



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO
VEGETAL DE *Fusarium* spp AISLADOS DE LA RIZOSFERA
DE *Zea mays* L.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO en BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

Biol. CANDELARIO RODRÍGUEZ SERRANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

CO-DIRECTOR DE TESIS: DRA. SILVIA SALAS MUÑOZ

CUERNAVACA, MORELOS. NOVIEMBRE, 2019

Agradecimientos institucionales

Con mucho esfuerzo y dedicación he logrado culminar una meta académica importante en mi vida. Es así como agradezco a las instituciones que contribuyeron durante mi formación como Maestro en Biotecnología. Debo un especial agradecimiento a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos a través del Centro de Investigación en Biotecnología y en colaboración con el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas por permitirme desarrollar mis estudios de la maestría en Biotecnología.

De igual manera agradezco al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el trayecto de la maestría, así como también por la beca de movilidad (Beca Mixta) para mi estancia en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales agrícolas y Pecuarias (INIFAP) campo experimental Zacatecas.

Por último y no menos importante quiero agradecer enormemente al Laboratorio de Biología Molecular y Sanidad Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) campo experimental Zacatecas, por abrirme sus puertas para poder realizar mi proyecto de maestría, además de proporcionarme los medios materiales para la realización de este estudio a través del Proyecto Fiscal: Evaluación de cepas de *Fusarium* spp como coadyuvante de producción para cultivos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.). Proyecto: 1-1.6-13171134806-A-M.2-1.

Agradecimientos personales

Nuestro camino o paso por la universidad, no es simplemente una etapa académica, es el momento mismo en el que tomamos la decisión de moldearnos para adquirir el conocimiento que definirá el curso de nuestra vida. Detrás de culminar esta obra académica, muchos capítulos fueron marcados con enseñanzas entre libros y clases, otras con matraces y cajas de Petri y desde luego no podrían faltar los capítulos del fracaso y la derrota siendo yo el personaje central en cada uno de ellos.

Es verdad que con esfuerzo, dedicación y constancia se pueden alcanzar grandes logros en la vida, pero, nada es equiparable con el amor incondicional que he recibido de mi familia y que ha sido la pieza más importante de mi carrera. Muchas gracias queridos padres por ser mi baluarte y mis testigos más fieles del arduo camino que he emprendido para conquistar mis sueños. Papá, mamá, estoy totalmente agradecido por estar a mi lado en las múltiples ocasiones en las que la vida me ha golpeado hasta desfallecer. Por eso, es preciso decir que todo lo que he conseguido hasta hoy se los debo a ustedes, pues con su apoyo he podido superar las circunstancias que la vida me ha presentado. A mis hermanos y a mi prima Alejandra, aunque a veces tengamos nuestras diferencias le debo esos empujones de aliento y admiración hacia mi persona.

No puedo dejar de lado y agradecer enormemente a mi abuelo Humberto, el guerrero más fuerte que he conocido, nunca borraré de mi mente el momento de tu partida, cada palabra y tu último suspiro quedaron grabados en mi corazón donde morará por siempre el recuerdo de lo grande que fue tu amor. Aunque físicamente ya no puedo decirte estas palabras, siempre te estaré eternamente agradecido por la calidez de tus abrazos y el pilar que siempre fuiste en mi andar. Con profundo dolor hoy te recuerdo con cada cristal que brota de mis ojos y aunque ya no pueda compartir contigo la alegría de culminar esta obra académica, te la envío en un abrazo lleno de amor hasta el cielo.

Los inconvenientes que se presentaron durante mi formación como maestro solo fueron situaciones que mejoraron mi aprendizaje, aunque en su momento me desalentaron a continuar y a dejarlo todo, y que sin duda formaron parte de múltiples escenas, situaciones y momentos no deseados, pero que finalmente solo me condujeron a mejores oportunidades y a darme cuenta que lo necesario fue el haber vivido cada una de esas experiencias que me hicieron valorar muchos aspectos personales y académicos.

Debo un especial y sincero agradecimiento a mis tutores académicos por el apoyo brindado y la paciencia con la que embarcaron junto a mí para hacer realidad este proyecto, especialmente a la Dra. Silvia Salas Muñoz por su incondicional apoyo en todo momento, muchas gracias Dra., por brindarme el aliento para no abandonar el posgrado y a seguir firme ante las adversidades, gracias por compartir desinteresadamente su conocimiento y ser paciente con mi aprendizaje en el laboratorio y por ser una gran persona conmigo y que junto a sus enseñanzas y exigencias me hicieron crecer profesionalmente. Así mismo también agradezco al Dr. J. Augusto Ramírez Trujillo por aceptarme como su alumno y que esto permitiera que pudiera continuar dentro del posgrado, gracias Doc., por ser el soporte que hizo posible que pudiera culminar mi maestría.

Agradezco infinitamente también al Dr. Luis Roberto Reveles Torres por aceptarme en su laboratorio de biología molecular y sanidad vegetal y permitirme desarrollar mis actividades experimentales con gran espacio y comodidad y del cual ahora ya formo parte de su equipo de trabajo. Gracias Doc., por brindarme su confianza y abrirme las puertas que dieron un giro inesperado en mi vida. No puedo dejar de lado a la Dra. Fátima B. Salazar Badillo, por compartir conmigo su conocimiento del fascinante reino de los hongos y brindarme su apoyo en todo momento y del que estoy seguro dará grandes frutos académicos.

En la vida hay buenos y malos momentos, hechos que nos marcan para bien o para mal, pero lo importante es saber vivir cada uno de ellos y dar la mejor cara y más aún cuando se cuenta con la mano de amigos leales que ayudan a sobre llevar la carga más ligera. En múltiples ocasiones la vida me ha puesto a prueba y

siento que ella misma me ha puesto a las personas indicadas y sobre todo a los mejores amigos y que junto a ellos he podido compartir muchas experiencias. Amiga Biri, muchas gracias por ser el vínculo que me permitió llegar a las instalaciones del INIFAP donde además encontré la paz y serenidad que tanto buscaba, gracias por extenderme tu hombro y ser ese paño de lágrimas en los momentos más amargos de este recorrido, siempre te estaré eternamente agradecido por tu lealtad y tu amistad y ojalá perdure por toda la eternidad.

No puedo dejar de lado a Francisco, quien en muy poco tiempo se ha convertido en un gran y fiel amigo para mí y que además me ha permitido compartir la bienaventuranza del fascinante reino de los hongos. Muchas gracias Pancho porque además de lo académico has prestado oído para desahogar mis penas. Les debo a ambos su gratitud y lealtad porque juntos sembramos infinitas cajas de esfuerzo y dedicación, que hoy han dado el fruto de un buen equipo de trabajo y por ser mis testigos de lo fascinante y difícil que fue concluir este proyecto académico.

No puedo dejar de lado al resto del equipo del laboratorio con los que pasé agradables momentos de risa y me demostraron su apoyo, cariño y comprensión en todo momento: Gaby, Cecy, Esther, Isa, Alix, Rubén y Jacob, muchas gracias por todos los buenos y malos momentos compartidos en un espacio que no solo nos ha hecho crecer profesionalmente, sino que también, nos ha brindado la comodidad de un segundo hogar. De igual manera a los compañeros que se fueron integrando al equipo de trabajo les agradezco toda su confianza. Quiero que sepan que en medio de todas las dificultades que he pasado me he sentido cobijado con la compañía de todos ustedes.

No puedo terminar sin antes agradecer a mis compañeros de generación, especialmente con quienes hice una verdadera amistad y aun cuando siendo un foráneo no dudaron en extenderme su apoyo. Reconozco que llegué a una ciudad y a una universidad sin conocer nada ni a nadie y ahora me voy, me voy con grandes experiencias, un nuevo logro académico, nuevos amigos e historias nuevas que contar. Lety y Jaki, les agradezco infinitamente la mano que me

extendieron en todo momento en este trayecto académico. Gracias por darme su apoyo en los episodios más desagradables y hacer de esta estancia más amena y sobre todo por otorgarme su amistad. De igual manera no puedo olvidar la compañía y las largas charlas con Magda y Adri.

No puedo terminar sin antes agradecer a cada uno de mis sinodales por tomarse el tiempo para revisar mi tesis y darme sus observaciones y sugerencias. Finalmente, a todas aquellas personas que han y están marcando mi vida y que me han permitido ser parte de la suya, amigos entrañables que han separado su camino del mío y los que ahora caminan conmigo, y que de una u otra forma han dejado huella en mi vida. No me alcanzan las palabras para terminar de agradecer a todas y cada una de las personas que han hecho posible este proyecto de Tesis, simplemente solo me queda decir muchas

¡GRACIAS!

