfenicol al 0.01% de cada uno.

Las cajas se incubaron 48 horas a 25 °C±2 en condiciones de luz constante y cuando las colonias comenzaron a presentar crecimiento, se tomó con un asa recta una mínima porción de micelio aéreo de una sola colonia y se transfirió a una nueva caja conteniendo PDA y se incubó de nuevo en las mismas condiciones descritas.

## Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN a partir de cultivos de *F. oxysporum*

**Preparación Buffer CTAB (2%).** El buffer se preparó a partir de soluciones stock de Tris HCl 1 M pH 8; EDTA 0.5 M a un pH 8 y NaCl 3 M. Las concentraciones finales de cada solución en el buffer fueron 100 mM, 10 mM y 1.4 M respectivamente.

La biomasa del hongo fue obtenida a partir de raspado en seco, de un cultivo de 7 días de crecimiento en medio PDA. El micelio se almacenó en tubos y se liofilizó durante 48 horas. El material fue macerado en nitrógeno líquido. Se usó aproximadamente 100 mg de tejido de cada aislamiento para la extracción.

Para la lisis celular, cada tubo conteniendo el tejido se le agregó 800  $\mu$ L del buffer CTAB y se realizó vortex a máxima velocidad durante 10 segundos hasta que la mezcla se homogenizó. Se incubó en baño maría durante una hora a 65 °C, mezclando por inversión cada 10 minutos.

Para la separación de las proteínas del ADN, se adicionaron 600  $\mu$ L de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 17,000 g por 10 minutos. Se extrajo la capa superior (acuosa) de aproximadamente 600  $\mu$ L y se depositó en un nuevo tubo, teniendo cuidado de evitar la interfaz de la capa acuosa/orgánica.

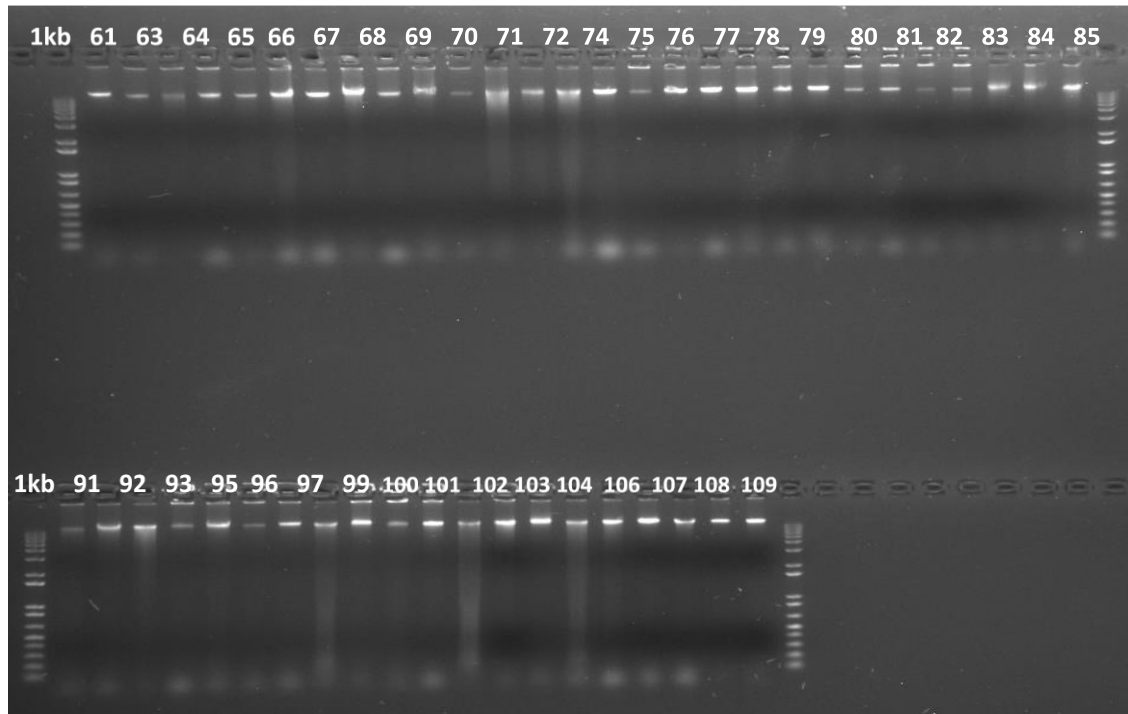
Para la precipitación del ADN y limpieza, se agregaron 360  $\mu$ L de isopropanol y se mezcló por inversión hasta ver la formación de una madeja. Se dejó reposar durante cinco minutos a temperatura ambiente en posición vertical y se centrifugó a 17,000 g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 ml de Etanol frío (-20°C) al 70%, mezclando por inversión.

Se incubó en baño maría a 65 °C durante 20 minutos y se centrifugó a 17,000 g por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos para remover las trazas de etanol.

El precipitado fue resuspendido en 50  $\mu$ L de buffer TE y posteriormente tratado con RNAsa a 37 °C durante 1 hora.



La calidad del ADN fue verificada mediante electroforesis en gel 1% de agarosa y usando espectrofotometría con un equipo NanoDrop-ND-1,000.



2.1. Verificación de la calidad de ADN extraído usando el protocolo anteriormente descrito. En la figura se muestran algunas de las muestras de *Fusarium* sp. colectadas

## Anexo 3. Condiciones de amplificación de marcadores para la identificación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y sus razas

**Identificación de *F. oxysporum*.** Se usaron los cebadores unif y unir que amplifican un fragmento entre 670 a 672 pares de bases, de una región que codifica la *endo*-poligalacturonasa *pg1* en *Fol* y *ForI* (Hirano y Arie, 2006).

Las condiciones de amplificación fueron ajustadas, evaluando gradientes de temperatura. La reacción se preparó en un volumen final de 25  $\mu$ L, conteniendo 3.5 mM de  $MgCl_2$ ; 1X de buffer de reacción; 160  $\mu$ M de cada primer; 160  $\mu$ M de dNTPs, 50 ng de ADN y 1.25 unidades de taq polimerasa recombinante (Invitrogen®).

La amplificación se llevó a cabo usando un equipo Mastercycler® pro384 (Eppendorf®); programado para un ciclo de desnaturalización por 2 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 95 °C, 45 segundos de anillamiento a 61 °C, 45 segundos de elongación a 72 °C y un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72 °C.

**Identificación de la forma especial *lycopersici* de *F. oxysporum*.** Para diferenciar la forma especial *lycopersici* de *radicis-lycopersici*, se usaron marcadores para regiones de los genes *SIX1*, *SIX2*, *SIX3* y *SIX5* que se encuentran en *Fol*. Después de realizar los ajustes correspondientes, para este caso la reacción de 25  $\mu$ L, consistió en 3,5 mM de  $MgCl_2$ ; 1X de buffer de reacción; 160  $\mu$ M de cada primer; 160  $\mu$ M de dNTPs, 50 ng de ADN y 1.25 unidades de taq polimerasa recombinante (Invitrogen®); y los ciclos térmicos fueron: desnaturalización por 2 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 95 °C, 45 segundos de anillamiento a 59 °C, 45 segundos de elongación a 72 °C y un ciclo final de extensión de 10 minutos a 72 °C.

**Identificación de razas de *Fol*.** Para diferenciar las razas de *Fol*, se usaron los marcadores SIX4 F1-SIX4 R1 (para la identificación de la raza 1) que amplifica una región de 967 pares de bases del gen *SIX4* que se encuentra presente únicamente en los

aislamientos que corresponden a la raza 1 (Tabla 1-2). Para la diferenciación de las razas 2 y 3, se usaron cebadores que amplifican regiones polimórficas del gen *SIX3*, presentes en aislamientos de la raza 3. Luego de los ajustes correspondientes, la reacción de 25  $\mu$ L consistió en 1.5 mM de  $MgCl_2$ ; 1X de buffer de reacción; 200  $\mu$ M de cada primer; 200  $\mu$ M de dNTPs, 50 ng de ADN y 1.25 unidades de taq polimerasa recombinante (Invitrogen®).

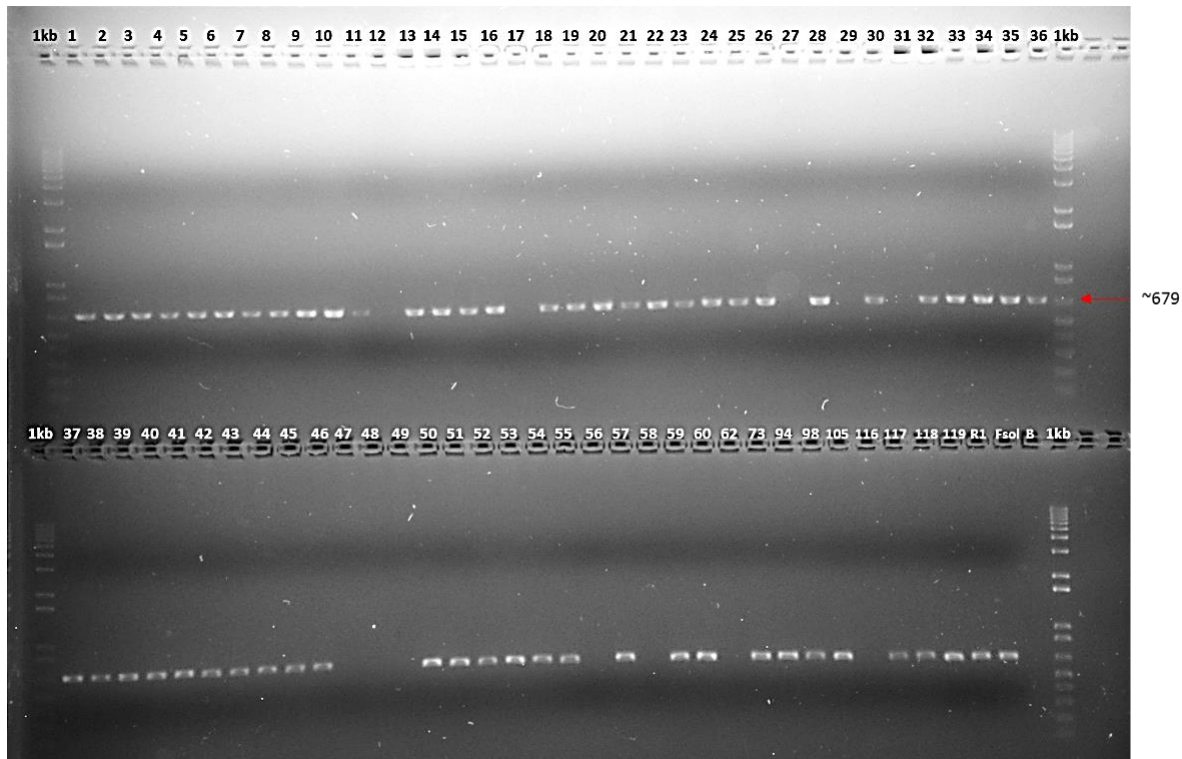
La amplificación de estos genes requirió la realización la metodología *touchdown* PCR para aumentar la especificidad de la reacción, dado que los polimorfismos presentes en la raza 3 son de un único nucleótido.

3.1. Condiciones de amplificación por la técnica *touchdown* PCR, usando cebadores con variaciones nucleotídicas, para la identificación de razas en Fol.

	<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>FASE 1</b>				
1	Desnaturalización inicial	95°C	3´	1X
2	Desnaturalización	95°C	30´´	
3	Anillamiento	69°C a 59°C	45´´	10X
4	Extensión	72°C	1´	
<b>FASE 2</b>				
5	Desnaturalización	95°C	30´´	
6	Anillamiento	59°C	45´´	25
7	Extensión	72°C	1´	
<b>FINAL</b>				
8	Extensión final	72°C	5´	1X

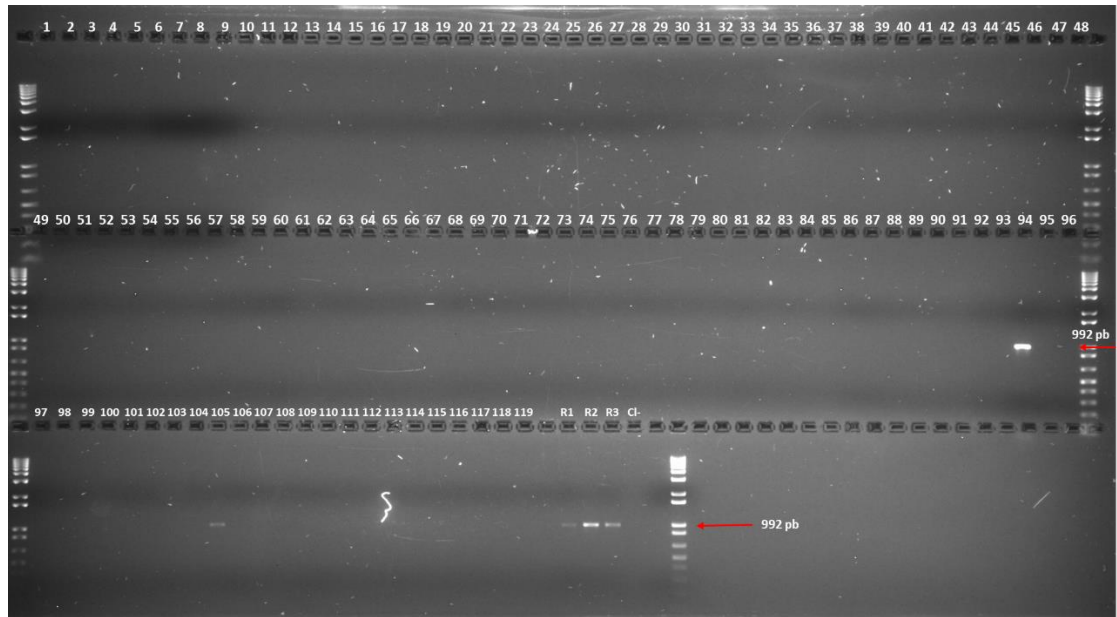
## Anexo 4. Identificación molecular de aislamientos de *Fol* afectando cultivos en Colombia

**Bandas del tamaño esperado amplificadas con los cebadores Uni.** Las bandas revelan que la mayoría de los aislamientos corresponden a *Fol* o *ForI* por la amplificación de un fragmento de la *endo*-poligalacturonasa *Pg1* de 679 pb, que posee polimorfismos particulares en *Fol* y *ForI*, comparado con otras formas especiales de *F. oxysporum*, según Hirano y Arie, (2006).



