



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD IRAPUATO

Actividad antifúngica del Ácido Naftalen Acético y su posible efecto sobre algunos genes reguladores de crecimiento y esporulación del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense*

Tesis que presenta

IBQ. María Karina Manzo Valencia

Para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

En la especialidad de

Biología de Plantas

Directora de Tesis

Dra. Dora Linda Asunción Guzmán de Peña

Irapuato, Guanajuato.

Marzo, 2016

UBICACIÓN DEL TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Micotoxinas perteneciente al Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, bajo la dirección de la Dra. Dora Linda A. Guzmán de Peña.

Irapuato, Guanajuato. Marzo 2016

AGRADECIMIENTOS

AL CONACYT, por el apoyo económico otorgado durante la realización de este estudio.

Al CINVESTAV-Irapuato por proveer las condiciones de realización de tesis y permitirme una estancia cómoda y de agradable ambiente.

A mis padres, especialmente a mi madre por todo lo que ha sacrificado, gracias por su amor, apoyo y comprensión, a mis hermanas Gloria y Sandra que las adoro y mi hermano Benito por su apoyo durante esta etapa.

Un agradecimiento especial a la Dra. Dora Linda Guzmán, por abrirme las puertas de su laboratorio. Agradezco su tiempo, dedicación y por compartir sus conocimientos dentro y fuera del laboratorio, también por ayudarme a ser un mejor ser humano.

A la Dra. Angélica Cibrian y al Dr. Miguel Ángel Gómez por sus consejos y observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A Laura Valdés por todo su apoyo personal y académico en Biología Molecular y ayudarme a realizar gran parte importante de mi proyecto de maestría.

A Laura Hernández por su apoyo incondicional y su amistad.

Al laboratorio del Dr. Ruiz en especial a Claudia León por su ayuda, disposición y por todo el equipo y material que me facilitaron.

A mis compañeras del Laboratorio “Chicas súper mega poderosas” que aprendí a quererlas e hicieron de mi estancia en el laboratorio una gran experiencia Diana, Viviana, Lupita y Estefanía.

A las grandes amistades que establecí durante mi estancia por compartir grandes aventuras, experiencias vividas y momentos inolvidables dentro y fuera del CINVESTAV: Luis Ernesto, Francisco, Magda, Octavio y Fernando.

A todos mis compañeros de generación con quienes conviví a lo largo de mi estancia.

Al Sr. Felipe y Margarita por siempre ayudarnos con el material en el laboratorio.

A Dora Elia, Diana, Sarita y Juan Pablo, por todo el apoyo administrativo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	10
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN	5
I. HIPÓTESIS.....	14
II. OBJETIVOS.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1. Material Biológico.	15
2. Medios de cultivo	15
2.1 Medios de cultivo.....	15
2.2 Medio de cultivo líquido.....	16
2.3 Otros sustratos utilizados	16
2.4 Inoculación y condiciones de cultivo	17
3. Métodos experimentales.....	18
3.1 Determinación de la incidencia de <i>Fusarium</i> en suelo de zonas productoras de plátano mediante el método de dilución de suelo en placa.....	18
3.2 Efecto del Acético Naftalen Acético sobre <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	22
4. Efecto del Acético Naftalen acético sobre <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici in vitro</i>	25
4.1.a Determinación del tiempo de germinación de las esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en medio de cultivo líquido	25
4.1.b Determinación de concentración mínima inhibitoria de ANA sobre la germinación de las esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	26
4.2. Determinación de la concentración+ mínima inhibitoria de ANA sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> por peso seco.	26
5. Determinación del efecto del ANA sobre la transcripción de los genes reguladores del crecimiento flbA y fluG y de esporulación brlA de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y f. sp. <i>cubense</i>	27
5.1. Condiciones de cultivo de <i>F. oxysporum</i>	27

5.2. Extracción de RNA total utilizando Trizol (Invitrogen)	27
5.3. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos de los genes fluG, flbA y brlA en <i>Fusarium oxysporum</i>	28
5.4. Determinación semicuantitativa de la expresión de los genes fluG, brlA y flbA mediante transcripción inversa (RT) seguida por reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	30
6. Viabilidad de las esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y f. sp. <i>cubense</i> tratadas con ANA por medio de una técnica colorimetría utilizando Alamar Blue ...	31
7. Viabilidad de las esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y f. sp. <i>cubense</i> tratadas con ANA por medio de una técnica de tinción con colorantes fluorescentes Ioduro de propidio y naranja de acridina.....	32
IV. RESULTADOS	34
1. Incidencia de <i>Fusarium</i> en suelo de zonas productoras de plátano	34
1.1 Aislamiento de los hongos con características macro y microscópicas de especies de <i>Fusarium</i>	34
1.2 Identificación microscópica de las especies de <i>Fusarium</i>	38
1.3 Identificación molecular de los aislados de suelo por amplificación de la región 5.8 S ITS1-ITS4 de los genes ribosomícos.	40
2. Determinación del efecto del Ácido Naftalen acético (ANA) utilizando el pato-sistema <i>Solanum lycopersicum-Fusarium oxysporum</i> en suelo en el invernadero..	44
3. Efecto del ANA sobre la población de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (FOC) inoculado en suelo de Michoacán contenido en recipientes en invernadero sin indicadores indirectos	50
4. Efecto del Acético Naftalen acético sobre <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici in vitro</i>	52
4.1a. Determinación del tiempo de germinación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici in vitro</i>	52
4.1b. Efecto de la concentración mínima inhibitoria de ANA sobre la germinación de esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	54
4.2 Efecto de la concentración mínima inhibitoria de ANA sobre el crecimiento de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	55

5. Efecto del ANA sobre la transcripción de los genes reguladores del crecimiento flbA y fluG y de esporulación brlA de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y f. sp. <i>cubense</i>	56
6. Viabilidad de las esporas, de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y f. sp. <i>cubense</i> tratadas con ANA, evaluada por medio de una técnica colorimétrica utilizando Alamar Blue	69
7. Viabilidad de las esporas, de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y f. sp. <i>cubense</i> tratadas con ANA, evaluada por la técnica de tinción con colorantes fluorescentes de Ioduro de propidio y naranja de acridina.....	71
V. DISCUSION	74
VI. CONCLUSIONES	80
VII. PERSPECTIVAS	82
VIII. BIBLIOGRAFIA	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar cada uno de los genes de crecimiento y esporulación de <i>Fusarium oxysporum</i> y los valores teóricos de tm	29
Tabla 2. Temperaturas de alineamiento, número de ciclos y tamaño de los fragmentos amplificados de los genes brlA, flbA y fluG.	30
Tabla 3. Número total de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) e Incidencia del Genero <i>Fusarium</i> en suelos de zonas bananeras de México	34
Tabla 5. Especies identificadas de <i>Fusarium</i> del suelo de zonas productoras de plátano.	42
Tabla 6. Efecto de la concentración del ANA 100 mM sobre el desarrollo de plántulas de Jitomate inoculas con <i>F. oxysporum</i>	44
Tabla 7. Efecto de la concentración del ANA (50 mM) sobre el desarrollo de plántulas de Jitomate inoculas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	46
Tabla 8. Tiempo de germinación de esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	53
Tabla 9. Efecto de diferentes concentraciones del Ácido Naftalen Acético sobre la germinación de <i>F. oxysporum</i> en medio PDB.	54
Tabla 10. Efecto del Ácido Naftalen Acético en diferentes concentraciones en el crecimiento de <i>F. oxysporum</i>	55
Tabla 11. Expresión de los genes brlA, fluG y flbA de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> con 3 horas de exposición al ANA. Con un tiempo total de incubación de 9 horas.	57

Tabla 12. Expresión de los genes *brlA*, *fluG* y *flbA* de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* con 3 horas de exposición al ANA. Tiempo total de incubación de 9 horas 58

Tabla 13. Esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con Ácido Naftalen Acético y teñidas con Ioduro de propidio - Naranja de acridina. 72

Tabla 14. Esporas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* tratadas con ANA y teñidas con Ioduro de propidio - Naranja de acridina. 73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo que describe las interacciones de genes en el control de la iniciación del desarrollo.....	12
Figura 2. Experimento de suelo inoculado con <i>F. oxysporum</i> contenido en vasos de unicel.....	25
Figura 3. Aislados del suelo del estado de Michoacán crecidos en medio de cultivo PDA.....	35
Figura 4. Aislados del suelo del estado de Veracruz crecidos en medio de cultivo PDA.....	36
Figura 5. Aislados del suelo del estado de Chiapas crecidos en medio de cultivo PDA.	37
Figura 6. Aislados del suelo de Tabasco con características de <i>Fusarium</i> crecidos en medio de cultivo PDA.	38
Figura 7. Imagen microscópica de microconidias y macroconidias de aislados de los suelos de zonas productoras de plátano, vista 40X.....	40
Figura 8. Análisis de DNA de hongos, en agarosa 1%.....	41
Figura 9. Análisis de productos de PCR en agarosa 1%, de DNA de hongos aislados de Michoacán.....	41
Figura 10. Árbol filogenético. (MEGA 6. Test Neighbor-Joining Tree).....	43

Figura 11. Plantas con 2.5 días después de la inoculación de <i>F. oxysporum</i> y tratadas con ANA.	45
Figura 12. Plantas tratadas con ANA siete días después de la inoculación.	45
Figura 13. Plantas con 7 días después de la inoculación de <i>F. oxysporum</i> y tratadas con ANA	46
Figura 14. Altura en plantas de Jitomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con ANA 50 mM. 35 días después de la inoculación	47
Figura 15. Grosor de tallo en plantas de Jitomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con ANA 50 mM. 35 días después de la inoculación	47
Figura 16. Altura en plantas de Jitomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con Ácido Naftalen Acético 50 mM. 70 días después de la inoculación.	48
Figura 17. Grosor del tallo de plantas de Jitomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con ANA 50 mM. 70 días después de la inoculación.	49
Figura 18. Número de frutos totales por planta de Jitomate inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y tratadas con ANA 50 mM. 70 días después de la inoculación.	50
Figura 19. UFC de <i>F. oxysporum</i> f .sp. <i>ubense</i> inoculado en suelo (1×10^7 esporas) y tratado con Ácido Naftalen Acético durante 10 días a 28 °C.	51
Figura 20. UFC de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> inoculado en suelo (1×10^7 esporas) y tratado con ANA durante 30 días a 28 °C.	52

Figura 21. Etapas de la germinación de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio PDB.....	53
Figura 22. Crecimiento de <i>F. oxysporum f sp lycopersici</i> con diferentes concentraciones de Ácido Naftalen Acético.	55
Figura 23. Efecto del Ácido Naftalen Acético sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	56
Figura 12a. Expresión relativa del gen fluG de <i>F. oxysporum f sp cubense</i> cultivado con Ácido Naftalen Acético a 5 y 10 mM. 6 hrs de pre-incubación y 3 hrs de exposición al ANA. 9 hrs de incubación total.....	58
Figura 24. Expresión relativa del gen fluG de <i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i> cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.	59
Figura 25. Expresión relativa del gen fluG de <i>F. oxysporum f. sp. cubense</i> cultivado con Ácido Naftalen Acético a 5 y 10 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.	60
Figura 26. Expresión relativa del gen brlA de <i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i> cultivado con ANA 1 y 5 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.	61
Figura 27. Expresión relativa del gen flbA de <i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i> cultivado con Ácido Naftalen Acético a 1 y 5 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.	61
Figura 28. Expresión relativa del gen brlA de <i>F. oxysporum f sp lycopersici</i> cultivado con Ácido Naftalen Acético a 1 y 5 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.	62

- Figura 29.** Expresión relativa del gen *brlA* de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* cultivado con las concentraciones 1 y 5 mM de ANA. 12 hrs de pre-incubación y 24 hrs exposición al ANA. 36 hrs de incubación total..... 63
- Figura 30.** Expresión relativa del gen *flbA* de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* cultivado con las concentraciones 1 y 5 mM de ANA. 12 hrs de pre-incubación y 24 hrs exposición al ANA. 36 hrs de incubación total..... 63
- Figura 31.** Expresión relativa del gen *fluG* de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* cultivado con Ácido Naftalen Acético a 1 y 5 mM. 12 hrs de pre-incubación y 24 hrs exposición al ANA. 36 hrs de incubación total. 64
- Figura 32.** Expresión relativa del gen *brlA* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA (60 hrs de incubación total). 65
- Figura 33.** Expresión relativa del gen *flbA* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 60 hrs de incubación total. 65
- Figura 34.** Expresión relativa del gen *fluG* de *F. oxysporum* f sp *cubense* cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 60 hrs de incubación total. 66
- Figura 35.** Expresión relativa del gen *brlA* de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* cultivado con Ácido Naftalen Acético a 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA (60 hrs de incubación total). 67
- Figura 36.** Expresión relativa del gen *brlA* de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 60 hrs de incubación total. 67

Figura 37. Expresión relativa del gen fluG de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA (60 hrs de incubación total).	68
Figura 38. Porcentaje de reducción del Alamar Blue debido al efecto del ANA sobre esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> durante 24 horas de exposición al compuesto.....	69
Figura 39. Porcentaje de reducción de Alamar Blue debido al efecto del ANA sobre esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> lycopersici</i> durante 24 horas de exposición al compuesto.....	70
Figura 40. Evaluación de la germinación y crecimiento de las esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> tratadas con ANA y cultivado en medio PDA e incubadas 7 días.	71
Figura 41. Evaluación de la germinación y crecimiento de las esporas de <i>F. oxysporum</i> f sp <i> lycopersici</i> tratadas con ANA y cultivado en medio PDA e incubadas 7 días.	71
Figura 42. Esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> lycopersici</i> incubadas con ANA por 72 y tenidas con Ioduro de propidio/Naranja de acridina..	72
Figura 43. Esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> incubadas en PDB sin ANA y con ANA por 72 y teñidas con Ioduro de propidio/Naranja de acridina. a) Células sin ANA; b) Células con ANA 5 mM y c) Células con ANA 10 mM.	73

RESUMEN

Los cultivos agrícolas se ven afectados severamente por hongos fitopatógenos causando grandes pérdidas económicas. *Fusarium* es uno de los hongos fitopatógenos que más daño causa generando marchitamiento en tomates, frijol y la enfermedad del Mal de Panamá. Este hongo se caracteriza por producir distintas formas especiales y razas que son fisiológicamente diferentes por su capacidad de ocasionar enfermedades en plantas específicas y tienen la habilidad de romper la resistencia de las plantas y la resistencia a los fungicidas. Se han implementado diversos tipos de control, los cuales no han sido totalmente efectivos. Entre las estrategias de control para hongos fitopatógenos y micotoxigénicos se ha reportado que el Ácido Naftalen Acético (ANA) inhibe el crecimiento, germinación y esporulación en ambos tipos de hongos. Por lo que este compuesto podría ser una alternativa para controlar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense*.

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad del ANA sobre la germinación de las micro y macroconidias, crecimiento micelial y sobrevivencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense* *in vitro*. Así como su efecto en la transcripción de los genes *fluG*, *flbA* y *brlA*. Para ello se utilizó una cepa de *F. oxysporum* de colección y una cepa aislada de suelos bananeros e identificada molecularmente. Para evaluar la germinación, el crecimiento y sobrevivencia se utilizaron técnicas microbiológicas para aislamiento e identificación. Para la identificación de los aislados se utilizaron primers específicos de la región 5.8 S ribosomal. Para determinar los niveles de transcripción se empleó RT-PCR semi-cuantitativo.

Se identificaron 21 aislados *Fusarium* pertenecientes a cinco especies: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. phaseoli*, *F. brachygibbosum* y *F. equiseti*; y se identificaron dos formas especiales de *F. oxysporum*; *ciceris* y *cubense*. Las relaciones filogenéticas entre los aislados fueron analizadas. Con respecto al efecto del ANA, se encontró que la concentración óptima inhibitoria sobre germinación de *F. oxysporum*

f. sp. *lycopersici* fue de 10 mM. Resultados similares se obtienen sobre el crecimiento micelial. El ANA tiene efecto fungicida sobre las esporas de las dos formas especiales de *F. oxysporum* estudiadas, ya que después de exponer las esporas al compuesto durante 72 hrs estas ya no son viables, lo cual se demostró evaluando la viabilidad con Naranja de Acridina y Ioduro de Propidio. La transcripción de los genes *brlA* y *fluG* se disminuye en presencia de concentraciones bajas de ANA y se inhibe totalmente cuando se emplean concentraciones de 10 mM, dependiendo del estadio de crecimiento del hongo en el cual se adiciona el compuesto. La sobrevivencia de esporas de *Fusarium* en suelo se ve negativamente afectada por el compuesto. Con base a los resultados obtenidos en este trabajo sugerimos que ANA podría ser utilizado como un fungicida para *F. oxysporum* f. sp. *cubense* y f. sp. *lycopersici*.

ABSTRACT

Agricultural crops are severely affected by fungal pathogens causing great economic losses. *Fusarium* is one of the most phytopathogenic fungi causing wilt in tomatoes, beans and Panama disease in banana. This fungus is capable to produce various formae speciales and races, these are physiologically different for the ability to cause disease in specific plants. These races can overcome genetical resistance to fungicides, difficulting the control of *Fusarium* diseases. Therefore diverse types of control have been implemented; most of them are not totally effective. Among the strategies to control phytopathogenic and mycotoxigenic fungi has been reported the Naphtalene Acetic Acid (NAA), this compound inhibits growth, germination and sporulation in both type of fungi.

The aim of this study was to determine the activity of NAA on the germination of micro and macroconidia, mycelial growth and survival of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and f. sp. *cubense* *in vitro*, also to analyze its effect on the transcription of *fluG*, *flbA* and *brlA* genes. To strains of *F. oxysporum* were used, one from the ATCC collection and the other one was isolated from banana soils in Mexico. Germination of spores, micelial growth and survival of spores in soil were evaluated through microbiological techniques after the fungus was exposed to different concentrations of NAA. The identification of fungal isolates was performed with the amplification of the region 5.8S ribosomal. To evaluated the transcript levels of the genes semiquantitative RT-PCR was used.

The 21 isolates of *Fusarium* obtained in this study were identified and they belong to five species: *solani*, *oxysporum*, *phaseoli*, *brachygibbosum* y *equiseti* and only two formae speciales were classified: f. sp. *cubense* and f. sp. *ciceris*. The phylogenetic relationships of the isolates were analyzed, and it was found that NAA 10 mM was the optimal inhibitory concentration for the germination in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Similar results were obtained on mycelial growth. The NAA has fungicidal effect on spores over the two formae speciales of *F. oxysporum* studied, exposure of spores to the compound for 72 hrs kills all of them, as was demonstrated by Propidium iodide

and acridine orange stains. The transcription of *brlA* and *fluG* decreases at low concentrations of NAA and at high concentrations (NAA 10 mM) transcription was inhibited completely. Survival of *Fusarium* spores in soil was negatively affected by the compound. Based on these results obtained in this work, we suggest that NAA could be used as a fungicide for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and f. sp. *cubense*.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos agrícolas se ven afectados por plagas (nematodos, artrópodos y roedores) y enfermedades (virus, bacterias y hongos) que reducen la vitalidad y capacidad de producción, entre los principales patógenos de plantas destacan los hongos, ocupando el segundo lugar en pérdidas de producción.

Desde hace varios años se han realizado estudios para controlar las enfermedades de las plantas y así disminuir las pérdidas causadas por hongos fitopatógenos. En la actualidad existen diferentes tipos de control, para lograr disminuir las pérdidas causadas por hongos fitopatógenos, como son: control químico, control biológico y resistencia genética. Para el control químico se han sintetizado cientos de fungicidas (bencenos sustituidos, tiocarbamatos, etilen-bis-Ditiocarbamatos, tioftalimidas, compuestos de cobre, organomercuricos, organoestánicos y de cadmio) y varias decenas tienen aplicación en forma de pulverizaciones foliares, de gránulos para tratamiento del suelo, para tratamientos de frutos y como recubrimientos para semillas, sin embargo, el uso prolongado y frecuente de químicos sintéticos, conduce a la resistencia de microorganismos a los compuestos activos, además causa daños severos al medio ambiente y a la salud (Nel *et. al.*, 2007). Con respecto a la resistencia genética se han obtenido híbridos resistentes de diferentes plantas para diversos hongos (Hwang & Ko, 2005), sin embargo, la alta diversidad que presentan algunos hongos fitopatógenos, la resistencia se rompe y el patógeno es capaz de enfermar a la planta. Esto es una limitante para que la resistencia pueda considerarse como el método de control efectivo. En cuanto al control biológico, se han empleado microorganismos antagonistas como *Bacillus amyloliquefaciens* que produce compuestos volátiles que inhiben germinación y crecimiento de *F. oxysporum* (Yuan, et al., 2012), otra bacteria utilizada es el género *Burkholderia* la cual produce sideroforos y puede controlar hongos fitopatógenos (Elshafie et al, 2012). También se han utilizado diversos hongos, tal es el caso de *Trichoderma* spp., que inhibe el crecimiento de varios hongos fitopatógenos como: *C. gloeosporoides*, *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum*,

Macrophomina phaseolina, *Rhizoctonia solani*, entre otros (Verma et al., 2007; Infante, et al., 2009; Talla, et al, 2015).

Otra alternativa para el control de hongos fitopatógenos es el empleo de compuestos no tóxicos como lo son los extractos de plantas. Tal es el caso de extractos de Eucalipto, Gengibre y plantas medicinales para el control de *Alternaria solani* (Stangarlin, et al, 2011). Además, extractos de plantas de diferentes familias fueron usados para control de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, los resultados muestran que los extractos de *Chenopodium ambrosioides* y otras 13 plantas cuando son obtenidos en forma acuosa, inhibieron hasta el 50% del crecimiento del hongo, en cambio cuando los extractos son obtenidos con solventes la inhibición es de más del 90% (Minz, et al, 2012). Otras sustancias empleadas para el control de hongos fitopatógenos son los reguladores y factores de crecimiento de plantas (hormonas vegetales sintéticas). Por ejemplo: el Ácido Naftalen Acético (auxina) (ANA) es un fitorregulador que, en función de la dosis empleada y momento de aplicación, tiene diferentes funciones: controla los rebrotes después de la poda, controla la caída de frutos en manzano y peral. También se ha usado para favorecer el enraizamiento de diversas plantas como alcachofa, begonia, cerezo, clavel, crisantemo, gardenia, geranio, hortensia, lila, manzano, melocotonero, etc.; para evitar la floración prematura y la caída de frutos en algodón, berenjena, cítricos, guayaba, mango, sandía, soja y vid; para el aclarado en cítricos y olivo; para inducir la floración en piña tropical y para impedir el deterioro de las hojas de lechuga en crecimiento. Actúa como inhibidor del crecimiento a concentraciones más altas de 0.08 M (Looney & McKellar, 1994; Dag, et al., 2009). Sin embargo, se ha comprobado que el ANA tiene efecto antifúngico cuando este compuesto se agrega en diferentes concentraciones (0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/ml) al medio de crecimiento, reduciendo el crecimiento radial en diferentes especies de *Colletotrichum*: *C. gloesporoides*, *C. dematium* y *C. coccodes*, (Lee et al., 2003). De igual manera tiene un efecto inhibitorio sobre *Sclerotinia sclerotiorum* cuando se adiciona al medio en concentraciones de 1, 10, 50, 100, 150 y 200 µg/ml, reduciendo el crecimiento radial, así como la formación de esclerocios (Al-Masri & Barakat, 2003).

Este compuesto también tiene efecto sobre hongos micotoxigénicos, Bucio et al, (2005) empleo diez diferentes reguladores de crecimiento en sus formas de compuestos o como sal de sodio o de potasio y en diferentes concentraciones sobre el desarrollo y síntesis de micotoxinas de *A. parasiticus* y *A. nidulans*. Las concentraciones utilizadas se determinaron conforme las utilizadas en cultivos de tejido vegetal. Los resultados que obtuvieron con las diferentes hormonas fueron efectos inhibitorios y estimulatorios sobre el crecimiento. Sin embargo, el Ácido Naftalen Acético fue el que presentó un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento y síntesis de micotoxinas a partir de la concentración 0.5 mM. A mayor concentración de ANA mayor inhibición en ambos parámetros. Otros experimentos realizados por Bucio Villalobos empleando ANA en granos de maíz inoculados con la cepa de *A. parasiticus* tratados previamente con una solución de 50 mM de ANA encontró que dicho compuesto inhibió la esporulación y la síntesis de aflatoxinas (Bucio Villalobos, 2002).

En trabajos realizados por Gowri et al, (2013) para inhibir crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Streptococcus aureus*, emplearon ANA y sus complejos con Co (II), Ni (II), Cu (II) y Hg (II) en agar en diferentes concentraciones (25, 50, 75 and 100 µg / ml). Los resultados mostraron grandes zonas de inhibición del crecimiento de *A. flavus* y *S. aureus*, a medida que la concentración del compuesto aumenta, el diámetro de la zona de inhibición también aumento, mostrando que estos compuestos son capaces de interferir en el proceso metabólico. También se comprobaron los complejos de ANA de cobalto (II) y cobre (II) son ligeramente más activo que el ANA sin complejos metálicos.

ANA también inhibe germinación de esporas y el crecimiento del tubo germinativo de *Alternaria solani*, cuando las concentraciones de ANA utilizadas fueron 10^{-2} a 10^{-4} M en caldo de Czapek Dox, (Bhajbhujje MN, 2015).

Este compuesto que tiene una función dual porque por un lado causa beneficio a las plantas y por el otro causa daño a los hongos, tal como se ha ilustrado, podría

ser una alternativa de control para *Fusarium oxysporum* ya que esta especie y sus formas especiales son muy agresivas para el reino vegetal.