Dedicatoria

Definitivamente el agradecimiento nace de las acciones recibidas por aquellas personas que amas profundamente, el amor se manifiesta de diversas formas que involucra a tus padres, amigos y seres queridos que marcan tu vida de una u otra manera. Pude darme cuenta con claridad que, dentro del desarrollo de esta tesis, pude ver y evidenciar que a pesar de que cometí errores y tomé algunas decisiones arriesgadas, siempre las dos únicas personas que estuvieron y permanecieron a mi lado en todo momento fueron mis padres, ellos me permitieron darme cuenta que realmente son mi compañía indispensable, a través de ellos pude entender y comprender el tamaño y alcance de su amor, su entrega y confianza en mí.

Esta tesis representa una fracción del mundo que busco y sueño, es una pequeña muestra de agradecimiento y afecto hacia mi familia, las razones que acabo de expresar me han permitido dedicar esta tesis principalmente.

A mi papá Abraham Rodríguez Gómez

A mi mamá Jovita Serrano Gómez

A mis hermanos Ulises, Alan y Abraham

A la Fam. Rodríguez Chairez y Bautista Moreno

Y muy especialmente a la memoria de mi abuelo Humberto Serrano Magallanes

Querida familia muchas gracias por darme la oportunidad de demostrarles que fui capaz de superar todos los obstáculos por muy difíciles que estos fueron y que hoy felizmente junto a ustedes puedo disfrutar el placer que se me concede de decir lo he logrado.

“En la naturaleza, los diálogos entre plantas y microorganismos ocurren en silencio bajo la rizosfera, bellamente orquestada bajo la sinfonía de moléculas y perfumes aromáticos”

Candelario Rodríguez Serrano

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Interacciones planta – microorganismos rizosféricos.....	4
2.1.1 Rizosfera.....	5
2.1.2 Microorganismos rizosféricos	7
2.3 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal.....	8
2.4 Mecanismos de promoción del crecimiento por microorganismos.....	9
2.4.1 Compuestos orgánicos volátiles producidos por los hongos.....	10
2.4.2 Compuestos orgánicos difusibles producidos por los hongos.....	13
2.5 Hongos promotores del crecimiento vegetal.....	15
2.6 Biología e importancia del género <i>Fusarium</i>	17
2.7 Importancia del cultivo de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.) var. mirasol.....	18
2.8 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	19
2.7 Antecedentes Directos.....	22
III. JUSTIFICACIÓN.....	24
IV. HIPÓTESIS.....	25
V. OBJETIVO.....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos específicos.....	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
6.1 Caracterización morfológica de las especies de <i>F. equiseti</i> y <i>F. cf graminearum</i>	26

6.2 Análisis de la promoción de crecimiento vegetal <i>in vitro</i> de los dos hongos de <i>Fusarium</i> spp en <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
6.2.1 Esterilización y germinación de las semillas de <i>A. thaliana</i>	27
6.2.2 Inoculación de las plántulas de <i>A. thaliana</i> con las especies de <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T).....	27
6.2.3 Análisis de los parámetros de crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas.....	28
6.2.4 Extracción y cuantificación de clorofila	29
6.4 Promoción del crecimiento vegetal mediante exudados (metabolitos) de <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T).....	30
6.4.1 Condiciones de cultivo de las cepas de <i>Fusarium</i> spp	30
6.4.2 Condiciones de cultivo vegetal con los exudados <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T).....	30
6.5 Análisis histoquímico de la actividad de la línea reportera <i>DR5::GUS</i> y <i>Rhd6</i>	31
6.6 Caracterización del fenotipo de promoción de crecimiento vegetal de <i>C. annuum</i> inoculados con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T).....	32
6.8.2 Análisis estadístico de la promoción de crecimiento vegetal de <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) en <i>A. thaliana</i> y chile mirasol.....	33
VII. RESULTADOS	35
7.1 Identificación fenotípica de los hongos filamentosos aislados de la rizosfera de maíz como promotores del crecimiento vegetal.....	35
7.1.1 Caracterización macro y microscópica de M102.R (<i>Fusarium equiseti</i>).36	
7.1.2 Caracterización macro y microscópica de P85.T (<i>Fusarium cf graminearum</i>)	38
7.2 Promoción de crecimiento vegetal <i>in vitro</i> de <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) en plántulas de <i>A. thaliana</i>	40
7.2.1 Promoción de crecimiento vegetal <i>in vitro</i> de <i>Fusarium equiseti</i> (M102.R) en plántulas de <i>A. thaliana</i>	40
7.2.2 Promoción de crecimiento vegetal <i>in vitro</i> de <i>Fusarium cf graminearum</i> (P85.T) en plántulas de <i>A. thaliana</i>	44
7.3 Promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i> en los exudados de los dos hongos de <i>Fusarium</i> spp en plántulas de <i>A. thaliana</i>	48
7.3.1 Promoción del crecimiento vegetal con los exudados de <i>Fusarium equiseti</i> (M102.R)	49

7.3.2 Promoción del crecimiento vegetal con los exudados de <i>Fusarium cf graminearum</i> (P85.T).....	56
7.4 Análisis de la actividad <i>DR5::GUS</i> y <i>Rdh6</i> de <i>A. thaliana</i> en su interacción con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T).....	65
7.4.1 Monitoreo de respuesta auxinas mediante la actividad GUS de <i>A. thaliana</i> en su interacción con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T).....	65
7.4.2 Análisis de la generación de pelos radiculares en línea <i>Rhd6</i> de <i>A. thaliana</i> en su interacción con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T).....	68
7.5 Caracterización del fenotipo de promoción de crecimiento vegetal de <i>Fusarium equiseti</i> (M102.R) y <i>Fusarium cf graminearum</i> (P85.T) en plantas de <i>Capsicum annuum</i> L (var. mirasol).....	70
VIII. DISCUSIÓN	77
VIII. CONCLUSIONES	90
IX. PERSPECTIVAS	91
X. BIBLIOGRAFÍA	92
XI ANEXOS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones en la rizosfera.....	5
Figura 2. Esquema de una raíz que muestra la estructura de la rizosfera	6
Figura 3. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal por microorganismos	10
Figura 4. Diseño experimental de la interacción <i>A. thaliana</i> - <i>Fusarium</i> spp.....	29
Figura 5. Diseño experimental de los exudados de <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) en plántulas de <i>A. thaliana</i>	31
Figura 6. Diseño experimental de la promoción de crecimiento vegetal de <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) en chile mirasol.....	34
Figura 7. Caracterización macro y microscópica de M102.R (<i>F. equiseti</i>).....	37
Figura 8. Caracterización macro y microscópica de P85.T (<i>F. cf graminearum</i>). .	39
Figura 9. Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de <i>F. equiseti</i> (M102.R) en <i>A. thaliana</i> a los 7 dpi.	41
Figura 10. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculada con <i>F. equiseti</i> (M102.R).	42
Figura 11. Arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> inoculada con <i>F. equiseti</i> (M102.R) a los 7 dpi.....	43
Figura 12. Cuantificación de clorofila de las plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con <i>F. equiseti</i> (M102.R).	44
Figura 13. Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) en <i>A. thaliana</i> a los 7dpi.	45
Figura 14. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculada con <i>F. cf graminearum</i> (P85.T).....	46
Figura 15. Arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> inoculada con <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) a los 7 dpi.	47
Figura 16. Cuantificación de clorofila de las plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con <i>F. cf graminearum</i> (P85.T).....	48
Figura 17. Promoción del crecimiento vegetal de los exudados de <i>F. equiseti</i> (M102.R) en <i>A. thaliana</i> a los 7 días de desarrollo.....	49

Figura 18. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. equiseti</i> (M102.R).....	50
Figura 19. Arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. equiseti</i> (M102.R)	51
Figura 20. Cuantificación de clorofila de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. equiseti</i> (M102.R).....	52
Figura 21. Promoción del crecimiento vegetal mediante los exudados de <i>F. equiseti</i> (M102.R) a los 7 días de desarrollo.	53
Figura 22. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. equiseti</i> (M102.R).....	54
Figura 23. Arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> inoculada con los exudados de <i>F. equiseti</i> (M102.R)	55
Figura 24. Cuantificación de clorofila de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. equiseti</i> (M102.R).....	56
Figura 25. Promoción del crecimiento vegetal en los exudados de <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) en <i>A. thaliana</i> a los 7 días de desarrollo.....	57
Figura 26. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. cf graminearum</i> (P85.T)	58
Figura 27. Arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. cf graminearum</i> (P85.T)	59
Figura 28. Cuantificación de clorofila de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. cf graminearum</i> (P85.T)	60
Figura 29. Promoción del crecimiento vegetal de los exudados de <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) en <i>A. thaliana</i> a los 7 días de desarrollo.....	61
Figura 30. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. cf graminearun</i> (P85.T)	62
Figura 31. Arquitectura de la raíz de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. cf graminearum</i> (P85.T)	63
Figura 32. Cuantificación de clorofila de <i>A. thaliana</i> con los exudados de <i>F. cf graminearum</i> (P85.T)	64