## Anexo 5. Identificación molecular de aislamientos de *Fol* afectando cultivos en Colombia

Bandas de tamaño esperado obtenidas para el marcador *SIX1* que permiten la identificación de aislamientos de *Fol*






6.2. Alineamiento del gen *SIX3* del aislamiento colombiano *Fo159* con cobertura del 100% e identidad 99%

***Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 hypothetical protein mRNA**

<i>Fo14287</i>	1	ATCTTGCCTAAACATTTACCACTATGCGTTTCCTTCTGCTTATAGCCATGTCCATGACAT	60
<i>Fo159</i>	64	ATCTTGCCTAAACATTTACCACTATGCGTTTCCTTCTGCTTATAGCCATGTCCATGACAT	123
<i>Fo14287</i>	61	GGGTTTGCTCTATTGCTGGGCTACCTGTGGAAGATGCCGATTCATCTGTCGGTCAGCTCC	120
<i>Fo159</i>	124	GGGTTTGCTCTATTGCTGGGCTACCTGTGGAAGATGCCGATTCATCTGTCGGTCAGCTCC	183
<i>Fo14287</i>	121	AAGGACGGGGTAACCCATATTGCGTGTTTCCCGGCCGCCGACGTCTTCTACTTCATTTA	180
<i>Fo159</i>	184	AAGGACGGGGTAACCCATATTGCGTGTTTCCCGGCCGCCGACGTCTTCTACTTCATTTA	243
<i>Fo14287</i>	181	CTACGAGCTTCAGCACCGAACCTCTGGGTTATGCTAGAATGTTACACAGAGACCCTCCAT	240
<i>Fo159</i>	244	CTACGAGCTTCAGCACCGAACCTCTGGGTTATGCTAGAATGTTACACAGAGACCCTCCAT	303
<i>Fo14287</i>	241	ATGAGCGGGCTGGCAATTCGGGACTGAATCACCGCATTTACGAACGAAGTCGCGTTGGAG	300
<i>Fo159</i>	304	ATGAGCGGGCTGGCAATTCGGGACTGAATCACCGCATTTACGAACGAAGTCGCGTTGGAG	363
<i>Fo14287</i>	301	GCCTCCGCACTGTCATTGATGTCGccccccGGACGGACACCAAGCCATCGCCAACCTACG	360
<i>Fo159</i>	364	GCCTCCGCACTGTCATTGATGTCGccccccGGACGGACACCAAGCCATCGCCAACCTACG	423
<i>Fo14287</i>	361	AGATCGAAGTCCGTCGTATTCTGTTGCAACACCTAATGCGGCTGGAGATTGCTTTTACA	420
<i>Fo159</i>	424	AGATCGAAGTCCGTCGTATTCTGTTGCAACACCTAATGCGGCTGGAGATTGCTTTTACA	483
<i>Fo14287</i>	421	CTGCACGCCTTAGTACCGGCTCTCGAGGTCCAGCCACAATCAGTTGGGATGCCGACGCTA	480
<i>Fo159</i>	484	CTGCACGCCTTAGTACCGGCTCTCGAGGTCCAGCCACAATCAGTTGGGATGCCGACGCTA	543
<i>Fo14287</i>	481	GTTATACCTACTATCTTACTATCTCAGAGGATTGATTCTGTGGCAGTTCCCCTTGGCAGA	540
<i>Fo159</i>	544	GTTATACCTACTATCTTACTATCTCAGAGGATTGATTCTGTGGCAGTTCCCCTTGGCAGA	603
<i>Fo14287</i>	541	GTGTTTAATTGCC 553	
<i>Fo159</i>	604	GTGTTTAATTGCC 616	

# Anexo 7. Resultado del análisis de suelo usado para bioensayos con *Fol* en plantas de tomate



**ACREDITADO ONAC**  
ORGANIZACIÓN NACIONAL DE Acreditación de COLOMBIA  
ISO/IEC 17025:2005  
13-LAB-031

**REPORTE DE RESULTADOS LABORATORIO DE SERVICIOS UNA MUESTRA VINCULACIÓN DE CONOCIMIENTO Y TECNOLOGÍA**

**LABORATORIO DE QUÍMICA DE SUELOS, AGUAS Y PLANTAS**

# DE SOLICITUD	CODIGO DE LABORATORIO
<b>3557</b>	<b>S17-26857</b>

**1. Información del cliente**

Nombre y Apellido: ANDREA DEL PILAR VILLARREAL  
 Cédula o NIT: 20500205  
 Dirección: KM 14 VIA MOSQUERA  
 Dpto: CUNDINAMARCA  
 Municipio: MOSQUERA  
 Tel. fijo/Celular: 3142635918-4227300 EXT: 1404  
 Tipo de análisis: Fertilidad completo,

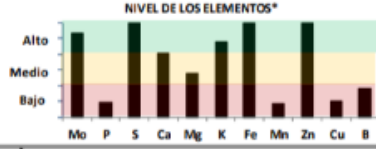
**2. Información de la muestra**

Identificación: M3	Altura: 2560
Matriz: SUELO	Cultivo: TOMATE CHONTO
Vereda: TIBAITATA	Estado: POR ESTABLECER
Finca: SUELO PARA ENSAYOS	Topografía del terreno: PLANO

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA con acreditación ONAC vigente a la fecha, con código de acreditación 13-LAB-031, bajo la norma ISO/IEC 17025:2005 "El laboratorio tiene acreditación ONAC bajo la norma NTC ISO/IEC 17025 en los ensayos de: pH ( VC\_R\_004 versión 2 de 18-09-2015), fósforo disponible bray II (NTC 5350:2005), conductividad eléctrica en suelos (NTC 5596:2008), cationes cambiabiles en suelo calcio, magnesio, potasio y sodio disponibles (NTC 5349:2008), micronutrientes en suelo por olsen modificado (NTC 5526:2007)"

Fecha de recepción: 2017-11-07 Jamer Ricardo Jiménez. (7882)  
 Fecha(s) de análisis: 2017-11-14 / 2017-11-17 Lider Unidad de Laboratorio de Suelos  
 Fecha de reporte: 2017-11-28

DETERMINACION ANALITICA	UNIDAD	MÉTODO	VALOR*	INTERPRETACIÓN*
pH	Unidades de pH	VC_R_004 versión 2	5,40	FUERTE A EXTREMADAMENTE ACIDO
Conductividad eléctrica	dS/m	NTC 5596:2008	1,68	NO SALINO
Materia orgánica (MO)	g /100 g	Walkley & Black	11,47	ALTO
Fósforo disponible (P) Bray II	mg/kg	NTC 5350:2005	8,70	BAJO
Azufre disponible (S)	mg/kg	Fosfato monobasico de calcio	161,95	ALTO
Acidez intercambiable (Al+H)	cmol <sub>c</sub> /kg	KCl	0,35	
Aluminio intercambiable (Al)	cmol <sub>c</sub> /kg	KCl	0,00	
Calcio intercambiable (Ca)	cmol <sub>c</sub> /kg	NTC 5349:2008	5,86	MEDIO
Magnesio Intercambiable (Mg)	cmol <sub>c</sub> /kg	NTC 5349:2008	1,65	MEDIO
Potasio intercambiable (K)	cmol <sub>c</sub> /kg	NTC 5349:2008	0,47	ALTO
Sodio intercambiable (Na)	cmol <sub>c</sub> /kg	NTC 5349:2008	0,30	NORMAL
Capacidad de intercambio cationico (CICE)	cmol <sub>c</sub> /kg	Suma de cationes	8,63	BAJO
Hierro disponible (Fe) Olsen	mg/kg	NTC 5526:2007	255,70	ALTO
Manganeso disponible (Mn) Olsen	mg/kg	NTC 5526:2007	2,07	BAJO
Zinc disponible (Zn) Olsen	mg/kg	NTC 5526:2007	5,78	ALTO
Cobre disponible (Cu) Olsen	mg/kg	NTC 5526:2007	<1,00	BAJO
Boro disponible (B)	mg/kg	Fosfato monobasico de calcio	0,18	BAJO

<p><b>SATURACION DE BASES</b></p> <p>Saturacion de Calcio 68% Alto                  Saturacion de Magnesio 19% Medio                  Saturacion de Potasio 5% Alto                  Saturacion de Sodio 3% Normal                  Saturacion de Aluminio 0%</p> <p><b>RELACIONES IONICAS</b></p> <p>Relacion Ca/Mg 3,5                  Relacion (ca+Mg)/K 15,9                  Relacion Mg/K 3,5                  Relacion Ca/B 6537</p>	<p><b>NIVEL DE LOS ELEMENTOS*</b></p> 
--	--

OBSERVACIONES: \* Interpretación basada en: ICA, 1992. Fertilización en diversos cultivos. Quinta aproximación. Manual de asistencia N 25; ND: No Determinado

Los resultados son validos unicamente para la muestra en referencia  
 Este documento ha sido producido electrónicamente y es válido sin la firma.  
 Este documento no puede ser reproducido total ni parcialmente, sin la autorización formal de CORPOICA  
 Para peticiones, quejas, solicitudes de información comuníquese al correo electronico atencionalcliente@corpoica.org.co o a la linea telefonica 018000121515

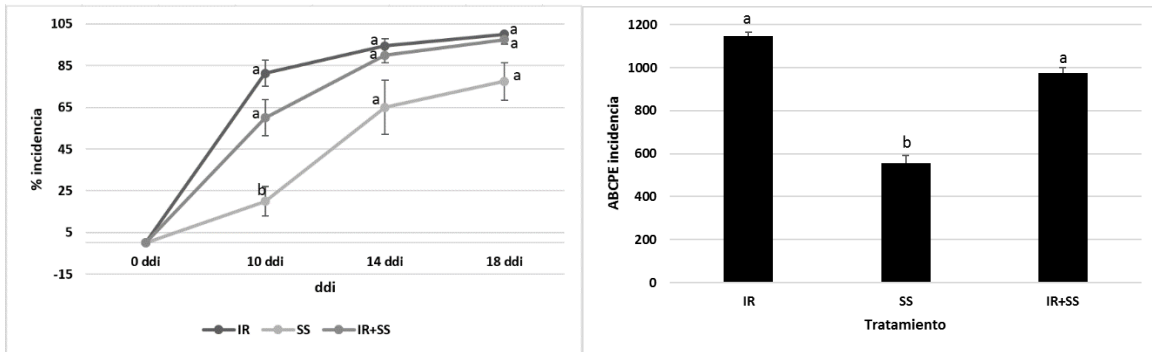
CORPORACION COLOMBIANA DE INVESTIGACION AGROPECUARIA, NIT: 800194600-3  
 CENTRO DE INVESTIGACION TIBAITATA  
 KILOMETRO 14 VIA MOSQUERA (CUNDINAMARCA)  
 TELEFONOS: 4227300, extensión 1414  
 E-MAIL: ypaez@corpoica.org.co

VC-F-227  
 Version: 2  
 Fecha de aprobación: 04-09-2017

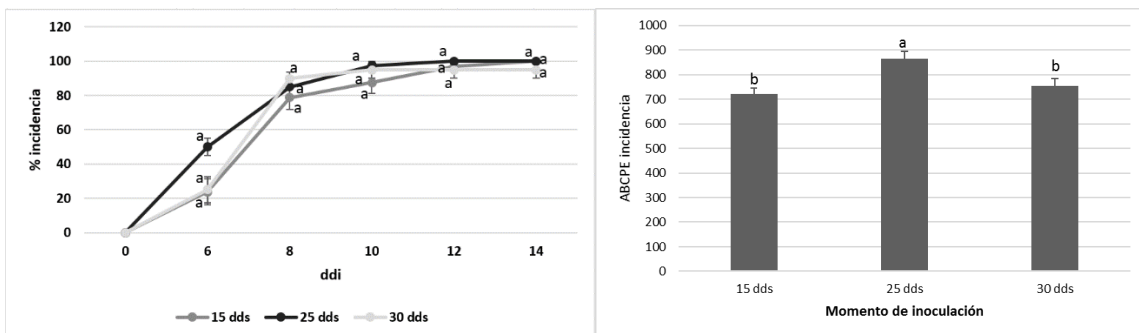


## Anexo 8. Resultados de estandarización de un protocolo de infección de *Fol* en plantas de tomate

8.1 Porcentaje de incidencia a través del tiempo ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0186$   $gl=23$ ;  $F=4.85$ ) y área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE de la incidencia ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0002$   $gl=23$ ;  $F=13.2$ ) de la marchitez vascular en la evaluación de tres formas de inoculación después de 18 días de inoculación. Las barras representan el error estándar.