Fusarium es el género de hongos filamentosos más extenso, ya que se encuentra ampliamente distribuido en suelo, sustratos orgánicos y en asociación a plantas, es considerado como uno de los géneros más adaptables y versátiles. Además de ser uno de los 10 principales hongos fitopatógenos (Li-Jun, et al, 2010). Causa daño a muchas especies de plantas, disminuyendo la producción agrícola y afecta la economía de los productores (Dean, et al, 2012). Uno de sus miembros más importantes es *F. oxysporum* esta es una de las especies que cuenta con mayor número de plantas hospedantes hortalizas, frutales, leguminosas, solanáceas y agaves (Correll, 1991, Baayen et al., 2000; Nash Smith, 2007). Esta especie y sus formas especiales ocasionan marchitamiento vascular seguido de la muerte de la planta (Nelson, 1981; Szczechura, et al, 2013; Kistler, 1997). Dentro de la versatilidad de este género se ha reportado (Darken, 1959) que *Fusarium* es benéfico, debido a que el filtrado libre de células de *F. moliniforme* induce la elongación de la raíz en plantas, debido a que produce ácido giberelico, un regulador de crecimiento de plantas. Igualmente se ha identificado que algunas cepas no patogénicas de *F. oxysporum* pueden disminuir la incidencia del marchitamiento en banana causada por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC). Estudios *in vitro* e invernadero mostraron que las cepas de *F. oxysporum* no patogénico (CAV225 y CAV241) no suprimen el crecimiento de FOC, sin embargo, estas cepas reducen la incidencia de FOC un 87.4 y 75% respectivamente (Nel, 2006).

Aspectos biológicos y patológicos de la especie *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum presenta colonias de crecimiento y pigmentación muy variadas (violeta, rosas, amarillas, lilas y blancas) y produce tres tipos de esporas: microconidias, macroconidias y clamidosporas.

Las microconidias son esporas unicelulares, sin septas, hialinas, pueden ser elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas, tienen de 5-12 μm de largo por 2.5-3.5

µm de ancho (Nelson, 1991). Las macroconidias en general son esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas con varias células y de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada y atenuada, tienen un tamaño de 27 a 46 µm de largo por 3.0 a 4.5 µm de ancho, este tipo de espora germina por ambos extremos. Las clamidosporas por poseen paredes bastante gruesas, lo que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a la ausencia de la planta hospedante. Las clamidosporas se forman simples o en pares, son terminales o intercalares y son las principales responsables de la supervivencia del hongo en tejido muerto de las plantas o en el suelo.

F. oxysporum produce formas especiales (f. sp.), esta es la capacidad del hongo de ser patógeno a una planta específica i. e. *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* solo causa daño a tomate. Estas formas especiales no se pueden diferenciar por su morfología o por las características culturales de las colonias, sin embargo, empleando biología molecular y con primers específicos se puede llegar a identificar las formas especiales de esta especie (Appel & Gordon, 1994; Lievens et al., 2008; Wang et al., 2011)

Algunas formas especiales de *F. oxysporum* se caracterizan por producir razas fisiológicas o patotipos, los cuales se distinguen entre sí por su diferente patogenicidad a distintas variedades de una misma especie de planta. En *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* se han reconocido ocho razas fisiológicas (Garibaldi, 1986), en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense* que se han identificado 3 y 4 respectivamente (Jones et al., 1997; Ploetz & Correll, 1988). El principal criterio para diferenciar las razas de *F. oxysporum* son las pruebas de patogenicidad y las características de virulencia, este es un procedimiento que requiere tiempo para el análisis y las reacciones puede ser influenciada por parámetros ambientales como temperatura, humedad y pH del suelo. Para mejorar la eficiencia de diferenciar razas se ha planteado otros enfoques: (1) estudiar la variación de la fitotoxicidad, (2) variabilidad electroforética de proteínas, (3) análisis bioquímicos y (4) pruebas de diagnóstico rápido altamente reproducibles como lo son fragmentos de restricción de

DNA de longitud polimórfica (RFLP), análisis de grupos de compatibilidad vegetativa (VGC), fingerprinting de la amplificación aleatoria de DNA de longitud polimórfica (RAPD), marcadores de los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), amplificación de la región ITS-RFLP(Cai et al., 2003; Gurjar et al., 2009; Zhou et al., 2010; Guo et al., 2014).

Con respecto a los cambios genéticos que *F. oxysporum* presenta se sabe que este patógeno es capaz de generar diversidad por transposición por los retrotranspososnes. Según Daboussi (1994) el genoma de *F. oxysporum* tiene 5% de transposones, lo cual genera un mayor nivel de variación que otras especies de *Fusarium*. Estos elementos transponibles en *F. oxysporum* pueden actuar como mutagenos insercionales y causar reordenamiento cromosómico, pero también pueden tener otras funciones como la capacidad de invadir nuevas poblaciones, estos cambios también influyen en muchos aspectos de evolución del genoma del hongo y podría proporcionarles la flexibilidad para adaptarse con éxito a condiciones ambientales (Daboussi, 1997).

Un ejemplo de la capacidad invasora de *Fusarium* es la enfermedad del Mal de Panamá que lo causa *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) que afecta al plátano. Esta es una de las 10 enfermedades más importantes en la agricultura a nivel mundial, debido a que se han generado 4 razas y estas han afectado a la producción de plátano en miles de hectáreas por décadas (OIRSA, 2009). La raza 1 de este hongo, causó la devastación de la variedad Gros Michel en 1960, la raza 2 es virulenta en las variedades Bluggoe y tetraploides, la raza 3, descrita por Waite en 1963 en Honduras, es patógeno para *Heliconia spp*, aparentemente es rara y ya no existe en América Central. Las razas 1 y 2 fueron controladas efectivamente por las variedades resistentes Cavendish. Sin embargo, se ha reportado la existencia de una nueva raza de FOC llamada raza tropical 4 (TR4). Esta ha vencido la resistencia en los subgrupos de Cavendish y otros cultivares de plátano, como lo son plátanos de cocción y una amplia gama de variedades de plátano de postre (no susceptibles a las razas 1 y 2). A principios de 1990, miles de hectáreas de plantaciones comerciales de Cavendish en Indonesia y Malasia se afectaron gravemente debido a graves epifitias causadas por

FOC-TR4, originando pérdidas en la producción de millones de dólares (Pérez-Vicente, 2014). La ocurrencia de epifitias de FOC-TR4 ha renovado la preocupación de su control, ya que su potencial destructivo es muy grande. Los recientes brotes originados por FOC-TR4 han demostrado que es una enfermedad transfronteriza de especial importancia para todos los países productores de banano en el mundo. Este fenómeno transfronterizo amenaza no sólo a la industria de exportación de plátano, sino también a millones de personas en las comunidades rurales, que dependen de los plátanos para su seguridad alimentaria y medios de vida. Más del 80% de plátanos y bananos son susceptibles a esta raza (OIRSA, 2009).

La enfermedad inicia con la pre penetración esto incluye el crecimiento del patógeno antes de introducirse a la planta, es decir, con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidosporas en dormancia presentes en el suelo y son estimuladas por los exudados secretados por las raíces de la plana, los exudados contienen azúcares y aminoácidos que sirven de nutrientes para los microorganismos. El mecanismo de penetración puede tener lugar de forma mecánica o por digestión de enzimas hidrolíticas secretadas por el patógeno. Estudios citológicos y genéticos indican que una presión generada por los apresorios permite penetrar la cutícula y la pared celular de la raíz. Del apresorio se produce una hifa fina de penetración que perfora la cutícula. El hongo también puede penetrar a través de aberturas naturales (como estomas, hidrátodos, nectarios o lenticelas) y a través de heridas. Las plantas sufren rupturas de su cutícula o de su epidermis por varias causas como daño mecánico, daño de insectos, nemátodos y otros herbívoros, cortes de poda, cosecha y otras prácticas y por el crecimiento mismo de la planta (Arauz, 1998). Una vez dentro de la planta, el hongo se mueve hacia el tejido vascular por colonización intracelular a los vasos del xilema y los invade cuando están maduros. El patógeno coloniza por crecimiento del micelio o por medio del transporte pasivo de microconidias en el xilema (Perez Vicente, 2014).

Como ya se había descrito la esporulación *F. oxysporum* genera tres tipos de esporas, el mecanismo de esporulación esta descrito en hongos modelo como *A. nidulans* donde gen *brlA* es el gen maestro de la esporulación asexual, existen otros genes

regulatorios de crecimiento como son *fluG* y *flbA* y que también están involucrados en la esporulación (Lee & Adams, 1995).

Existen varios modelos propuestos de la vía de señales de los genes de crecimiento y esporulación (Timberlake & Prade, 1993; Adams et al., 1996; Adams et al., 1998; Yu, 2010), En el modelo propuesto por Adams et al, *fluG* es un gen necesario para la síntesis de un pequeño factor difusible responsable para endógenamente regular la inducción de la esporulación asexual, se ha demostrado que este gen está presente en niveles casi constantes durante todo el ciclo de vida del hongo. Para que este gen induzca la esporulación requiere de la actividad de otros genes tempranos de desarrollo como son: *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*. El gen *flbC* tiene funciones independientes de *flbB*, *flbD* y *flbE*. Mientras *flbA* tiene un papel directo en la activación *brlA*, la posición de *flbA* en esta vía no está clara. Debido a que mutaciones de *flbA* afectan el crecimiento vegetativo, se propone que *flbA* también controla otros aspectos de desarrollo de la colonia que son independientes de su papel en la formación de conidios. Además de la vía de inducción *fluG* endógeno, la formación de conidios puede también ser activadas por señales ambientales, como el estrés de carbono, el estrés de nitrógeno y el aumento de la osmolaridad. Fig. 1.

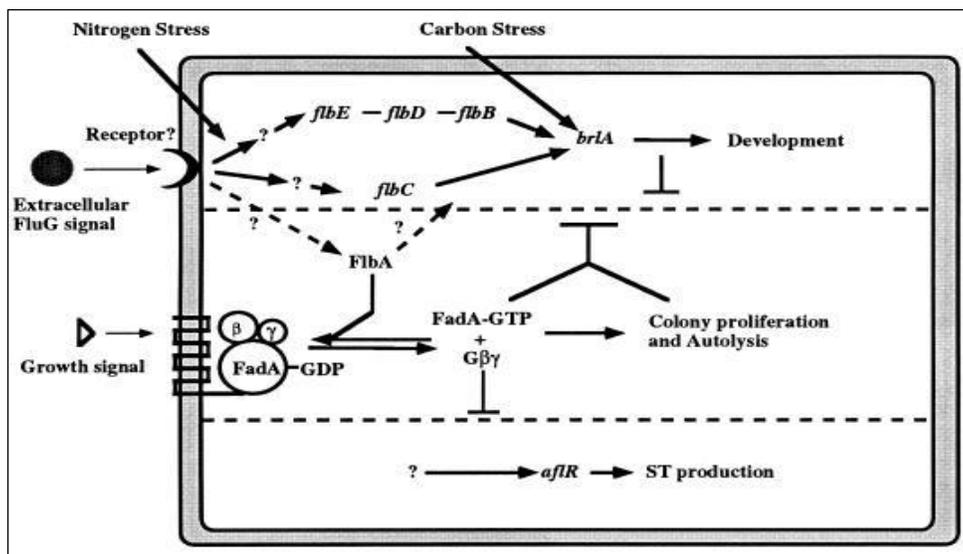


Figura 1. Modelo que describe las interacciones de genes en el control de la iniciación del desarrollo.

La presencia de diversos tipos de esporas así como la capacidad de generar formas especiales y razas fisiológicas hace que sea un hongo muy difícil de controlar.

Por tal motivo en este trabajo se realizaron estudios enfocados en analizar la capacidad del Ácido Naftalen acético para inhibir la germinación, el crecimiento y la esporulación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. De igual manera determinar a nivel molecular el efecto del ANA sobre la transcripción de los genes involucrados crecimiento *fluG* y *flbA* y de esporulación *brlA*. Esto con el fin de identificar el mecanismo de acción del ANA sobre *F. oxysporum*.

I. HIPOTESIS

El Ácido Naftalen Acético podría inhibir germinación, crecimiento y sobrevivencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *ubense in vitro*, debido a un efecto negativo sobre la transcripción de los genes reguladores de crecimiento (fluG y flbA) y de esporulación (brlA).

II. OBJETIVOS.

Objetivo general

Determinar la actividad del Ácido Naftalen Acético sobre la germinación de las micro y macroconidias, crecimiento micelial y sobrevivencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *ubense in vitro*. Así como su efecto en la transcripción de los genes fluG, flbA y brlA.

Objetivos específicos

1. Aislar e identificar *Fusarium* de suelos de dos regiones productoras de plátano (Chiapas, Michoacán, Tabasco y Veracruz).
2. Determinar si el ANA tiene efecto sobre *Fusarium oxysporum* en suelo, utilizando como indicador indirecto a plántulas de jitomate.
3. Determinar características de tiempo de germinación, crecimiento y velocidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en ausencia de ANA.
4. Comprobar el efecto de ANA sobre la germinación de esporas (micro, macroconidias) y crecimiento micelial.
5. Determinar los niveles de transcritos de los genes fluG, flbA y brlA, en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *ubense* cultivados con ANA adicionado en dos etapas de desarrollo y a diferentes tiempos de exposición.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico.

Para la realización de este trabajo se utilizaron las siguientes cepas fúngicas:

- *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, American Type Culture Collection (ATCC) 60095. Cepa de colección agente causal de la enfermedad de marchitamiento vascular en plantas de jitomate.
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, aislado del suelo de zona productora de plátano del estado de Michoacán e identificada por amplificación de las regiones ITS-5.8 rDNA. Esta cepa es el agente causal de la enfermedad de marchitamiento vascular en plátano, cepa aislada e identificada en este trabajo.

2. Medios de cultivo

Los medios utilizados para el crecimiento de *F. oxysporum* pueden ser sólidos o líquidos y deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de estos hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Se puede añadir sales u otras sustancias para generar medios selectivos (MAS).

2.1 Medios de cultivo

- Medio de Papa Dextrosa Agar (PDA) Difco™ BD®. El medio se preparó según las indicaciones del fabricante, 39 g/L. El medio fue esterilizado y dispensado en cajas Petri estériles (90 X 15mm) 20 ml aproximadamente por caja.
- Medio Malta Sal Agar (MAS), el cual contiene la siguiente composición:

Extracto de malta	20g
Agar bacteriológico	20g
NaCl	60g

Agua destilada 1L

El medio fue esterilizado y dispensado en cajas Petri (90 X 15mm) aproximadamente 20 ml por caja, en condiciones estériles.

2.2 Medio de cultivo líquido

Caldo de Papa Dextrosa (PDB) DIFCO. Una vez preparado como indica el fabricante, 24 g/litro, fue agregado en matraces de diferentes volúmenes (250, 125, 25 ml) según las condiciones del experimento, fue esterilizado a 15 lb durante 20 minutos.

2.3 Otros sustratos utilizados

Para llevar a cabo los experimentos en invernadero con plantas de jitomate, así como conocer la incidencia de *Fusarium* en zonas productoras de plátano se empleó suelo con las características que continuación se describen:

Suelo mezcla general. Es una composición de varios sustratos, estos se mencionan a continuación: tierra general, tierra de hoja, sunshine mix 3, verniculita y perlita en relación 1:2:3:1:1. La mezcla del suelo fue colocada en macetas de 20 litros.

Suelo de zona productora de plátano de los estados de Michoacán, Veracruz, Tabasco y Chiapas. Muestras de suelo de 1Kg de las diferentes zonas productoras de plátano se obtuvieron a una profundidad de 20 cm en 2 puntos distantes de cada parcela, cerca de las plantas de plátano. Las muestras del suelo se trasladaron al laboratorio utilizando bolsas de plástico y se mezclaron homogéneamente para formar una muestra compuesta. Esta se colocó en una bolsa de papel estraza y fueron colocadas dentro de una bolsa de plástico, se almacenaron a 4°C. Las muestras se mantuvieron a esta temperatura hasta su procesamiento para evitar la alteración de las condiciones del suelo.

2.4 Inoculación y condiciones de cultivo

2.4.1 Conservación de las cepas utilizadas

Todas las cepas utilizadas en el presente trabajo fueron crecidas en cajas de PDA y se incubaron durante 15 días, hasta que el cultivo presento macro y microconidias. A los cultivos se les agregó agua destilada estéril adicionada de tritón al 0.01% se dejaron reposar quince minutos y las esporas fueron obtenidas raspando la colonia fúngica con asa recta estéril. Las suspensiones así obtenidas fueron colocadas en viales ámbar que contenían 1.5 ml de agua destilada estéril y fueron mantenidas a 4 °C.

2.4.2 Obtención del inóculo.

Para obtener el inóculo de las cepas, estas se sembraron en cajas de PDA por separado utilizando 100 µL de la suspensión de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* o de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Las cajas se incubaron durante 15 días a 28°C. Finalizado el tiempo de incubación se preparó la suspensión de esporas como se describe a continuación;

- En condiciones estériles, se agregan 15 ml de agua destilada estéril con Tritón X-100 al 0.01%, a los cultivos fúngicos de cada una de las cepas.
- Se dejó reposar el cultivo 10 minutos y con una varilla de vidrio estéril se talla la superficie de las colonias, para obtener las esporas del cultivo.
- La suspensión de esporas se transfirió a un tubo Falcón estéril de 50 ml, con ayuda de una pipeta Pasteur estéril.
- La suspensión de esporas fue sometida a choque térmico (4°C por 12hrs para homogenizar la germinación. Este procedimiento se realizó para cada uno de los experimentos (Guzman & Ruiz, 1997).

2.4.3 Determinación de la concentración del inóculo.

Para determinar la concentración del inóculo, las esporas se cuentan utilizando la cámara de Neubauer. Primero se realizó una dilución de la suspensión concentrada

de esporas tomando 100 µl y adicionando 900 µl de agua (dilución 1:10) en un tubo Eppendorf. De esta dilución de esporas se tomó una gota (10 µl) y se colocó en la cámara de Neubauer. El conteo se realizó en un microscopio de luz a 40X. Se contaron 5 cuadrantes C por duplicado. Se utilizó el cuadrante C de la cámara para todos los conteos. La fórmula para calcular la concentración fue:

$$\left(\frac{\sum \bar{X}C_V^I}{5}\right) \times (2.5 \times 10^5) = \frac{\text{esporas}}{\text{mL}}$$

$\sum \bar{X}C_V^I$ = Sumatoria de las medias de cinco cuadrantes en cada uno de los cuadrantes de "C" en la cámara de Neubauer (Morris & Nicholls, 1978)

2.4.4 Condiciones de incubación.

Todos los experimentos realizados fueron incubados a 28°C, en condiciones estacionarias a diferentes tiempos como se describe en cada experimento.

3. Métodos experimentales

3.1 Determinación de la incidencia de *Fusarium* en suelo de zonas productoras de plátano mediante el método de dilución de suelo en placa

1. Las muestras de suelo homogeneizadas fueron submuestreadas para obtener muestras de 10g de cada uno de los suelos. En condiciones estériles los 10 g del suelo se adicionaron a un matraz con 90 ml de agua destilada estéril (dilución 10^{-1}). Para cada suelo de las diferentes regiones (Michoacán, Veracruz, Chiapas y Tabasco) se utilizaron dos replicas. Las muestras se homogenizaron con agitación vigorosa en vórtex antes de tomar las alícuotas para las diluciones.

2. De la dilución 1:10 se toma 1 ml y se transfirió a un tubo con 9 ml agua destilada estéril (dilución 10^{-2}). De esta manera se realizan diluciones decimales sucesivas hasta 10^{-5} . Para mayor exactitud se utilizaron puntas estériles diferentes en cada paso de la dilución. También se realizó agitación vigorosa con vórtex antes de tomar la alícuota para cada dilución.

3. Se utilizaron las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} para sembrarlas en medio de malta sal agar para ello se tomaron 100 μ l de cada dilución y se colocaron en el centro de la superficie del medio de cultivo (MAS). La siembra de las diluciones se realizó por triplicado.
4. Se extendió la alícuota en la superficie de la placa con una varilla previamente esterilizada (inmersa en alcohol y pasándola por la flama del mechero permitiendo su enfriamiento) con la finalidad de asegurar una distribución homogénea en toda la superficie del medio.
5. Las placas se incubaron a 28°C en ausencia de luz y con humedad relativa alta.
6. Para determinar la incidencia de hongos del tipo *Fusarium* se contaron las colonias con características de *Fusarium*, después de 7 días de incubación en cada dilución sembrada

3.1.1. Aislamiento de colonias de *Fusarium* en suelo de zonas productoras de plátano.

Las colonias que presentaron características macroscópicas típicas de *Fusarium* tales como: micelio aéreo blanco algodonoso o rosa algodonoso, pigmentación en el anverso del medio rosa, violeta o morado y amarillo fueron aisladas. Se sembraron en cajas de PDA mediante la técnica de colonia gigante, en condiciones estériles y se incubaron a 28°C en ausencia de luz, durante 7 días.

Las cepas así obtenidas fueron observadas microscópicamente por preparación directa para asegurar la presencia de macro y microconidias características del genero *Fusarium*.

- La técnica de preparación directa.
 - a) Sobre un portaobjetos limpio y seco se depositó una gota de azul de lacto-fenol.
 - b) Con un asa recta estéril se tomó una muestra de cada uno de los aislados, la muestra se toma pasando el asa sobre el extremo (o cualquier parte de la

colonia en donde se observe esporulación) y por la superficie exterior de la colonia

- c) La muestra se coloca directamente en un portaobjetos con la gota de azul de lacto-fenol y se dispersó de forma homogénea.
- d) La preparación de cada aislado se cubrió con un cubreobjetos.
- e) Todas las colonias fueron observadas microscópicamente para identificar los aislamientos correspondientes al género *Fusarium* (Barnett & Hunter, 1998; Nelson, et al, 1983).

3.1.2. Identificación molecular de los aislados de suelo por amplificación de la región 5.8 S ITS1-ITS4 de los genes ribosómicos.

3.1.2a Extracción del DNA de los aislados de *Fusarium*

1. Se tomó micelio de cada uno de los aislados de manera independiente y se guardan en un pedazo de papel aluminio, el cual inmediatamente se sumerge en nitrógeno líquido, para congelar el micelio.
2. El micelio se tritura en un mortero estéril con nitrógeno líquido hasta tener un polvo siempre congelado.
3. Se utilizaron aproximadamente 0.5 g de micelio triturado, se colocaron en y tubos Eppendorf y se agregó el mismo peso de perlas pequeñas de vidrio.
4. Se agregaron 250 µl de la solución 1 y 500 µl de la solución 2.

Solución 1

EDTA 50 mM + Tris/HCl 20 mM pH 8

Para preparar 100 ml

EDTA. 0.5 mM	10 ml
Tris 2 M	1ml
Agua destilada estéril	89 ml

Solución 2

SDS 0.5% + EDTA 50 mM

Para preparar 100 ml

EDTA 0.5 mM	10 ml
SDS 20%	2.5 ml
Agua destilada estéril	87.5 ml

5. Los tubos se agitaron en vórtex durante 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Se adicionan 500 µl de cloroformo /fenol/alcohol isoamílico (25:24:1)
7. Se agitaron nuevamente en vórtex durante 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo.
9. A la fase acuosa se le agregaron 2.5 µl de RNasa 10 mg/ml y se incubaron de 40 minutos a una temperatura de 37°C
10. Posteriormente se añadieron 350 µl de isopropanol frío, se mezcló suavemente y se incubó a – 20°C durante 30 minutos, se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos, después se decantó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 12000 rpm 15 minutos
11. Finalmente se eliminó el etanol y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se re suspendió en agua destilada estéril.
12. Se cuantificó la concentración de DNA en el NanoDrop
13. Para evaluar la integridad del DNA obtenido se utilizaron geles de agarosa al 1.0%.

3.1.2b. Identificación de los aislados por amplificación de las regiones ITS1-ITS4 5.8 rDNA

La identificación molecular de los hongos se llevó a cabo mediante la amplificación de la región 5.8S de los genes ribosómicos. La región ITS1-5.8S-ITS4 fue amplificada a partir del DNA genómico usando los oligonucleótidos específicos ITS1: (5´ TCCGTAGGTGAA CCTGCGG 3´), ITS4: (5´ GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3´) (Luo and Mitchell, 2002).

El programa de amplificación: pre-desnaturalización a 95°C por 5 min; 35 ciclos a 95°C por 30 seg, 50/55/60°C por 30s, y 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 10 min. Los datos de secuenciación fueron optimizados usando el programa BioEdit v. 7.0 y los alineamientos fueron creados utilizando CLUSTAL-X (Thompson, *et al.*, 1997).

Identificación por secuenciación: Para una identificación del género y especie de los aislados, las secuencias fueron alineadas y comparadas con las secuencias ya depositadas en bases de datos como NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el programa BLAST (Gasch, et al., 2000) y para dar más confianza a los resultados y verificar si se conducía al mismo resultado se utilizaron bases de datos adicionales: BROAD Institute.

3.2 Efecto del Acético Naftalen Acético sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

3.2.1. Determinación del efecto del Ácido Naftalen Acético (ANA) utilizando el pato-sistema *Solanum lycopersicum*-*Fusarium oxysporum* en suelo en el invernadero.

El efecto del ANA sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en suelo, contenido en macetas en el invernadero, se realizó utilizando plantas de jitomate como indicadores indirectos. Uno de los desafíos para el control de las enfermedades es el de disminuir los propágulos en el suelo. Por ello resultaba interesante determinar si el compuesto (ANA) era capaz de disminuir la producción de las esporas producidas por *Fusarium* así como su crecimiento en condiciones muy similares a las que ocurren en el campo. De esta manera si el compuesto afectaba al patógeno, indirectamente tendríamos plantas sin enfermedad aun inoculando el patógeno. Por lo que se diseñó un experimento de invernadero con plantas de jitomate sembradas en mezcla general de suelo con los tratamientos que se describen a continuación:

Por lo que se diseñaron los siguientes tratamientos:

Tratamiento	Plantas/maceta	Descripción del tratamiento
1	6	Mezcla general de Suelo
2	6	Suelo + <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
3	6	Suelo + <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> + ANA 50 Mm
4	6	Suelo + <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> + ANA 100 mM

Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento, teniendo número total de plantas de 18.