Figura 33. Expresión del gen de fusión <i>DR5::GUS</i> en plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) a los 5 dpi	67
Figura 34. Análisis de la línea <i>Rdh6</i> de <i>A. thaliana</i> en su interacción con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T)	69
Figura 35. Fenotipo de crecimiento vegetal de <i>Capsicum annum</i> inoculadas con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T)	71
Figura 36. Cuantificación de los parámetros vegetativos de las plantas de chile mirasol inoculadas con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) a los 15, 30 y 45 dpi.....	73
Figura 37. Fenotipo de crecimiento vegetal de <i>Capsicum annum</i> inoculadas con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T)	74
Figura 38. Cuantificación de los parámetros vegetativos de las plantas de chile guajillo inoculadas con <i>F. equiseti</i> (M102.R) y <i>F. cf graminearum</i> (P85.T) a los 60 dpi	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hongos reportados como promotores del crecimiento vegetal (PGPF) y su origen de aislamiento	8
Tabla 2. Compuestos orgánicos volátiles producidos por hongos con efectos benéficos en plantas	11
Tabla 3. Fitohormonas producidas por hongos filamentosos.....	15

ABREVIATURAS

At/MS: Interacción indirecta en MS

At/MS-Mo: Interacción indirecta en MS

At/PDA-Mo: Interacción indirecta en PDA

AuxRE: Elemento de respuesta a auxinas

CA: Agar harina de maíz

CLA: Agar clavel

cm: Centímetro

DMF: N, N-9 dimetilformamida

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dpi: Días post-inoculación

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EtOH: Etanol

β -GUS: Enzima reportera β -D-glucuronidasa de *Escherichia coli*

h: Hora

HMA: Hongos micorrizicos arbusculares

IAA: Ácido indol-3-acético

ISR: Resistencia sistémica inducida

ITS: Regiones transcritas internas

mM: Milimolar

MA: Micorrizas arbusculares

mg: Miligramos

min: minuto

mL: Mililitro

Mo: Microorganismo

MS: Medio sales MS (Murashige y Skoog)

nm: Nanometros

PDA: Agar papa dextrosa

PDB: Caldo papa dextrosa

PGPF: Hongos promotores del crecimiento vegetal

pH: Potencial de hidrógeno

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: revoluciones por minuto

SNA: Agar Spezieller Nährstoffarmer

µm: Micrometro

VOC's: Compuestos orgánicos volátiles

°C: Grados celcius

RESUMEN

El uso de microorganismos rizosféricos representa una alternativa frente al uso de agroquímicos, entre estos se pueden mencionar a los hongos filamentosos capaces de aumentar el crecimiento, desarrollo y vigor de las plantas. Con base en lo anterior, en este trabajo se presenta la identificación morfológica de dos hongos filamentosos y su análisis como promotores del crecimiento vegetal aislados de la rizosfera de *Zea mays* L. Anteriormente, las dos cepas empleadas en este estudio M102.R y P85.T se habían identificado molecularmente como *Fusarium equiseti* y *Fusarium cf graminearum*, respectivamente. Por otra parte, el análisis de la promoción de crecimiento vegetal de ambas especies de hongos se llevó a cabo empleando como sistema *A. thaliana* bajo diferentes condiciones de cultivo e interacciones [directa (MS) e indirecta (MS y PDA)]. Observando mejores resultados en la interacción indirecta en MS. Además, se adicionaron al medio exudados de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) generados en MS y PDB a cultivos de plántulas de *A. thaliana* demostrando un efecto en la generación de raíces secundarias y peso fresco principalmente. Posteriormente, se monitoreó la respuesta en la acumulación de auxinas utilizando la línea DR5::GUS de *A. thaliana*, en donde ambas cepas mostraron un aumento en la acumulación de auxinas en la roseta, hojas y raíces de las plántulas. Adicionalmente, se utilizó la línea mutante *Rhd6* de *A. thaliana*, la cual no genera raíces secundarias ni pelos radiculares, sin embargo, al estar en interacción con ambas cepas, lograron recuperar el fenotipo de la línea mutante principalmente ante la interacción indirecta en MS y PDA. Aunado a esto se analizó la actividad de promoción de crecimiento en plantas de interés económico como es el chile (*Capsicum annum* L.), en donde se mostró que ambas cepas promovieron el crecimiento, sin embargo, la cepa de *F. equiseti* M102.R fue la que generó mejores resultados en el aumento de crecimiento y desarrollo de las plantas de chile mirasol.

Palabras clave: *A. thaliana*, Chile, Crecimiento vegetal, *Fusarium*, Rizosfera.

ABSTRACT

Nowadays an alternative against the use of agrochemicals are the rhizospheric microorganisms. Among these we can find filamentous fungi capable of increasing the growth, development, and vigor of plants. In this study, morphological identification and analysis of the effect as growth promoters of two fungi strains isolated from the rhizosphere of *Zea mays* L. plants were carried. Previously, the two strains were molecularly identified as *Fusarium equiseti* (M102.R) and *Fusarium cf graminearum* (P85.T). The analysis of the effect as growth promoters of these two fungal strains was carried out with *Arabidopsis thaliana* plants, using a system that allows direct plant-fungal contact or avoids their physical interaction (split system). The plantlets that grew in the split system exhibited higher biomass than the ones in direct contact with *Fusarium* species. Additionally, was conducted an assay where *A. thaliana* plantlets were grown in Murashine Skoog medium (MS) that containing exudates from both fungal strains. The exudates were obtained by growing both fungal strains in Potato Dextrose Agar (PDA) potato and MS. This assay showed that the exudates of both fungal strains have the ability to induce the growth of plants, at showing an increase in the fresh weight of these, and induce the development of secondary roots in the plants. Subsequently, the induction of secondary root production was analyzed with reporter and mutant lines of *A. thaliana*, *DR5::GUS* and *Rdh6* respectively. In the *DR5::GUS A. thaliana* plants it was observed a greater activity of the GUS reporter with both fungal strains, this was mostly observed in the rosette, leaves, and seedling roots. The *Rdh6 A. thaliana* plants when it was interacting with both fungal strains, showed the phenotype recover mainly in the split system. Finally, the growth promotion activity was analyzed in chili (*Capsicum annuum* L.) plants, where it was observed that both strains have this ability. However, the fungal strain M102.R showed to be the best.

Keywords: *A. thaliana*, Chili, Plant growth, *Fusarium*, Rhizosphere.

**ANÁLISIS DE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL DE *Fusarium*
spp AISLADOS DE LA RIZOSFERA DE *Zea mays* L.**

I. INTRODUCCIÓN

La producción de alimentos es esencial para el desarrollo humano, sin embargo, para lograr abastecer a la población mundial se ha generado un aumento en el cambio de uso de suelo hacia las actividades agrícolas lo que ha generado, además, un aumento de fertilizantes nitrogenados, pesticidas y otros insumos químicos. A pesar de su popularidad, el empleo de estos trae consigo graves consecuencias para el medio ambiente afectando severamente la pérdida de la biodiversidad, la microbiota y calidad del suelo, así como también la salud humana (Tilman et al., 2002; Trivedi et al., 2017).

Los principales retos de la agricultura sostenible implican altos rendimientos a bajo costo. Ante esta necesidad se ha incrementado la búsqueda de alternativas para cumplir con la demanda en la producción de alimentos que, además sean amigables con el medio ambiente. Una forma de desarrollar un método de producción de cultivos sostenible es mediante la aplicación de microorganismos benéficos (Trivedi et al., 2017). Interacciones simbióticas como las que las plantas mantienen con microorganismos (v. gr. hongos), favorecen el crecimiento, desarrollo y vigor de las plantas. A su vez, éstas les confieren protección a sus simbiontes contra el estrés biótico y abiótico, y proporcionan al mismo tiempo una mayor disponibilidad de nutrientes para las plantas con lo que se puede lograr disminuir el uso de fertilizantes y pesticidas (Bhuvaneshwari et al., 2014; Trivedi et al., 2017).