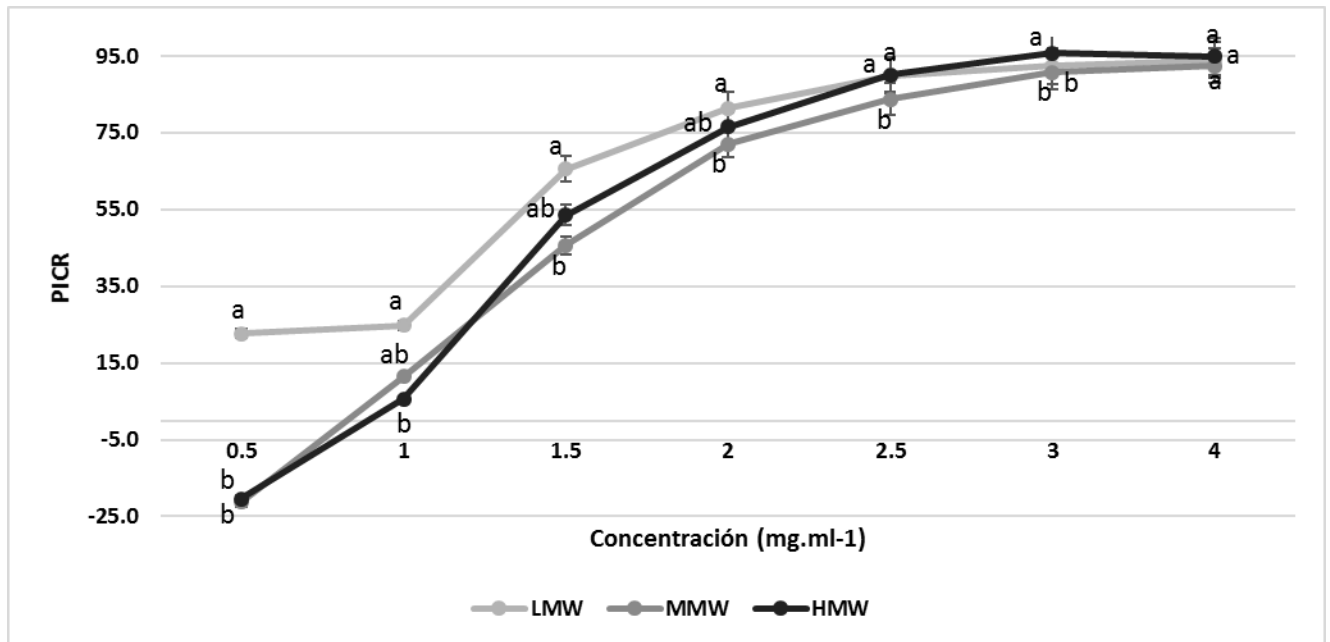


7.2. Porcentaje de incidencia a través del tiempo ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.2901$   $gl=23$ ;  $F=1.31$ ) y área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0071$   $gl=23$ ;  $F=6.32$ ) de la incidencia de la marchitez vascular en plantas de tomate inoculadas a diferentes edades (15, 25 y 30 dds) después de 14 días de inoculación.



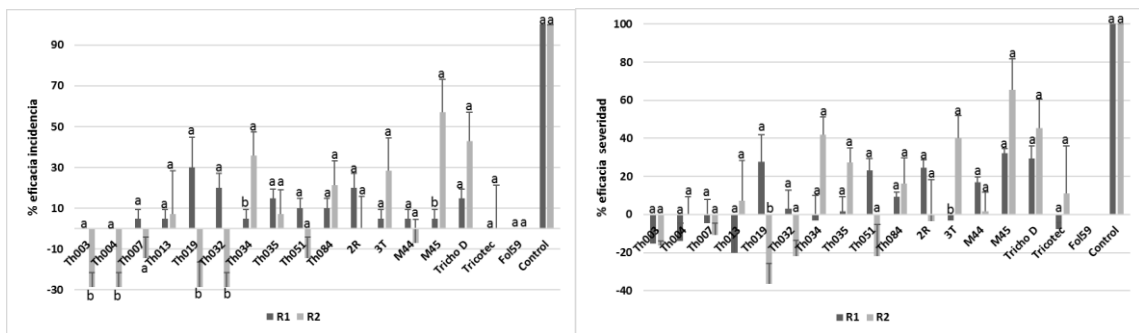
## Anexo 9. Pruebas *in vitro* de la actividad antimicrobiana de quitosán sobre *Fol*

9.1. Dependencia de la actividad inhibitoria de quitosán sobre *Fol*, con el peso molecular y la concentración 7 ddi. ( $\alpha= 0.05$ ; valor de  $p=0.0000$   $gl=59$ ;  $F=66.4$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas entre pesos moleculares en cada concentración. Las barras representan el error estándar. Los resultados mostrados corresponden al promedio entre las réplicas biológicas ( $n=15$ ).

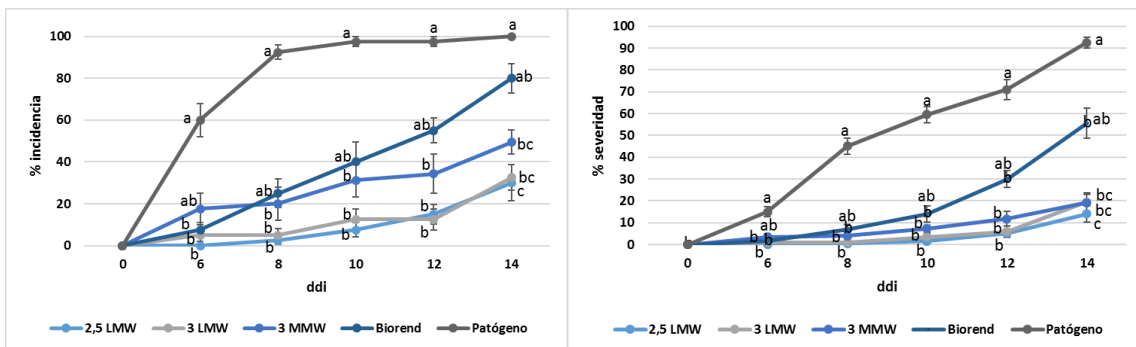


# Anexo 10. Pruebas *in planta* de la actividad biocontroladora de *Trichoderma* spp. y quitosán sobre *Fol*

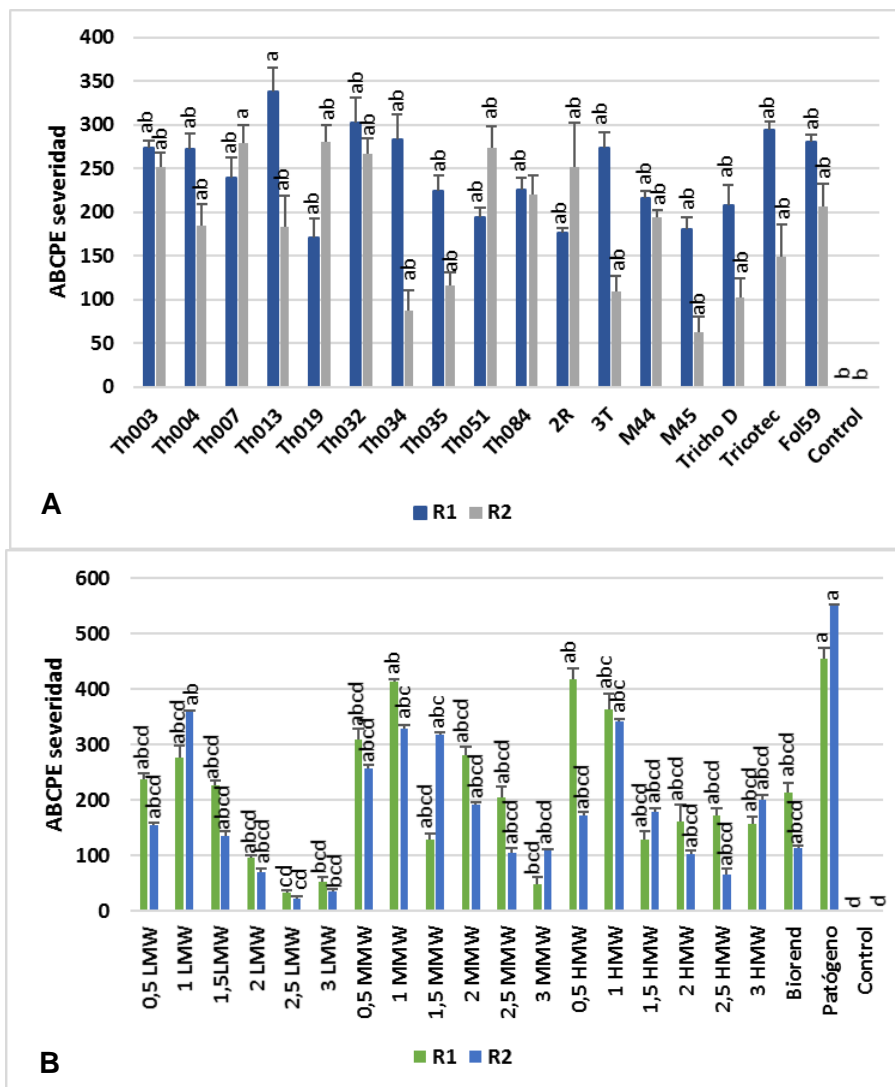
10.1. Eficacia calculada sobre la reducción de la incidencia ( $\alpha= 0.05$ ;  $p=0.2349$ ;  $gl=143$ ;  $F=4.15$ ) y de la severidad ( $\alpha= 0.05$ ;  $p=0.1913$ ;  $gl=7$ ;  $F= 1.94$ ) de la enfermedad marchitez vascular del tomate, por parte de aislamientos de la especie *Trichoderma*, después de 14 ddi. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos. Las barras representan el error estándar. Los resultados mostrados corresponden los promedios de cada una de las réplicas biológicas comparándolas entre sí ( $n=20$ ).



10.2. Porcentaje de la incidencia ( $\alpha= 0.05$ ;  $p=0.0000$ ;  $gl=47$ ;  $F=33.6$ ) y la severidad ( $\alpha= 0.05$ ;  $p=0.0000$ ;  $gl=47$ ;  $F=34.8$ ) alcanzados a través del tiempo por los tratamientos más destacados de quitosán sobre plantas de tomate. Las plantas fueron tratadas con quitosán e inoculadas con *Fo/59*.



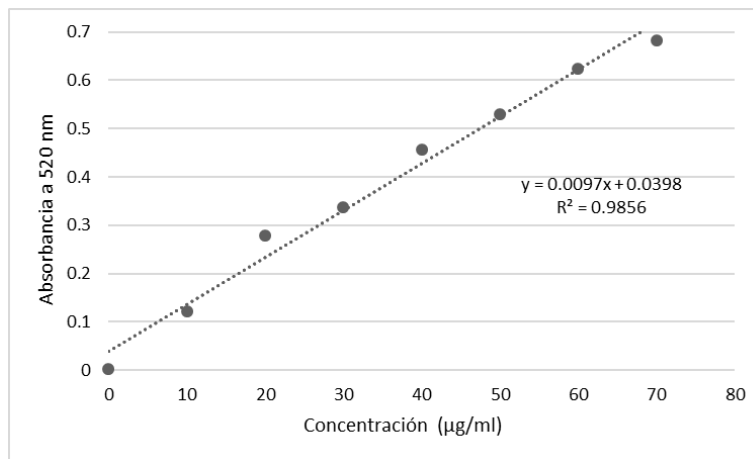
10.3. Comparación de los resultados de ABCPE de la severidad entre las réplicas biológicas 1 y 2 en los experimentos independientes de la evaluación de A) *Trichoderma* spp. ( $\alpha= 0.05$ ;  $p=0.0002$ ;  $gl=71$ ;  $F=3.49$ ) y B) quitosán ( $\alpha= 0.05$ ;  $p=0.0000$ ;  $gl=83$ ;  $F=17.4$ ) frente a *Fol* en plantas de tomate ( $n=20$ ).