Las semillas de jitomate se sembraron directamente en el suelo y después de 28 días de edad se inocularon con el patógeno y Ácido Naftalen Acético. La inoculación del hongo se realizó en el suelo en cuatro puntos equidistantes alrededor de la planta con ayuda de una jeringa, la aguja se sumergió en el suelo cerca de la raíz de las plantas, la concentración de esporas empleada fue de 2.5×10^5 esporas/ml (total de $1 \times 10^6/4$ ml). De igual manera el ANA se colocó en los mismos cuatro puntos alrededor de la planta, con la idea de que el hongo y la sustancia quedaran en el mismo lugar, se agregó 1 ml en cada punto (volumen total 4 ml de 50 y 100 mM en los respectivos tratamientos). El experimento se realizó durante la primavera del 2014, la temperatura predominante durante meses fue de 28-30 °C, con una humedad relativa baja.

Las plantas fueron monitoreadas a los 2.5, 7, 35 y 70 días (hasta llegar a etapa de producción) después de la inoculación. A lo largo del ensayo se hicieron observaciones del estado físico y desarrollo de las plantas así como de los síntomas característicos que causa *Fusarium* en las plantas. Se evaluaron los siguientes parámetros: altura de las plantas, diámetro del tallo y síntomas como el marchitamiento, clorosis y/o manchas necróticas.

3.2.2 Efecto del ANA sobre la población de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) inoculado en suelo de Michoacán contenido en recipientes en invernadero sin indicadores indirectos.

Para la realización de este experimento se utilizaron vasos de unicel de 250 ml, a los cuales se les agregaron 180 gr de suelo de la zona productora de plátano del estado de Michoacán. Los tratamientos empleados fueron: a) suelo más 25 ml de agua destilada estéril; b) suelo inoculado con una suspensión de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* de $1 \times 10^7/25$ ml; c) Suelo más 25 ml de una solución de ANA 10 mM y d) Suelo inoculado *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (1×10^7 esporas) mas 25 ml de ANA 10 mM. Para cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones. Como se observa en la Fig. 2.

Los vasos se taparon con tapas de plástico transparente y se colocaron en el invernadero a una temperatura de 29 °C y se mantuvieron durante 10 y 30 días. Transcurrido el tiempo en el invernadero se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los vasos de todos los tratamientos, se sembraron cajas de PDA, éstas se incubaron en obscuridad a 28 °C durante 7 días, después se realizó el conteo de colonias con características de *Fusarium*.

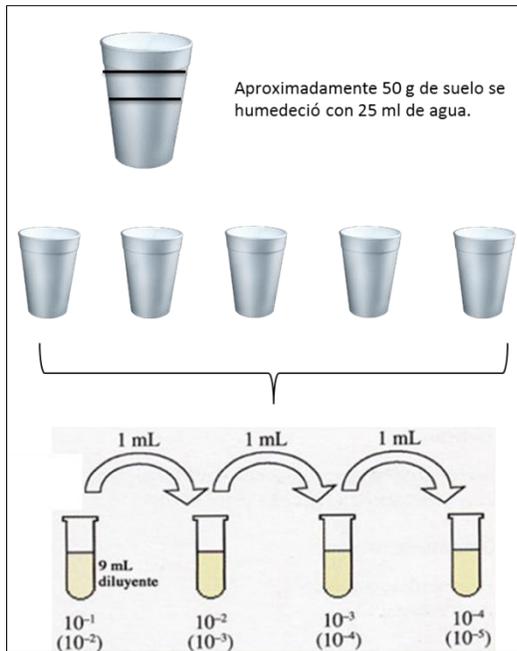


Figura 2. Experimento de suelo inoculado con *F. oxysporum* contenido en vasos de unicel.

4. Efecto del Acético Naftalen acético sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in vitro

4.1. a Determinación del tiempo de germinación de las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en medio de cultivo líquido.

Para determinar la germinación de las esporas fúngicas se utilizó una microplaca de Elisa de 96 pozos a los cuales se les agregó PDB y se adicionaron las siguientes concentraciones del inóculo fúngico fueron 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 en un volumen de $300 \mu\text{l}$ y se incubaron a diferentes tiempos 3, 6, 8, 10, 12, 15 y 24 horas. Transcurrido los tiempos establecidos se tomaron muestras de cada concentración y se colocaron en un portaobjetos para observarlas al microscopio, la germinación se determinó mediante el conteo de esporas clasificándolas en germinadas y no germinadas.

Metodología para el conteo de esporas: El conteo de campos se realizó tomando en cuenta toda la superficie del cubre objetos a 10X y observar únicamente

los campos necesarios donde realizaría el conteo de 100 esporas. Estos campos se seleccionaron al azar y se contaron utilizando la técnica de conteo en zig-zag. El volumen de la muestra que se tomo fue de 15µl.

4.1.b Determinación de concentración mínima inhibitoria de ANA sobre la germinación de las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Para determinar el efecto del Ácido Naftalen Acético sobre las esporas de *F. oxysporum* primero se llevó a cabo la obtención del inóculo de *F. oxysporum* y se determinó la concentración de esporas en la suspensión obtenida. Posteriormente la suspensión de esporas 1×10^6 se inoculó en los pozos conteniendo 300 µl de PDB, inmediatamente se adicionó el ANA a que quedara en concentraciones de 0, 10, 25, 50 y 100 mM. El experimento se realizó con 5 repeticiones por cada tratamiento y la microplaca se incubó en oscuridad, estáticas a 28°C durante 24 hrs. Una vez concluido el tiempo de incubación se realizó el conteo de las esporas clasificándolas como esporas germinadas y no germinadas.

4.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de ANA sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por peso seco.

Se utilizaron las siguientes concentraciones de ANA en 25 ml de PDB: 0, 5, 8, 10, 25 y 50 Mm, cada una contenida en matraces Erlenmeyer de 125ml y se inocularon con 1 ml de una suspensión de esporas de *Fusarium* de 1×10^7 /ml. Los matraces fueron incubados en oscuridad, en condiciones estáticas, a 28°C durante 15 días. Después del tiempo de incubación, se procedió a determinar el crecimiento del hongo por peso seco. Para ello se siguió el procedimiento que a continuación se describe:

- Los cultivos se filtraron por separado sobre un disco de papel filtro previamente desecado y a peso constante en un embudo Buchner.
- El micelio y el papel se colocaron en una caja Petri de vidrio y fueron desecados en el horno a 80°C durante 24 horas.
- Las cajas fueron colocadas en el desecador durante 24 horas.

- Se pesa el papel conteniendo el micelio y por diferencia se determina el peso del micelio (peso final del papel- el peso inicial del papel).

5. Determinación del efecto del ANA sobre la transcripción de los genes reguladores del crecimiento flbA y fluG y de esporulación brlA de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense*.

5.1. Condiciones de cultivo de *F. oxysporum*.

Matraces con 25 ml de medio de cultivo líquido (PDB) fueron inoculados con una suspensión de esporas de 1×10^7 , estos fueron incubados a 28 °C en oscuridad y estáticos.

Se realizó un primer periodo de incubación de 6 y 12 horas para obtener germinulas pequeñas y largas respectivamente. Posteriormente se agregó el compuesto ANA quedando con una molaridad de ANA 5 y 10 mM. En seguida los matraces se regresaron a incubar para que el hongo estuviera en contacto con el ANA hasta completar diferentes tiempos de incubación total: 9, 36, 54 y 60 horas.

Como control se utilizó otra serie de matraces sin adición del Ácido Naftalen Acético, se sometieron a un segundo periodo de incubación hasta completas las horas mencionadas con anterioridad. Transcurrido el tiempo de incubación de cada uno de los tratamientos, estos fueron centrifugados a 6000 rpm en tupos Falcón de 15 ml. El micelio obtenido se guardó a – 70 °C hasta ser utilizados para obtener RNA.

5.2. Extracción de RNA total utilizando Trizol (Invitrogen).

Para extraer el RNA total de las muestras a analizar se utilizó TriZOL (Invitrogen), la metodología consta de los siguientes pasos:

1. Se trituró el micelio hasta obtener un polvo fino con nitrógeno líquido y se adicionó 1 ml de trizol, se transfirió el micelio con el trizol a un tubo eppendorf nuevo y se incubó durante 5 minutos a 24 °C.
2. Se adicionó 200 µl de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y se agito en vórtex durante 15 segundos seguido de una incubación durante 3 minutos a 24 °C y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a 8 °C.
3. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se adicionaron 500 µl de alcohol isopropílico. Se agitó en vórtex durante 5 segundos y se incubó durante 10 minutos a 24 °C y se centrifugo a 12,000 rpm durante 10 minutos a 8 °C. Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla adicionando 500 µl de etanol al 70% (preparado con agua con DEPC), se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 8 °C.
4. Finalmente se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, se adicionaron 20 µl de agua con DEPC para resuspender la pastilla.

5.3. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos de los genes fluG, flbA y brlA en *Fusarium oxysporum*.

Para diseñar los oligos primero se identifica los genes que codifican las proteínas de fluG, brlA y flbA en *F. oxysporum*

1. Se realizó una búsqueda de las proteínas homólogas de cada uno de los genes en UniprotKB donde es sistema da como resultado proteínas homólogas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (strain race 1) (*Panama disaese fungus*) identificadas como proteínas regulatorias de fluG, brlA y flbA.
2. Utilizando las secuencias de las proteínas homologas de fluG, brlA y flbA se realizó un análisis tipo Pblast en la siguiente página:
www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/FeactureSearch.html
donde se reporta el genoma secuenciado de la cepa de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* MN25 que infecta a tomate.
3. El número de genes homólogos fueron alineados utilizando el programa ClustaW para identificar las regiones con homología de las cuales se seleccionaron algunas

para diseñar los oligonucleótidos específicos que fueron utilizados para el análisis de expresión diferencial.

4. Para el diseño de los oligos de acuerdo con los datos ya obtenidos se utilizó la página www.ncbi.nlm.nih.gov/tolol/primer-blast/ con base a los resultados de la página se obtuvieron 10 pares de oligonucleótidos. El oligonucleótido que se seleccionó fue en base a su tm (melting temperatura) y al porcentaje de GC.

Cada uno de los pares de oligonucleótidos diseñados amplificaron un solo fragmento entre 250 – 521 pb lo cual demostró su especificidad. Se demostró que la tm teórica para los diferentes pares de oligonucleótidos oscilaba entre 64.5 y 69.7 (tabla 1) y la temperatura de alineamiento durante la amplificación de los fragmentos génicos era entre 60 y 66.2 °C (Tabla 2). Asimismo se determinó el número de ciclos óptimos para la amplificación de los genes por PCR usando cDNA obtenido mediante por RT-PCR. Se probaron 20, 25, 30 y 35 ciclos para cada uno de los genes. Se observó que para fluG la amplificación a los 30 ciclos fue lineal, para flbA 25 ciclos y para brlA 35 ciclos.

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar cada uno de los genes de crecimiento y esporulación de *Fusarium oxysporum* y los valores teóricos de tm

Gen	Secuencia nucleotidica	Longitud (pb)	Tm (°C)	% GC	Fragmento	
					gDNA	cDNA
brlA	GAGCCATGTGCAAGTGTGAC	21	65.0	55.00	336	250
	CGCTCCTCCTGCTCAATAACA	22	66.7	52.38		
fluG	GTTTCTGCTCCGTCATCTTTGG	22	67.2	50.00	366	317
	AGTTGATGGGTCGGGGGATTT	21	69.7	52.38		
flbA	AGCTTCAACGCAGGTATCCAA	22	66.0	47.62	521	437
	TGATACCCTTGACGTTGGT	20	64.5	50.00		
Actina	CTCTCTTCCAGCCTTCTGTCC	21	64.7	57.14	295	263
	AGCAAGAATGGAACCACCGAT	21	67.0	47.62		

Tabla 2. Temperaturas de alineamiento, número de ciclos y tamaño de los fragmentos amplificados de los genes *brlA*, *flbA* y *fluG*.

Gen	Secuencia nucleotídica	Tm (°C)	No de ciclos	Fragmento	
				gDNA	cDNA
brlA	GAGCCATGTGCAAGTGTGAC	61.5	35	336	250
	CGCTCCTCCTGCTCAATAACA				
fluG	GTTTCTGCTCCGTCATCTTTGG	66.2	30	366	317
	AGTTGATGGGTCGGGGGATTT				
flbA	AGCTTCAACGCAGGTATCCAA	60.0	25	521	437
	TGATACCCTTGGACGTTGGT				
Actina	CTCTCTTCCAGCCTTCTGTCC	60.5	30	295	263
	AGCAAGAATGGAACCACCGAT				

5.4. Determinación semi-cuantitativa de la expresión de los genes *fluG*, *brlA* y *flbA* mediante transcripción inversa (RT) seguida por reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Se obtuvo RNA de las diferentes condiciones ya mencionadas para la síntesis de cDNA.

I. Preparación de la muestra de RNA para eliminar contaminación por DNA.

Las muestras de RNA se trataron con DNasa agregando en un tubo para microcentrífuga 1 ug de RNA muestra, 1 µl 10X DNasa, 1 Reaction Buffer, 1 µl DNasa I, Amp. Grade 1 V/µl y 10 µl de agua con DEPC.

Una vez preparada la mezcla de reacción se incubó el tubo por 15 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de incubación se inactivó la DNasa por calentamiento a 65°C durante 10 minutos

II. Síntesis de cDNA.

Se le añadió a la muestra tratada con DNasa 1 µl de oligo dt 12-18, 1 µl de dNTP's y 10 µl de agua destilada estéril. Se incubó la mezcla a 65°C durante 5 minutos inmediatamente se pasó en hielo y se añadieron los siguientes reactivos 4 µl de buffer 5X, 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de RNasa out. Se mezcló el contenido del tubo y se incubó a 42 °C durante 2 minutos, en seguida se añadió 1 µl (200 U) de SuperScript II RT y se incubó a 42 °C durante 50 minutos.

Para inactivar la reacción se empleó una temperatura de 70 °C durante 15 minutos.

Reacción de cadena de polimerasa (PCR).

El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial, 94°C por 2 minutos; desnaturalización: 30 ciclos 94 por 15 segundos; alineamiento: 55°C por 30 segundos; extensión: 68°C por un minuto y extensión final: 68°C por 5 minutos. Se corrieron los geles en agarosa al 1.5% y fueron vistos en el foto documentador.

Para medir la intensidad de las bandas se utilizó el programa ImageJ

6. Viabilidad de las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *ubense* tratadas con ANA por medio de una técnica colorimetría utilizando Alamar Blue

1. Se utilizó una suspensión de esporas de 1×10^7 para inocular 10 ml de medio de cultivo líquido con los siguientes tratamientos:
 - Medio de cultivo PDB.
 - Medio PDB + *F. oxysporum* f sp *ubense*
 - Medio PDB + *F. oxysporum* f sp *ubense* + ANA 5 mM.
 - Medio PDB + *F. oxysporum* f sp *ubense* + ANA 10 mM.

Cada tratamiento con tres repeticiones. Un set de matraces idénticos se utilizó para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

2. Todos los matraces se incubaron a 28 °C durante un tiempo de 24 horas.
3. Trascurrido el tiempo de incubación, se colocaron 90 µl de cada uno de los tratamientos en una placa de Elisa.

4. Se añadió 10 µl del reactivo de alamar blue en una cantidad igual al 10% del volumen del pozo y se incubaron durante un tiempo de 4 horas a 37 °C.
5. La placa se retiró una vez transcurrido el tiempo de incubación y se midió la absorbancia a 570 y 600 nm.
6. Para calcular el % de reducción del alamar usando lecturas de absorbancia se utilizó la fórmula que se presenta a continuación

$$\% \text{ de Reducción de Alamar Blue} = \frac{(E_{\text{oxi}600} \times A_{570}) - (E_{\text{oxi}570} \times A_{600})}{(E_{\text{red}570} \times C_{600}) - (E_{\text{red}600} \times C_{570})} \times 100$$

Donde:

$E_{\text{OXI} 570}$ = Coeficiente de extinción molar (E) del reactivo de alamar Blue oxidado a 570 = 80586

$E_{\text{OXI} 600}$ = E del reactivo alamar blue oxidado a 600 nm = 117216

A_{570} = absorbancia de los pocillos de ensayo a 570 nm

A_{600} = Absorbancia de los pocillos de ensayo a 600 nm.

$E_{\text{red} 570}$ = E del reactivo de alamar blue reducido a 570 = 155677

$E_{\text{red} 600}$ = E del reactivo de alamar blue reducido a 600 = 14652

C_{570} = Absorbancia del control negativo (medio más alamar blue sin células a 570 nm)

C_{600} = Absorbancia del control negativo (medio más alamar blue sin células a 600 nm)

7. Viabilidad de las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense* tratadas con ANA por medio de una técnica de tinción con colorantes fluorescentes Ioduro de propidio y naranja de acridina

1. Se utilizó una suspensión de esporas de 1×10^7 para inocular 10 ml de medio de cultivo líquido con los siguientes tratamientos:

- Medio de cultivo PDB.
- Medio PDB + *F. oxysporum* f. sp. *cubense*
- Medio PDB + *F. oxysporum* f. sp. *cubense* + ANA 5 mM.
- Medio PDB + *F. oxysporum* f. sp. *cubense* + ANA 10 mM.

Cada tratamiento con tres repeticiones.

Un set de matraces se idénticos se utilizó para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

2. Todos los matraces se incubaron a 28 °C durante un tiempo de 72 horas.
3. Después de la incubación cada una de las muestras de los tratamientos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en un mililitro de agua destilada estéril, se realizaron dos lavados más haciendo el procedimiento anterior.
4. La pastilla se re suspendió en 200 µl de agua destilada estéril.
5. De la muestra anterior se tomaron 50 µl y se agregaron 50 µl agua destilada estéril, se agregaron 20 µl de Ioduro de propidio al 2% y 40 µl naranja de acridina al 1%.
6. Se protegen de la luz y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos en oscuridad.
7. Se separaron las células del colorante mediante centrifugación 10000 rpm durante 5 minutos y se resuspende la pastilla en 100 µl de agua destilada.
8. Se tomaron 10 µl de cada una de las muestras y se colocan en un portaobjetos para realizar las observaciones.
9. La observaciones se realizaron en un microscopio (BX50, Olympus, Japón) utilizando objetivo 20X/0.50, UPlan-FL (α - 0.17). Los métodos de iluminación consistieron en luz incandescente (Lámpara de Halógeno, IOUSH, Japón) y luz ultravioleta con lámpara de vapor de mercurio (OSRAM, México) y filtros de excitación a 450 a 550 nm para naranja de acridina y 550-600 nm para ioduro de propidio. La adquisición de imágenes se realizó con una cámara de alta sensibilidad para fluorescencia Infinity3 (Lumenera, Canadá) sincronizada a través del programa Image Pro Premier 9.1 (Media Cybernetics, EUA).

IV. RESULTADOS

1. Incidencia de *Fusarium* en suelo de zonas productoras de plátano

La incidencia de *Fusarium* en los suelos de zonas productoras de plátano se realizó mediante el método de dilución del suelo tal como se indica en metodología experimental. En las muestras de suelos de las diferentes zonas bananeras de México se identificaron poblaciones con características morfológicas de *Fusarium*. Como se puede observar no existen grandes diferencias en el número total de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo, ya que el exponencial es el mismo, 10^5 (Tabla 3). Sin embargo cuando se calcula la incidencia de los *Fusaria* es interesante notar que los suelos del estado de Veracruz tienen una incidencia más alta que los otros suelos analizados.

Tabla 3. Número total de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) e Incidencia del Género *Fusarium* en suelos de zonas bananeras de México

Origen de Suelo	Población fúngica total UFC/gr	Población con características de <i>Fusarium</i> UFC/gr	Incidencia de con características de <i>Fusarium</i>
Chiapas	$7 \times 10^5 \pm 3$	$3 \times 10^5 \pm 1.73$	43% b
Michoacán	$6 \times 10^5 \pm 2$	$3 \times 10^5 \pm 2$	50% b
Veracruz	$6 \times 10^5 \pm 1$	$5 \times 10^5 \pm 1.73$	83% a
Tabasco	$8 \times 10^5 \pm 3.61$	$5 \times 10^5 \pm 2$	62% ab

UFC= Unidades Formadoras de Colonia. Los valores son media de tres repeticiones, \pm Desviación Estándar, Duncan ($p=0.05$)

1.1 Aislamiento de los hongos con características macro y microscópicas de especies de *Fusarium*.

Las colonias con características macroscópicas similares del género *Fusarium*, tales como: crecimiento algodonoso aéreo, afelpado o polvoso, de color blanco, violeta, naranja, amarillo o rosa fueron aislados por colonia gigante. Una vez desarrollados

(7días) se tomaron inóculos para realizar observaciones microscópicas por medio de la técnica directa y confirmar la presencia de micro y macroconidias

1.1.1 Suelo de Michoacán

En este suelo se aislaron cuatro diferentes tipos de colonias: SFM1, colonias de crecimiento lento (2 cm / 7 días), algodonosas con coloración blanca y morado rojizo; SFM2, colonias de crecimiento rápido (8 cm/ 7 días) con micelio aéreo de color crema a beige; SFM3 colonia de crecimiento lento de coloración violeta claro; SFM4, colonia de crecimiento lento de aspecto afelpado, color blanco y rosa en el medio y pigmento color violeta en el reverso del medio.

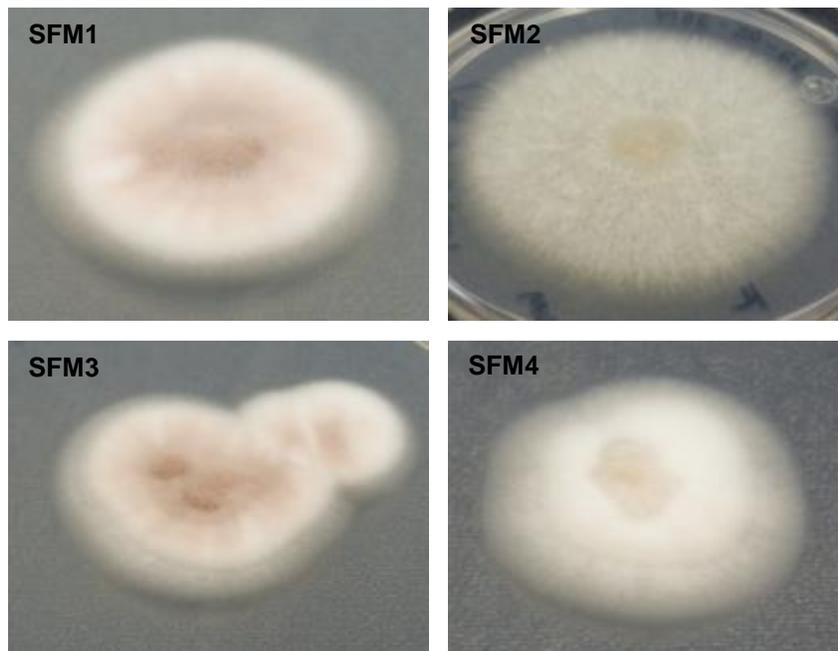


Figura 3. Aislados del suelo del estado de Michoacán crecidos en medio de cultivo PDA; (SFM1) Colonia algodonosa color morado-rojizo; (SFM2) Colonia amarillo-beige con poco micelio algodonoso aéreo (SFM3); Colonia algodonosa color morado y (SFM4) Colonia algodonosa color blanco.

1.1.2 Suelo de Veracruz.

En este suelo se aislaron seis diferentes tipos de colonias: SFV1, colonia con abundante micelio aéreo con coloración claro, en el centro de la colonia se observó coloración rosa intenso, el reverso de la colonia mostró pigmentaciones rosa intenso; SFV2, colonia de aspecto algodonoso y polvoso, color rojizo con poco micelio aéreo;

SFV3, colonia con poco micelio aéreo algodonoso con coloración rosa claro y en el centro se observó una coloración rosa-rojiza; SFV4 colonia algodonosa color blanco con poco micelio aéreo, en el reverso de la caja se observó poca coloración violeta-claro; SFV5, colonia algodonosa con poco micelio aéreo con coloración rosa claro el reverso presentó en el centro pigmentaciones rosa intenso y SFV6, colonia algodonosa con abundante micelio aéreo con coloración violeta claro, el reverso de la colonia presentó la misma coloración (Fig. 4).

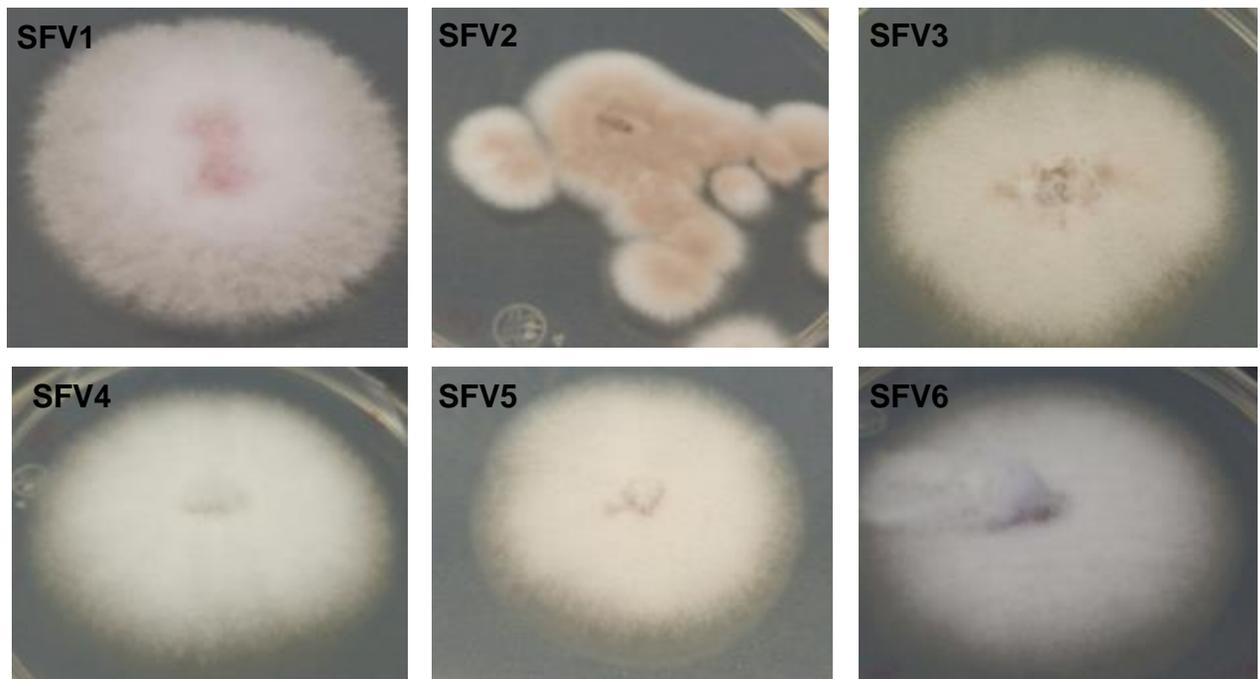


Figura 4. Morfología colonial de los aislados del suelo del estado de Veracruz crecidos en medio de cultivo PDA. (SFV1) Algodonosa color rosa (SFV2) Algodonosa color rojiza (SFV3) Algodona color rosa claro, (SFV4) Algodonosa blanca, (SFV5) Algodonosa color rosa claro y (SFV6) Algodonosa color violeta claro.