En los entornos naturales, las plantas interactúan con diferentes microorganismos rizosféricos, entre los que se encuentran los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) y las rizobacterias. La rizosfera provee un nicho de relaciones simbióticas planta-microorganismo mismas que son establecidas a través del intercambio y la percepción de moléculas químicas entre ambos simbiontes, las cuales además pueden tener un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Contreras-Cornejo et al., 2016; Igiehon y Babalola, 2018).

La colonización de la raíz por sus simbioses ocurre a través del intercambio y la percepción de señales químicas, lo que desencadenan una respuesta transcriptómica, proteómica y metabólica en ambos organismos (Contreras-Cornejo et al., 2016; Mukherjee et al., 2012).

Estas interacciones microbianas con plantas altamente complejas y dinámicas están determinadas en gran medida por diversos factores como el tipo de suelo y pH, elementos importantes en la configuración del microbioma de la rizosfera. Además, se hipotetiza que las plantas son capaces de reclutar microorganismos mediante los exudados de raíz o rizodepósitos que se componen de aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos que varían de acuerdo a la especie de planta, y a las condiciones bióticas como la presencia de plantas competidoras que pueden influir en la estructura de la comunidad microbiana y abióticas como pH, disponibilidad de nutrientes, que alteran las propiedades fisicoquímicas del suelo (Mendes et al., 2013; Rasmann y Turlings, 2016; Rillig et al., 2015).

Los exudados de raíz influyen selectivamente en el crecimiento de los microorganismos rizosféricos al alterar la composición química del suelo próximo a las raíces de las plantas y al servir como sustratos de crecimiento selectivo para estos microorganismos. Recíprocamente estos microorganismos rizosféricos proporcionan a las plantas una mayor disponibilidad de nutrientes, además de conferir resistencia sistémica inducida, también pueden producir algunas fitohormonas como las auxinas y giberelinas que tienen características de promover el crecimiento vegetal, mejorando en consecuencia el proceso de fotosíntesis, aumentando el contenido de clorofila y la asimilación de dióxido de carbono (Canarini et al., 2019; Yang y Crowley, 2000; Igiehon y Babalola, 2018).

El potencial benéfico de los microorganismos asociados al sistema de raíces puede proporcionar soluciones sostenibles para aumentar la productividad de cultivos agrícolas ante los desafíos del cambio climático y una mayor demanda de alimentos para una población en extensión. Con base en lo anterior, en el

presente trabajo de tesis se muestra la identificación morfológica de dos especies de hongos filamentosos y su análisis como promotores del crecimiento vegetal bajo diferentes condiciones de cultivo en plantas dicotiledóneas, los cuales fueron aislados de la rizosfera de *Zea mays* L., con la finalidad de identificar la variabilidad de *Fusarium* spp causante de la pudrición de tallo de maíz e identificación de fuentes de resistencia genética. Así mismo los dos hongos seleccionados para este estudio de un total de 35 cepas de hongos filamentosos en un trabajo previo no mostraron efectos negativos en el crecimiento y desarrollo cuando se inocularon en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Interacciones planta – microorganismos rizosféricos

Las interacciones entre una planta y su microbiota son altamente complejas y dinámicas. Las características fisicoquímicas del suelo modulan estas interacciones, como por ejemplo su composición mineral, salinidad, pH, disponibilidad de nutrientes, aporte orgánico, temperatura y humedad, influyen en el tipo de interacciones que las plantas establecen con sus simbioses. Las interacciones planta-microorganismo pueden pertenecer a un gradiente de interacciones antagonistas o mutualistas (v. gr. simbiosis) y los microorganismos interactuantes pueden ser endófitos o de vida libre (Schuster y Schmolli, 2010; Turner et al., 2013; Rillig et al., 2015; Igiehon y Babalola, 2018).

El primer paso en la interacción planta-microorganismo es el reconocimiento entre ambos. Habitualmente, las plantas exudan moléculas que son reconocidas por los microorganismos del suelo, que a su vez producen señales que desencadenan la colonización (Badri et al., 2009; Vargas et al., 2009; Sarma et al., 2015). La composición de los exudados de la raíz es crucial en la comunicación planta microorganismo, sin embargo, esta capacidad varía según la especie de planta, la edad, el estado nutricional y la exposición al estrés (Figura 1) (Lareen et al., 2016). Los exudados de la raíz influyen en la composición del microbioma de la rizosfera, a menudo se dividen en dos clases de compuestos. Los de bajo peso molecular como: azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, fenoles, y los compuestos de alto peso molecular como: proteínas y mucílago (Bais et al., 2006; Pérez-Jaramillo et al., 2016). Los tres métodos principales por los cuales las plantas secretan estas sustancias químicas en la rizosfera son la difusión a través de la membrana, el uso de canales iónicos para compuestos de bajo peso molecular y el transporte vesicular para compuestos de alto peso molecular (Badri y Vivanco, 2009).

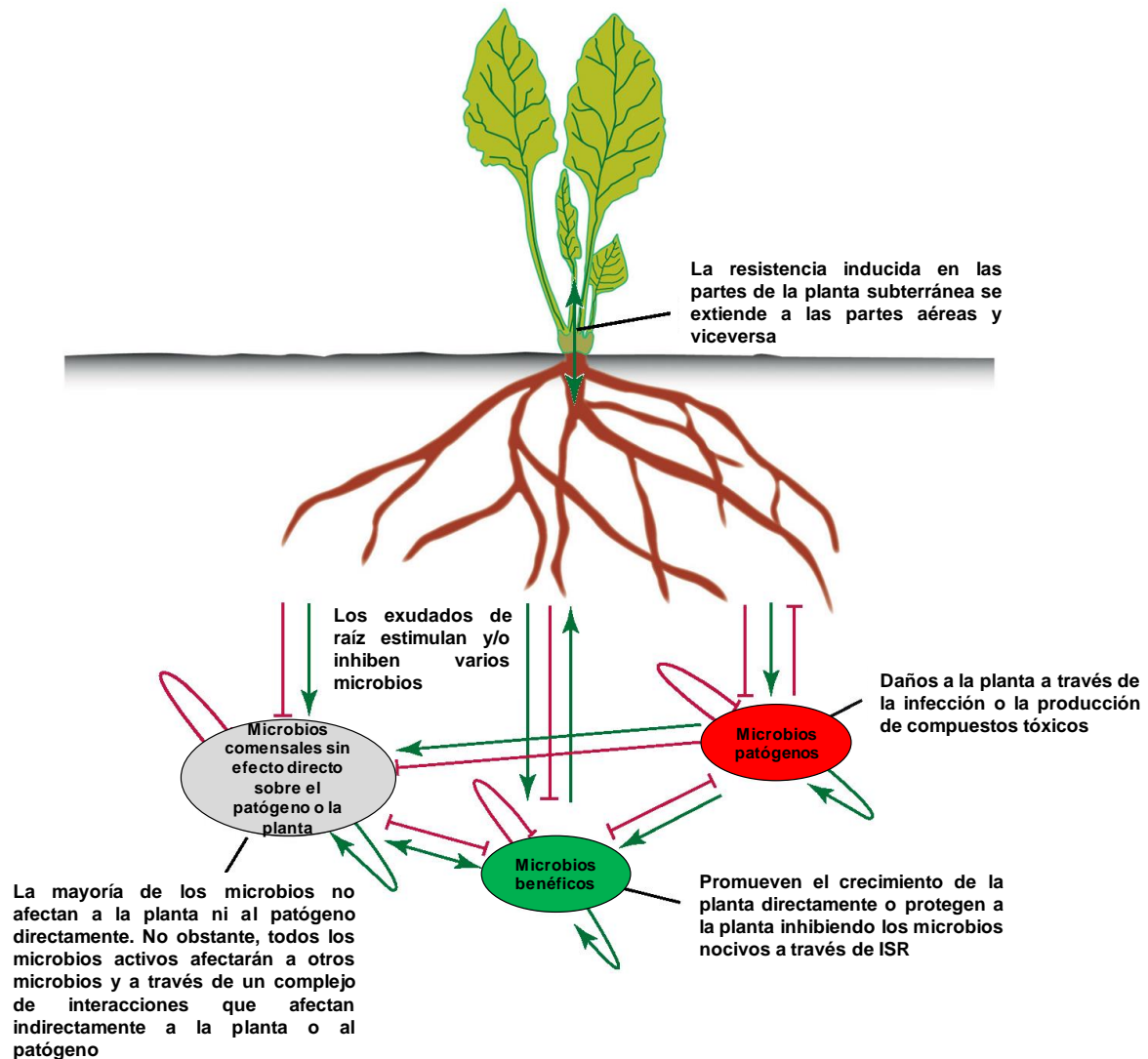


Figura 1. Interacciones en la rizosfera. Las plantas pueden influir en la composición y activación de su microbioma a través de la exudación de compuestos que estimulan (flechas verdes) o inhiben (flechas rojas bloqueadas) una amplia gama de patógenos transmitidos por el suelo (Tomado y modificado de Berendsen et al., 2012).