## Anexo 11. Curva patrón de prolina para la determinación de concentración en plantas

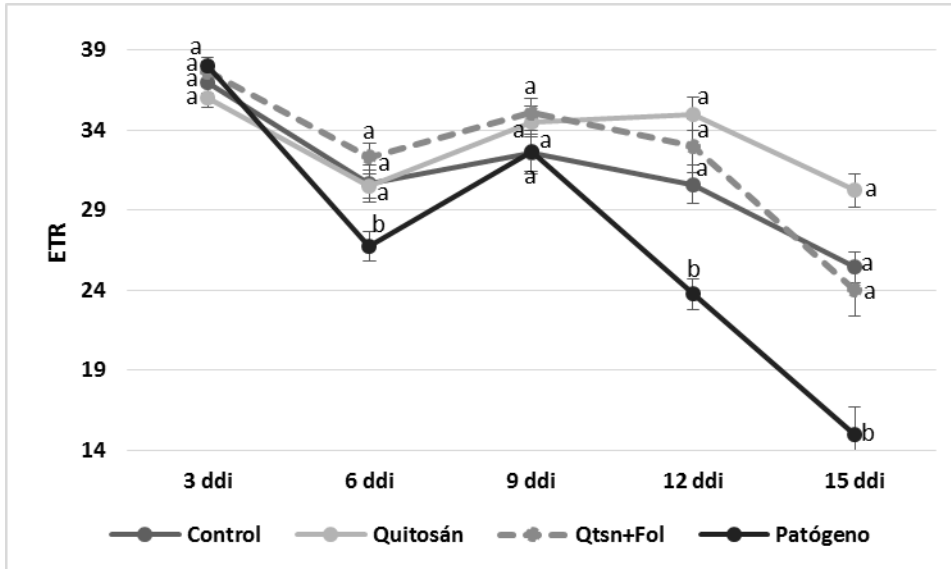
11.1 Curva de calibración usando una solución patrón para la determinación de prolina en tejidos foliares.

Concentración (µg/ml)	OD promedio 520 nm
0	0.003333
10	0.121
20	0.279
30	0.336333
40	0.457
50	0.529
60	0.623
70	0.6835



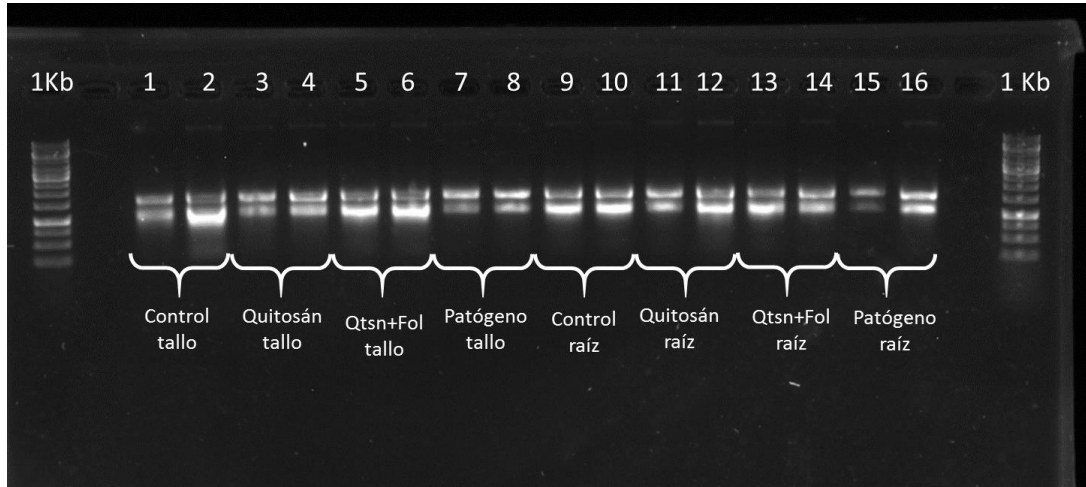
## Anexo 12. Respuesta fisiológica de plantas de tomate tratadas con quitosán en interacción con *Fol*

12.1 Tasa de transferencia de electrones (ETR) en plantas de tomate tratadas con quitosán (Quitosán), tratadas con quitosán e inoculadas con *Fol59* (Qtsn+Fol), inoculadas con *Fol59* (Patógeno) y sin ningún tratamiento (Control).



## Anexo 13. Respuesta molecular de plantas de tomate tratadas con quitosán, en interacción con *Fol*

11.1 Gel de agarosa al 2% para verificación de calidad de ARN extraído de plantas de tomate.



11.2 Cuantificación y calidad de ARN realizada mediante espectrofotometría.

Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
Absoluto Tallo R1	131	2.08	1.89
Absoluto Tallo R2	890.8	2.18	2.19
Absoluto Raíz R1	296.4	2.09	2.23
Absoluto Raíz R2	340.1	2.13	2.11
Quitosán Tallo R1	414.3	2.08	1.76
Quitosán Tallo R2	401.7	2.14	2.15
Quitosán Raíz R1	122.3	2.13	1.75
Quitosán Raíz R2	118.8	2.08	2.12
Quitosán+Fol Tallo R1	320.8	2.1	1.9
Quitosán+Fol Tallo R2	344.8	2.13	2.06
Quitosán+Fol Raíz R1	162.7	2.17	1.44
Quitosán+Fol Raíz R2	394.2	2.13	2.12
Patógeno tallo R1	302.9	2.17	1.98
Patógeno tallo R2	267	2.14	1.85
Patógeno Raíz R1	47.2	2.04	2.07
Patógeno Raíz R2	254.9	2.13	1.58





## Anexo 14. Variables fisiológicas en interacción tomate - *Fo/59*

Tratamiento	Fv/Fm	qP	Y(II)	gs	CRA	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides	
Día 3									
<b>Absoluto</b>	0.729 ±0.003	0.682 ±0.014	0.463 ±0.008	-	-	0.621 ±0.044	5.392 ±0.104	1.677 ±0.031	0.948 ±0.022
<b>Quitosán</b>	0.724 ±0.003	0.679 ±0.011	0.449 ±0.008	-	-	0.584 ±0.026	4.711 ±0.147	1.528 ±0.043	0.811 ±0.025
<b>Quitosán+Fol</b>	0.725 ±0.004	0.710 ±0.011	0.469 ±0.008	-	-	0.592 ±0.031	3.989 ±0.154	1.318 ±0.039	0.765 ±0.021
<b>Patógeno</b>	0.728 ±0.003	0.700 ±0.013	0.480 ±0.008	-	-	0.615 ±0.029	4.836 ±0.078	1.584 ±0.024	0.783 ±0.016
Día 6									
<b>Absoluto</b>	0.726 ±0.010	0.645 ±0.019	0.381 ±0.017	-	-	0.774 ±0.072	5.899 ±0.079	1.959 ±0.027	0.768 ±0.010
<b>Quitosán</b>	0.739 ±0.003	0.644 ±0.014	0.375 ±0.008	-	-	0.626 ±0.028	4.539 ±0.107	1.538 ±0.035	0.588 ±0.017
<b>Quitosán+Fol</b>	0.744 ±0.003	0.681 ±0.013	0.423 ±0.019	-	-	0.658 ±0.042	6.170 ±0.061	2.102 ±0.018	0.858 ±0.014
<b>Patógeno</b>	0.725 ±0.010	0.610 ±0.014	0.336 ±0.012	-	-	0.627 ±0.037	6.827 ±0.058	2.361 ±0.019	0.881 ±0.014
Día 9									
<b>Absoluto</b>	0.743 ±0.004	0.663 ±0.017	0.407 ±0.014	878.81	±44.55	0.702 ±0.046	5.038 ±0.114	1.759 ±0.040	0.672 ±0.019
<b>Quitosán</b>	0.732 ±0.003	0.683 ±0.027	0.431 ±0.012	928.36	±69.43	0.777 ±0.028	4.225 ±0.068	1.491 ±0.022	0.547 ±0.016
<b>Quitosán+Fol</b>	0.746 ±0.003	0.694 ±0.010	0.441 ±0.011	525.02	±86.27	0.570 ±0.031	6.122 ±0.098	2.211 ±0.034	0.795 ±0.015
<b>Patógeno</b>	0.744 ±0.004	0.624 ±0.021	0.405 ±0.016	315.01	±110.83	0.517 ±0.027	5.988 ±0.122	2.128 ±0.039	0.837 ±0.020
Día 12									
<b>Absoluto</b>	0.739 ±0.004	0.603 ±0.016	0.383 ±0.015	664.31	±84.79	0.856 ±0.026	4.959 ±0.161	1.751 ±0.042	0.613 ±0.020
<b>Quitosán</b>	0.736 ±0.004	0.688 ±0.013	0.438 ±0.013	789.26	±66.69	0.915 ±0.039	4.599 ±0.058	1.664 ±0.017	0.574 ±0.013
<b>Quitosán+Fol</b>	0.731 ±0.004	0.630 ±0.024	0.407 ±0.019	231.50	±64.42	0.713 ±0.034	4.131 ±0.122	1.493 ±0.036	0.512 ±0.016
<b>Patógeno</b>	0.698 ±0.012	0.548 ±0.015	0.299 ±0.012	39.73	±4.79	0.614 ±0.064	3.236 ±0.113	1.204 ±0.039	0.372 ±0.014
Día 15									
<b>Absoluto</b>	0.742 ±0.003	0.519 ±0.015	0.322 ±0.012	272.57	±30.97	0.746 ±0.051	6.002 ±0.154	2.182 ±0.055	0.661 ±0.020

Identificación de un aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y respuesta fisiológica en tomate durante la infección frente a dos elicitores fúngicos

---

<b>Qitosán</b>	0.738	±0.003	0.617	±0.015	0.383	±0.013	290.84	±28.00	0.810	±0.045	6.880	±0.147	2.479	±0.048	0.827	±0.031
<b>Qitosán+Fol</b>	0.687	±0.027	0.537	±0.021	0.304	±0.020	131.91	±20.54	0.671	±0.055	6.500	±0.150	2.264	±0.050	0.884	±0.027
<b>Patógeno</b>	0.519	±0.039	0.453	±0.032	0.190	±0.021	33.09	±3.56	0.592	±0.051	3.674	±0.199	1.332	±0.061	0.594	±0.039

---

## Bibliografía

- Abbashar, A. M. (2003). *Investigations On Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici The Casual Agent Of Tomato Wilt (Lycopersicon esculentum Mill)*. University of Khartoum.
- Ádám, A., Nagy, Z., Kátay, G., Mergenthaler, E., & Viczián, O. (2018). Signals of Systemic Immunity in Plants: Progress and Open Questions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1146. <http://doi.org/10.3390/ijms19041146>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press.
- AGRONET. (2018). Area, producción, rendimiento y participación nacional por cultivo. Retrieved May 14, 2018, from <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Ahmad, M., Manzoor, K., & Ikram, S. (2017). Versatile nature of hetero-chitosan based derivatives as biodegradable adsorbent for heavy metal ions; a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 190–203. <http://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.07.008>
- Akhter, A., Hage-Ahmed, K., Soja, G., & Steinkellner, S. (2015). Compost and biochar alter mycorrhization, tomato root exudation, and development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Frontiers in Plant Science*, 6(July), 529. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00529>
- Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., & Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 184(3), 529–544. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03014.x>
- Alburquenque, C., Bucarey, S. A., Neira-carrillo, A. Ó. N., A, B. U. R. Z. Ú., Hermosilla, G. Á. N., & Tapia, C. V. (2010). Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. *Medical Mycology*, 48(December), 1018–1023. <http://doi.org/10.3109/13693786.2010.486412>
- Alexander, L. J., & Hoover, M. M. (1955). Disease Resistance in Wild Species of Tomato. *Ohio Agricultural Experiment Station*, 752, 37–41.
- Alexander, L. J., & Tucker, C. M. (1945). Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. "*lycopersici*." *Journal of Agricultural Research*, 70(9), 303–313.
- Ali Khan, S., Bahadar Khan, S., Kamal, T., M. Asiri, A., & Akhtar, K. (2016). Recent Development of Chitosan Nanocomposites for Environmental Applications. *Recent Patents on Nanotechnology*, 10(3), 181–188.
- Alzáte, L. F., Valencia, M., & Cuervo, R. (2013). Extracción y caracterización de quitosano a partir del hongo *Aspergillus niger* para andamios como soporte para el

- crecimiento de tejidos. *Revista Colombiana de Materiales*, (5), 42–47.
- Andersen, E., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. (2018). Disease Resistance Mechanisms in Plants. *Genes*, 9(7), 339. <http://doi.org/10.3390/genes9070339>
- Aoki, T., O'Donnell, K., & Geiser, D. M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 189–201. <http://doi.org/10.1007/s10327-014-0509-3>
- Arias, L. A., Bojacá, C. R., Ahumada, D. A., & Schrevens, E. (2014). Monitoring of pesticide residues in tomato marketed in Bogota, Colombia. *Food Control*, 35(1), 213–217. <http://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.06.046>
- Atkinson, N., & Urwin, P. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63(10), 3523–3544. <http://doi.org/10.1093/jxb/err313>
- Badalyan, S. M., Innocenti, G., & Garibyan, N. G. (2004). Interactions between xylotrophic mushrooms and mycoparasitic fungi in dual-culture experiments. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), 44–48.
- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2011). A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, (460381), 1–29. <http://doi.org/10.1155/2011/460381>
- Bai, Y., Yan, Z., Moriones, E., & Fernández-Muñoz, R. (2018). Tomato disease resistances in the post-genomics era. *Acta Horticulturae*, (1207), 1–18. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1207.1>
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 89–113. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 78–87. <http://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2015.04.004>
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205–207. <http://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Beckers, G. J., & Conrath, U. (2007). Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 425–431. <http://doi.org/10.1016/J.PBI.2007.06.002>
- Ben Rejeb, K., Abdelly, C., & Savouré, A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 278–284. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007>
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249–260. <http://doi.org/10.1139-6709>

- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W., & Roitsch, T. (2004). Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum*, 122(4), 419–428. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00433.x>
- Berger, S., Sinha, A. K., & Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58(15–16), 4019–4026. <http://doi.org/10.1093/jxb/erm298>
- Biju, V. C., Fokkens, L., Houterman, P. M., Rep, M., & Cornelissen, B. J. C. (2017). Multiple Evolutionary Trajectories Have Led to the Emergence of Races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(4), 1–20. <http://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.02548-16>.
- Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G. S., & Nichols, E. J. (2001). Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology*, 107(3), 167–175. [http://doi.org/10.1016/S0168-1923\(00\)00242-2](http://doi.org/10.1016/S0168-1923(00)00242-2)
- Boddy, L. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 185–194. [http://doi.org/10.1016/S0168-6496\(99\)00093-8](http://doi.org/10.1016/S0168-6496(99)00093-8)
- Bohn, G. W., & Tucker, C. M. (1940). Studies on *Fusarium* wilt of the Tomato. I. Immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill, and its inheritance in hybrids. *Missouri Agricultural Experiment Station*, 311.
- Boix-Ruíz, A., Gálvez-Patón, L., de Cara-García, M., Palmero-Llamas, D., Camacho-Ferre, F., & Tello-Marquina, J. C. (2015). Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica*, 43(4), 471–483. <http://doi.org/10.1007/s12600-014-0444-z>
- Botero, A., Gómez, I., Benítez, É., & García, C. (2015). Liming with dolomite reduces the efficacy of the biocontrol fungus *Trichoderma koningiopsis* against cabbage clubroot. *Agronomía Colombiana*, 33(1), 49–57. <http://doi.org/10.15446/agron.colomb.v33n1.46759>
- Brodersen, C. R., & McElrone, A. J. (2013). Maintenance of xylem Network Transport Capacity: A Review of Embolism Repair in Vascular Plants. *Frontiers in Plant Science*, 4(April), 108. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00108>
- Brotman, Y., Gupta, K., & Viterbo, A. (2010). *Trichoderma*. *Current Biology*, 20(9), 390–391.
- Burbano-Erazo, E. (2016). *Producción, evaluación y selección de líneas de tomate tipo "chonto" (Solanum lycopersicum Mill.) con hábito de crecimiento determinado*. Universidad Nacional de Colombia.
- Cabarcas, M., Marimón, W., & Miranda, M. (2011). *Diseño de un proceso económico y competitivo para la extracción de quitina y producción de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón*. Universidad de Cartagena.
- Cakir, B., Gul, A., Yolageldi, L., & Ozaktan, H. (2014). Response to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomato roots involves regulation of SA- and ET-responsive

- gene expressions. *European Journal of Plant Pathology*, 1–13.  
<http://doi.org/10.1007/s10658-014-0394-9>
- Cao, L., Blekemolen, M. C., Tintor, N., Cornelissen, B. J. C., & Takken, F. L. W. (2018). The *Fusarium oxysporum* Avr2-Six5 Effector Pair Alters Plasmodesmatal Exclusion Selectivity to Facilitate Cell-to-Cell Movement of Avr2. *Molecular Plant*.  
<http://doi.org/10.1016/j.molp.2018.02.011>
- Carbonell, P., Aranzazu, A., Salinas, J. F., García-Martínez, S., & Ruiz, J. J. (2018). Twenty Years of Tomato Breeding at EPSO-UMH : Transfer Resistance from Wild Types to Local Landraces — From the First Molecular Markers to. *Diversity*, 10(12), 1–11. <http://doi.org/10.3390/d10010012>
- Carrillo-Fasio, J. A., Estrada, G., Enrique, J., Ortega, C., Márquez, I., Adriana, Z., ... Sañudo-Barajas, J. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen , en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill .) en el Valle de Culiacán , Sinaloa , México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 123–127.
- Carvalho, L. C., Dennis, P. G., Badri, D. V., Tyson, G. W., Vivanco, J. M., & Schenk, P. M. (2013). Activation of the Jasmonic Acid Plant Defence Pathway Alters the Composition of Rhizosphere Bacterial Communities. *PLoS ONE*, 8(2), 1–5.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0056457>
- Castro, P. A., Ramos, J. P., Estévez, S. L., & Rangel, A. (2004). Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de tomate de la ciudad de Bogotá. *Revista de Ingeniería*, (20), 14–22.
- Catanzariti, A. M., Do, H. T. T., Bru, P., de Sain, M., Thatcher, L. F., Rep, M., & Jones, D. A. (2017). The tomato *I* gene for *Fusarium* wilt resistance encodes an atypical leucine-rich repeat receptor-like protein whose function is nevertheless dependent on SOBIR1 and SERK3/BAK1. *Plant Journal*, 89(6), 1195–1209.  
<http://doi.org/10.1111/tpj.13458>
- Chaudhary, R., & Atamian, H. (2017). Resistance-Gene-Mediated Defense Responses against Biotic Stresses in the Crop Model Plant Tomato. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 8(4), 1–11. <http://doi.org/10.4172/2157-7471.1000404>
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4), 551–560. <http://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chet, I., Inbar, J., & Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In S. B. (eds) Wicklow DT (Ed.), *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships* (pp. 165–184). Berlin: Springer-Verlag.
- Chiang, K. S., Liu, H. I., Tsai, J. W., Tsai, J. R., & Bock, C. H. (2017). A discussion on disease severity index values. Part II: using the disease severity index for null hypothesis testing. *Annals of Applied Biology*, 171(3), 490–505.  
<http://doi.org/10.1111/aab.12396>
- Choudhary, D. K., & Varma, A. (2016). *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*. (D. K. Choudhary & A. Varma, Eds.) (1st ed.). Uttar Pradesh: Springer India.

- Chowdhury, S., Basu, A., & Kundu, S. (2017). Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases. *Scientific Reports*, 7(1), 1–17. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-17248-7>
- Chun, S. C., & Chandrasekaran, M. (2019). Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic stress tolerance in tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 948–954. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.167>
- Clayton, E. E. (1923). The Relation of Temperature to the *Fusarium* Wilt of the Tomato. *American Journal of Botany*, 10(2), 71. <http://doi.org/10.2307/2435575>
- Conrath, U. (2011). Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, 16(10), 524–531. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.004>
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J. S., & López-Bucio, J. (2014). *Enhanced Plant Immunity Using Trichoderma*. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00036-9>
- Copping, L. G., & Menn, J. J. (2000). Biopesticides: A review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56(8), 651–676. [http://doi.org/10.1002/1526-4998\(200008\)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U](http://doi.org/10.1002/1526-4998(200008)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U)
- Corferias. (2017). Las exportaciones de frutas y hortalizas en fresco y procesado han crecido 10.4%. Retrieved August 8, 2018, from <http://corferias.com/index.cfm?doc=modulos/noticias/view&id=1486&intIdioma=1&StrIdioma=es>
- Cotes, A. M. (1993). *Effect of seed priming in the presence of Trichoderma koningii on seed and seedling disease induced in tomato by Rhizoctonia solani and Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Gembloux.
- Cotes, A. M., Espinel, C., Villamizar, L., & Gómez, M. (2018). Biological control of tomato *Fusarium* wilt and whiteflies with two fungal biopesticides. *Acta Horticulturae*, 1207, 129–138. <http://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1207.17>
- Cotes, A. M., Thonart, P., & Lepoivre, P. (1994). Relationship between the protective activities of several strains of *Trichoderma* against damping-off agents and their ability to produce hydrolytic enzymes in soil or in synthetic media. *Med. Fac. Landboww. Univ*, 5(3a), 931–941.
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M. I., Steinberg, C., & Alabouvette, C. (2002). Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 467–476.
- Couto, D., & Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537–552. <http://doi.org/10.1038/nri.2016.77>
- Curutiu, C., Lazar, V., & Chifiriuc, M. C. (2017). Pesticides and antimicrobial resistance: from environmental compartments to animal and human infections. In *New Pesticides and Soil Sensors* (pp. 373–392). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978->

0-12-804299-1.00011-4

- Daguerre, Y., Siegel, K., Edel-Hermann, V., & Steinberg, C. (2014). Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: A review. *Fungal Biology Reviews*, 28(4), 97–125. <http://doi.org/10.1016/j.fbr.2014.11.001>
- de Boer, W., Verheggen, P., Klein Gunnewiek, P. J. A., Kowalchuk, G. A., & van Veen, J. A. (2003). Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 835–44. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.2.835-844.2003>
- de Sain, M., & Rep, M. (2015). The Role of Pathogen-Secreted Proteins in Fungal Vascular Wilt Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 23970–23993. <http://doi.org/10.3390/ijms161023970>
- Dean, R. A., Lichens-Park, A., & Kole, C. (2014). Genomics of plant-associated fungi and oomycetes: Dicot pathogens. *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*, 1–239. <http://doi.org/10.1007/978-3-662-44056-8>
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Desaeger, J., Dickson, D. W., & Locascio, S. J. (2017). *Methyl Bromide Alternatives for Control of Root-knot Nematode (Meloidogyne spp.) in Tomato Production in Florida. Journal of Nematology* (Vol. 49).
- Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Męglecz, E., & Roncero, M. I. G. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1140–1152. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02307.x>
- Di Pietro, A., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., & Roncero, M. I. G. (2003). *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, 4(5), 315–325. <http://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x>
- Divya, K., Vijayan, S., & Jisha, M. S. (2018). Antifungal, antioxidant and cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and its use as an edible coating on vegetables. *International Journal of Biological Macromolecules*. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.130>
- Djonović, S., Pozo, M. J., Dangott, L. J., Howell, C. R., & Kenerley, C. M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 19(8), 838–53. <http://doi.org/10.1094/MPMI-19-0838>
- Dmitriev, a P. (2003). Signal Molecules for Plant Defense Responses to Biotic Stress. *Text*, 50(3), 417–425.
- Doares, S. H., Syrovetst, T., Weilert, E. W., & Ryan, C. A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway, 92,



4095–4098.

- Dong, X., Xiong, Y., Ling, N., Shen, Q., & Guo, S. (2014). Fusaric acid accelerates the senescence of leaf in banana when infected by *Fusarium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(4), 1399–1408. <http://doi.org/10.1007/s11274-013-1564-1>
- Druzhinina, I., & Kopchinskiy, A. (2008). International subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* taxonomy. Retrieved June 11, 2018, from <http://www.isth.info/>
- Duniway, J. (1971). Water relations of *Fusarium* wilt. *Physiology Plant Pathology*, *1*, 539–548.
- Duyvesteijn, R. G. E., van Wijk, R., Boer, Y., Rep, M., Cornelissen, B. J. C., & Haring, M. A. (2005). Frp1 is a *Fusarium oxysporum* F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Molecular Microbiology*, *57*(4), 1051–1063. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04751.x>
- Dzung, N. A., Khanh, V. T. P., & Dzung, T. T. (2011). Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. *Carbohydrate Polymers*, *84*(2), 751–755. <http://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.07.066>
- El-Mohamedy, R. S. R., Abdel-Kareem, F., & Daami-Remadi, M. (2014). Chitosan and *Trichoderma harzianum* as Fungicide Alternatives for Controlling *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato. *Tunisian Journal of Plant Protection*, *9*(1), 31–43.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, *8*(4), 968–987. <http://doi.org/10.3390/md8040968>
- Escobar, D. M., Ossa, C. P., Quintana, M. A., & Ospina, W. A. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica*, *18*(1), 260–266.
- Escobar, D., Urrea, C., Gutiérrez, M., & Zapata, P. (2011). Producción de matrices de quitosano extraído de crustáceos. *Revista Ingeniería Biomédica*, *5*(9), 20–25.
- FAO, F. and A. O. of the U. N. (2018). Faostat: Production quantities of Tomatoes by country. Retrieved from <http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC/visualize>
- Felipini, R. B., Boneti, J. I., Katsurayama, Y., Neto, A. C. R., Veleirinho, B., Maraschin, M., & Piero, R. M. Di. (2016). Apple scab control and activation of plant defence responses using potassium phosphite and chitosan. *European Journal of Plant Pathology*, *145*, 929–939. <http://doi.org/10.1007/s10658-016-0881-2>
- Flor, H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Microbiology*, *9*, 275–296.
- Fontenelle, A. D. B., Guzzo, S. D., Lucon, C. M. M., & Harakava, R. (2011). Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection*, *30*(11), 1492–1500. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.07.019>