1.1.3 Suelo de Chiapas

En este suelo se aislaron nueve diferentes tipos de colonias: SFCH1, colonia algodonosa con abundante micelio aéreo, color blanco y centro violeta claro, el reverso de la colonia se observó con coloración violeta claro; SFCH2, colonia afelpada de coloración amarilla, el reverso de la colonia color beige; SFCH3, colonia algodonosa con abundante micelio aéreo color blanco, el reverso de la colonia con

pigmentación violeta claro y el centro violeta intenso; SFCH4, colonia algodonosa con abundante micelio aéreo color blanco, el reverso blanco.

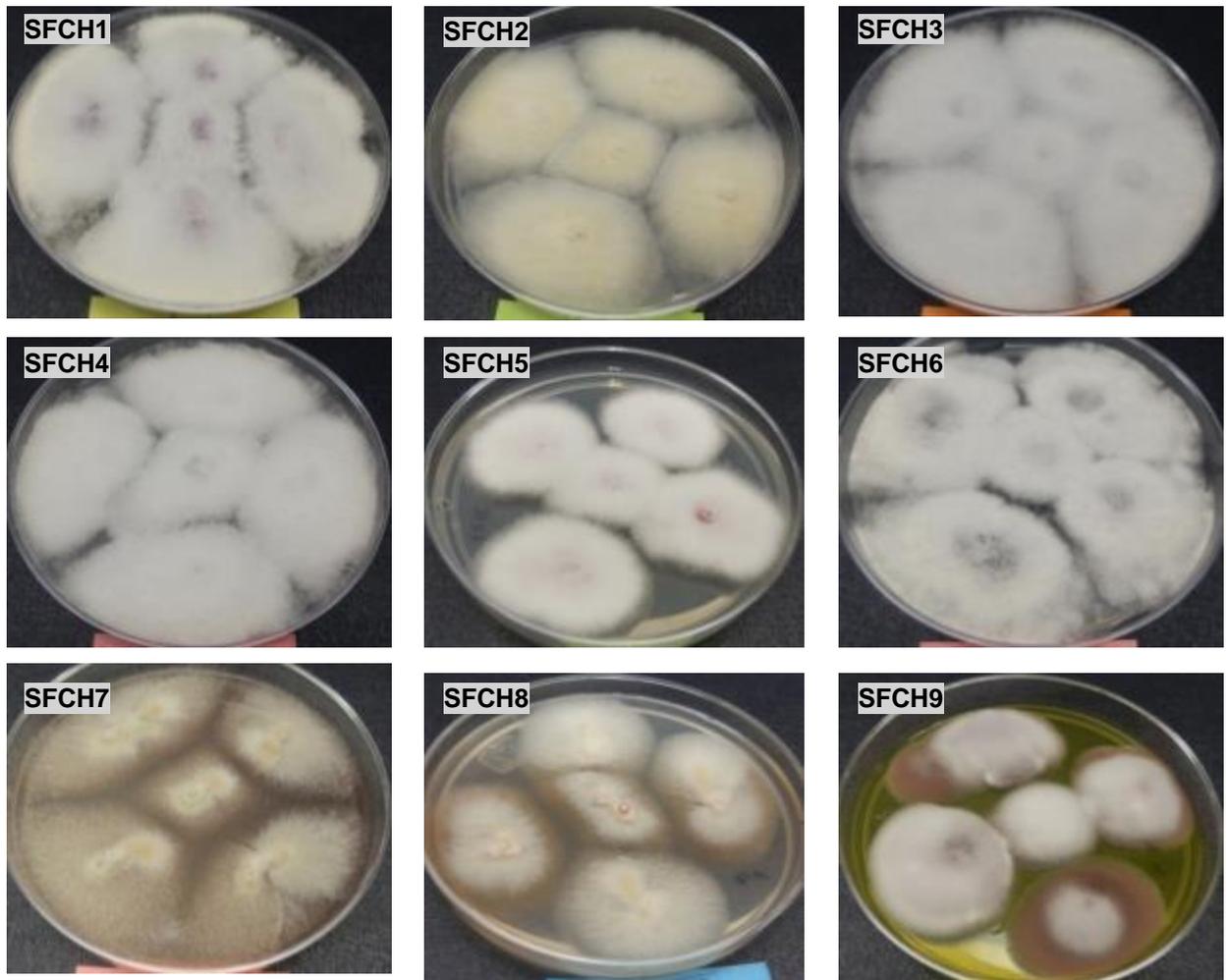


Figura 5. Morfología colonial de aislados de suelo del estado de Chiapas crecidos en medio de cultivo PDA. (SFCH1) Algodonosa color blanco y centro violeta claro (SFCH2 Algodonosa color amarillo-beige (SFCH3) Algodona blanca, (SFCH4) Algodonosa blanca, (SFCH5) Algodonosa color rosa claro (SFCH6) Algodonosa blanca y centro color violeta, (SFCH7 y SFCH8) Algodonosa color amarillo claro con pigmentación marrón y (SFCH9) Algodonosa con coloración blanca y violeta.

SFCH5, colonia algodonosa con poco micelio aéreo, con dos tipos de colores rosa y violeta claro, el reverso de la colonia color violeta. SFCH6, colonia algodonosa con abundante micelio aéreo de coloración blanca y centro violeta intenso, el reverso de la

colonia color violeta claro; SFCH7, colonia algodonosa con poco micelio aéreo, de coloración amarilla, el reverso de la colonia presento pigmentaciones color marrón. SFCH8 colonia algodonosa color amarillo-beige con poco micelio aéreo, las pigmentaciones marrones que presentó se observaron solo en algunos segmentos de la colonia y SFCH9, el crecimiento de este tipo de colonias fue muy variable, colonias con y sin micelio aéreo de coloración morado-rojizo, el reverso de la colonia se observó color amarillo claro (Fig.5).

1.1.4 Suelo de Tabasco

Los aislados en suelo de Tabasco presentaron las siguientes características: SFT1 colonia algodonosa color amarillo con poco micelio aéreo algodonoso algunos segmentos de la colonia de pigmentación color marrón claro y SFT2 colonia algodonosa con poco micelio aéreo color blanco y presentó pigmentación color violeta claro (Fig. 6).

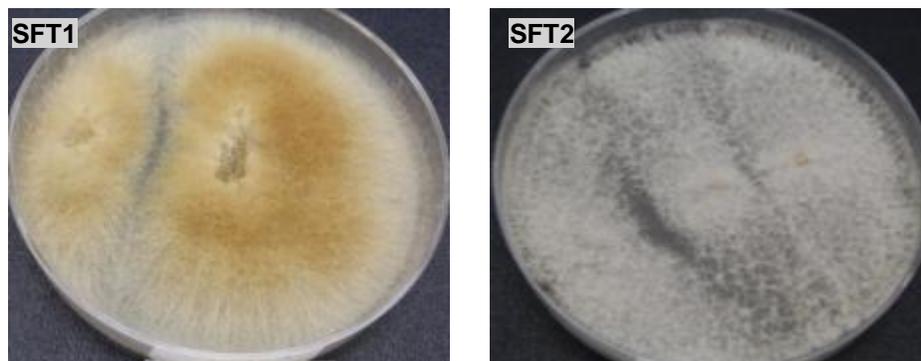


Figura 6. Morfología colonial de aislados del suelo de Tabasco con características de *Fusarium* crecidos en medio de cultivo PDA. (SFT1) Algodonosa color amarillo-marrón y (SFT2) Algodonosa blanca.

1.2 Identificación microscópica de las especies de *Fusarium*.

Todas las colonias aisladas de los diferentes suelos fueron observadas por microscopía en preparaciones directas a partir de cultivos de 7 días de incubación. Las colonias SFM1, SFM3, SFCH9 y SFV2, con coloración morado-rojizo presentaron

micelio muy delgado y microconidas de dos tipos: alargadas y redondas (Fig. 7a) y no presentaron macroconidas. La ausencia de estas estructuras no permitió hacer una identificación de especie de estas colonias. Las colonias SFCH1, SFCH3, SFCH6, SFV4, SFV6 y SFT2 algodonosas con abundante micelio aéreo de coloración violeta claro presentaron microconidias abundantes en forma recta y algunas se observaron poco curvadas y escasas macroconidias se observaron alargadas moderadamente curvadas en los extremos (Fig. 7b).

De acuerdo con las características ya descritas de micro y macroconidas y forma de crecimiento se identificaron estos aislados como *F. oxysporum*. Las colonias SFCH7, SFCH8 y SFT1 algodonosas con poco micelio aéreo de coloración amarillo-marrón las macroconidas presentes en este tipo de colonias fueron curvadas de 3 a 5 septas transversales (Fig. 7c), la identificación de este aislado de acuerdo a las características de las macroconidias fue *F. sambucinum*. Las colonias SFM2 algodonosas con coloración beige-amarillo claro se observaron macroconidias alargadas, fusiformes moderadamente curvadas o curvadas, de 3 a 7 septos transversales (Fig. 7d). De acuerdo a lo descrito este aislado se identificó como *F. solani*.

Las colonias SFCH4, SFCH5, SFV3 y SFV5 algodonosas color rosa-violeta claro presentaron abundantes microconidias y pocas macroconidias, las microconidias fueron de formas variadas: cilíndricas, ligeramente curvadas y rectas (Fig. 7e). En cuanto a las macroconidias presentaron formas alargadas, poco curvadas y delgadas en los extremos, basándonos en estos datos los aislados se identificaron como *F. moniliforme*. Las colonias SFM4 y SFCH2 presentaron únicamente microconidias rectas delgadas y cilíndricas (Fig. 7f). La ausencia de estas estructuras no permitió hacer una identificación de especie de estas colonias.

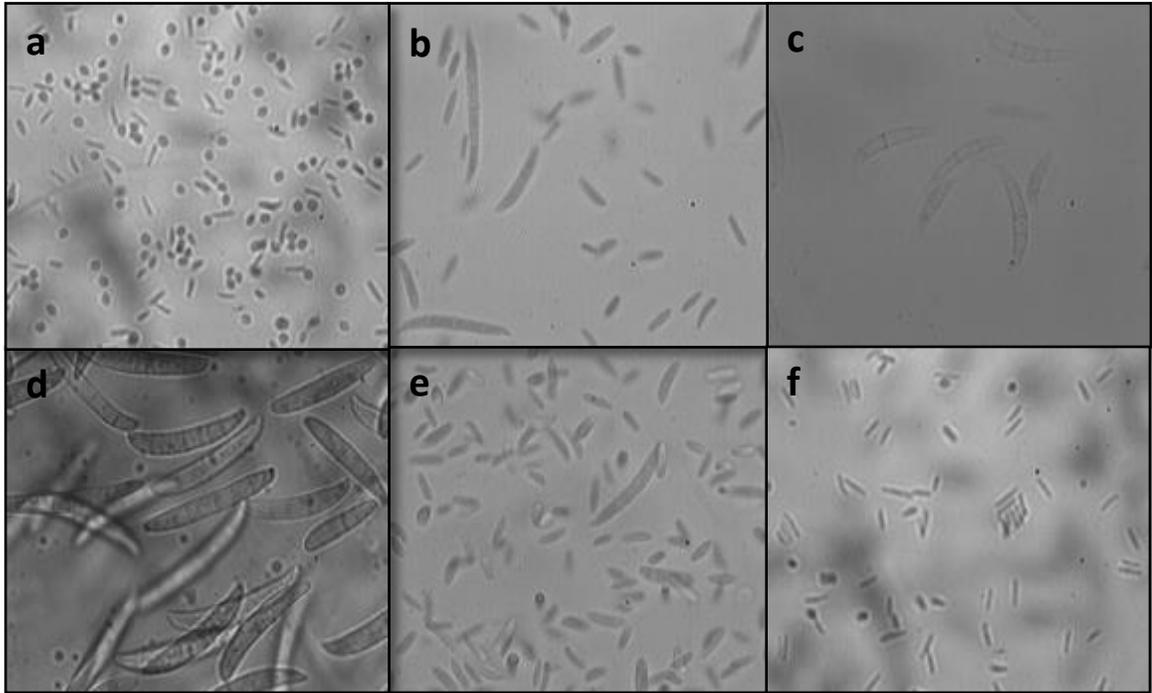


Figura 7. Morfología microscópica de microconidias y macroconidias de aislados de los suelos de zonas productoras de plátano vista 40X.

1.3 Identificación molecular de los aislados de suelo por amplificación de la región 5.8 S ITS1-ITS4 de los genes ribosómicos.

La identificación molecular de cada uno de los aislados se realizó obteniendo el DNA de cada una de ellas y su integridad se verificó por electroforesis (Fig. 8). En esta identificación se utilizaron el par de primers específicos que amplificó el fragmento esperado de DNA de 250-280 pb en los 21 aislamientos (Fig. 9).

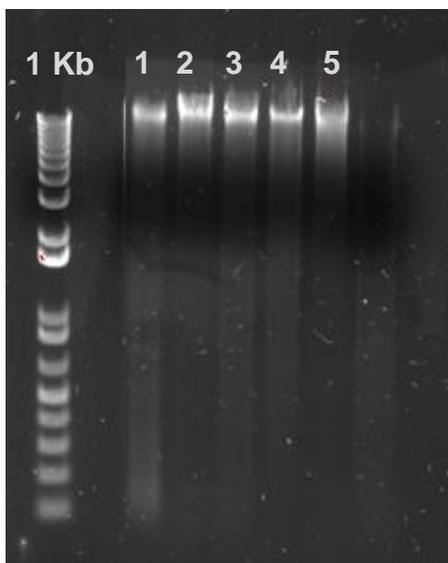


Figura 8. Análisis de DNA de aislados en agarosa 1%. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 Kb; Carriles 1-5. DNA de 5 aislados diferentes del suelo de Michoacán con características de *Fusarium*.

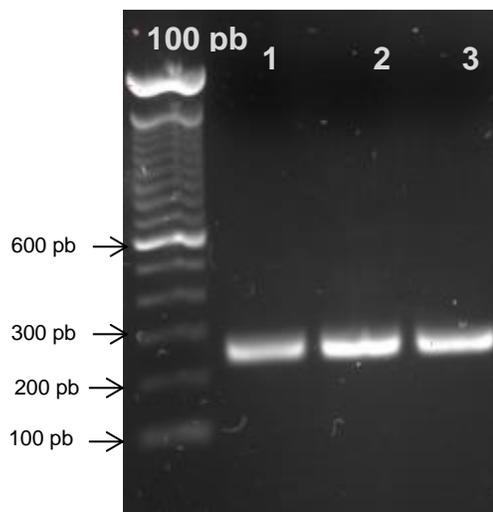


Figura 9. Análisis de productos de PCR en agarosa 1%, de DNA de 3 aislados de Michoacán. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb; Carril 1- 3 PCRs de aislados de Michoacán.

Para la identificación de género y especie de los aislados, las secuencias fueron alineadas y comparadas con las secuencias ya depositadas en bases de datos: NCBI y Broad Institute. A partir de los 4 muestras de suelo analizadas de las zonas productoras de plátano, provenientes de diferentes regiones del país se obtuvieron 21 aislados de *Fusarium* spp., pertenecientes a 5 especies: *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. phaseoli*, *F. equiseti* y *F. brachygibbosum* (Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización molecular por alineamiento de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias (ITS) de los genes rDNA de las especies de *Fusarium* aisladas de suelo de zonas productora de plátano (Chiapas, Michoacán, Tabasco y Veracruz).

Nombre de la muestra ¹	Especie identificada	Numero de acceso ²	IS ³
SFCH1	<i>F. oxysporum</i>	KP903503	100%

SFCH2	<i>F. oxysporum</i>	KM203588	100%
SFCH3	<i>F. oxysporum</i>	KJ938022	100%
SFCH4	<i>F. oxysporum</i>	KP186123	100%
SFCH5	<i>F. oxysporum</i>	KP942920	100%
SFCH6	<i>F. oxysporum</i>	KM203588	100%
SFCH7	<i>F. solani</i>	HQ176440	99%
SFCH8	<i>F. solani</i>	KM203607	100%
SFCH9	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	EU442584	100%
SFM1	<i>F. phaseoli</i>	KR080812	100%
SFM2	<i>F. solani</i>	KT250733	100%
SFM3	<i>F. phaseoli</i>	KF717534	99%
SFM4	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	HQ694500	100%
SFT1	<i>F. equiseti</i>	EU332105	100%
SFT2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	KJ412508	99%
SFV1	<i>F. brachygibbosum</i>	KP031674	99%
SFV2	<i>F. phaseoli</i>	KF717534	100%
SFV3	<i>F. oxysporum</i>	KR909396	100%
SFV4	<i>F. oxysporum</i>	KM103328	100%
SFV5	<i>F. oxysporum</i>	KJ774041	100%
SFV6	<i>F. oxysporum</i>	KP942920	100%

¹Nombre otorgado a las cepas analizadas por localidad de recolecta (CH= Chiapas, M=Michoacán, T=Tabasco y V=Veracruz). ²Base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information). ³ Índice de similitud entre las secuencias de las especies aisladas y las especies compradas.

De todas las especies de *Fusarium* encontradas en suelos de las diferentes regiones solo dos formas especiales pudieron ser identificadas por biología molecular: f. sp. *ciceris* y f. sp. *cubense*, Tabla 5.

Tabla 5. Especies identificadas de *Fusarium* del suelo de zonas productoras de plátano.

Estado	Especies identificadas
Chiapas	<i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>
Michoacán	<i>F. phaseoli</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>
Veracruz	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. phaseoli</i> , <i>F. brachygibbosum</i>
Tabasco	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> , <i>F. equiseti</i>

El número de especie de *Fusarium* identificadas dentro de cada región fue variable. Sin embargo, las especies de *Fusarium oxysporum* constituyeron el 47% de

los aislamientos identificados y se aislaron de las cuatro zonas productoras de plátano. En dos regiones se identificó *F. oxysporum* f. sp. *cubense*

1.4 Árbol filogenético de los hongos aislados de suelo de zonas productoras de plátano.

Se observaron dos distintos clusters, la mayoría de las ramas se agrupa dependiendo de la región geográfica, excepto por *F. brachygibbosum*, *F. phaseoli*, *F. solani* y *F. equiseti*. El aislado *F. oxysporum* f. sp. *cubense* de Michoacán presenta mayor diversidad genética y se agrupa en diferente rama. Los aislados de Tabasco se agrupan muy cerca de los aislados de Chiapas, esto puede deberse a que estas especies tienen un mismo ancestro de origen ya que son lugares cercanos y conservan similitudes en sus secuencias (Fig.10).

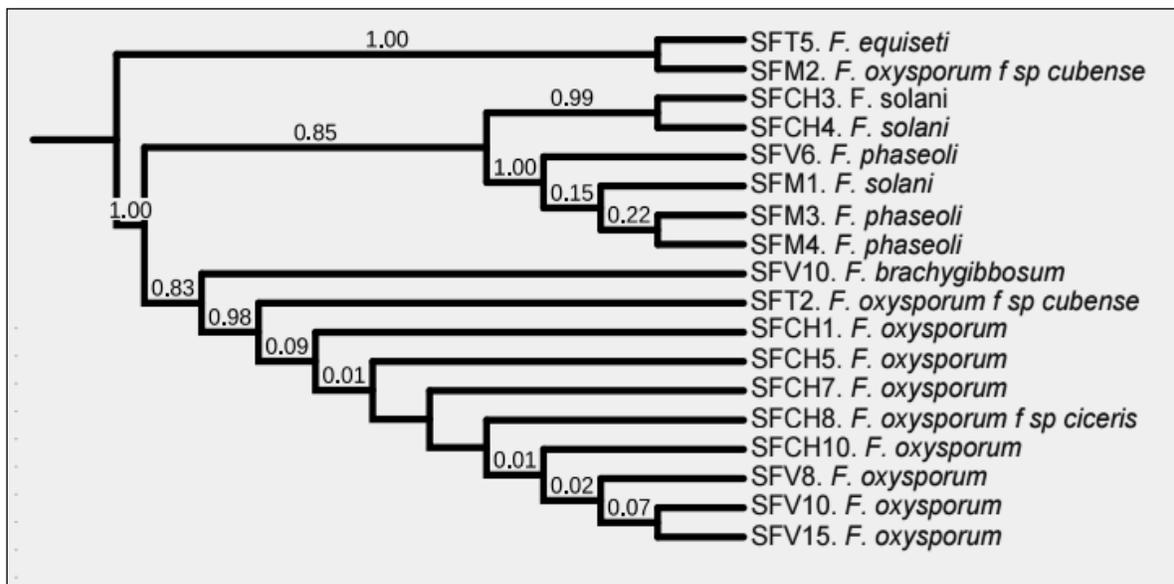


Figura 10. Árbol filogenético. (MEGA 6. Test Neighbor-Joining Tree).

2. Determinación del efecto del Ácido Naftalen acético (ANA) utilizando el pato-sistema *Solanum lycopersicum-Fusarium oxysporum* en suelo en invernadero.

Para comprobar el efecto del Ácido Naftalen acético sobre *Fusarium* se diseñó un pato-sistema utilizando como indicador indirecto plántulas de (*Solanum lycopersicum-F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*). Se realizaron dos experimentos.

Primer experimento. Se sembraron semillas de jitomate en mezcla general, cuando las plantas tenían 28 días de edad, se separaron en grupos de seis plantas por maceta y por triplicado para aplicar los siguientes tratamientos: a) plantas sin *Fusarium* y sin ANA (control); b) Plantas con *Fusarium* y c) Plantas con *Fusarium* + ANA 100mM. Se realizaron observaciones a los 2.5 y 7 días después de la aplicación de los tratamientos.

Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* no presentaron ningún síntoma característico de la enfermedad que causa este hongo a los 2.5 días. Las plantas se observaron sanas con las mismas características de altura y color que las plantas control. Sin embargo, las plantas con ANA 100 mM se marchitaron después de la adición de este compuesto (tabla 3). A los 7 días ninguna de las plantas de cada tratamientos presentó síntomas característicos de marchitamiento como son manchas foliares y/o marchitamiento vascular. Las plantas con 100 mM de ANA murieron a los 7 días (Tabla 6, Fig. 11 y 12).

Tabla 6. Efecto de la concentración del ANA 100 mM sobre el desarrollo de plántulas de Jitomate inoculas con *F. oxysporum*.

Tratamiento	Número de plantas		Número de plantas	
	Marchitas	Sanas	Marchitas	Sanas
	2.5 días		7 días	
Plantas + <i>Fusarium</i> + ANA	18	0	18	0
Plantas + <i>Fusarium</i>	0	18	0	18
Planta	0	18	0	18



Figura 11. Plantas a los 2.5 días después de los tratamientos: **a)** Plantas + *F. oxysporum* + ANA 100 mM; **b)** Plantas + *F. oxysporum* y **c)** Plantas sin *Fusarium* y sin ANA (Control). Experimento por triplicado con 6 repeticiones.



Figura 12. Estado físico de las plantas tratadas con ANA siete días después del tratamiento.

Segundo experimento. Se sembraron semillas de jitomate en mezcla general, cuando las plantas tenían 28 días de edad, se separaron en grupos de seis plantas por maceta y por triplicado para aplicar los siguientes tratamientos: a) plantas sin *Fusarium* y sin ANA (control); b) Plantas con *Fusarium* y c) Plantas con *Fusarium* + ANA 50 mM. Este experimento se monitoreo a los 2.5, 7, 35 y 70 días.

A los 2.5 y 7 días todas las plantas, con los diferentes tratamientos no presentaron ningún síntoma de enfermedad, tal como se ilustra en la tabla 7 y se observa en la Fig. 13.

Tabla 7. Efecto de la concentración del ANA (50 mM) sobre el desarrollo de plántulas de Jitomate inoculas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Tratamiento	Número de plantas		Número de plantas	
	Marchitas	Sanas	Marchitas	Sanas
	2.5 días		7 días	
Plantas	0	18	0	18
Plantas + <i>Fusarium</i>	0	18	0	18
Planta + <i>Fusarium</i> + ANA 50 mM	0	18	0	18

Experimento por triplicado con 6 repeticiones



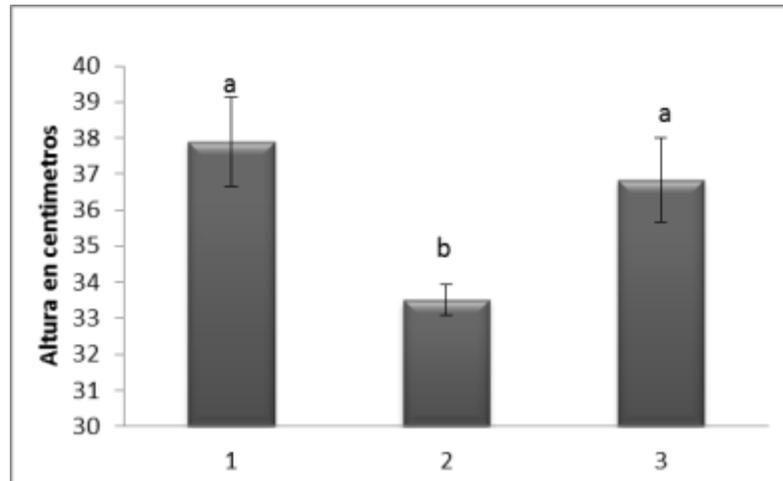
Figura 13. Plantas a los 7 días después de la aplicación de los tratamientos: **a)** Plantas + *F. oxysporum* + ANA 100 mM; **b)** Plantas + *F. oxysporum* y **c)** Plantas control sin inoculación y sin ANA. Experimento por triplicado con 6 repeticiones

Al realizar las mediciones de altura, grosor de tallo y floración en las plantas de jitomate a los 35 días se encontró que existían diferencias entre los tratamientos. Las plantas con los diferentes tratamientos no presentaron ningún síntoma de la enfermedad y todas presentaron floración.