2.1.1 Rizosfera

La rizosfera se definió hace más de 100 años por Lorenz Hiltner como la zona adyacente a la raíz donde se encuentran los microorganismos y procesos importantes para el crecimiento y salud de las plantas (Figura 2). También es definido como la zona de influencia de las raíces y la cual alberga una gran diversidad de microorganismos que interactúan con las plantas. Algunas de estas

interacciones pueden mejorar la captación de nutrientes por parte de las plantas y simultáneamente la captación de nutrientes no disponibles del suelo. Además, los microorganismos que habitan en la rizosfera pueden inducir resistencia sistémica a las enfermedades en las plantas, suprimir la colonización de patógenos de la raíz y estimular la colonización endofítica (Dobbelaere et al., 2003; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Los organismos presentes en la rizosfera incluyen microartrópodos, algas, protozoarios, nematodos, hongos y bacterias (Johansson et al., 2004), estos organismos son diferentes a los que circundan fuera de la rizosfera, debido a la presencia de diferentes compuestos químicos de alto y bajo peso molecular en la interfaz de la raíz y el suelo de la planta, conocidos habitualmente como rizodepósitos o exudados de raíz que sirve como una fuente de nutrición para estos (Bais et al., 2006; Badri y Vivanco, 2009; Doornbos et al., 2012).

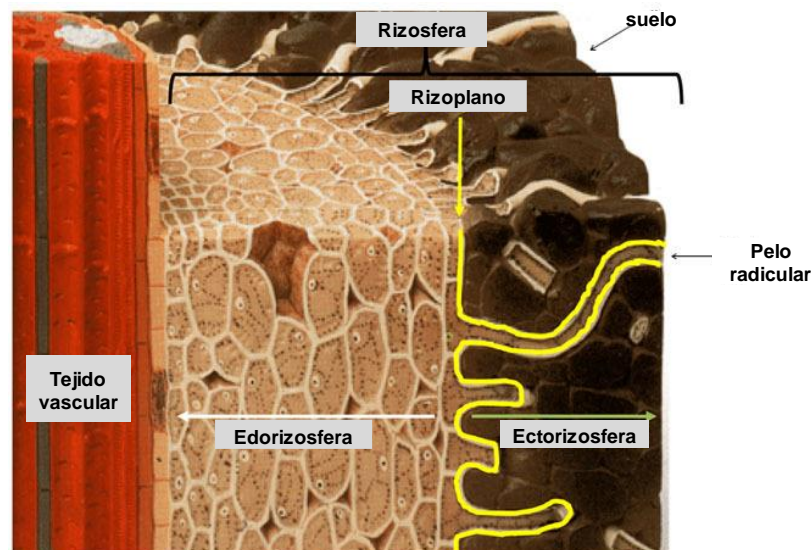


Figura 2. Esquema de una raíz que muestra la estructura de la rizosfera (Tomado y modificado de McNear, 2013).

2.1.2 Microorganismos rizosféricos

La rizosfera alberga muchos microorganismos que tienen un efecto neutro sobre la planta, pero también atrae a microorganismos que ejercen efectos perjudiciales o benéficos (Raaijmakers et al., 2009). Los microorganismos que afectan negativamente el crecimiento y la salud de las plantas son conocidos comúnmente como patógenos e incluye una gran variedad de hongos, oomicetos, bacterias y nematodos. Por otra parte, existen una amplia gama de microorganismos que se consideran benéficos para las plantas e incluye bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos endo y ectomicorrizas, bacterias y hongos que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas (Somers et al., 2004; Raaijmakers et al., 2009).

Además, varios de los microorganismos de la rizosfera, pueden tener un efecto directo positivo sobre el crecimiento y la salud de las plantas como fitoestimulantes y biofertilizantes, mientras que otros pueden inducir una respuesta sistémica en la planta, lo que resulta en la activación de los mecanismos de defensa de la planta (Pieterse et al., 2003; Raaijmakers et al., 2009). Además, los microorganismos rizosféricos benéficos contribuyen a mejorar la disponibilidad de nutrientes. En los ecosistemas naturales, la mayoría de los nutrientes como Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Azufre (S) están unidos a moléculas orgánicas y, por lo tanto, están mínimamente biodisponibles para las plantas (Bonkowski, 2004; Richardson et al., 2009).

Para acceder a estos nutrientes, las plantas dependen de bacterias y hongos, que poseen la maquinaria metabólica para despolimerizar y mineralizar los compuestos de N, P y S. Esto libera formas inorgánicas de N, P y S en el suelo, incluidas especies iónicas como amonio, nitrato, fosfato y sulfato, que son las formas de nutrientes preferidas para las plantas. En entornos naturales, estas transformaciones de nutrientes microbianos son impulsores clave del crecimiento de las plantas (Schimel y Bennett, 2004; van der Heijden et al., 2008).

2.3 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal

La coevolución entre plantas y microorganismos ha derivado en el establecimiento de relaciones benéficas donde ocurre una promoción del crecimiento y desarrollo vegetal, mejorando la disponibilidad de nutrientes y la resistencia al estrés biótico y abiótico (Bulgarelli et al., 2013; Braga et al., 2016). Los microorganismos más conocidos como promotores del crecimiento vegetal incluyen a las micorrizas (Parniske, 2008) y algunas especies del género *Trichoderma* (Schuster y Schmoll, 2010) y las rizobacterias (Vejan et al., 2016). En la tabla 1, se muestran algunos hongos reportados como promotores del crecimiento vegetal.

Tabla 1. Hongos reportados como Promotores del Crecimiento Vegetal (PGPF) y su origen de aislamiento (Tomado y modificado de Hossain et al., 2017).

Filo	Hongos promotores del crecimiento vegetal (PGPF)	Origen de aislamiento	Referencias
Ascomycota	<i>Alternaria</i> sp	Raíz de <i>Rosa rugosa</i> , <i>Camellia japonica</i> , <i>Delonix regia</i> , <i>Dianthus caryophyllus</i> , <i>Rosa hybrid</i>	Zhou et al., 2014
	<i>Aspergillus</i> sp	Chili (<i>Capsicum annuum</i>) Suelo de origen tropical y subtropical, rizosfera de garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	Islam et al., 2014 Chuang et al., 2007
	<i>Aspergillus niger</i>	Pasto bermuda (<i>Cynodon dactylon</i>)	Yadav et al., 2011 Islam et al., 2014
	<i>Fusarium</i> spp	Rizosfera de <i>Zoysia tenuifolia</i> y <i>Lygeum spartum</i>	Koijma et al., 2013 Maciá-Vivente et al., 2009
	<i>Fusarium equiseti</i>	Raíz de banana (<i>Musa</i> sp) y diversos ambientes	Waweru et al., 2014 Bitas et al., 2015
	<i>F. oxysporum</i>	Rizosfera de <i>Z. tenuifolia</i> , raíz de <i>Rosa rugosa</i> , <i>Camellia japonica</i> , <i>Delonix regia</i> , <i>Dianthus caryophyllus</i> , <i>Rosa hybrid</i>	Sultana et al., 2008 Zhou et al., 2014
	<i>Phoma</i> sp	Suelo	Yedidia et al., 2001
	<i>T. asperellum</i>	Suelo	Contreras-Cornejo et al., 2011
	<i>T. atroviride</i>	Suelo	Shaw et al., 2016
	<i>T. hamatum</i>	Suelo, rizosfera de girasol, leguminosas y cereales	Hyacumachi, 1994, Brotman et al., 2013, Jogaiah et al., 2013, Akhter et al., 2015
	<i>T. harzianum</i>	Suelo	Contreras-Cornejo et al., 2009
	<i>T. virens</i> Gv.29-8	Suelo	Contreras-Cornejo et al., 2009

Continuación tabla 1

Basidiomycota	<i>Rhizoctonia solani</i>	Raíz de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Muslim et al., 2003
	<i>Piriformospora indica</i>	Desierto Thar, India	Bhuyan et al., 2015
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>		Ignatova et al., 2015
Zygomycota	<i>Mucor sp</i>	Rizosfera de pasto (<i>Z. tenuifolia</i>)	Hyacumachi, 1994
	<i>Rhizopus</i>	Suelo contaminado con arsénico	Srivastava et al., 2012
Oomycota	<i>Phytophthora cryptogea</i>	Tomate (<i>L. esculentum</i>)	Attitalla et al., 2001
	<i>Pythium oligandrum</i>	Suelo	Benhamou et al., 2012

2.4 Mecanismos de promoción del crecimiento por microorganismos

Las interacciones planta-microorganismo (hongos y bacterias) son muy diversas, desde patógenas hasta benéficas actuando los microorganismos como endófitos. Las especies fúngicas y bacterianas son capaces de detectar el huésped e iniciar sus estrategias de colonización en la rizosfera produciendo una amplia gama de sustancias que interfieren en distintos procesos morfogénicos de las plantas (Ortiz-Castro et al., 2009).