- Fraire-Velázquez, S., Rodríguez-Guerra, R., & Sánchez-Calderón, L. (2011). Abiotic and Biotic Stress Response Crosstalk in Plants. In A. Shank (Ed.), *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives* (Intech Eur, p. 346). Mexico.
- Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157(3), 493–502. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x>
- Galván Márquez, I., Akuaku, J., Cruz, I., Cheetham, J., Golshani, A., & Smith, M. L. (2013). Disruption of protein synthesis as antifungal mode of action by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 108–112. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.025>
- Gao, J.-X., Yu, C.-J., Wang, M., Sun, J.-N., Li, Y.-Q., & Chen, J. (2017). Involvement of a velvet protein ClVelB in the regulation of vegetative differentiation, oxidative stress response, secondary metabolism, and virulence in *Curvularia lunata*. *Scientific Reports*, 7, 46054. <http://doi.org/10.1038/srep46054>
- García, A., Romero, R., & Castro, H. (2016). Aprovechamiento de las escamas de la industria acuícola en el departamento. *Producción + Limpia*, 11(2), 102–110. <http://doi.org/10.22507/pml.v11n2a9>
- Gawehns, F., Houterman, P. M., Ichou, F. A., Michielse, C. B., Hijdra, M., Cornelissen, B. J. C., ... Takken, F. L. W. (2014). The *Fusarium oxysporum* Effector Six6 Contributes to Virulence and Suppresses I-2-Mediated Cell Death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(4), 336–348. <http://doi.org/10.1094/MPMI-11-13-0330-R>
- Ghazalibiglar, H., Kandula, D. R. W., & Hampton, J. G. (2016). Biological control of *Fusarium* wilt of tomato by *Trichoderma* isolates. *New Zealand Plant Protection*, 69, 57–63.
- Gisi, U., & Cohen, Y. (1996). Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 549–72. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.549>
- Goltsev, V. N., Kalaji, H. M., Paunov, M., Bąba, W., Horaczek, T., Mojski, J., ... Allakhverdiev, S. I. (2016). Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63(6), 869–893. <http://doi.org/10.1134/S1021443716050058>
- Gómez, D. A. (2015). *Technical and economic feasibility analysis of a plant process for production of chitosan from shrimp shells in Colombia*. University of Antioquia.
- González, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. *Revista Protección Vegetal*, 27(1), 1–7.
- Gordon, T. R. (2017). *Fusarium oxysporum* and the Fusarium wilt Syndrome. *Annual Review of Phytopathology*, 55, 23–39. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615>
- Goy, R. C., Britto, D. de, & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19(3), 241–247. <http://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>

- Grattidge, R., & O'Brien, R. G. (1982). Occurrence of a Third Race of *Fusarium* Wilt of Tomatoes in Queensland. *Plant Disease*, 66, 165–166.
- Griffith, G. W., & Shaw, D. S. (1998). Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 4007–4014.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., & Dinoor, A. (2001). Combining Biocontrol Agents to Reduce the Variability of Biological Control. *Biological Control*, 91(7), 621.
- Gutiérrez, J. A., & Londoño, A. (2009). Determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en tomates de mercados de cadena en las ciudades de Pereira y Armenia, Colombia. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(3), 165–171.
- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., & Schulze-Lefert, P. (2017). Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 565–589. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035623>
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43–56. <http://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (2002). *Trichoderma & Gliocladium Volume 2. Enzymes, biological control and commercial applications.*
- Henry, G., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnologie, Agronomie, Société et ...*, 16(2), 12.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17–25. <http://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Hernández-Lauzardo, A. ., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montealvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., & Bello-Pérez, L. . (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* ( Ehrenb .: Fr .) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73, 541–547. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.12.020>
- Hincapié Echeverri, O. D., Saldarriaga Cardona, A., & Díaz Diez, C. (2017). Biological, botanical and chemical alternatives for the control of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) diseases. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 70(2), 8169–8176. <http://doi.org/10.15446/rfna.v70n2.64521>
- Hirano, Y., & Arie, T. (2006). PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology*, 72(5), 273–283. <http://doi.org/10.1007/s10327-006-0287-7>
- Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2008). Suppression of plant

- resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens*, 4(5), 1–6. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000061>
- Houterman, P. M., Ma, L., Van Ooijen, G., De Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W., & Rep, M. (2009). The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant Journal*, 58(6), 970–978. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x>
- Houterman, P. M., Speijer, D., Dekker, H. L., De Koster, C. G., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2007). The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants: Short communication. *Molecular Plant Pathology*, 8(2), 215–221. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00384.x>
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4–10. <http://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S., & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 615–631. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.04.006>
- Hua-Van, A., Davière, J. M., Kaper, F., Langin, T., & Daboussi, M. J. (2000). Genome organization in *Fusarium oxysporum*: Clusters of class II transposons. *Current Genetics*, 37(5), 339–347. <http://doi.org/10.1007/s002940050537>
- Huang, H., Liu, B., Liu, L., & Song, S. (2017). Jasmonate action in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1349–1359. <http://doi.org/10.1093/jxb/erw495>
- Huang, Z., Zhang, Z., Zhang, X., Zhang, H., Huang, D., & Huang, R. (2004). Tomato TERF1 modulates ethylene response and enhances osmotic stress tolerance by activating expression of downstream genes. *FEBS Letters*, 573(28716), 110–116. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.064>
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*, 7(8), 1267–1287. <http://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
- Inami, K., Yoshioka-akiyama, C., Morita, Y., Yamasaki, M., Teraoka, T., & Arie, T. (2012). A Genetic Mechanism for Emergence of Races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Inactivation of Avirulence Gene AVR1 by transposon insertion. *PLoS ONE*, 7(8), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044101>
- Iriti, M., & Faoro, F. (2009). Chitosan as a MAMP, searching for a PRR. *Plant Signaling and Behavior*, 4(1), 66–68. <http://doi.org/10.4161/psb.4.1.7408>
- Iriti, M., Picchi, V., Rossoni, M., Gomarasca, S., Ludwig, N., Gargano, M., & Faoro, F. (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 493–500. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.01.004>
- Jain, S., Akiyama, K., Kan, T., Ohguchi, T., & Takata, R. (2003). The G protein b subunit

- FGB1 regulates development and pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics*, 43, 79–83. <http://doi.org/10.1007/s00294-003-0372-9>
- Jain, S., Akiyama, K., Mae, K., Ohguchi, T., & Takata, R. (2002). Targeted disruption of a G protein  $\alpha$  subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics*, 41(6), 407–413. <http://doi.org/10.1007/s00294-002-0322-y>
- Jaramillo, J. E., Rodríguez, V. P., Gil, L. F., García, M. C., Hio, J. C., Quevedo, D., ... Guzmán, M. (2013). *Tecnologías del cultivo del tomate bajo condiciones protegidas* (1st ed.). Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.
- Jelinski, N. A., Broz, K., Jonkers, W., Ma, L.-J., & Kistler, H. C. (2017). Effector Gene Suites in Some Soil Isolates of *Fusarium oxysporum* Are not Sufficient Predictors of Vascular Wilt in Tomato. *Phytopathology*, 612–626.
- Jia, C., Zhang, L., Liu, L., Wang, J., Li, C., & Wang, Q. (2013). Multiple phytohormone signalling pathways modulate susceptibility of tomato plants to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 637–650. <http://doi.org/10.1093/jxb/ers360>
- Jia, X., Meng, Q., Zeng, H., Wang, W., & Yin, H. (2016). Chitosan oligosaccharide induces resistance to Tobacco mosaic virus in Arabidopsis via the salicylic acid-mediated signalling pathway. *Scientific Reports*, 6(1), 26144. <http://doi.org/10.1038/srep26144>
- Jiao, J., Zhou, B., Zhu, X., Gao, Z., & Liang, Y. (2013). Fusaric acid induction of programmed cell death modulated through nitric oxide signalling in tobacco suspension cells. *Planta*, 238(4), 727–737. <http://doi.org/10.1007/s00425-013-1928-7>
- Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Tran, L. S. P., & Ito, S. I. (2018). Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against *Fusarium* wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 870–882. <http://doi.org/10.1111/mpp.12571>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature Reviews*, 444(November), 323–329. <http://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kalaji, H. M., Carpentier, R., Allakhverdiev, S. I., & Bosa, K. (2012). Fluorescence parameters as early indicators of light stress in barley. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 112, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.03.009>
- Kashiwa, T., Suzuki, T., Sato, A., Akai, K., Teraoka, T., Komatsu, K., & Arie, T. (2016). A new biotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 emerged by a transposon-driven mutation of avirulence gene AVR1. *FEMS Microbiology Letters*, 363(May), 1–6. <http://doi.org/10.1093/femsle/fnw132>
- Kaur, S., & Dhillon, G. S. (2013). The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Critical Reviews in Microbiology*, 1–21. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2013.770385>
- Kauss, H., Jeblick, W., & Domard, A. (1989). The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension

- cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, 178(3), 385–392. <http://doi.org/10.1007/BF00391866>
- Khiareddine, H. J., & El-Mohamedy, R. S. (2015). Variation in Chitosan and Salicylic Acid Efficacy Towards Soil-borne and Air-borne Fungi and Their Suppressive Effect of Tomato Wilt Severity. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 6(11). <http://doi.org/10.4172/2157-7471.1000325>
- Kiirika, L. M., Stahl, F., & Wydra, K. (2013). Phenotypic and molecular characterization of resistance induction by single and combined application of chitosan and silicon in tomato against *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81, 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.11.002>
- Kipreos, E. T., & Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biology*, 1(5), 1–7.
- Klosterman, S. J., Subbarao, K. V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S. E., Thomma, B. P. H. J., ... Ma, L.-J. (2011). Comparative Genomics Yields Insights into Niche Adaptation of Plant Vascular Wilt Pathogens. *PLoS Pathogens*, 7(7), 19. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002137>
- Konappa, N., Krishnamurthy, S., & Siddaiah, C. N. (2018). Evaluation of biological efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(63), 1–11.
- Kong, Q., Sun, T., Qu, N., Ma, J., Li, M., Cheng, Y., ... Zhang, Y. (2016). Two redundant receptor-like cytoplasmic kinases function downstream of pattern recognition receptors to regulate activation of SA biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 171(2), pp.01954.2015. <http://doi.org/10.1104/pp.15.01954>
- Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D. A., Druzhinina, I. S., Thon, M., ..., & Mukherjee, M. (2011). Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 12(R40), 1–15. <http://doi.org/10.1177/1362361317702559>
- Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Chandra, R., Pal, A., Raliya, R., Biswas, P., & Saharan, V. (2018). Engineered chitosan based nanomaterials : Bioactivity , mechanisms and perspectives in plant protection and growth. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113(April), 494–506. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.130>
- Kuramae, E. E., Buzeto, A. L., Ciampi, M. B., & Souza, N. L. (2003). Identification of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB in lettuce, AG 4 HG-I in tomato and melon, and AG 4 HG-III in broccoli and spinach, in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 109(4), 391–395. <http://doi.org/10.1023/A:1023591520981>
- Lafontaine, P. J., & Benhamou, N. (1996). Chitosan treatment: An emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Biocontrol Science and Technology*, 6(1), 111–124. <http://doi.org/10.1080/09583159650039575>
- Lagopodi, A. L., Ram, A. F. J., Lamers, G. E. M., Punt, P. J., van den Hondel, C. A. M. J., Lugtenberg, B. J. J., & Bloemberg, G. V. (2002). Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed

- by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, *15*(2), 172–179.  
<http://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.2.172>
- Lamichhane, J. R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P., & Messéan, A. (2016). Conventional Pesticides in Agriculture: Benefits Versus Risks. *Plant Disease*, *100*(1), 10–24. <http://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0574-FE>
- Latowski, D., Surówka, E., & Strzałka, K. (2010). Regulatory Role of Components of Ascorbate–Glutathione Pathway in Plant Stress Tolerance. In N. A. Anjum, S. Umar, & M.-T. Chan (Eds.), *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants* (pp. 1–443). Springer Netherlands. <http://doi.org/10.1007/978-90-481-9404-9>
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'souza, C., Harashima, T., Shen, W. C., Wang, P., ... Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *64*(4), 746–85. <http://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.746-785.2000>
- León, R. (2013). *Estudio del papel del ácido jasmónico (JA) como señal reguladora del proceso de micorrización arbuscular en Solanáceas*. Universidad de Granada.
- Leslie, J., & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (First edit). Ames, Iowa: Blackwell.
- Li, R. X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q. R., Li, R., & Chen, W. (2015). Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0130081>
- Li, X. F., Feng, X. Q., Yang, S., Wang, T. P., & Su, Z. X. (2008). Effects of Molecular Weight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity Against *Aspergillus niger*. *Iranian Polymer Journal*, *17*(11), 843–852.
- Lievens, B., Houterman, P. M., & Rep, M. (2009). Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS Microbiology Letters*, *300*(2), 201–215. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01783.x>
- Lin, W., Hu, X., Zhang, W., Rogers, J. W., & Cai, W. (2005). Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *Journal of Plant Physiology*, *162*(8), 937–944. <http://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2004.10.003>
- Liu, L., Sonbol, F. M., Huot, B., Gu, Y., Withers, J., Mwimba, M., ... Dong, X. (2016). Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nature Communications*, *7*, 1–10. <http://doi.org/10.1038/ncomms13099>
- Liu, S. Y., Chen, J. Y., Wang, J. L., Li, L., Xiao, H. L., Adam, S. M., & Dai, X. F. (2013). Molecular characterization and functional analysis of a specific secreted protein from highly virulent defoliating *Verticillium dahliae*. *Gene*, *529*(2), 307–316. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2013.06.089>