Los análisis de altura a los 35 días muestran que el control (planta sin inoculación del patógeno y sin ANA) tiene la mayor altura, las planta + *F. oxysporum* +

ANA 50 mM tienen menor altura pero no hay diferencias significativas con respecto al control, las plantas con *F. oxysporum* presentaron el menor crecimiento (Fig. 14).

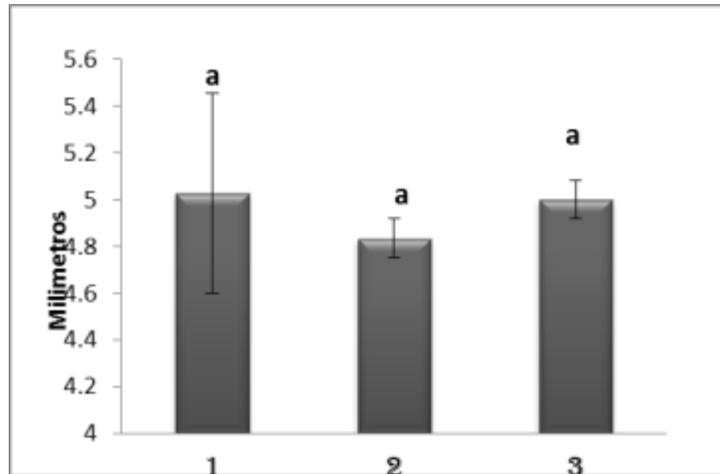
Figura 14. Altura en plantas de Jitomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con ANA 50 mM. 35 días después de la inoculación



1) Planta control sin inoculación de *F. oxysporum* y sin ANA; **2)** Planta + *F. oxysporum* y **3)** Planta + *F. oxysporum* ANA 50 mM. Las barras representan la media de 3 repeticiones (6 plantas por cada repetición) n=18. Duncan (p=0.05)

Para la variable grosor de tallo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, se observan fluctuaciones entre 0.02 a 0.17 mm entre los tratamientos (Fig. 15).

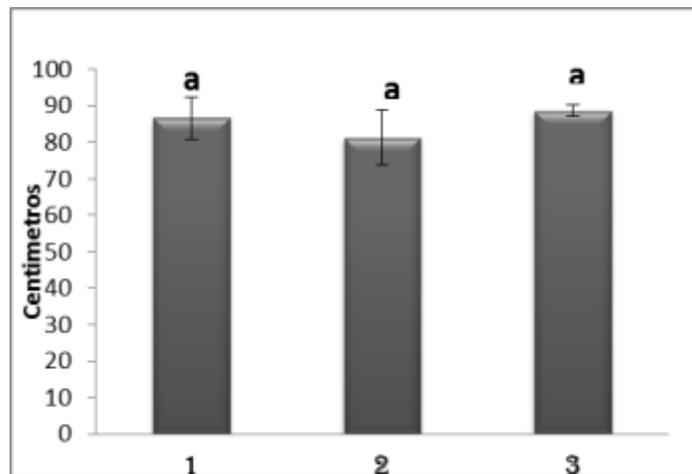
Figura 15. Grosor de tallo en plantas de Jitomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con ANA 50 mM. 35 días después de la inoculación



1) Planta control sin inoculación de *F. oxysporum* y sin ANA; 2) Planta + *F. oxysporum* y 3) Planta + *F. oxysporum* + ANA 50 mM. Las barras representan la media de 3 repeticiones (6 plantas por cada repetición) n=18. Duncan (p=0.05)

Las plantas con los diferentes tratamientos a los 70 días no presentaron ningún síntoma de la enfermedad. Al valorar la altura de las plantas tampoco se observó ninguna diferencia entre los tratamientos. El análisis estadístico demostró que no había diferencias significativas (Fig. 16).

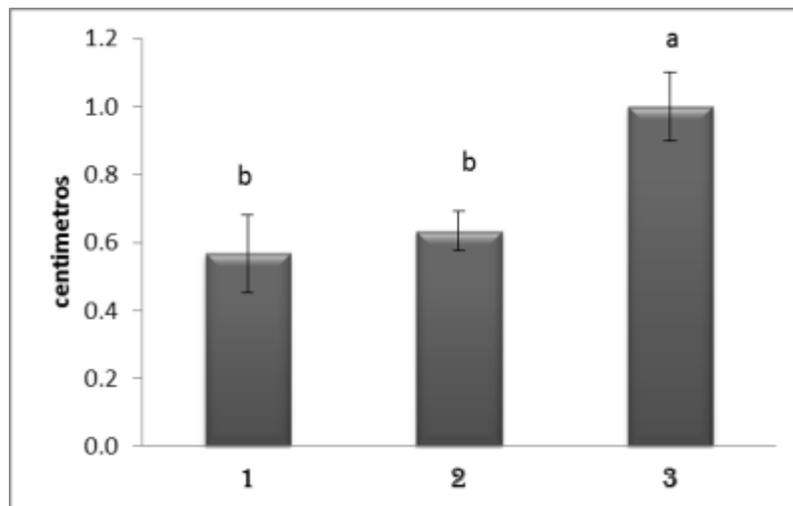
Figura 16. Altura en plantas de Jitomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con ANA 50 mM. 70 días después de la inoculación.



1) Planta control sin inoculación de *F. oxysporum* y si ANA; 2) Planta + *F. oxysporum* y 3) Planta + *F. oxysporum* + ANA 50 Mm. Las barras representan la media de 3 repeticiones (6 plantas por cada repetición) n=18. Duncan (p=0.05).

Con respecto al grosor de tallo, las plantas control y las plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* mostraron valores similares (0.5-0.6 cm), en cambio las plantas con 50 mM de ANA presentaron valores más altos (1.0 cm). Estas diferencias son significativas (Fig. 17).

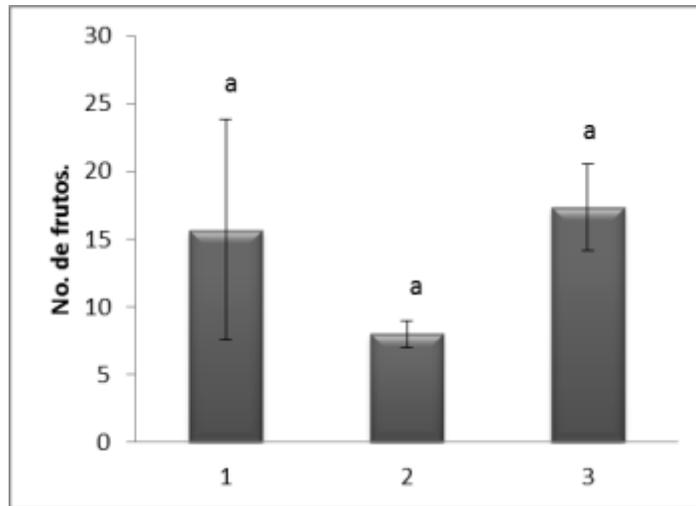
Figura 17. Grosor del tallo de plantas de Jitomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con ANA 50 mM. 70 días después de la inoculación.



1) Planta control sin inoculación de *F. oxysporum* y sin ANA; **2)** Planta + *F. oxysporum* y **3)** Planta + *F. oxysporum* + ANA 50 mM. Las barras representan la media de 3 repeticiones (6 plantas por cada repetición) n=18. Duncan (p=0.05)

Con respecto al número de frutos totales producidos por las plantas se encontró que tanto las plantas control (no inoculadas) como las plantas inoculadas con el patógeno presentaron un menor número de frutos, 15 y 8 respectivamente. Las plantas con el patógeno y ANA 50 mM produjeron 19. Las diferencias encontradas no son significativas. (Fig. 18).

Figura 18. Número de frutos totales por planta de Jitomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y tratadas con ANA 50 mM. 70 días después de la inoculación.



1) Planta control sin inoculación de *F. oxysporum* y sin ANA; 2) Planta + *F. oxysporum* y 3) Planta + *F. oxysporum* + ANA 50 mM. Las barras representan la media de 3 repeticiones (6 plantas por cada repetición) n=18. Duncan (p=0.05)

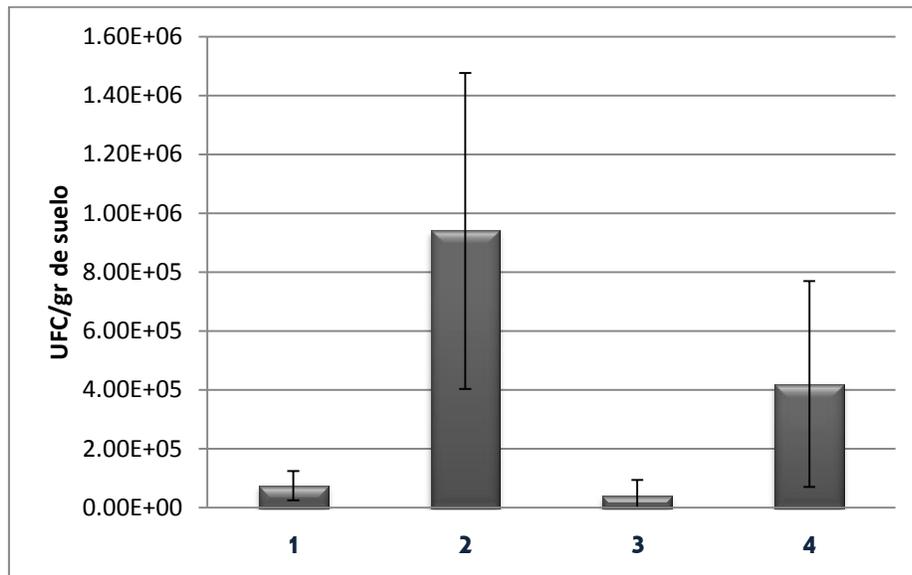
3. Efecto del ANA sobre la población de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* (FOC) inoculado en suelo de Michoacán contenido en recipientes en invernadero sin indicadores indirectos

Para evaluar el efecto inhibitorio del ANA sobre *F. oxysporum* inoculado en suelo se tomaron muestras de cada unidad experimental (cinco vasos por tratamiento) y se hicieron diluciones seriadas, como se explica en Materiales y Métodos, para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Las UFC contadas fueron las que presentaron características de *Fusarium* (algodonosas con micelio aéreo color blanco y violeta claro). El número de UFC se determinó a los 10 y 30 días de exposición al ANA 10 mM.

A los 10 días de incubación el número de UFC de *Fusarium* es bajo en el suelo sin inoculación (número de colonias), en cambio en el suelo inoculado encontramos

9.4×10^5 UFC. En contraste en los tratamientos donde fue aplicado ANA el número de UFC disminuyó (Fig. 19).

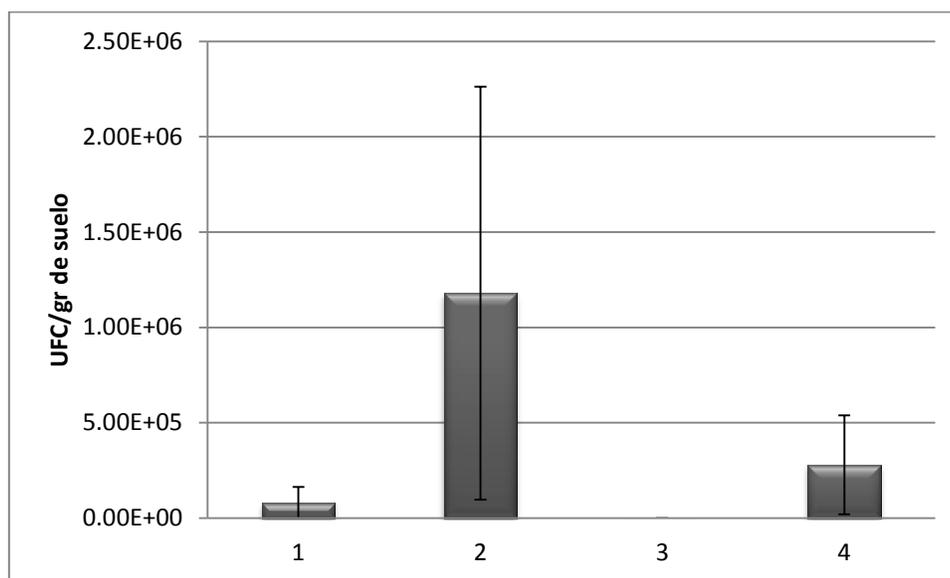
Figura 19. UFC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* inoculado en suelo (1×10^7 esporas) y tratado con ANA durante 10 días a 28 °C.



1). Suelo; 2) Suelo + FOC; 3) Suelo + ANA y 4) Suelo + FOC + ANA. Las barras representan la media de 5 repeticiones.

A los 30 días de incubación, se encontró que el número de UFC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* aumentó a 1.18×10^6 en el tratamiento 1 (control sin ANA), el aumento fue de 20.33%, En el suelo + ANA no se identificaron UFC con características de *F. oxysporum*. En el tratamiento 3, donde el suelo es inoculado con el hongo y tratado con ANA se observa una reducción de las UFC de 4.2×10^5 a 2.8×10^5 , lo que corresponde a 33.33% (Fig. 20).

Figura 20. UFC de *F. oxysporum* f. sp. *ubense* inoculado en suelo (1×10^7 esporas) y tratado con ANA durante 30 días a 28 °C.



1). Suelo; 2) Suelo + FOC; 3) Suelo + ANA y 4) Suelo + FOC + ANA. Las barras representan la media de 5 repeticiones.

4. Efecto del Acético Naftalen acético sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in vitro

a. Determinación del tiempo de germinación de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* in vitro.

El tiempo de germinación de microconidias y macroconidias de *Fusarium oxysporum* se llevó a cabo en medio PDB utilizando placas de Elisa de 96 pozos las cuales fueron inoculadas con una concentración de inóculo de 1×10^6 esporas/pozo. Se realizaron observaciones a las 3, 6, 8, 10, 12, 15 y 24 horas. Para establecer diferencias se contaron las esporas en diferentes estadios de germinación.

El primer estadio de la germinación de las micro y macroconidias ocurre a las 6 horas con un porcentaje muy bajo (1.49%). A las 8 horas se observan pequeñas germinulas en un 12.67%. A las 10 horas la germinula ha crecido 2 veces el tamaño de las macroconidias. A las 12 horas la germinula alcanzó 3 veces el diámetro de una

macroconidia; a las 15 horas la mayoría de las esporas han germinado (63.26%) y se observa la formación de micelio y a las 24 horas solo se observa crecimiento micelial. tal como se ilustra en la Fig.21. Los resultados son promedio de 5 repeticiones de cada tiempo y por cada repetición se observaron 10 campos (Tabla 8).

Tabla 8. Tiempo de germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Tiempo de incubación de las esporas (horas)	% de germinación
3	0
6	1.49
8	12.67
10	17.40
12	21.03
15	63.26
24	100

Los valores son media de cinco repeticiones y 10 campos por cada repetición.

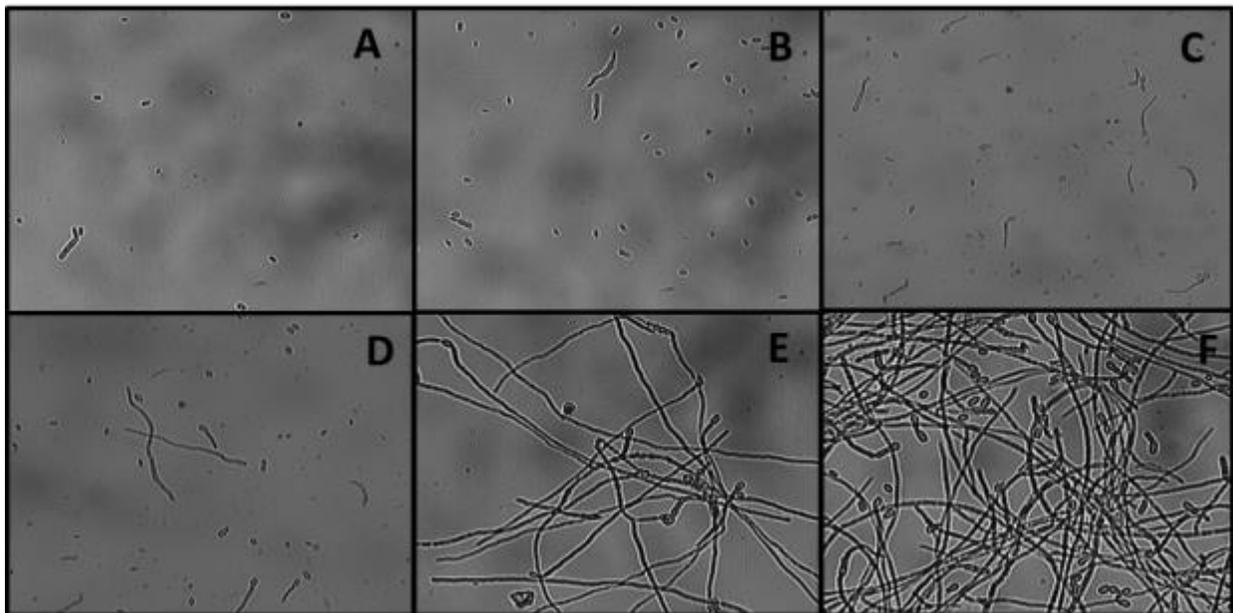


Figura 21. Etapas de la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* en medio PDB. (A) Esporas sin germinar; (B) Macroconidias con protuberancia (C) Micro y macroconidias con germinula; (D) Germinula diámetro de 2 a 3 veces tamaño de la espora; (E) Germinula con 5 o más veces el diámetro de macroconidia y (F) Micelio.

4.2 Efecto de la concentración mínima inhibitoria de ANA sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

El efecto del ANA sobre la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* se evaluó contando las esporas germinadas y no germinadas después de 24 horas de exposición a diferentes concentraciones del compuesto. Las esporas incubadas solo en PDB presentaban crecimiento micelial (Fig. 22 A y D). Las esporas expuestas a ANA se vieron afectadas dramáticamente ya que la germinación se inhibió totalmente (Tabla 9). También se observó que mayor concentración de ANA ocurre destrucción de las esporas Fig. 22 B, C, E y F.

Tabla 9. Efecto de diferentes concentraciones del Ácido Naftalen Acético sobre la germinación de *Fusarium oxysporum* en medio PDB.

PDB + ANA (mM)	% de germinación a las 24 h
0	100
10	0
25	0
50	0
100	0

Media de 5 repeticiones por tratamiento.

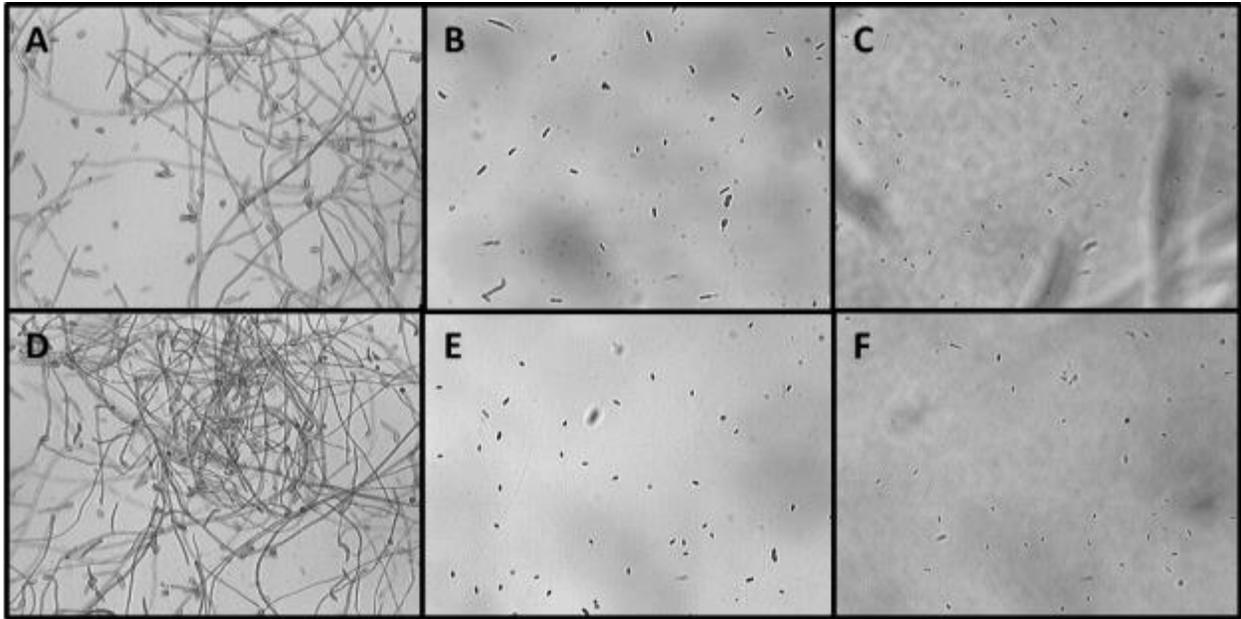


Figura 22. Crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con diferentes concentraciones de Ácido Naftalen Acético. A y D) *F. oxysporum* en medio PDB sin ANA; B) *F. oxysporum* + ANA 10 mM; C) *F. oxysporum* + ANA 25 mM; E) *F. oxysporum* + ANA 50 Mm y F) *F. oxysporum* + ANA 100 mM.

4.3 Efecto de la concentración mínima inhibitoria de ANA sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Los resultados obtenidos muestran que *F. oxysporum* crece (100%) de forma normal cuando no se le adiciona ANA, mientras que la adición de diferentes concentraciones del compuesto afectan el crecimiento notablemente, concentraciones bajas de ANA (5 mM) el hongo solo crece 1.3% (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto del Ácido Naftalen Acético en diferentes concentraciones en el crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

Concentración de ANA mM	Peso seco de micelio mg
0	85.66 ± 35.81
5	1.52 ± 0.31
8	0.88 ± 0.39
10	0.4 ± 0.36
25	0 ± 0.00
50	0 ± 0.00

Los valores representan media de cinco repeticiones.

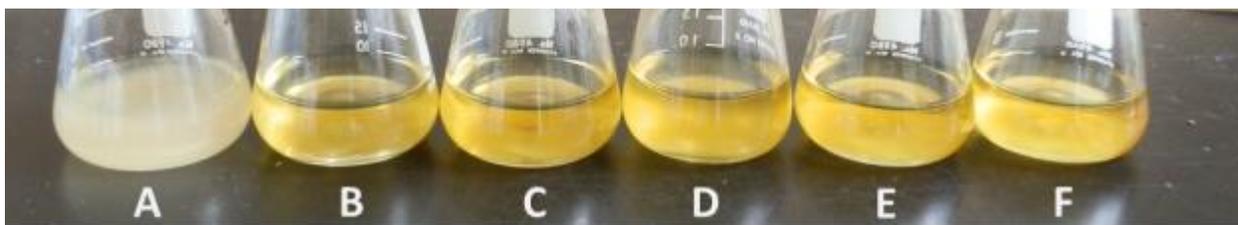


Figura 23. Efecto del Ácido Naftalen Acético sobre *Fusarium oxysporum* A) *F. oxysporum* sin ANA; B) *F. oxysporum* + ANA 5mM; C) *F. oxysporum* + ANA 8 mM; D) *F. oxysporum* + ANA 10 mM; E) *F. oxysporum* + ANA 25 mM y F) *F. oxysporum* + ANA 50 mM.

5. Efecto del ANA sobre la transcripción de los genes reguladores del crecimiento vegetativo flbA y fluG y de esporulación brlA de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense*.

Se obtuvo RNA de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense* incubado en diferentes condiciones de cultivo, tal como se describe en la sección de métodos experimentales. Las concentraciones de los diferentes RNAs obtenidos fueron de 975-2000 ng/μl con una relación de 260/280 de 1.7 - 2.0.

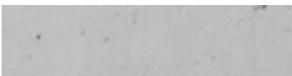
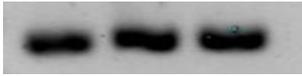
Se diseñaron los oligos de flbA, fluG y brlA, se determinó la Tm de cada uno de los pares de oligos y se realizó la normalización de las condiciones de PCR (número de ciclos). Finalmente mediante RT-PCR semi-cuantitativo se verificó si existe expresión diferencial de los genes reguladores de crecimiento y esporulación fluG, flbA y brlA, los resultados se describen a continuación:

5.1. a Cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pre-incubado 6 hrs y expuesto al ANA 5 y 10 mM durante 3 horas para determinar los niveles de transcripción de los genes flbA, brlA y fluG

Los cultivos pre-incubados 6 horas permiten la germinación de las esporas del hongo, ya que se demostró anteriormente que al adicionar ANA a las esporas desde tiempo cero se inhibe completamente la germinación. Una vez que se confirmó, por

microscopia de luz, que las esporas ya habían germinado se adicionó el ANA en diferentes concentraciones en matraces separados. Bajo estas condiciones no hubo transcripción de los genes flbA, brlA y fluG, ni en el control ni en ninguno de los dos tratamientos con ANA (5 mM y 10 mM). Como se observa en la parte superior de la tabla 11 en comparación con los niveles de transcripción de la actina en la parte inferior de la misma.