Los microorganismos promueven el crecimiento de las plantas mediante mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos se definen como aquellos que dan como resultado la promoción del crecimiento de las plantas, incluyen la producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y secuestro de hierro por sideróforos. Los mecanismos indirectos actúan sobre otro sistema biológico, se refieren a mecanismos de defensa que inhiben el funcionamiento de uno o más organismos fitopatógenos, tanto hongos como bacterias. Los mecanismos indirectos incluyen competencia por nutrientes, parasitismo, antibiosis (producción de antibióticos) y activación de defensas naturales propias de la planta conocidos como resistencia sistémica inducida (ISR) (Olanrewaju et al., 2017) (Figura 3).

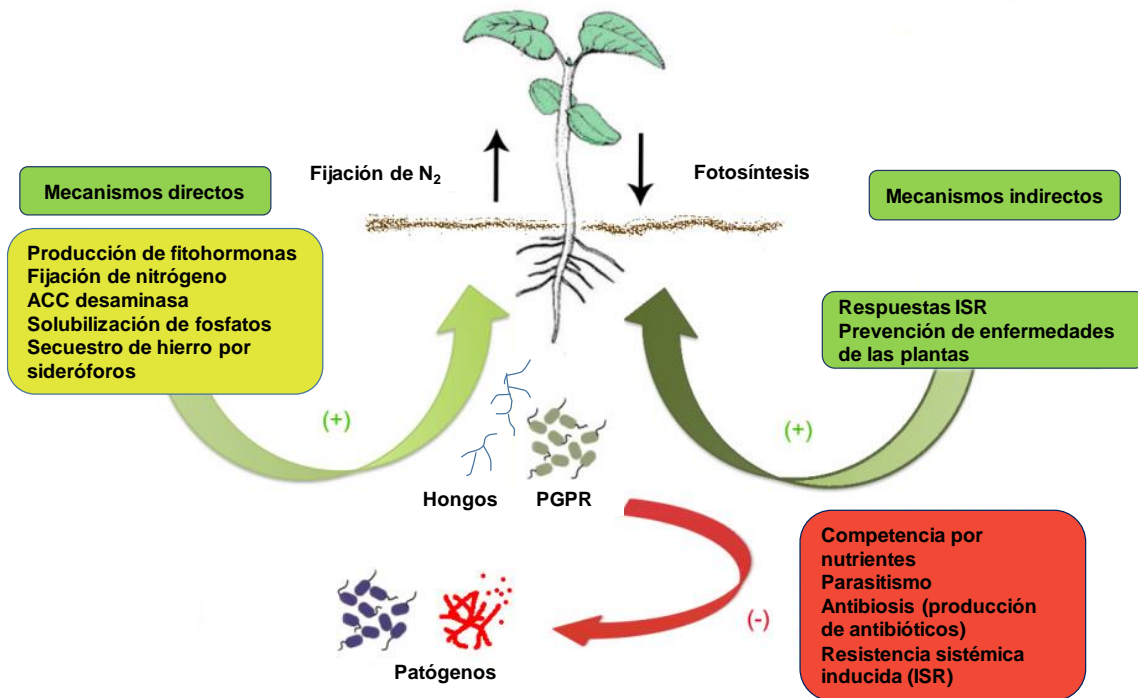


Figura 3. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal por microorganismos. **Mecanismos directos)** Mejoran el crecimiento y desarrollo de las plantas e incluye la producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, producción de sideróforos y metabolitos secundarios. **Mecanismos indirectos)** Actúan sobre otro sistema biológico, involucra los mecanismos de defensa que inhiben el funcionamiento de uno o más organismos fitopatógenos (Tomado y modificado de Nazir et al., 2018).

2.4.1 Compuestos orgánicos volátiles producidos por los hongos

En la naturaleza, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) median la comunicación en las interacciones que mantienen las plantas (i.e. patógenos, herbívoros). Estos compuestos son típicamente pequeños (hasta C₂₀) con masa molecular baja (100–500 Daltons) volátiles a temperatura y presión ambiente (Schmidt et al., 2015).

La mayoría de los volátiles microbianos se consideran productos del metabolismo primario y secundario, formados principalmente por la oxidación de la glucosa (Korpi et al., 2009). Las rutas biosintéticas subyacentes son el metabolismo aeróbico, heterótrofo del carbono, la fermentación, el catabolismo de aminoácidos,

la biosíntesis de terpenoides, la degradación de ácidos grasos y la reducción de azufre (Peñuelas et al., 2014).

Los compuestos volátiles bacterianos suelen estar formados por alquenos, alcoholes, cetonas, terpenos, bencenoides, pirazinas, ácidos y ésteres, mientras que los compuestos volátiles fúngicos están dominados por alcoholes, bencenoides, aldehídos, alquenos, ácidos, ésteres y cetonas (Kai et al., 2009; Piechulla y Degenhardt, 2014; Schmidt et al., 2015). Los VOC's producidos por hongos y bacterias participan en su interacción con los microorganismos patógenos de las plantas mostrando actividades antimicrobianas al igual que con las plantas como moduladores del crecimiento vegetal (Vespermann et al., 2007). En la tabla 2, se muestran algunos de los VOC's producidos por hongos benéficos y patógenos con efectos positivos en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Tabla 2. Compuestos orgánicos volátiles producidos por hongos con efectos benéficos en plantas (Tomado y modificado de Kanchiswamy et al., 2015).

Hongo	Efecto	Molécula	Referencia
<i>Trichoderma virens</i>	Crecimiento vegetal e induce respuesta de defensa contra <i>Botrytis cinerea</i>	β -cariofileno; β -elemeno; germacreno <i>D</i> δ -cadineno	Contreras-Cornejo et al., 2014
<i>Trichoderma atroviride</i> <i>Trichoderma virens</i>	Crecimiento vegetal	2-pentilfurano α -bergamoteno	González-Pérez et al., 2018
<i>Trichoderma atroviride</i>	Promueve el desarrollo y regula la morfogénesis de las raíces en <i>A. thaliana</i>	6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP)	Garnica-Vergara et al., 2016
<i>Trichoderma viride</i>	Crecimiento vegetal y desarrollo de raíces laterales	Alcohol de isobutilo Alcohol isopentilo Farneseno 3-metilbutanol y Geranilacetona	Hung et al., 2013
<i>Muscodor</i> sp.	Crecimiento vegetal y actividad antimicrobiana	Naftaleno, Tetrahidrofurano, 2-metilfurano, zuleno, α -felandreno, β -felandreno, 2-pentilfurano, aromadendrene, β -cariofileno	Macias-Rubalcava et al., 2010 Yuan et al, 2012

Continuación tabla 2

<i>Fusarium oxysporum</i> MSA 3	Induce brote y longitud de la raíz y aumento de peso fresco de las plántulas de lechuga	β -cariofileno	Minerdi et al., 2011 Bitas et al., 2015 Thongkamngam y Jaenaksorn, 2017
<i>Phoma</i> sp. GS8-3 <i>Ampelomyces</i> sp. (F-a-3) <i>Cladosporium</i> sp. (D-c-4)	Crecimiento vegetal y resistencia sistémica inducida (ISR)	Benzoato de metilo (C ₆ H ₅ CO ₂ CH ₃) <i>m</i> -cresol (CH ₃ C ₆ H ₄ OH) Acetato de isobutilo	Naznin et al., 2014
<i>Phomopsis</i> sp	Resistencia sistémica inducida (ISR) Actividad antifúngica	Sabineno, 3-metilbutan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol y acetona	Singh et al., 2011

Los volátiles tienen un papel importante en las interacciones entre microorganismos, el requisito previo para la efectividad volátil es su liberación, emanación, distribución y su percepción por parte de un organismo objetivo. Esto está garantizado por las propiedades fisicoquímicas de los compuestos volátiles como es su bajo peso molecular, alta presión de vapor, bajo punto de ebullición, lo que facilita la distribución incluso a largas distancias (Farmer, 2001; Baldwin et al., 2006; Heil y Ton, 2008; Effmert et al., 2012).