- Lockwood, J. L. (1977). Fungistasis in soils. *Biological Reviews*, 52(1), 1–43. <http://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1977.tb01344.x>
- López-Berges, M. S., Hera, C., Sulyok, M., Schäfer, K., Capilla, J., Guarro, J., & Di Pietro, A. (2013). The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular Microbiology*, 87(1), 49–65. <http://doi.org/10.1111/mmi.12082>
- López-Díaz, C., Rahjoo, V., Sulyok, M., Ghionna, V., Martín-Vicente, A., Capilla, J., ... López-Berges, M. S. (2017). Fusaric acid contributes to virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular Plant Pathology*. <http://doi.org/10.1111/mpp.12536>
- López, P. F. (2014). *Obtención de quitosano a partir de desechos del exoesqueleto de camatón tití (Xiphopenaeus riveti) para el desarrollo de películas poliméricas plastificadas con glicerina*. Universidad de San Buenaventura.
- Lorenzini, G., Guidi, L., Nali, C., Ciompi, S., & Soldatini, G. F. (1997). Photosynthetic response of tomato plants to vascular wilt diseases. *Plant Science*, 124(2), 143–152. [http://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)04600-1](http://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)04600-1)
- Luan, F., Wei, L., Zhang, J., Mi, Y., Dong, F., Li, Q., & Guo, Z. (2018). Antioxidant activity and antifungal activity of chitosan derivatives with propane sulfonate groups. *Polymers*. <http://doi.org/10.3390/polym10040395>
- Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(2), 175–190. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.004>
- Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., ... Kazan, K. (2013). *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 399–416. <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>
- Ma, L.-J., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A., ... Rep, M. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, 464(7287), 367–373. <http://doi.org/10.1038/nature08850>
- Ma, L., Houterman, P. M., Gawehns, F., Cao, L., Sillo, F., Richter, H., ... Takken, F. L. W. (2015). The AVR2-SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytologist*, 208(2), 507–518. <http://doi.org/10.1111/nph.13455>
- Ma, P. L., Lavertu, M., Winnik, M., & Buschmann, M. D. (2009). New Insights into Chitosan - DNA Interactions Using Isothermal Titration Microcalorimetry. *Biomacromolecules*, 10, 1490–1499.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2009). *Brock - Biología De Los Microorganismos 10ª Ed by Kalu.pdf*. (P. Education, Ed.) (10th ed.). Southern Illinois University Carbondale.
- Maina, F. M., Hauschild, R., & Sikora, R. (2008). *Protection of tomato plants against fusaric acid by resistance induction*. ©*Journal of Applied Biosciences* (Vol. 1).



- Mandal, S., Mallick, N., & Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7), 642–649. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.03.001>
- Manikandan, R., Harish, S., Karthikeyan, G., & Raguchander, T. (2018). Comparative Proteomic Analysis of Different Isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* to Exploit the Differentially Expressed Proteins Responsible for Virulence on Tomato Plants. *Frontiers in Microbiology*, 9(420), 13. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00420>
- Martínez-Medina, A., Fernández, I., Sánchez-Guzmán, M. J., Jung, S. C., Pascual, J. A., & Pozo, M. J. (2013). Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 4(June), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00206>
- Marzano, M., Gallo, A., & Altomare, C. (2013). Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* vs. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through UV-induced tolerance to fusaric acid. *Biological Control*, 67(3), 397–408. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.008>
- Masse, G. (1885). The “sleepy disease” of tomatoes. *Garden. Chromogen Service*, 3(17), 707–708.
- Mastouri, F., Björkman, T., & Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), 1213–1221. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0091>
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), 485–512. <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll a fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. <http://doi.org/10.1093/jxb/51.345.659>
- McGovern, R. J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*, 73, 78–92. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
- Melgarejo, L. M., Romero, M., Hernandez, S., Barrera, J., Solarte, E., Pérez, V., ... Pérez, W. (2010). *Experimentos en Fisiología Vegetal*. (U. N. de Colombia, Ed.) (First edit). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Mesa, P. E. (2016). *Efecto de microorganismos biocontroladores y aditivos orgánicos sobre el camaduleo de la papa ocasionado por Spongospora subterranea f. sp. subterranea*. Universidad Nacional de Colombia.
- Mesa, P. E., Cotes, A. M., & Moreno, C. A. (2014). Efecto promotor de crecimiento vegetal y biocontrolador de *Trichoderma koningiopsis* sobre *Rhizoctonia solani* en el cultivo de arroz. In *VIII Congreso Latinoamericano de Colombia Micología*.
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311–324. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>

- Misawa, T., & Kuninaga, S. (2010). The first report of tomato foot rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-3 PT and AG-2-Nt and its host range and molecular characterization. *Journal of General Plant Pathology*, 76(5), 310–319. <http://doi.org/10.1007/s10327-010-0261-2>
- Molla, A. H., Fakhru'l-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanafi, M. M., & Alam, M. Z. (2001). *In-vitro* compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(9), 849–856. <http://doi.org/10.1023/A:1013844306960>
- Moreno, C. A., Castillo, F., González, A., Bernal, D., Jaimes, Y., Chaparro, M., ... Cotes, A. M. (2009). Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(2), 111–120. <http://doi.org/10.1016/j.pmpp.2009.10.001>
- Moreno, C. A., Cotes Prado, A. M., & Valbuena, R. I. (2010). *Desarrollo de un bioplaguicida a base de Trichoderma koningiopsis Th003 y uso en el cultivo de la lechuga para el control del moho blanco (Sclerotinia sclerotiorum y Sclerotinia minor)*.
- Nakashima, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Reports*, 32(7), 959–970. <http://doi.org/10.1007/s00299-013-1418-1>
- Nankishore, A., & Farrell, A. D. (2016). The response of contrasting tomato genotypes to combined heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 202, 75–82. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.07.006>
- Nelson, P. E. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In M. Mace, A. Bell, & C. Beckman (Eds.), *Fungal Wilt Diseases of Plants* (1st ed., pp. 51–78). New York: Academic Press.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press.
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., ... Chandra, N. S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific Reports*, 6(January), 1–14. <http://doi.org/10.1038/srep21367>
- Nobori, T., Mine, A., & Tsuda, K. (2018). Molecular networks in plant-pathogen holobiont. *FEBS Letters*. <http://doi.org/10.1002/1873-3468.13071>
- Nogués, S., Cotxarrera, L., Alegre, L., & Trillas, M. I. (2002). Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist*, 154(2), 461–470. <http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00379.x>
- Olivain, C., & Alabouvette, C. (1999). Process of Tomato Root Colonization by a Pathogenic Strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Comparison with a Non-Pathogenic Strain. *New Phytologist*, 141(3), 497–510.
- Olivain, C., Humbert, C., Nahalkova, J., Fatehi, J., L'haridon, F., & Alabouvette, C.

- (2006). Colonization of Tomato Root by Pathogenic and Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strains Inoculated Together and Separately into the Soil. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 72(2), 1523–1531. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1523-1531.2006>
- Orzali, L., Corsi, B., Forni, C., & Riccioni, L. (2017). Chitosan in Agriculture : A New Challenge for Managing Plant Disease. In E. Shalaby (Ed.), *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides* (p. 318). Rome, Italy.
- Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J., & Lopez-Llorca, L. V. (2008). Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 541–553. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x>
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23, 23–54.
- Pareja-Jaime, Y., Isabel, M., Roncero, G., & Ruiz-Roldán, M. C. (2008). Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Is Required for Full Virulence on Tomato Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 21(6), 728–736.
- Park, A., Ro-Dong, A., Jo, K. J., Jo, Y. Y., Jin, Y. L., Kim, K. Y., ... Kim, Y. W. (2002). Variation of antifungal activities of chitosans on plant pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(1), 84–88.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., & Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 46–56. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.013>
- Patel, S., & Saraf, M. (2017). Biocontrol efficacy of *Trichoderma asperellum* MSST against tomato wilting by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(5–6), 228–238. <http://doi.org/10.1080/03235408.2017.1287236>
- Paz, J., Galvis, R. D., Vargas, R. A., & Agudelo, A. C. (2012). Caracterización de quitina y quitosano obtenidos a partir de residuos de camarón y micelio de *Aspergillus niger*. *Acta Agronómica*, (Número especial), 81–82.
- Pedroza, A., & Samaniego, J. (2009). Analisis del area bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) en patosistemas agricolas. In *Tópicos selectos de estadística aplicados a la fitosanidad* (pp. 6–16). <http://doi.org/10.13140/2.1.4475.7767>
- Peña-Lomelí, N., Sánchez-del Castillo, A., Rodríguez-Pérez, F., Moreno-Pérez, J. E., & Moreno, E. del C. (2013). *Comportamiento productivo de híbridos F1 de tomate y sus poblaciones F2*. *Revista fitotecnia mexicana* (Vol. 36). Sociedad Mexicana de Fitogenética.
- Pérez, A., Rojas, J., Rodriguez, J., Arrieta, I., Arrieta, Y., & Rodríguez, A. (2014). Actividad antibacteriana de soluciones ácidas de quitosano obtenido de exoesqueleto de camarón. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 104–110.
- Pichyangkura, R., & Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 49–65.

<http://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.031>

- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., van Der Ent, S., & van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308–316. <http://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pieterse, C. M. J., Poelman, E. H., van Wees, S. C. M., & Dicke, M. (2013). Induced plant responses to microbes and insects. *Frontiers in Plant Science*, 4(November), 475. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00475>
- Pieterse, C. M. J., van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 489–521. <http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pinheiro, C., & Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 869–882. <http://doi.org/10.1093/jxb/erq340>
- Pitzschke, A., Schikora, A., & Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 421–426. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.008>
- Pshibytko, N. L., Zenevich, L. A., & Kabashnikova, L. F. (2006). Changes in the photosynthetic apparatus during *Fusarium* wilt of tomato. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(1), 25–31. <http://doi.org/10.1134/s1021443406010031>
- Pusztahelyi, T. (2018). Chitin and chitin-related compounds in plant–fungal interactions. *Mycology*, 9(3), 189–201. <http://doi.org/10.1080/21501203.2018.1473299>
- Qi, J., Song, C. P., Wang, B., Zhou, J., Kangasjärvi, J., Zhu, J. K., & Gong, Z. (2018). Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(9), 805–826. <http://doi.org/10.1111/jipb.12654>
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457–1465. <http://doi.org/10.1021/bm034130m>
- Raho, N., Ramirez, L., Lanteri, M. L., Gonorazky, G., Lamattina, L., ten Have, A., & Laxalt, A. M. (2011). Phosphatidic acid production in chitosan-elicited tomato cells, via both phospholipase D and phospholipase C/diacylglycerol kinase, requires nitric oxide. *Journal of Plant Physiology*, 168(6), 534–539. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.09.004>
- Ramos Berger, L. R., Montenegro Stamford, T. C., de Oliveira, K. Á. R., de Miranda Pereira Pessoa, A., de Lima, M. A. B., Estevez Pintado, M. M., ... de Souza, E. L. (2018). Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit *Colletotrichum* species. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 635–641. <http://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.11.178>
- Reino, L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., & Collado, I. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry*

- Reviews*, 7, 89–123. <http://doi.org/10.1007/s11101-006-9032-2>
- Reis, A., Costa, H., Boiteux, L. S., & Lopes, C. A. (2005). First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 on Tomato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 426–428. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582005000400017>
- Rep, M. (2005). Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 19–27. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.014>
- Rep, M., van Der Does, H. C., Meijer, M., Van Wijk, R., Houterman, P. M., Dekker, H. L., ... Cornelissen, B. J. C. (2004). A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1373–1383. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04177.x>
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264–272. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>
- Rongai, D., Pulcini, P., Pesce, B., & Milano, F. (2017). Antifungal activity of pomegranate peel extract against *Fusarium* wilt of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 147(1), 229–238. <http://doi.org/10.1007/s10658-016-0994-7>
- Rubio-Reque, G. L., Baltodano-Sánchez, F. D. M., Liliana, I., Wilson-Krugg, J. H., & Muñoz-Ríos, M. A. (2008). Resistencia in vitro de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP. *Revista Biológica de La Universidad de Trujillo*, 28.
- Saharan, V., & Pal, A. (2016). *Chitosan Based Nanomaterials in Plant Growth and Protection*. Springer India.
- Saharan, V., Sharma, G., Yadav, M., Choudhary, M. K., Sharma, S. S., Pal, A., ... Biswas, P. (2015). Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 346–353. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.027>
- Samadi, L., & Behboodi, B. (2006). Fusaric acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: roles of caspase-like activity, cytochrome c, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Planta*, 225(1), 223–234. <http://doi.org/10.1007/s00425-006-0345-6>
- Sánchez, A. D., Barrera, V., Reybet, G. E., & Sosa, M. C. (2015). Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Revista de La Facultad de Agronomía, La Plata*, 114(1), 61–70.
- Sarwar, M. (2015). The Dangers of Pesticides Associated with Public Health and Preventing of the Risks. *International Journal of Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 1(2), 130–136.
- Sathiyabama, M., Akila, G., & Einstein Charles, R. (2014). Chitosan-induced defence responses in tomato plants against early blight disease caused by *Alternaria solani*