Tabla 11. Expresión de los genes brlA, fluG y flbA de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con 3 horas de exposición al ANA. Con un tiempo total de incubación de 9 horas.

flbA			BrlA			FluG		
C	5 mM	10 mM	C	5 mM	10 mM	C	5 mM	10 Mm
								
								

Tres repeticiones llevadas a cabo con oligonucleótidos específicos

5.2b Cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *cubeense* pre-incubado 6 hrs y expuesto a ANA 5 y 10 mM durante 3 horas para determinar los niveles de transcripción de los genes flbA, brlA y fluG

Bajo estas condiciones los genes flbA y brlA no se expresaron ni en el control ni en los tratamientos con ANA (5 y 10 mM). El gen fluG solo se expresó cuando el hongo se incubo sin ANA (control). Como se observa tabla 12 en la imagen superior de la tercera fila.

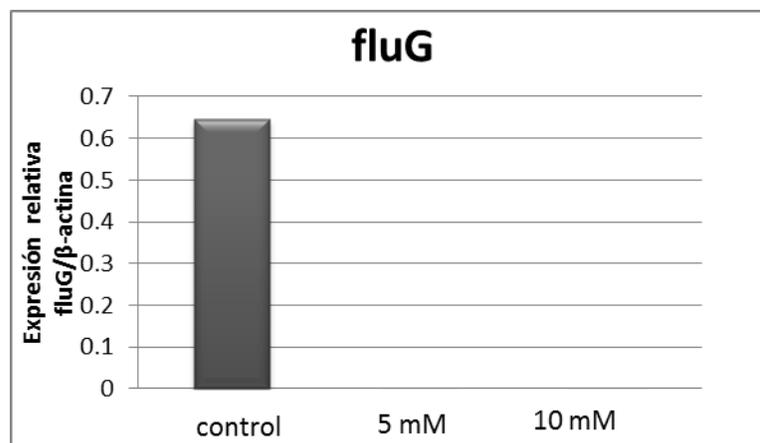
Tabla 12. Expresión de los genes brlA, fluG y flbA de *F. oxysporum* f. sp. *cube*nse con 3 horas de exposición al ANA. Tiempo total de incubación de 9 horas

flbA			BrIA			fluG		
C	5 mM	10 mM	C	5 mM	10 mM	C	5 mM	10 mM

Tres repeticiones llevadas a cabo con oligonucleótidos específicos.

Cuando se mide expresión relativa de del gen con ImageJ se confirmó los datos anteriormente descritos (Fig. 12a)

Figura 12a. Expresión relativa del gen fluG de *F. oxysporum* f. sp. *cube*nse cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 6 hrs de pre-incubación y 3 hrs de exposición al ANA. 9 hrs de incubación total.

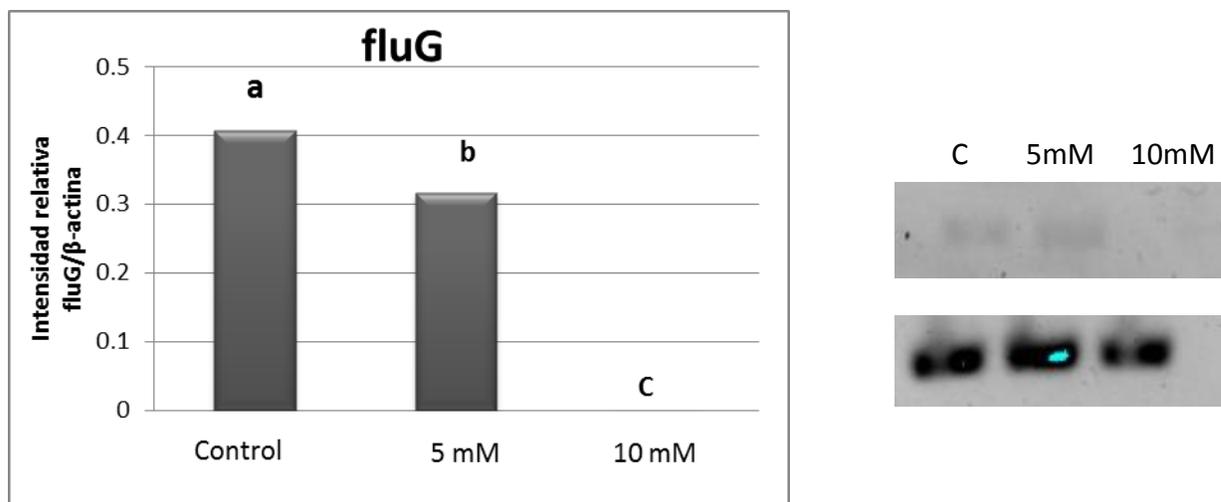


Las barras representan la media de tres repeticiones, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina

5.3a Cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pre-incubado 6 hrs y expuesto a ANA 5 y 10 mM durante 48 horas para determinar los niveles de transcripción de los genes *flbA*, *brlA* y *fluG*

Al aumentar el tiempo de exposición (48 hrs) del hongo al ANA, los niveles de transcritos de los genes *brlA* y *flbA* fue negativa tanto en el control como en los tratamientos con ANA. En cambio, la transcripción del gen *fluG* ocurre tanto en el control como en presencia de ANA 5 mM. Cuando la concentración de ANA es 10 mM, no ocurre la transcripción de este gen (Fig. 23).

Figura 24. Expresión relativa del gen *fluG* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.



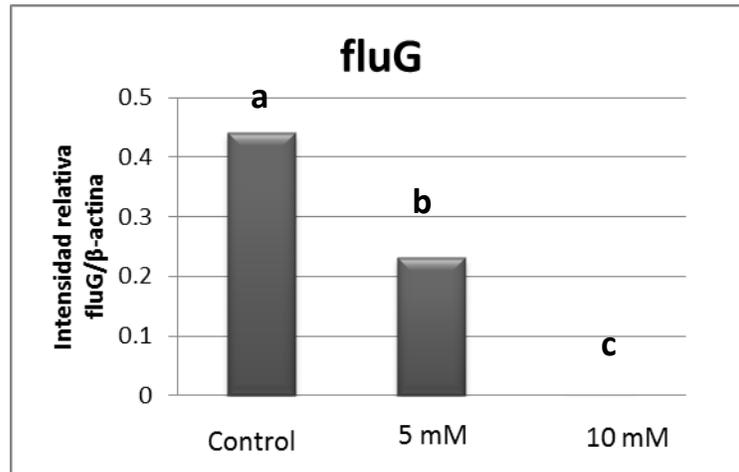
Las barras representan la media de tres repeticiones, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$)

5.3b Cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *cubeense* pre-incubado 6 hrs y expuesto a ANA 5 y 10 mM durante 48 horas para determinar los niveles de transcripción de los genes *flbA*, *brlA* y *fluG*.

La transcripción de los genes *brlA* y *flbA* en *F. oxysporum* f. sp. *cubeense* fue negativa tanto en el control como en los tratamientos con ANA. En cambio, la transcripción del gen *fluG* ocurre tanto en el control como en presencia de ANA 5 mM.

Cuando la concentración de ANA es 10 mM, no ocurre la transcripción de este gen. (Fig. 25)

Figura 25. Expresión relativa del gen *fluG* de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.



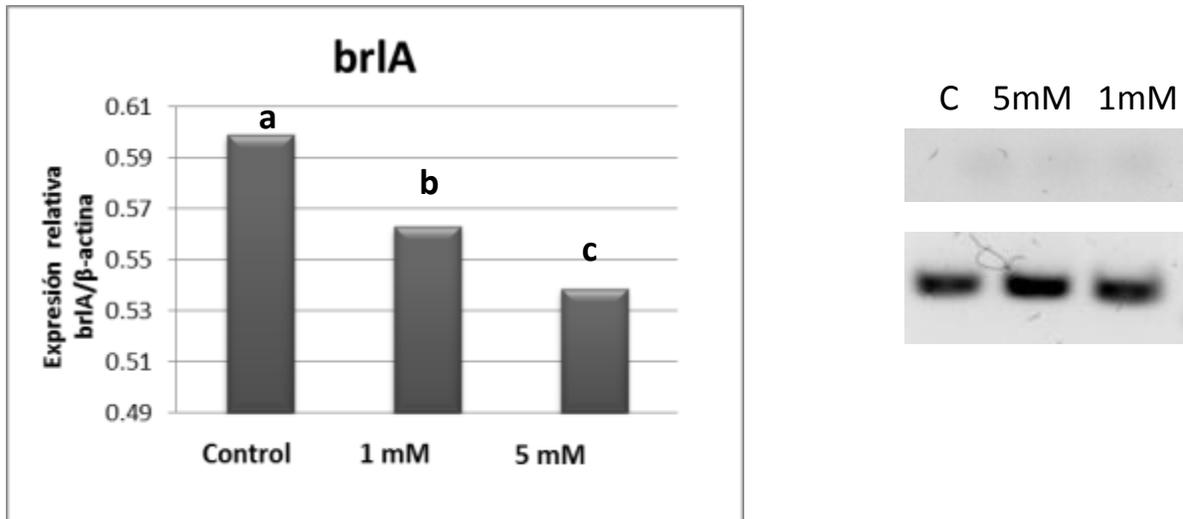
Las barras representan la media de tres repeticiones, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$)

5.4a Cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pre-incubado 12 hrs y expuesto a ANA 1 y 5 mM durante 24 horas para determinar los niveles de transcripción de los genes *flbA*, *brlA* y *fluG*

La pre-incubación del hongo durante 12 hrs permitió que las germinulas presentaran mayor crecimiento que a las 6 hrs de pre-incubación. Esta condición podría asegurar la transcripción de los genes de interés en los controles y permitiría detectar el efecto del ANA 1 y 5 mM sobre los mismos.

En estas condiciones los transcritos del gen *brlA* se observaron tanto en el control como en los tratamientos con ANA (1 y 5 mM). Al determinar la expresión relativa se encontró que los niveles de transcritos del gen fueron mayores en el control y se reducen cuando en hongo se cultivó en presencia del ANA. A mayor concentración de ANA (5 mM) menor expresión relativa (Fig. 26).

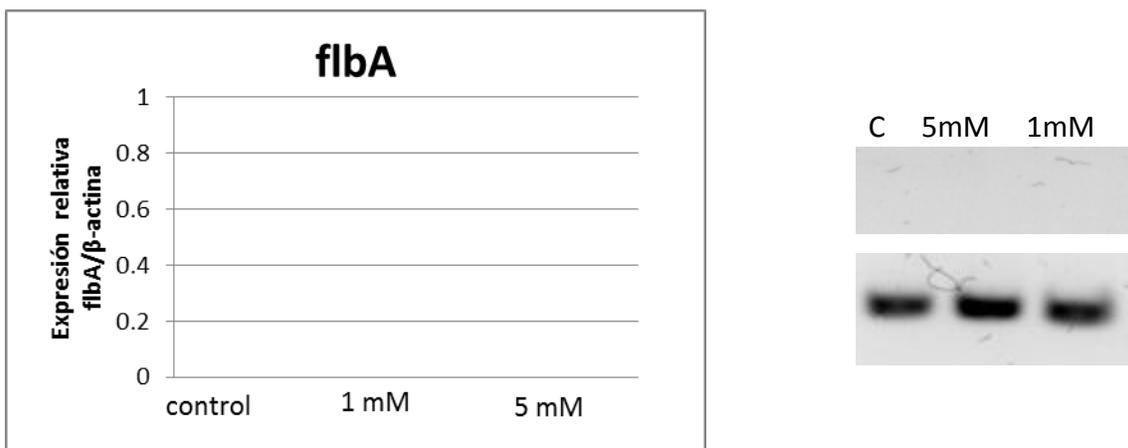
Figura 26. Expresión relativa del gen *brlA* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultivado con ANA 1 y 5 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.



Las barras representan la media de tres repeticiones, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$)

En las condiciones de cultivo antes descritas no se detectó transcripción del gen *flbA* ni en el control ni en los tratamientos con ANA (1 y 5 mM), Fig. 27.

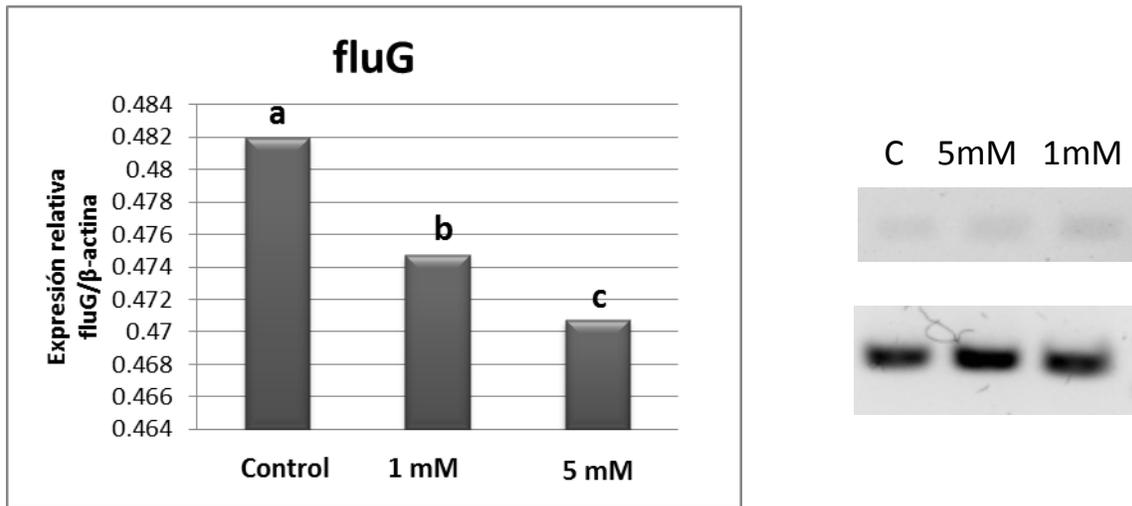
Figura 27. Expresión relativa del gen *flbA* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultivado con ANA a 1 y 5 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.



Las barras representan la media de tres repeticiones, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$).

En estas condiciones se observó la transcripción del gen fluG tanto en el control como en los tratamientos con ANA (1 y 5 mM). Al medir la expresión relativa de este gen, los resultados muestran que la mayor expresión de fluG fue en control sin ANA y dicha expresión disminuye conforme aumenta la concentración del ANA, viéndose más afectada con una concentración de 5 mM (Fig. 28).

Figura 28. Expresión relativa del gen brIA de *F. oxysporum f sp lycopersici* cultivado con ANA a 1 y 5 mM. 6 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 54 hrs de incubación total.

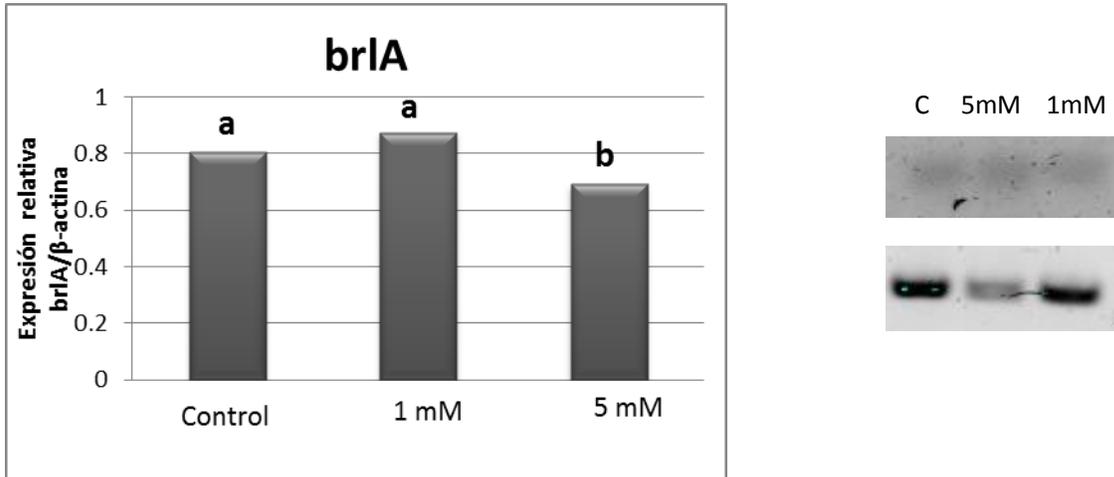


Las barras representan la media de tres repeticiones, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β-actina. Duncan (p=0.05).

5.4b Cultivo de *F. oxysporum f. sp. cubense* pre-incubado 12 hrs y expuesto al ANA 1 y 5 mM durante 24 horas para determinar los niveles de transcripción de los genes flbA, brIA y fluG

Los resultados que se obtuvieron cuando se utiliza *F. oxysporum f. sp. cubense* con las condiciones ya descritas se observó que la expresión del gen brIA en todos los tratamientos. Al medir la expresión relativa de este gen, los resultados muestran que el control presentó altos niveles de transcritos. Los valores más altos de expresión se observaron con ANA 1 mM (Fig. 29). La expresión del gen brIA disminuye con ANA 5 mM. Estos resultados indican que el compuesto no tiene un efecto negativo sobre este gen cuando se utilizan concentraciones de ANA 1 mM.

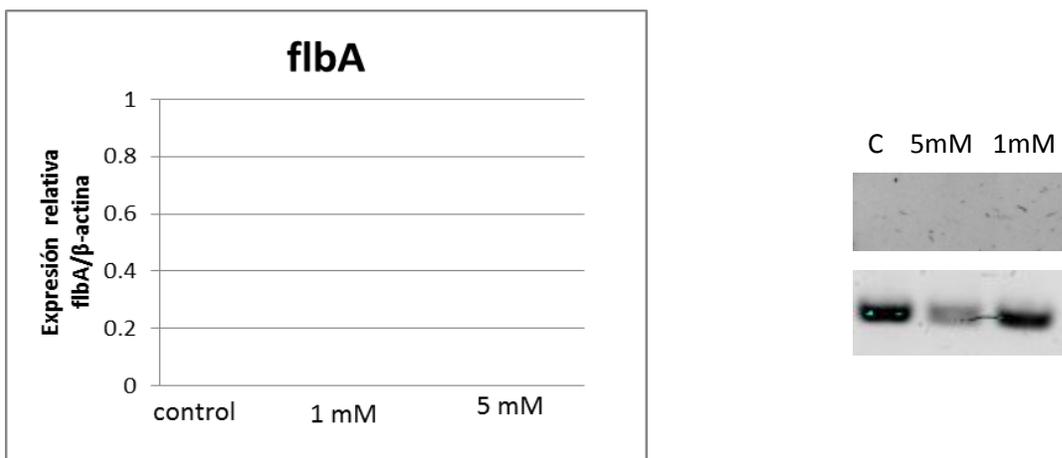
Figura 29. Expresión relativa del gen *brlA* de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* cultivado con las concentraciones 1 y 5 mM de ANA. 12 hrs de pre-incubación y 24 hrs exposición al ANA. 36 hrs de incubación total.



Las barras representan la media de tres repeticiones, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$)

En las condiciones de cultivo no hubo niveles transcritos del gen *flbA* ni en el control ni en los tratamientos con ANA (1 y 5 mM), Fig. 30.

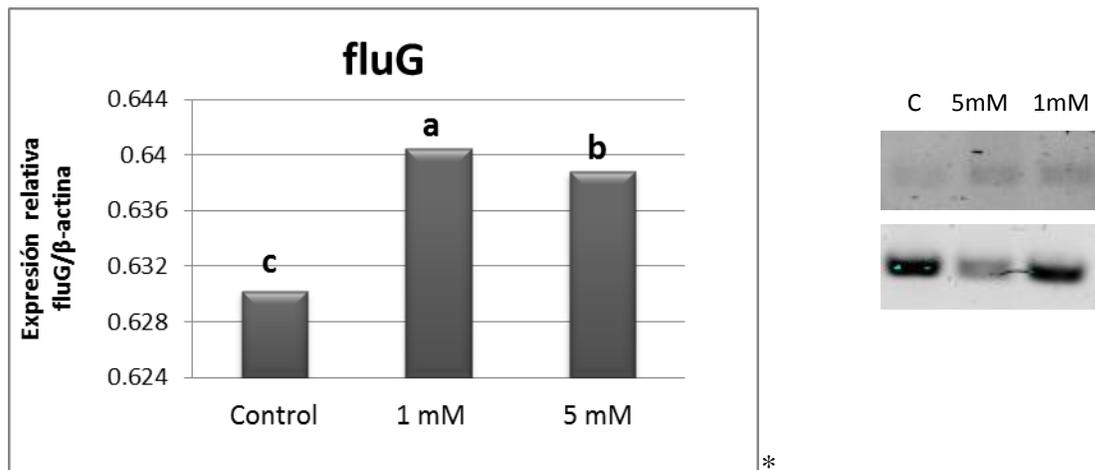
Figura 30. Expresión relativa del gen *flbA* de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* cultivado con las concentraciones 1 y 5 mM de ANA. 12 hrs de pre-incubación y 24 hrs exposición al ANA. 36 hrs de incubación total.



Las barras representan la media de tres repeticiones, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$).

En estas condiciones se observó la transcripción del gen fluG tanto en el control como en los tratamientos con ANA (1 y 5 mM). Al medir la expresión relativa de este gen, los resultados muestran que el control presentó bajos niveles de transcritos, los tratamientos con ANA (1 y 5 mM) presentaron mayor expresión de este gen. Donde la mayor expresión se observó con la concentración de ANA 1 mM (Fig. 31).

Figura 31. Expresión relativa del gen fluG de *F. oxysporum* f. sp. *cubeense* cultivado con ANA a 1 y 5 mM. 12 hrs de pre-incubación y 24 hrs exposición al ANA. 36 hrs de incubación total.



Las barras representan la media de tres repeticiones, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β-actina. Duncan ($p=0.05$)

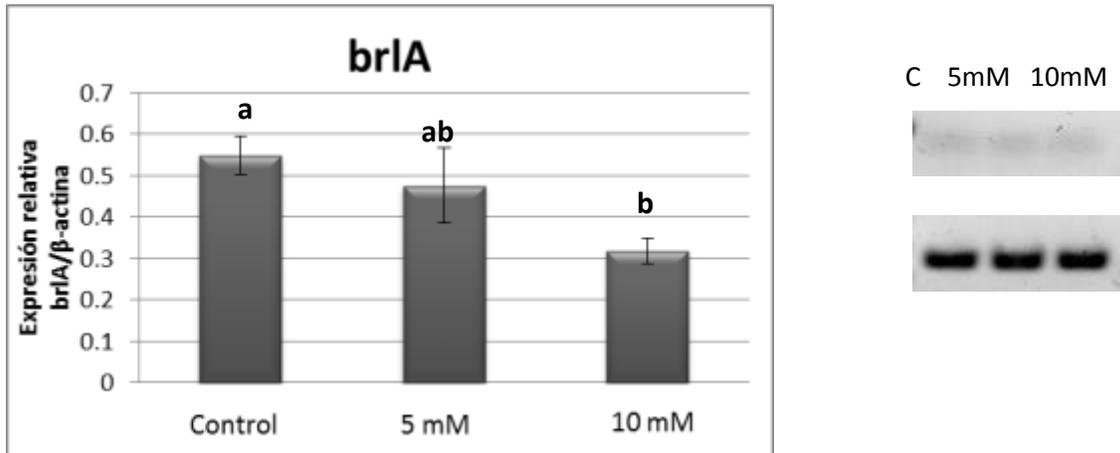
5.5a Cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pre-incubado 12 hrs y expuesto a ANA 5 y 10 mM durante 48 horas para determinar los niveles de transcripción de los genes flbA, brlA y fluG

Con base a los resultados del experimento anterior se cambiaron las condiciones del experimento. Se aumentó la concentración de ANA a 5 y 10 Mm, y el tiempo de exposición del hongo con el compuesto (48 hrs).

En estas condiciones de cultivo el gen brlA se expresó en todos los tratamientos. La mayor expresión se observó en el control (sin ANA), después en el tratamiento con ANA 5 mM y la menor expresión del gen fue en ANA 10 mM (Fig. 32). Los análisis estadísticos muestran que no hay diferencia significativa entre el control y la

concentración de ANA 5mM pero si hay diferencia significativa entre el control y la concentración de ANA 10 mM.

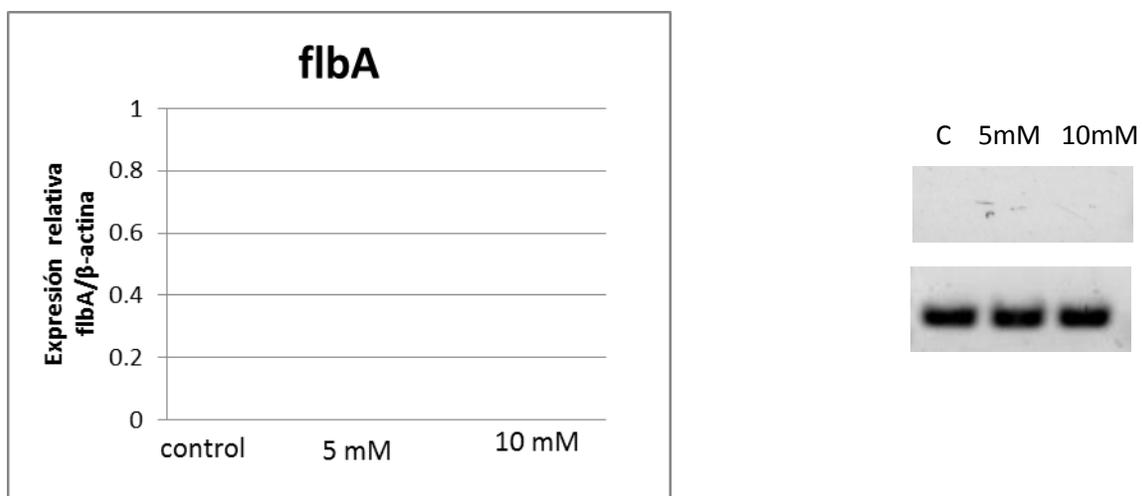
Figura 32. Expresión relativa del gen *brlA* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA (60 hrs de incubación total).