La distribución volátil subterránea se realiza por difusión (proceso mediante el cual las moléculas de un gas se esparcen o difunden) y advección (transporte de un fluido), los cuales se pueden mover a través de la red de poros del suelo, ya que son activos en las fases gaseosa y líquida, y pueden ser revolatizados después de pasar por los poros saturados de agua. Sin embargo, debido a su alta presión de vapor, los volátiles se mueven principalmente por difusión de vapor (Minnich y Schumacher, 1993; Effmert et al., 2012). Todos estos procesos están influenciados por las propiedades químicas inherentes de la sustancia volátil y las propiedades físicoquímicas del suelo circundante, que afectan la adsorción, la desorción y la degradación. La adsorción/desorción depende de la polaridad del compuesto, la textura del suelo y la arquitectura espacial, y la presencia de agua. A microescala, el aumento de la humedad reduce la adsorción de volátiles no polares a las superficies minerales; mientras que a macroescala, los volátiles no

polares son absorbidos cada vez más por la materia orgánica en suelos húmedos o mojados. A diferencia de la distribución volátil subterránea, tradicionalmente la emisión de VOC's hacia la atmosfera se ha considerado como un flujo unidireccional del sitio de síntesis (Minnich y Schumacher, 1993; Ruiz et al., 1998; Insam y Seewald, 2010; Effmert et al., 2012; Niinemets et al., 2014).

Al igual que los microorganismos se ha demostrado que las plantas producen y liberan activamente VOC's como respuesta a diferentes estímulos ambientales, influyendo de manera significativa en la comunicación planta-planta y planta-microorganismo. Los VOC's pueden ser producidos por varios órganos de la planta (hojas, flores, frutos y raíces) y se ha demostrado que son mediadores clave en las interacciones bióticas tanto en la superficie como debajo del suelo (Dudareva et al., 2006; Peñuelas et al., 2014). Los VOC's producidos por las plantas en la superficie están dominados por cuatro familias químicas que se originan a partir de las siguientes vías biosintéticas: terpenoides (ácido mevalónico [MVA] y fosfato de metileritritol [MEP]); derivados de ácidos grasos (vía lipoxigenasa [LOX]); compuestos benzenoides y fenilpropanoides (vía del ácido shikímico); y derivados de aminoácidos (Maffei, 2010; Baldwin, 2010; Dudareva et al., 2013; Delory et al., 2016).

2.4.2 Compuestos orgánicos difusibles producidos por los hongos

Las plantas y los hongos son fuentes ricas de miles de metabolitos secundarios (MS) constituyendo uno de los principales agentes bioquímicos involucrados en la interacción planta-hongo, algunos de estos compuestos orgánicos o metabolitos son unos de los principales agentes infecciosos en las plantas, sin embargo, existen metabolitos secundarios secretados por hongos benéficos capaces de alterar de manera positiva el crecimiento y desarrollo de las plantas (Pusztahelyi et al., 2015). Los metabolitos secundarios fúngicos se pueden dividir en cuatro clases químicas principales: policétidos, terpenoides, compuestos derivados del ácido shikímico y péptidos no ribosómicos. Además, los metabolitos híbridos compuestos por restos de diferentes clases son comunes, como en los

meroterpenoides, que son fusiones entre terpenos y policétidos (Collemare et al., 2008).

Algunas especies de hongos liberan diversos metabolitos de bajo peso molecular que influyen en la acumulación de hormonas vegetales relacionadas con la defensa o emplean sus propios imitadores de fitohormonas para suprimir la inmunidad de la planta y/o ayudar en el crecimiento vegetal (Patkar y Naqvi, 2017). El ácido indol-3-acético (IAA) es la principal auxina en las plantas, que regula los procesos de crecimiento y desarrollo como la división y elongación celular, la diferenciación tisular, la dominancia apical y las respuestas a la luz, la gravedad. Además, las raíces son más sensibles a las fluctuaciones en el nivel de esta hormona ya que se requiere IAA para la iniciación de la raíz primaria y lateral, así como estimular el aumento en la longitud de los pelos radicales derivados de la epidermis (Fu et al., 2015).

De manera similar la síntesis de IAA producida por hongos puede inducir la formación de raíces laterales y el desarrollo de pelos radiculares. La promoción del crecimiento y desarrollo de las raíces provoca una mayor absorción de nutrientes por parte de las plantas asociadas. Sin embargo, la producción de IAA por hongos no necesariamente ejerce efectos positivos sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz. El IAA sintetizado y secretado por hongos patógenos puede actuar como un factor de virulencia durante el desarrollo de la enfermedad. Aunque el papel exacto del IAA producido por hongos en las interacciones planta-hongo sigue siendo desconocido, se especula que el IAA de los hongos puede contribuir a la patogenicidad de la planta a través de dos mecanismos distintos. Primero, el IAA puede tener un efecto de virulencia directo en las plantas al aflojar la pared celular, abrir los estomas e inhibir la señalización de defensa dependiente del ácido salicílico (SA). En segundo lugar, el IAA puede inducir la biosíntesis de IAA endógeno de la planta, lo que resulta en la amplificación del efecto de virulencia causado por el IAA patógeno. El resultado de la interacción planta-hongo también es altamente dependiente de las especies de plantas y hongos (Cohen et al.,

2002; Fu et al., 2015). En la tabla 3, se muestra algunos hongos sintetizadores de fitohormonas.

Tabla 3. Fitohormonas producidas por hongos filamentosos (Tomado y modificado de Shi et al., 2017).

Hongo	Molécula	Referencia
<i>G. fujikuroi</i>	Giberelinas	Lu et al., 1995
<i>G. fujikuroi</i> NRRL2284	Giberelinas	Pastrana et al., 1993
<i>G. fujikuroi</i> CDBB H-984	Giberelinas	Escamilla et al., 2000
<i>F. moniliforme</i>	Giberelinas	Meleigy et al., 2009
<i>C. coerulescens</i> RWD 390	Ácido abscísico	Jens et al., 1987
<i>A. niger</i> NX-53	Ácido abscísico	Hui et al., 2007
<i>R. solani</i> Rs 4. IU To	Ácido abscísico	Dörffling et al., 20014
<i>F. oxysporum</i> CBS 758.68	Ácido abscísico	Dörffling et al., 20014
<i>B. cinerea</i> TB-3	Ácido abscísico	Tan et al., 1998
<i>F. oxysporum</i>	Ácido indolacético (IAA)	Hasan, 2002
<i>F. proliferatum</i>	Ácido indolacético (IAA)	Tsavkelova et al., 2012
<i>F. graminearum</i>	Ácido indolacético (IAA)	Luo et al., 2016
<i>T. virens</i> Gv29.8	Ácido indolacético (IAA)	Contreras-Cornejo et al., 2009
<i>T. atroviride</i> IMI206040		

2.5 Hongos promotores del crecimiento vegetal

Los hongos son un grupo heterótrofo de microorganismos que pueden tener relaciones simbióticas con una amplia variedad de organismos autótrofos (Dayle et al., 2001). Generalmente, los hongos que establecen relaciones benéficas con las raíces de las plantas son comúnmente denominados micorrizas, su éxito ecológico refleja un alto grado de diversidad en lo genético y fisiológico cerca de 6,000 especies que se clasifican dentro de los filos Glomeromycota, Ascomycota y Basidiomycota, además, se encuentran asociados con más del 80 % de las plantas terrestres y representan la simbiosis más común y extendida en el planeta (Schüssler et al., 2001; Bonfante y Anca, 2009).

Los hongos definen los tipos de micorrizas (i. e. endomicorrizas y ectomicorrizas). Las ectomicorrizas, por lo general forman relaciones simbióticas con especies arbóreas y arbustivas, normalmente las hifas permanecen de forma extracelular induciendo cambios importantes en la morfogénesis de la raíz, su presencia solo

conduce a modificaciones sutiles en células epidérmicas o corticales. Por otra parte, las endomicorrizas, es decir, micorrizas arbusculares (AM), las hifas penetran en las células de la raíz para establecer una simbiosis intracelular (Bonfante y Anca, 2009).