- (Ellis and Martin) Sorauer. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 47(14), 1777–1787. <http://doi.org/10.1080/03235408.2013.858423>
- Sathiyabama, M., & Charles, R. E. (2015). Fungal cell wall polymer based nanoparticles in protection of tomato plants from wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Carbohydrate Polymers*, 133, 400–407. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.066>
- Schmidt, S. M., Houterman, P. M., Schreiver, I., Ma, L., Amyotte, S., Chellappan, B., ... Rep, M. (2013). MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics*, 14(1), 119. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-119>
- Scott, J. W., & Jones, J. P. (1989). Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. *Euphytica*, 40(1–2), 49–53. <http://doi.org/10.1007/BF00023296>
- Segarra, G., Casanova, E., Avilés, M., & Trillas, I. (2010). Trichoderma asperellum strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology*, 59(1), 141–149. <http://doi.org/10.1007/s00248-009-9545-5>
- Sekiguchi, S., Miura, Y., Kaneko, H., Nishimura, S. I., Nishi, N., Iwase, M., & Tokura, S. (1994). Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers. *Food Hydrocolloids: Structures, Properties, and Functions*, 71–76.
- Sen, A., Chatterjee, R., Bhisare, P., & Subba, S. (2018). Grafting as an Alternate Tool for Biotic and Abiotic Tolerance with Improved Growth and Production of Solanaceous Vegetables: Challenges and Scopes in India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 7(1), 121–135. <http://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.014>
- Sepúlveda-Chavera, G., Huanca, W., Salvatierra-Martínez, R., & Latorre, B. A. (2014). First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 and *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Tomatoes in the Azapa Valley of Chile. *Plant Disease*, 98(10), 1432–1432. <http://doi.org/10.1094/PDIS-03-14-0303-PDN>
- Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 459–464. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.011>
- Sharif, R., Mujtaba, M., Rahman, M. U., Shalmani, A., Ahmad, H., Anwar, T., ... Wang, X. (2018). The Multifunctional Role of Chitosan in Horticultural crops: a review. *Molecules*, 23(872), 1–20. <http://doi.org/10.3390/molecules23040872>
- Shoresh, M., Yedidia, I., & Chet, I. (2005). Biological Control Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Biological Control*, 95(1), 76–84. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0076>
- Silva, M. S., Arraes, F. B. M., Campos, M. de A., Grossi-de-Sa, M., Fernandez, D., Cândido, E. de S., ... Grossi-de-Sa, M. F. (2018). Review: Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Plant Science*, 270(October 2017), 72–84.

- <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.013>
- Simbaqueba, J. (2015). *Mapeo de genes candidatos involucrados en la inducción de resistencia sistémica y promoción de crecimiento por Trichoderma koningiopsis (Th003) en tomate*. Universidad Militar Nueva Granada.
- Singh, A., Shukla, N., Kabadwal, B. C., Tewari, A. K., & Kumar, J. (2018). Review on plant-*Trichoderma*-pathogen interaction. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(2), 2382–2397. <http://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.291>
- Singh, V. K., Singh, H. B., & Upadhyay, R. S. (2017). Role of fusaric acid in the development of 'Fusarium wilt' symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 320–332. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.028>
- Singh, V. K., & Upadhyay, R. S. (2014). Fusaric acid induced cell death and changes in oxidative metabolism of *Solanum lycopersicum* L. *Botanical Studies*, 55(1), 66. <http://doi.org/10.1186/s40529-014-0066-2>
- Smith, A., Beltrán, C. A., Kusunoki, M., Cotes, A. M., Motohashi, K., Kondo, T., & Deguchi, M. (2013). Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of General Plant Pathology*, 79(1), 74–85. <http://doi.org/10.1007/s10327-012-0419-1>
- Sobrado, M. A. (1994). Leaf age effects on photosynthetic rate, transpiration rate and nitrogen content in a tropical dry forest. *Physiologia Plantarum*, 90(1), 210–215. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb02213.x>
- Solanki, V. H., Patel, R. M., & Patel, K. G. (2015). Biochemical Alteration in Tomato Varieties Resistant and Susceptible To *Fusarium oxysporum*, 15(2), 5029–5036.
- Soliman, M. H., & El-Mohamedy, R. S. R. (2017). Induction of defense-related physiological and antioxidant enzyme response against powdery mildew disease in okra (*Abelmoschus esculentus* L.) plant by using chitosan and potassium salts. *Mycobiology*. <http://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.409>
- Soto-Suárez, M., Baldrich, P., Weigel, D., Rubio-Somoza, I., & San Segundo, B. (2017). The Arabidopsis miR396 mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses against fungal pathogens. *Scientific Reports*, 7(1), 44898. <http://doi.org/10.1038/srep44898>
- Steinberg, C., Whipps, J. M., Wood, D., & Fenlon, J. (1999). Mycelial development of *Fusarium oxysporum* in the vicinity of tomato roots. *Mycological Research*, 103(6), 769–778.
- Steinberg, C., Whipps, J. M., Wood, D., Fenlon, J., & Alabouvette, C. (1999). Mycelial development of *Fusarium oxysporum* in the vicinity of tomato roots. *Mycological Research*, 103(6), 769–778. <http://doi.org/10.1017/S0953756298007710>
- Sundaramoorthy, S., & Balabaskar, P. (2013). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of*

- Applied Biology & Biotechnology*, 1(03), 36–40.  
<http://doi.org/10.7324/JABB.2013.1306>
- Tachaboonyakiat, W. (2016). *Antimicrobial applications of chitosan. Chitosan Based Biomaterials* (Vol. 2). Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-100228-5.00009-2>
- Taghdi, Y., Hermosa, R., Domínguez, S., Rubio, M. B., Essalmani, H., Nicolás, C., & Monte, E. (2015). Effectiveness of composts and *Trichoderma* strains for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 232–240.  
[http://doi.org/DOI:10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-15226](http://doi.org/DOI:10.14601/Phytopathol_Mediterr-15226)
- Takken, F., & Rep, M. (2010). The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 309–314. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00605.x>
- Tans-Kersten, J., Huang, H., & Allen, C. (2004). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*, 34(1), 173–178.  
<http://doi.org/10.1128/JB.183.12.3597>
- Teixeira, A. (2017). *Chitosan as seed soaking agent: germination and growth of Coriandrum sativum and Solanum lycopersicum*. Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar.
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5), 260–270.  
<http://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>
- Tikhonov, V. E., Yamskov, I. A., & Palma-guerrero, J. (2006). Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N - / 2 ( 3 ) - ( dodec-2-enyl ) succinoyl / -derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 2(64), 66–72.  
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.021>
- Tripathy, B. C. hara., & Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 7(12), 1621–1633.  
<http://doi.org/10.4161/psb.22455>
- Tucci, M., Ruocco, M., De Masi, L., De Palma, M., & Lorito, M. (2011). The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 341–354. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00674.x>
- USDA, U. S. D. of A. (2014). Programa de datos de Plaguicidas (PDP) 2011 – 2014. Retrieved from <http://www.panna.org/your-health/food>
- Vallejo-Cabrera, F. A. (2000). Consideraciones generales sobre el mejoramiento genético del tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Acta Agronomica*, (Capítulo II), 11–24.
- van Dam, P., Fokkens, L., Schmidt, S. M., Linmans, J. H. ., Kistler, H. C., Ma, L.-J., & Rep, M. (2016). Effector profiles distinguish formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Environmental Microbiology*, 18(11), 1–42. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.13445>
- van Dam, P., & Rep, M. (2017). The Distribution of Miniature Impala Elements and SIX



- Genes in the *Fusarium* Genus is Suggestive of Horizontal Gene Transfer. *Journal of Molecular Evolution*, 85(1–2), 14–25. <http://doi.org/10.1007/s00239-017-9801-0>
- van der Does, H. C., Constantin, M. ., Houterman, P. M., Takken, F. L. W., Cornelissen, B. J. C., Haring, M. A., ... Rep, M. (2018). *Fusarium oxysporum* colonizes the stem of resistant tomato plants , the extent varying with the R-gene present. *European Journal of Plant Pathology*, 1–11.
- van Der Does, H. C., Lievens, B., Claes, L., Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2008). The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1475–1485. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01561.x>
- van der Does, H. C., & Rep, M. (2007). Virulence Genes and the Evolution of Host Specificity in Plant-Pathogenic Fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(10), 1175–1182. <http://doi.org/10.1094/MPMI-20-10-1175>
- Van, N. S., Minh, D. H., & Anh, N. D. (2013). Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of robusta coffee in green house. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(4), 289–294. <http://doi.org/10.1016/J.BCAB.2013.06.001>
- van Wees, S. C., van der Ent, S., & Pieterse, C. M. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 443–448. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.005>
- Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R. G., Romero-Gomez, S. de J., Rico-Garcia, E., Ocampo-Velazquez, R. V., ... Torres-Pacheco, I. (2017). Plant Hormesis Management with Biostimulants of Biotic Origin in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 8(October), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.01762>
- Vidhyasekaran, P. (2016). *Switching on Plant Innate Immunity Signaling Systems - Bioengineering and Molecular Manipulation of PAMP-PIMP-PRR Signaling Complex*. (F. Baluška & J. Vivanco, Eds.). Coimbatore: Springer International Publishing AG Switzerland. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-26118-8>
- Vlaardingerbroek, I., Beerens, B., Schmidt, S. M., Cornelissen, B. J. C., & Rep, M. (2016). Dispensable chromosomes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Molecular Plant Pathology*, 17(9), 1455–1466. <http://doi.org/10.1111/mpp.12440>
- Wagner, A., Michalek, W., & Jamiolkowska, A. (2006). Chlorophyll fluorescence measurements as indicators of fusariosis severity in tomato plants. *Agronomy Research*, 4(Special Issue), 461–464.
- Walker, J. M. (2010). *Plant Stress Tolerance Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)*. (R. Sunkar, Ed.) (Springer). Hertfordshire: Humana Press.
- Walters, D. R. (2015). *Physiological responses of plants to attack. Crop & Soil Systems Research Group* (Wiley Blac, Vol. 1). Edinburg.
- Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: Challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263–1280. <http://doi.org/10.1093/jxb/ert026>

- Walters, D., Walsh, D., Newton, A., & Lyon, G. (2005). Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*, 95(16), 1368–1373. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1368>
- Walters, M. (2015). The plant innate immune system. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*, 26, 8–12.
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [http://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wiesel, L., Newton, A. C., Elliott, I., Booty, D., Gilroy, E. M., Birch, P. R. J., & Hein, I. (2014). Molecular effects of resistance elicitors from biological origin and their potential for crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 5(November), 655. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00655>
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., ... Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *The Open Mycology Journal*, 8(1), 71–126. <http://doi.org/10.2174/1874437001408010071>
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*, 96(2), 181–185. <http://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>
- Xing, K., Xing, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Shen, X., Li, X., & Miao, X. (2018). Fungicidal effect of chitosan via inducing membrane disturbance against *Ceratocystis fimbriata*. *Carbohydrate Polymers*, 192(February), 95–103. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.053>
- Xing, K., Zhu, X., Peng, X., & Qin, S. (2015). Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2), 569–588. <http://doi.org/10.1007/s13593-014-0252-3>
- Xu, J.-R. (2000). MAP Kinases in Fungal Pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, 31(3), 137–152. <http://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1237>
- Yadeta, K. A., & J. Thomma, B. P. H. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4(April), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097>
- Yendyo, S., Ramesh, G. ., & Pandey, B. R. (2017). Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescencens* and *Bacillus subtilis* for biological control of *Ralstonia* wilt of tomato. *F1000Research*, (0), 1–22. <http://doi.org/10.12688/f1000research.12448.1>
- Yockteng, R., Almeida, A. M. R., Yee, S., Andre, T., Hill, C., & Specht, C. D. (2013). A Method for Extracting High-Quality RNA from Diverse Plants for Next-Generation Sequencing and Gene Expression Analyses. *Applications in Plant Sciences*, 1(12), 1–6. <http://doi.org/10.3732/apps.1300070>
- Yoon, M. Y., Cha, B., & Kim, J. C. (2013). Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *Plant Pathology Journal*, 29(1), 1–9.

- <http://doi.org/10.5423/PPJ.RW.05.2012.0072>
- You, J., Zhang, J., Wu, M., Yang, L., Chen, W., & Li, G. (2016). Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*, *101*, 31–38. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.006>
- Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, *185*, 57–63. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.029>
- Zehra, A., Meena, M., Dubey, M. K., Aamir, M., & Upadhyay, R. S. (2017). Synergistic effects of plant defense elicitors and *Trichoderma harzianum* on enhanced induction of antioxidant defense system in tomato against *Fusarium* wilt disease. *Botanical Studies*, *58*(1). <http://doi.org/10.1186/s40529-017-0198-2>
- Zeng, W., Melotto, M., & He, S. Y. (2010). Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*(5), 599–603. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.05.006>
- Zhang, A. X., Zou, P., & Li, P. (2017). Biostimulant Activity of Chitooligomers : Effect of Different Degrees of Acetylation and Polymerization on Wheat Seedlings under Salt Stress, *4*(12), 80333.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., & Wang, X. (2004). Phospholipase D1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *PNAS*, *101*(25), 9508–9513.
- Zou, P., Yang, X., Wang, J., Li, Y., Yu, H., Zhang, Y., & Liu, G. (2016). Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food Chemistry*, *190*(12), 1174–1181. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.076>