Las barras representan la media de tres experimentos independientes, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$)

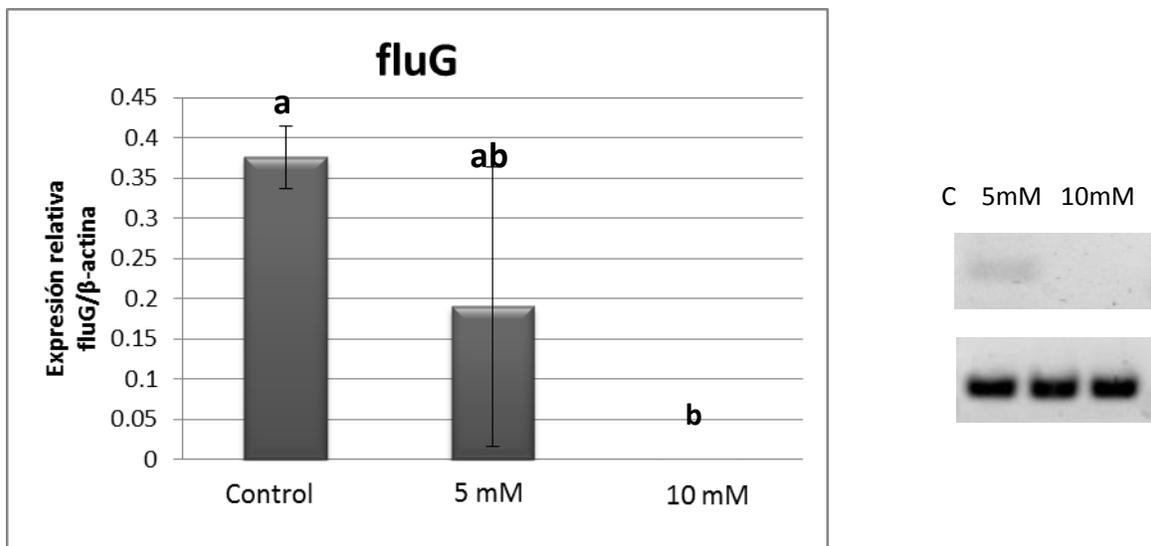
En estas condiciones de incubación la transcripción del gen *flbA* no ocurrió ni en el control ni en los tratamientos con ANA (5 y 10 mM), tal como se observa en la Fig. 33

Figura 33. Expresión relativa del gen *flbA* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 60 hrs de incubación total.



Los transcritos del gen fluG se encontraron, tanto en el control como en los tratamientos con ANA (5 y 10 mM). La mayor expresión relativa de este gen ocurrió en el control (cultivo sin ANA). Esta expresión disminuye cuando el hongo se cultivó con ANA 5 mM, con ANA 10 mM la transcripción se inhibe completamente (Fig. 34). Los análisis estadísticos no muestran diferencia significativa de la transcripción del gen fluG entre el control y ANA 5mM pero si entre transcripción del control y ANA 10 mM.

Figura 34. Expresión relativa del gen fluG de *F. oxysporum f sp cubense* cultivado con ANA a 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 60 hrs de incubación total.

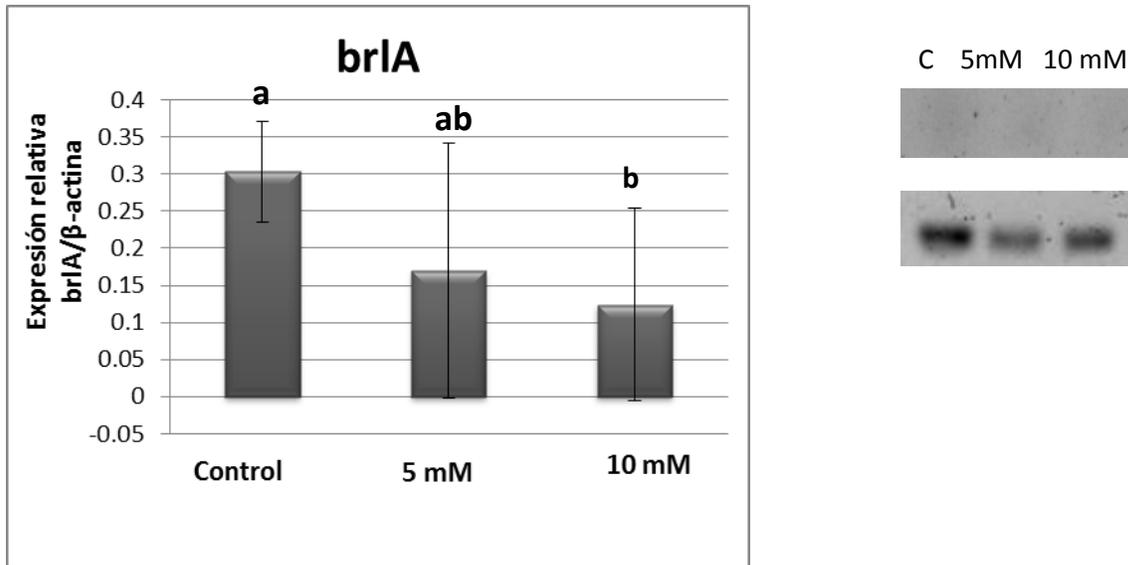


Las barras representan la media de tres experimentos independientes, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$)

5.5b Cultivo de *F. oxysporum f. sp. cubense* pre-incubado 12 hrs y expuesto a ANA 5 y 10 mM durante 48 horas para determinar los niveles de transcripción de los genes flbA, brlA y fluG

La expresión del gen brlA en *F. oxysporum f. sp. cubense* en estas condiciones de incubación ocurrió tanto en el control como en los tratamientos con ANA (5 y 10 mM). La mayor expresión de este gen fue en el control (sin ANA), en el tratamiento con ANA 5 mM la expresión fue menor, y el análisis estadístico no muestra diferencias significativas. En el tratamiento con ANA 10 mM el nivel de expresión fue más bajo que con 5 mM los análisis estadísticos muestran diferencias significativas (Fig. 35).

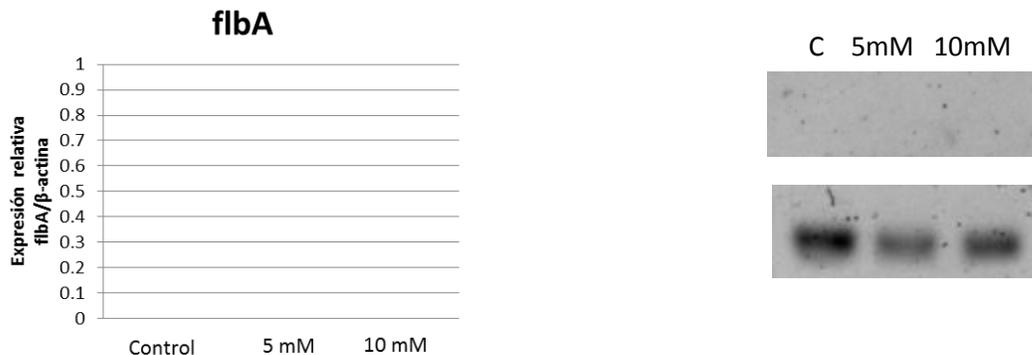
Figura 35. Expresión relativa del gen *brlA* de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* cultivado con ANA 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA (60 hrs de incubación total).



Las barras representan la media de tres experimentos independientes, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$)

En estas condiciones de incubación la transcripción del gen *flbA* no ocurrió ni en el control ni en los tratamientos con ANA (5 y 10 mM), tal como se observa en la Fig. 36.

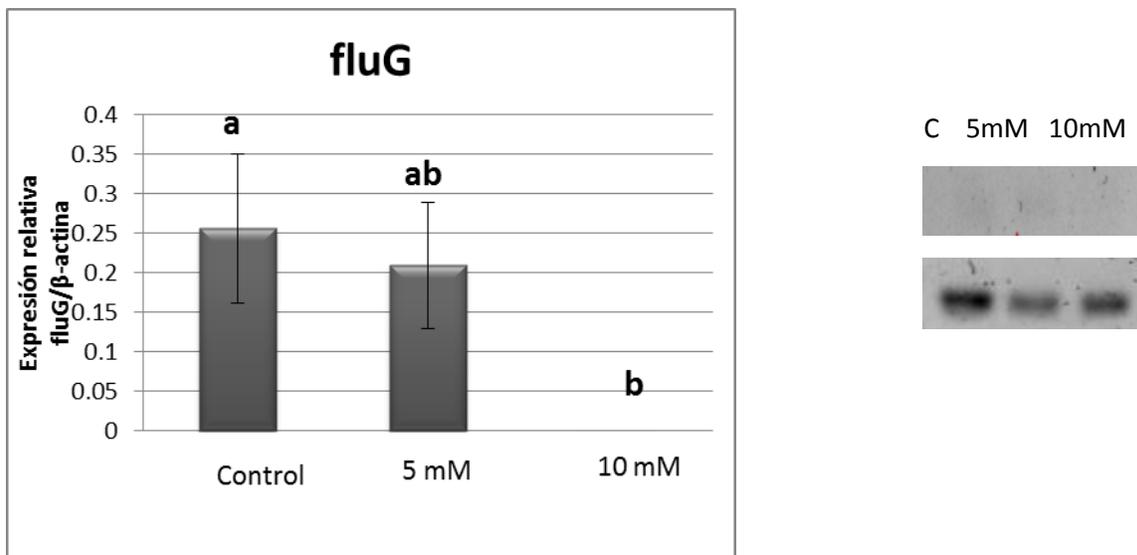
Figura 36. Expresión relativa del gen *flbA* de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* cultivado con ANA 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA. 60 hrs de incubación total.



Las barras representan la media de tres experimentos independientes, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$).

En el caso de la expresión relativa del gen fluG los datos muestran que la mayor expresión ocurrió en el control sin ANA y dicha expresión disminuye cuando se agrega ANA 5 mM, esta expresión se inhibe totalmente cuando el hongo es expuesto a ANA 10 mM (Fig. 37). Los análisis estadísticos muestran que no hay diferencia significativa entre el nivel de transcrito del control y del tratamiento con ANA 5mM, pero si hay diferencia significativa entre el control, ANA 5mM y ANA 10 mM.

Figura 37. Expresión relativa del gen fluG de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* cultivado con ANA 5 y 10 mM. 12 hrs de pre-incubación y 48 hrs exposición al ANA (60 hrs de incubación total).



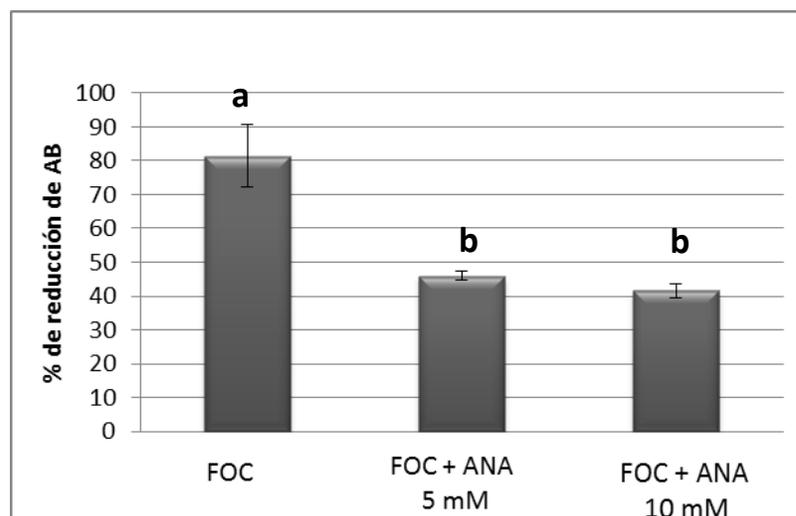
Las barras representan la media de tres experimentos independientes, llevados a cabo con oligonucleótidos específicos y normalizados con β -actina. Duncan ($p=0.05$)

6. Viabilidad de las esporas, de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *ubense* tratadas con ANA, evaluada por medio de una técnica colorimétrica utilizando Alamar Blue

Las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *ubense* fueron incubadas en una placa de Elisa con medio PDB y dos concentraciones de ANA (5 y 10 mM) durante 24 hrs, con su respectivo control (PDB sin ANA). Al término del periodo de incubación a cada tratamiento se les agregó Alamar blue y se midió la absorbancia a 570 y 600 nm.

El porcentaje de reducción del Alamar en *F. oxysporum* f. sp. *ubense* en el control (sin ANA) fue de 81.46%, cuando se emplea ANA 5 mM, el porcentaje fue de 46.01% y la reducción del Alamar fue de 41.55% cuando crece con ANA 10 mM. Estos resultados de los tratamientos con ANA 5 y 10 mM mostraron una diferencia de reducción de 35.45 y 39.91% respectivamente, comparándolos con el control (Fig. 38).

Figura 38. Porcentaje de reducción del Alamar Blue debido al efecto del ANA sobre esporas de *F. oxysporum* f. sp. *ubense* durante 24 horas de exposición al compuesto.

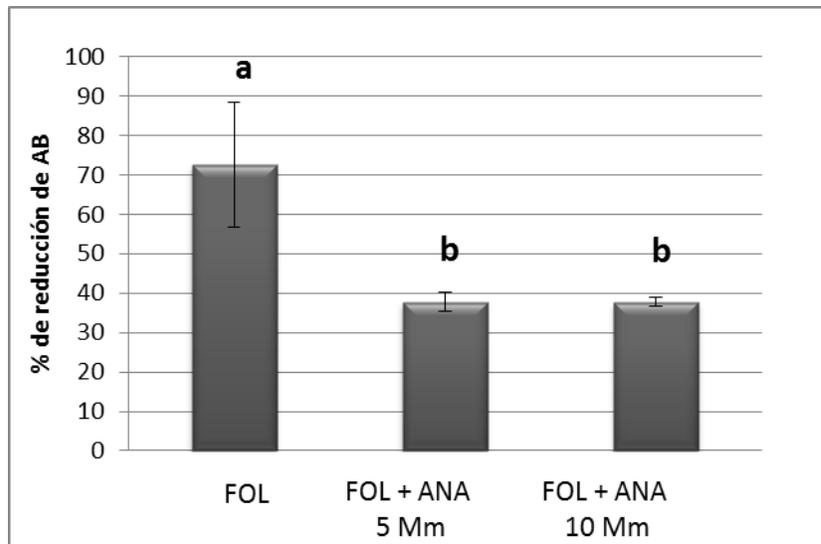


Las barras representan media de 3 repeticiones. Duncan ($p=0.05$)

En el caso de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* el porcentaje de reducción del Alamar en el control (sin ANA) fue de 72.44% y de 37.87% cuando el hongo crece en

ANA 5 y 10 mM. La diferencia de reducción del Alamar fue de 34.66% con respecto al control (Fig. 39).

Figura 39. Porcentaje de reducción de Alamar Blue debido al efecto del ANA sobre esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* durante 24 horas de exposición al compuesto.



Las barras representan media de 3 repeticiones. Duncan ($p=0.05$).

Las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cupense* tratadas con Alamar blue fueron sembradas en cajas de PDA para verificar su viabilidad. Para ello se colocaron 50 μ l de cada uno de los tratamientos en cajas Petri con medio PDA y se dejaron incubar durante 7 días a 28 °C.

Las esporas de ambas formas especiales de *F. oxysporum*, f. sp. *cupense* (Fig. 40) y f. sp. *lycopersici* (Fig. 41) tratadas con ANA 5 y 10 mM no germinaron, ni crecieron en el medio PDA después de 7 días de incubación. En cambio en el control el crecimiento micelial fue abundante tal como se observa en las Fig. 40 a y 41a.

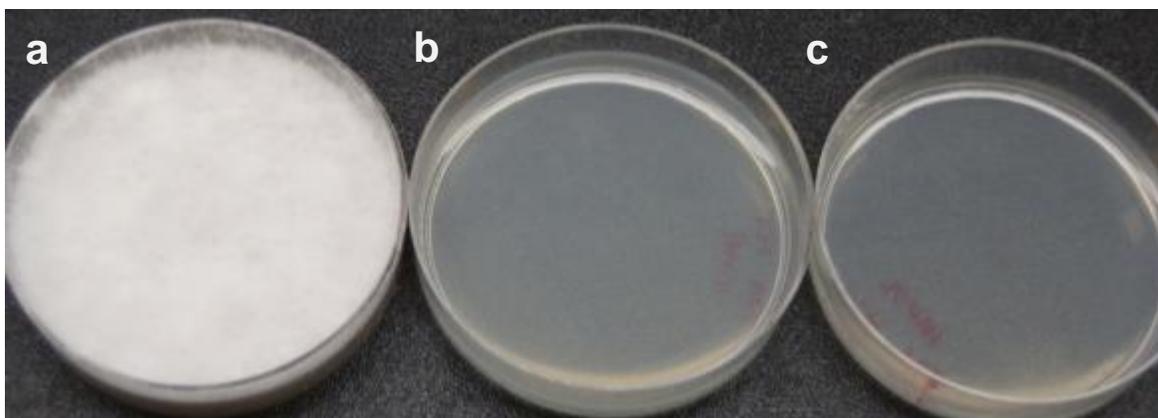


Figura 40. Evaluación de la germinación y crecimiento de las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* tratadas con ANA y cultivado en medio PDA e incubadas 7 días. a) FOC sin ANA; b) FOC + ANA 5 mM y c) FOC + ANA 10 mM.

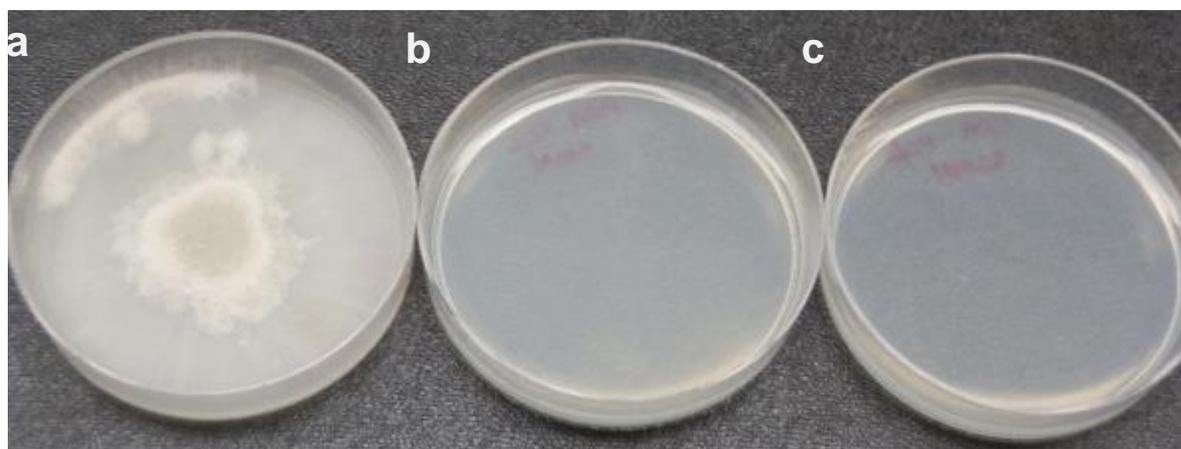


Figura 41. Evaluación de la germinación y crecimiento de las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con ANA y cultivado en medio PDA e incubadas 7 días. a) FOL sin ANA; b) FOL + ANA 5 mM y c) FOL + ANA 10 mM.

7. Viabilidad de las esporas, de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense* tratadas con ANA, evaluada por la técnica de tinción con colorantes fluorescentes de Ioduro de propidio y naranja de acridina

Las esporas de *F. oxysporum* de ambas formas especiales fueron incubadas en PDB (control) y en PDB con ANA (5 y 10 mM) durante 72 hrs. Las esporas así tratadas se tiñeron con Ioduro de propidio y Naranja de acridina como se describe en

materiales y métodos. Las observaciones se realizaron en el microscopio de Fluorescencia.

Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento y por cada repetición se contaron cinco campos, por cada repetición se contaron 300 esporas, dando en total 900 esporas por tratamiento. Las esporas se clasificaron en esporas vivas (color verde) y esporas muertas (color rojo). Las esporas del tratamiento control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* presentaron crecimiento micelial abundante (Fig. 42a), en cambio todas las esporas contadas (Tabla 13) en el tratamiento con ANA 5 y 10 mM estaban muertas (todas de color rojo, Fig. 42 b y c)

Tabla 13. Esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tratadas con ANA y teñidas con Ioduro de propidio - Naranja de acridina.

Concentración de ANA	# de esporas vivas	% de esporas vivas	# de esporas muertas	% de esporas muertas
0	Micelio	100%	-	-
5 mM	0	0%	900	100%
10 Mm	0	0%	900	100%

Tratamiento por triplicado
 Conteo de 5 campos por tratamiento

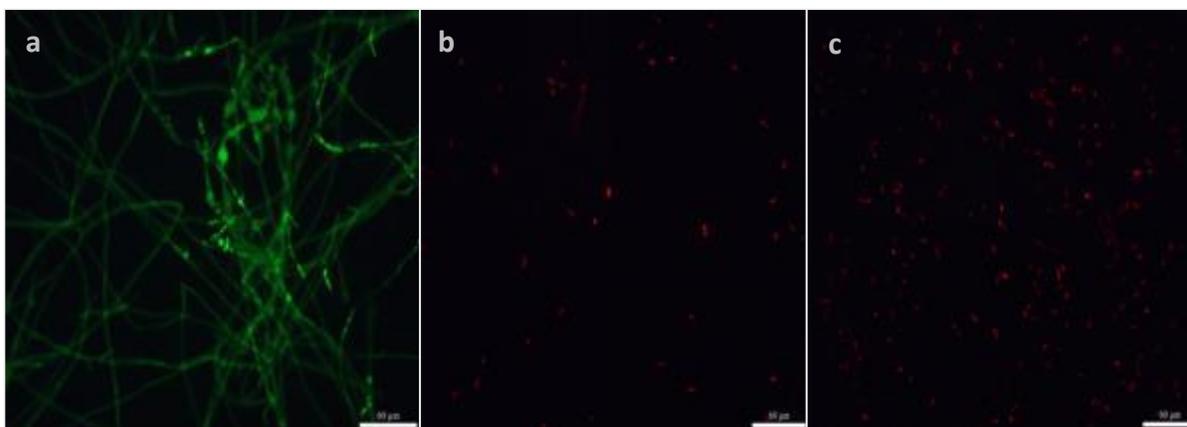


Figura 42. Esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* incubadas con ANA por 72 y tenidas con Ioduro de propidio/Naranja de acridina. a) Esporas sin ANA; b) Esporas con ANA 5 mM y c) Esporas con ANA 10 mM.

Con respecto a los resultados obtenidos con *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en este experimento se observó que el control (esporas en PDB) presentaba crecimiento micelial abundante (Fig. 43 a), en cambio cuando las esporas fueron incubadas con ANA 5 y 10 mM el porcentaje de esporas vivas fue de 14 y 11% respectivamente (Tabla 14). Esto significa un porcentaje de 86 y 89% de esporas muertas. Las observaciones microscópicas corroboran los datos anteriores, ya que se pueden observar algunas esporas vivas (color verde) en ambos tratamientos con ANA (Fig. 43 b y c).

Tabla 14. Esporas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* tratadas con ANA y teñidas con Ioduro de propidio - Naranja de acridina.

Concentración de Ácido Naftalen Acético	# de esporas vivas	% de esporas vivas	# de esporas muertas	% de esporas muertas
0	Micelio	100%	-	-
5 mM	126	14%	774	86%
10 mM	99	11%	801	89%

Tratamiento por triplicado
 Conteo de 5 campos por tratamiento

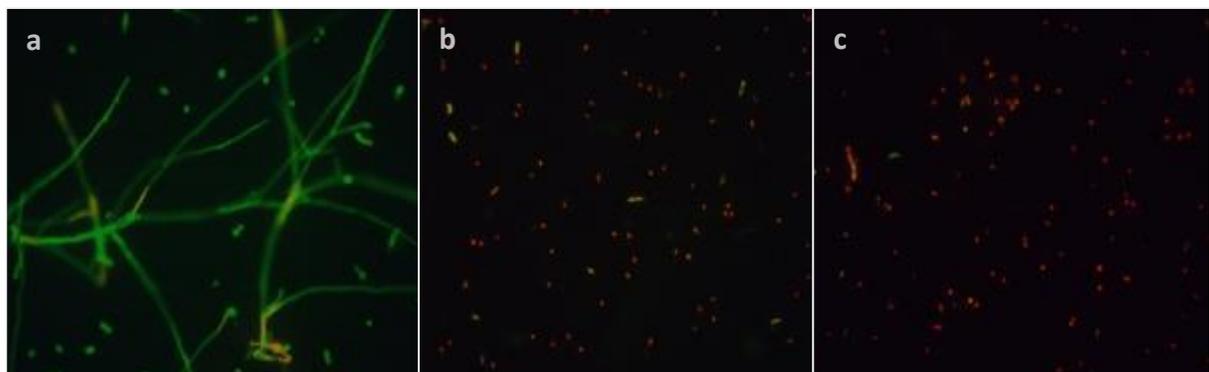


Figura 43. Esporas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* incubadas en PDB sin ANA y con ANA por 72 y teñidas con Ioduro de propidio/Naranja de acridina. a) Esporas sin ANA; b) Esporas con ANA 5 mM y c) Esporas con ANA 10 mM.

V. DISCUSION

1. Incidencia de *Fusarium* en suelo de zonas productoras de plátano

En este trabajo se aislaron 5 especies del genero *Fusarium*, a partir de muestras de suelo, que al ser agrupados en el árbol filogenético ilustran una amplia diversidad genética entre y dentro de los dos grupos de aislados, esto confirma la gran distribución de este género y su capacidad de colonizar suelo tal como lo describen Siti, *et al.*, (2012) y Montiel *et al.*, (2005). Ellos también encontraron una alta diversidad de especies de este género entre y dentro de los grupos, en suelo de cucurbitáceas (*F. solani*, *F. chlamdosporum*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*), y una alta variedad de especies en suelo de raíces de frijol (*F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. oxysporum*, *F. verticilloides*, *F. proliferarum*, *F. sporotrichioides* y *F. solani*).

Interesantemente *F. oxysporum* fue la especie más frecuentemente aislada de suelo de zonas productoras de plátano, aunque no se observaron plantas enfermas. Este hongo normalmente se asocia a la marchitez y amarillamiento (Nelson, 1991). Sin embargo, se ha reportado que algunas cepas de *F. oxysporum* pueden ser no patogénicas (Appel, *et al* 1996; Nel *et al*, 2007), y que algunos aislados son benéficos para las plantas y se han utilizado como cepas antagónicas de su misma especie (Gordon & Okamoto, D., 1992).

En dos de las regiones estudiadas, Michoacán y Tabasco, se logró aislar e identificar *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, este hecho resulta interesante porque esta forma especial es capaz de infectar a las variedades Gros Michel (AAA), Manzano (AAB), Silk (AAB), y Taiwan, Latundan (AAB), variedades que no se siembran en ninguna de las dos regiones estudiadas. Es importante destacar que se ha reportado una gran variabilidad patogénica y genética de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, debido a la presencia de transposones ($\pm 5\%$) y de retrotransposones en su genoma (Daboussi, 1997), esta variabilidad se identifica como razas fisiológicas, debido a su alta especificidad para causar la enfermedad, además de que facilita su capacidad para adaptarse a diferentes ambientes, al grado de que una raza puede convertirse

en otra (Guo, et al, 2014). Por esta capacidad de *F. oxysporum* de generar razas que pueden ser altamente patogénicas es un riesgo potencial que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* esté presente en suelos Mexicanos, ya que podría darse el caso de que hongo evolucionara a razas que afectaran severamente las variedades de plátanos existentes de nuestro país. Cabe resaltar que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* aislado del estado de Michoacán presentó más variación genética y se encuentra muy separado del de grupo de *F. oxysporum*, esto puede deberse a mutaciones generadas debido a las condiciones del suelo del que se aisló.

2. Efecto del ANA utilizando el pato-sistema *Solanum lycopersicum-Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en suelo en el invernadero

En el experimento en invernadero utilizando el patosistema *Solanum lycopersicum-Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, no se observaron síntomas de enfermedad en las plantas de jitomate, consecuentemente se puede decir que las plantas fueron resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ATCC 60095. Probablemente el genotipo empleado, saladet, fue resistente a la cepa utilizada, ya que se ha reportado que existen diferentes genotipos de jitomates resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Cai, et al., 2003; Álvarez, et al., 2007). También existe la posibilidad de que la cepa del hongo no fue patógena sobre jitomate porque la actividad de la microbiota antagonista natural presente en el suelo no estéril, pudo haber inhibido el número de propágulos y el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Otra posibilidad a considerar es la forma de inoculación del patógeno a las plantas, ya que el hongo fue inoculado cerca de la raíz al mismo tiempo que el ANA. En contraste, en trabajos realizados por otros autores donde infectan semillas directamente con el inóculo del patógeno o sumergen la raíz de la planta en el inóculo el patógeno es más efectivo causando la enfermedad (Sánchez et al, 1975). Vale la pena hacer notar que las plantas con el patógeno y con ANA presentaron un mejor aspecto, que las de los otros tratamientos, esto puede deberse a que el ANA afecto negativamente a *Fusarium* y positivamente a las plantas, este efecto se observó en el aumento del grosor del tallo. Se sabe que este compuesto, que es un regulador de crecimiento, y

se aplica periódicamente contribuye a que las plantas tengan un tallo más grueso desarrollo (Uddain, *et al.*, 2009).

Por lo tanto con este diseño experimental no fue posible calificar la actividad del ANA como fungicida. Los resultados contrastan con los reportes de ANA como fungicida foliar para *Sclerotinia sclerotiorum* en frijol y pepino (Al-Masri & Barakat, 2003).

3. Efecto del ANA sobre la población de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) inoculado en suelo de Michoacán contenido en recipientes en invernadero sin indicadores indirectos

La concentración 10 mM de ANA adicionada a suelo no estéril, de parcelas bananeras de Michoacán, disminuyó el número de UFC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Esta actividad es interesante porque es la primera vez que se identifica que una hormona vegetal pueda tener actividad inhibitoria al introducirse al suelo de cultivo. Este resultado contrasta con otros reportes donde el efecto de ANA y otras hormonas de crecimiento, sobre hongos fitopatógenos se han evaluado foliarmente (Michniewiez & Rozej, 1988; Shaul *et al.*, 1995, Al-Masri *et al.*, 2002; Al-Masri & Barakat, 2003; Bhajbhujje, 2015). Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir que el ANA podría aplicarse directamente al suelo antes y después de la siembra de algunos cultivos para disminuir la densidad del inoculo, y consecuentemente disminuir la incidencia de la enfermedad.

4. Efecto del Ácido Naftalen Acético en esporas de *F. oxysporum* *in vitro*.

4.1 Efecto de la concentración mínima inhibitoria de ANA sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

El ANA inhibe la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100 mM). Resultados similares encontró Bhajbhujje, (2015) quien observó inhibición de la germinación de esporas de *Alternaria*

solani empleando diferentes concentraciones de ANA (0.1 mM a 10 mM), el mayor porcentaje de inhibición (84%) ocurrió cuando empleó una concentración de 10 mM, sin embargo cuando emplearon las concentraciones del ANA de 0.1 mM y 1 mM la reducción de la germinación de esporas fue de 6% y 35% respectivamente. La inhibición de la germinación puede deberse a que el ANA inhibe la transcripción de genes reguladores de crecimiento y esporulación *fluG* y *brlA*.

4.2 Efecto de la concentración mínima inhibitoria de ANA sobre el crecimiento de *F. oxysporum* *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

La concentración mínima inhibitoria de ANA, que afecta negativamente el crecimiento de *F. oxysporum* hasta en un 98.7%, es de 5mM. Resultados similares se obtuvieron en *Sclerotinia sclerotiorum* (Al-Masri, et al, 2002), la reducción de la velocidad de crecimiento fue de 50% cuando se utilizó una concentración de 5mM de ANA. Este efecto negativo en el crecimiento micelial de ANA ocurre cuando se adiciona a cultivos de *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus parasiticus*. El compuesto en una concentración de 0.5 mM disminuyó también la esporulación de ambos hongos. (Bucio Villalobos, et al. 2005). El efecto inhibitorio aumenta conforme aumenta la concentración de ANA en todos los hongos estudiados, esto podría ayudar a usar una concentración que afecte a más de un hongo fitopatógeno.

4.3 Efecto del ANA sobre la transcripción de los genes reguladores del crecimiento *flbA* y *fluG* y de esporulación *brlA* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense*.

La transcripción de *fluG* en *F. oxysporum* f. sp. *cubense* se inhibe en ausencia y con 5 y 10 mM de ANA, cuando este se adiciona a las 6 hrs de crecimiento y se expone solo 3 horas al compuesto. El gen *fluG* está presente durante todo el ciclo de vida en el modelo fúngico *Aspergillus nidulans*, se ha reportado que *fluG* es necesario para el desarrollo del hongo y la expresión apropiada de *brlA* durante la esporulación (Lee & Adams, 1995). La falta de transcritos de *fluG* en los tratamientos con ANA es indicativo de que los procesos de desarrollo y esporulación quedaron bloqueados en etapas tempranas de desarrollo. En el caso de *brlA* la ausencia de transcrito, se debe

a que este gen se expresa en estadios de desarrollo tardíos, es decir, cuando el hongo va a esporular y además necesita recibir la respuesta de actividad de fluG (Adams & Yu, 1996). Cuando el ANA se adicionó a las 6 horas y se expone a 48 horas, los niveles de transcritos son mayores que los observados con una exposición de 3 horas. Esto indica que el hongo siguió creciendo y que el proceso de crecimiento no se bloqueó.

En contraste, los transcritos de fluG y brlA se incrementan cuando el hongo es expuesto a 1 mM de ANA cuando es aplicado en un estadio tardío de crecimiento del hongo (12 hrs) y con una exposición de 24 hrs. Esta acción estimulante del ANA en la transcripción de fluG y brlA, podría significar una estimulación en la esporulación. Nuestros resultados son congruentes con lo reportado por Khan, *et al.*, (2012) quien indica que bajas concentraciones de ANA (2×10^{-4} mM) estimulan la germinación de esporas de *Beauveria bassiana* y *Metrhazium anisopliae*, obteniendo más de 95.8% de germinación. Los autores también determinaron un aumento en el crecimiento vegetativo. Consecuentemente 1mM de ANA no sería una concentración recomendable de utilizar como posible medida de control.

En el caso de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, no se detectó transcrito de fluG cuando ANA se adiciona en una etapa de crecimiento de 6 hrs y se expone 3 hrs al compuesto. Este resultado es diferente al observado en *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, esto puede deberse a que *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se encontraba en un estado de desarrollo más temprano que *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, debido a que el primero crece más lentamente que el segundo. Así que cuando se adicionó ANA a las 6 hrs, se inhibieron todos los procesos que estaban ocurriendo en las germinulas, inhibiendo así la transcripción de fluG.

En este estudio se ha establecido que ANA inhibe la de los genes brlA y fluG de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, cuando se adiciona a las 6 y 12 hrs de crecimiento y expuesto al compuesto durante diferentes tiempos (24 y 48 hrs). Un efecto similar observó Bucio Villalobos *et al* (2002) sobre la transcripción del gen flbA en *A. parasiticus* y *A. nidulans* con ANA 50 mM.

Llama la atención que flbA no se expresó en *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ni en f. sp. *lycopersici*, en ninguna de las condiciones que se emplearon, por lo podemos suponer que en estos tiempos los niveles de expresión de flbA no son detectables o posiblemente el tiempo de expresión es posterior a 60 hrs de incubación. Vale la pena mencionar que los oligos para flbA fueron diseñados de acuerdo al protocolo descrito, sin embargo, no se encontró transcrito. Interesantemente existen datos de hongos en los cuales se detectan genes del grupo flbs (flbB, flbC, flbD y flbE), pero no flbA (Yu, J. H, 2010). En este hongo *Aspergillus fumigatus* no se incluye la actividad de flbA como gen esencial para la esporulación. Esta información abre la posibilidad de que flbA no esté presente en forma activa en *Fusarium* y que sean otros genes del grupo flbs los que activan la esporulación. (Yu, J. H, 2010)

5. Viabilidad de las esporas, de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y f. sp. *cubense* tratadas con ANA, evaluada por la técnica de tinción con colorantes fluorescentes de Ioduro de propidio y naranja de acridina

Para determinar la viabilidad celular existen varios tipos colorantes fluorescentes los cuales son indicadores confiables para diferenciar células vivas de células muertas, i. e. el Ioduro de propidio y naranja de acridina (Bank, 1988). El naranja de acridina es una base débil que penetra fácilmente a las células vivas, y tiñe de verde aquellas en fase de división activa, funciona como un colorante de inclusión (Hassan, 2002; Schichnes, et al., 2006). En cambio el Ioduro funciona como un colorante de exclusión, que no puede penetrar a las células vivas pero entra fácilmente en las células muertas o moribundas (Eilam, 1992). Una vez que este colorante penetra, a través de la membrana de la célula, se une a los ácidos nucleicos y hace que emita una fluorescencia de color rojo brillante (Kenneth & James 1985). Este tipo de tinción confirmó que todas las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* expuesta a ANA (5 y 10 mM) estaban muertas a las 72 hrs. En el caso de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* se confirmó que solo el 90% de las esporas estaban muertas. Es muy probable que la disminución de la densidad del inoculo esté relacionada con el efecto fungicida del ANA sobre las esporas de *Fusarium*.

VI. CONCLUSIONES

- *Fusarium oxysporum* fue la especie prevalente, con una representatividad del 47 % del total de los aislados.
- En el árbol filogenético obtenido se presentan dos distintos clusters, la mayoría de las ramas se agrupa dependiendo de la región geográfica, excepto por *F. brachygibbosum*, *F. phaseoli*, *F. solani* y *F. equiseti*. El aislado *F. oxysporum* f. sp. *cubense* de Michoacán presenta mayor diversidad genética y se agrupa en diferente rama.
- Los dos aislados de suelo de Tabasco se agrupan muy cerca de los aislados de suelo de Chiapas. esto puede deberse a que estas especies tienen un mismo ancestro de origen ya que son lugares cercanos y conservan similitudes en sus secuencias
- *F. oxysporum* f. sp. *cubense* se aisló de suelo de Tabasco y Michoacán.
- *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ATCC 60095 no fue patógena para la variedad de jitomate utilizada en este trabajo. Por lo tanto, no fue posible evaluar la capacidad fungicida del ANA en el pato-sistema utilizado.
- La concentración 10mM de ANA disminuye el número de Unidades Formadoras de Colonias de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* cuando se adiciona a suelo. El efecto es mayor conforme aumenta el tiempo de exposición (30 días).
- *Fusarium oxysporum* es susceptible al ANA en concentraciones bajas como 5 mM. El crecimiento micelial se redujo en 99.83% y la germinación de esporas se inhibió en un 100%.

- La expresión de los genes *brlA* y *fluG* se ve afectada negativamente por ANA.
- *F. oxysporum* f. sp. *cubense* requiere mayores concentraciones de ANA para disminuir la transcripción de los genes *brlA* y *fluG* en comparación con las bajas concentraciones que afectan la transcripción de los genes en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- ANA puede ser utilizado como un fungicida efectivo para controlar *F. oxysporum*.

VII. PERSPECTIVAS.

1. Determinar la acción residual del efecto inhibitorio del ANA en suelo.
2. Determinar el efecto de ANA sobre la transcripción de los genes flbs (flbB, flbC, flbD y flbE) que están involucrados en etapas de desarrollo y que son importantes para activar al gen maestro de esporulación brlA.
3. Determinar la actividad del ANA sobre la germinación de las micro y macroconidias, crecimiento micelial y sobrevivencia de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* raza tropical 4 (FOC-TR4) *in vitro*. Así como su efecto en la transcripción de los genes fluG, flbA y brlA.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Adams T. H., Yu J. H. and Wieser J. (1996). The *Aspergillus* FibA RGS Domain Protein Antagonizes G Protein Signaling to Block Proliferation and Allow Development. *The EMBO Journal*, **15**, 5154-5190.
- Adams T. H., Yu J. H. and Wieser J. (1998). Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 35-54.
- Al-Masri M. I., Al-Shtayeh M. S., Elad Y., Sharon A., Tudzynski P. and Barakat R. (2002). Effect of Plant Growth Regulators on White Mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) on Bean and Cucumber. *Phytopathology*, **150**, 481-487.
- Al-Masri M. I. and Barakat R. (2003). Role of the Auxin, Naphtalene Acetic Acid (NAA) in the Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*, Causative Organism of white mold disease. *Hebron University Research Journal*, **1**, 4-15.
- Álvarez A. A., López-Benítez A., Borrego Escalante F., Rodríguez-Herrera S. A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz F., y Gámez-Vázquez A. J. (2007). Marchitez Vascular del Tomate: II. Herencia de la Resistencia a la Raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Tres Especies del Género *Lycopersicon*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **26**, 180-183.
- Appel D. J. and Gordon, T. R. (1994). Local and regional variation in populations of *Fusarium oxysporum* from agricultural field soils. *Phytopathology*, **84**, 786- 791.
- Baayen R.P., O'Donnell K., Bonants P.J.M., Cigelnik, E., Kroon L.P.N.M., Roebroek J.A. and Waalwijk, C., (2000). Gene Genealogies and AFLP Analysis in the *Fusarium oxysporum* Complex Identify Monophyletic and Non-

monophyletic formae speciales Causing Wilt and Rot Disease. *Phytopathology*, **90**, 891-900.

- Bank Harvey L. (1988). Rapid Assessment of Islet Viability with Acridine Orange and Propidium Iodide. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, **24**, 266-271.
- Barnett H. L., and Hunter B. B. (1998). Illustrated Genera Of Imperfect Fungi. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota. 218 p.
- Bhajbhujje MN, (2015). In vitro Fungitoxic Effect of Some Plant Growth Regulators on Spore Germination and Germ Tube Emergence of *Alternaria solani*. *International Journal of Life Sciences*, **3**, 125-130.
- Bucio Villalobos, C. M. (2002). Efecto de los Reguladores de Crecimiento y otros Compuestos del Maíz sobre el Crecimiento, la Diferenciación y la Síntesis de Micotoxinas. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencia, especialidad en Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Bucio-Villalobos, C. M., Luna-Olvera, H. A., Anguiano-Ruvalcaba, G. L., & Guzmán-de-Peña, D. A. (2005). Effect of Plant Growth regulators on mycotoxigenic *Aspergillus spp.* in vitro. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **23**, 68-73.
- Cai G., Rosewich Gale L., Schneider R. W., Kistler H. C., Davis R. M., Elias K. S., and Miyao E. M. (2003). Origin of Race 3 of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* Single Site in California. *Phytopathology*, **93**, 1014–1022.
- Correll James C. (1991). The Relationship Between Formae Speciales, Races and Vegetative Compatibility Groups in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **81**, 1061-1064.

- Daboussi M. J. and Langin T. (1994). Transposable Elements in the Fungal Plant *Fusarium oxysporum*. *Genetica Journal*, **93**, 49-59.
- Daboussi, M. J. (1997). Fungal Tranposable Elements and Genome Evolution. *Genetica*, **100**, 253-260.
- Dag A., Bustan A., Avni A., Lavee S. and Riov Joseph. (2009). Fruit Thinning Using NAA Shows Potential for Reducing Biennial Bearing of 'Barnea' and 'Picual' Oil Olive Trees. *Crops & Pasture Science*, **60**, 1124-1130.
- Darken M. A., Jensen A. L. and Shu P. (1959). Production of Gibberellic Acid by Fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **7**, 301-303.
- Dean R., Van Kan J. A. L., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D., Rudd J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. and Foster G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, **13**, 414–430.
- Eilam T., Bushnell W.R., Anikster Y. and McLaughlin. (1992). Nuclear DNA Content of Basidiospores of Selected Rust Fungi as Estimated From Fluorescence of Propidium Iodide-Stained Nuclei. *Phytopathology*, **82**, 705-712.
- Elshafie H. S., Camele I., Racioppi R., Scrano L., Iacobellis N. S. and Bufo S. A. (2012). In vitro Antifungal Activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against Some Phytopathogenic Fungi, *International Journal of Melecular Sciences*, **13**, 16291-16302.
- Garibaldi A., Gullino M. L. and Lento G. (1986). Sensitivity to Benomyl of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* isolated in Ital over 17 years, *Revista de ortoflorofruticoltura italiana*, **70**, 139-144.
- Gasch A. P., Spellman P. T., Kao, C. M., Carmel H., Eisen M. B., Storz G., Botstein, D. and Brown P. O. (2000). Genomic Expression Programs in the

Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 4241-4257.

- Gordon, T. R. and Okamoto D. (1992). Population Structure and the Relationship Between Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **82**, 73-77.
- Gowri M., Ananthalskshmi S. and Punitha J. T. (2013). *In vitro* Antimicrobial Screening of Naphthalene Acetic Acid Compounds. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. **4**, 2780-2784.
- Guo L, Han L, Yang L, Zeng H, Fan D, et al. (2014) Genome and Transcriptome Analysis of the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Causing Banana Vascular Wilt Disease. *PLoS ONE*, **9**, e95543.
- Gurjar G., Barve M., Giri A. and Gupta V. (2009). Identification of Indian Pathogenic Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with Gene Specific, ITS and random markers. *Mycologia*, **101**, 484-495.
- Hassan M., Corkidi G., Galindo E., Flores C. and Serrano-Carreón L. (2002). Accurate and Rapid Viability Assessment of *Trichoderma harzianum* Using Fluorescence-Based Digital Image Analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **80**, 677-684.
- Hwang S. H. and Ko W. H. (2004). Cavendish Banana Cultivars Resistant to *Fusarium* Wilt Acquired through Somaclonal Variation in Taiwan. *Plant Disease*, **88**, 580-588.
- Infante D., Martínez B., González N. and Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, **24**, 14-21.

- Jones J. P., Stall R. E. and Zitter T.A. (1997). Compendium of tomato diseases. St. Paul, American phytopathological Society. 100 p.
- Kenneth H. J, and James A. S. (1985). An Improved to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **33**, 77-79.
- Khan S., Bagwan, N. B., Fatima S. and Iqbal M. A. (2012). In vitro Compatibility of Two Entomopathogenic Fungi with Selected Insecticides Fungicides and Plant Growth Regulators. *Libyan Agriculture Research Center Journal International*, **3**, 36-41.
- Kistler, H. C. (1997). Genetic Diversity in the Plant-Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **87**, 474-479.
- Lee B.N. and Adams T. H. (1995). fluG and flbA function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through brlA β activation. *The EMBO Journal*, **15**, 299-309.
- Lee M. W., Alam S., Han K. D., Lee J. M., Hurt H., Shim J. O., Chang K. C. and Lee T. S. (2003). In vitro Effects of Plant Extracts and Phytohormones on Mycelial Growth of Anthracnose Fungi. *Mycobiology*, **32**, 134-138.
- Lievens B., Rep M. and Thomma BP. (2008). Recent Developments in the Molecular Discrimination of Formae Speciales of *Fusarium oxysporum*. *Pest Management Science*, **64**, 781-788.
- Li-Jun Ma, *et al.* (2010), Comparative Genomics Reveals Mobile Pathogenicity Chromosomes in *Fusarium*. *Nature*, **464**, 367-373.

- Looney N. E. and McKellar E. (1994). Thinning Spartan Apples with Carbaryl and Naphthaleneacetic Acid: Influence of Spray Volume and Combinations of Chemicals. *Canadian Journal of Plant Science*, **64**, 161-166.

- Luo G and Mitchell TG. (2002). Rapid Identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**, 2860-2865.

- Minz S., Samuel C. O. and Tripathi S. C. (2012). The Effect of Plant Extracts on the Growth of Wilt Causing Fungi *Fusarium oxysporum*. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **4**, 13-16.

- Michniewicz M. and Rozej B. (1988). Is the Gibberellin Limiting Factor for the Growth and Development of *Fusarium culmorum*?. *Acta Physiologiae Plantarum* **10**, 227-236.

Morris S. C. and Nicholls P. J. (1978). An Evaluation of Optical Density to Estimate Fungal Spore Concentration in Water Suspensions. *Phytopathology*, **68**, 1240-1241,

- Nash Smith, S. (2007). An Overview of Ecological and Habitat Aspects in the Genus *Fusarium* with Special Emphasis on the Soil-Born Pathogenic Forms. *Plant Pathology Bulletin*, **16**, 97-120.

- Nel B., Steinberg C., Labuschagne N., Viljoen A. (2006). The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. *Plant Pathology*, **55**, 217-223.

- Nel B., Steinberg C. and Viljoen A. (2007). Evaluation of Fungicides and Sterilants for Potential Application in the Management of *Fusarium* Wilt of Banana. *Crop Protection*, **26**, 697-705.

- Nelson P. E., Toussoun, T. A., and Marasas W.F.O. (1983). *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. USA. 185 p.
- Nelson, P. E. (1991). History of *Fusarium* Systematics. *Phytopathology*. **81**, 1045-1048.
- OIRSA. (2009). www.oirsa.org. Marzo 2014.
- Perez Vicente L. (2014). Technical Manual Prevention and Diagnostic of *Fusarium* Wilt (Panama disease) of Banana Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* Tropical Race 4 (TR4). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 1-66.
- Ploetz R. C. and Correll J. C. (1988). Vegetative Compatibility Among Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Plant Disease*, **72**, 325-328.
- Sanchez L. E., Endo R. M., and Leary J. V. (1975). A Rapid Technique for Identifying the Clones of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Causing Crown and Root rot of Tomato. *Phytopathology*, **65**, 726-727.
- Schichnes D., Nemson, J. A. and Ruzin S. E. (2006). Fluorescent Staining Method for Bacterial Endospores. *Microscope*, **54**, 91-93.
- Shaul O., Elad, Y., and Zieslin N. (1995). Suppression of Botrytis Blight Disease of Rose Flowers with Gibberellic Acid: Effect of Concentration and Mode of Application. *Postharvest Biology and Technology*, **6**, 321-330.
- Stangarlin J. R., Kuhn O. J., Assi L. and Schwan-Estrada R. F. (2011). Control of Plant Disease Using Extracts from Medicinal Plants and Fungi. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 1033-1042.

- Siti Nordahliawate M. S., Nur Aim M. Z., Nur A. A. and Salleh B. (2012). Diversity of *Fusarium* species Isolated from Soil Cultivated with Cucurbits within East Coast, Peninsular Malaysia. *Pertanika Journal. Tropical. Agriculture. Science*. **35**, 381-386.
- Szczechura W., Staniaszek M. and Habdas H. (2013). *Fusarium oxysporum* f sp *radices lycopersici* the cause of *Fusarium*, Crown and Root Rot in Tomato Cultivation. *Journal of Plant Protection Research*, **53**, 172-176.
- Talla S. G., Raju, A. S. R., Karri S. and Kumar Y. S. (2015). Production and antagonistic effect of *Trichoderma* spp. on Pathogenic Microorganisms (*Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*). *African Journal of Biotechnology*, **14**, 668-675.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. G. (1997). The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4877-4882.
- Uddain, J., Akhter H., K.M., Mostafa, M.G. and Rahman M. J. (2009). Effect of Different Plant Growth Regulators on Growth and Yield of Tomato. *International Journal of Sustainable Agriculture*, **3**, 58-63.
- Verma M., Brar S. K., Tyagi R.D. Surampalli R. Y. and Valero J. R. (2007). Antagonistic Fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, **37**, 1-20.
- Yu, Jae-Hyuk, (2010). Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, **38**, 229-237.
- Yuan Jun, Raza W., Shen Q. and Huang Q. (2012). Antifungal Activity Of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium*

oxysporum f. sp. *cupense*. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 5942-5944.

- Wang H., Xiao M., Kong F., Chen S., Dou H.T., Sorrell T., Li R. Y. and Xu Y. C. (2009). Accurate and Practical Identification of 20 *Fusarium* Species by Seven-Locus Sequence Analysis and Reverse Line Blot Hybridization and an In Vitro Antifungal Susceptibility Study. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 1890-1898.
- Zhou X. G., Everts K. L. and Bruton B. D. (2010). Race 3, a New and Highly Virulent Race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* Causing Fusarium Wilt in Watermelon. *Plant Disease*, **94**, 92-98.