Las micorrizas arbusculares son simbiosis obligados incapaces de completar su ciclo de vida en ausencia de una raíz huésped. Los hongos penetran y colonizan las raíces de las plantas, donde se diferencian en estructuras altamente ramificadas conocidas como arbusculos, siendo los principales sitios de intercambio de nutrientes entre los dos organismos. El desarrollo concomitante de hifas extraradicales fuera de las raíces de las plantas permite que los hongos suministren al huésped nutrientes esenciales como fosfatos, nitratos y otros minerales del suelo. Mientras que las micorrizas arbusculares reciben hidratos de carbono derivados de la fotosíntesis en el huésped. Además, esta simbiosis de AM también confiere resistencia a la planta contra patógenos y estrés ambiental (Akiyama y Hayashi, 2006).

Además de los glomales (micorrizas), existen otros géneros fúngicos con capacidad de promover el crecimiento vegetal y conferir resistencia al estrés biótico y abiótico como lo son algunas especies del género *Trichoderma*, (Schuster y Schmoll, 2010). Aunque el género *Penicillium*, es más comúnmente conocido por la producción de antibióticos, también se han reportado especies de este género como promotoras de crecimiento vegetal. En un estudio realizado por Babu et al., (2015) reportan la promoción de crecimiento vegetal de *Penicillium menonorum* en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.).

Otro de los géneros que se tiene escasa información como promotores de crecimiento es *Fusarium* spp, ya que la mayoría son patógenos, sin embargo, se ha reportado la actividad antagónica de *Fusarium oxysporum* (F221-B) frente a hongos fitopatógenos (Thongkamngam y Jaenaksorn, 2017). Así mismo también se ha reportado la promoción de crecimiento vegetal de *Fusarium oxysporum*

mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) en plantas de *Arabidopsis thaliana* y tabaco (Bitas et al., 2015). Además, en otro trabajo realizado por Zhou et al. (2018), reportan la promoción de crecimiento vegetal de *Alternaria* spp A13 en *Salvia miltiorrhiza* mostrando un incremento significativo en peso fresco y seco y un aumento en el contenido de ácido fenólico total, ácidos litospermiños A y B (LAA y LAB). En otro estudio realizado por Šišić et al. (2017), demostraron la capacidad de *Fusarium equiseti* como promotor de crecimiento vegetal en plantas de guisante *Pisum sativum* L. en las que además redujo la enfermedad de la pudrición de la raíz en plantas de guisante inoculadas con *Fusarium avenaceum* y *Peyronellaea pinodella*.

2.6 Biología e importancia del género *Fusarium*

El género *Fusarium* se describió por primera vez por Link (1809), pertenece al filo *Ascomycota*, clase *Ascomycetes*, orden *Hypocreales*, mientras que los teleomorfos de las especies de *Fusarium* se clasifican en su mayoría en el género *Gibberella*, y para un número menor de especies, los géneros *Hemanectria* y *Albonectria* (Leslie y Summerell, 2006; Moretti, 2009).

Además, de la identificación molecular, un enfoque para la clasificación de especies del género *Fusarium* es la morfológica, en base a la generación de las esporas asexuales y sexuales en los teleomorfos. Generalmente, algunas especies pueden llegar a producir tres tipos de esporas asexuales: macroconidio, microconidio y clamidiosporas, comúnmente la morfología de las macroconidias es la principal característica para la identificación de las especies de este género mientras que las microconidias y clamidiosporas, se considera su presencia-ausencia como un carácter morfológico secundario (Nelson et al., 1994; Moretti, 2009). Las especies de *Fusarium* están ampliamente distribuidas en el suelo y en partes subterráneas y aéreas de las plantas, restos de plantas y otros sustratos orgánicos, los cuales son comunes en regiones tropicales, templadas, desérticas e incluso en el ártico. A menudo son considerados como hongos transmitidos por el

suelo debido a su abundancia en el mismo y su asociación frecuente con las raíces de las plantas, ya sea como saprófitos o parásitos causando enfermedades en varios cultivos de importancia agrícola, incluyendo los cereales (Nelson et al., 1994).

Sin embargo, existen algunos reportes de especies de este género con actividad pasiva, que pueden llegar a interactuar con las plantas sin llegar a ocasionarles algún daño fisiológico. En un estudio realizado por Thongkamngam y Jaenaksorn (2017), evaluaron la eficacia de la cepa no patogénica de *F. oxysporum* F221-B, como un posible agente de control biológico contra hongos fitopatógenos, que ocasionan marchitamiento y podredumbre de la raíz de lechuga, en su estudio encontraron que la cepa F221-B reduce la incidencia y severidad de la enfermedad en un 60 a 80 % en comparación con el control inoculado con los patógenos, además F221-B promovió significativamente el crecimiento en 3 variedades de lechuga.

2.7 Importancia del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) var. mirasol

México es considerado un país con una gran diversidad vegetal, además también representa el centro de origen y domesticación de diversas plantas cultivadas. Dentro de las primeras plantas domesticadas se encuentra el chile (*Capsicum annuum* L.) perteneciente a la familia Solanaceae. El género *Capsicum* incluye 33 especies y 10 variedades siendo la especie *Capsicum annuum* la de mayor importancia (Castellón-Martínez, 2014).

El chile se cultiva como una planta herbácea anual, posee tallos delgados, lampiños y erguidos. Las hojas son enteras lanceoladas u ovales, mientras que las flores son solitarias, hermafroditas e hipóginas y por lo general pentámeras. Particularmente el chile variedad guajillo presenta frutos (bayas huecas) delgados, largos y puntiagudos con una longitud de 12 cm, aunque puede variar de acuerdo con el tipo y las condiciones de cultivo (Galindo y Cabañas, 2006; Montes-Hernández, 2010).

En México, las entidades de mayor producción de chile son; Sinaloa, Chihuahua, Guanajuato, Sonora y Zacatecas, siendo este último el líder en la producción de chile seco (*C. annuum*) variedad guajillo, aportando el 35 % del valor total generado en el sector agrícola (Galindo y Cabañas, 2006). El chile mirasol y/o guajillo es la variedad más cultivada para la producción de chile seco dado que es menos susceptible al ataque de secadera, considerado como un factor limitante de mayor importancia (Velásquez-Valle et al., 2014).

Sin embargo, además del uso de pesticidas químicos para el control de enfermedades de los cultivos de chile, existen alternativas que permiten disminuir el uso de agroquímicos. El control biológico de conservación a través de la diversificación vegetativa (cultivos trampa) es una estrategia efectiva para el manejo de plagas. El cultivo de plantas trampa es un medio empleado como un control biológico de conservación que implica cultivar otra especie en un área seleccionada para atraer plagas del cultivo objetivo, evitando que las plagas alcancen el cultivo y finalmente controlar esa plaga para reducir el daño al cultivo principal. Las diferentes especies de cultivos trampa pueden liberar diferentes metabolitos (rizodepositos) o compuestos volátiles atrayendo microorganismos benéficos o repeliendo agentes patógenos o incluso insectos plaga (Sarkar et al., 2018). La efectividad del cultivo intercalado de chile con maíz empleando como cultivo trampa el maíz ha obtenido grandes resultados en donde el ataque por microorganismos como bacterias, hongos y virus e insectos plaga se ha reducido (Been-Issa et al., 2017).

2.8 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana ha sido el principal sistema de modelo de plantas, lo que ha permitido grandes avances en la comprensión del desarrollo de las plantas, la señalización, la biología de las hormonas, la defensa de patógenos, la resistencia a las enfermedades y la respuesta al estrés abiótico, por nombrar algunos. Además, también es un recurso para el estudio de otros organismos

multicelulares. *A. thaliana* fue la primera planta cuyo genoma fue secuenciado completamente, y el tercer organismo multicelular después de *Caenorhabditis elegans* (Adams et al., 2000; Chang et al., 2017).

Las propiedades que conforman un sistema modelo son de tres tipos (i) el valor económico o las propiedades intrínsecas que se adaptan a las especies elegidas para su uso en el laboratorio, tales como tamaño pequeño, facilidad de cultivo, fecundidad, tiempo de generación corto, capacidad para manipulaciones genéticas como cruce y mutagénesis, genoma pequeño y el potencial para manipular la función del gen, (ii) procedimientos estandarizados y simples para el aislamiento de DNA y RNA, transformación, extracción de proteínas y otros métodos de laboratorio, (iii) la disponibilidad de cepas genéticas, construcciones de genes reporteros, genomas completamente anotados, y repositorios, bases de datos y centros de stock (Chang et al., 2017).

A. thaliana es una planta dicotiledónea pequeña que pertenece a la familia Brassicaceae. Se considera un modelo de estudio ya que presenta muchas ventajas, como un ciclo de vida corto, alrededor de 5 a 6 semanas, produciendo un gran número de semillas que permanecen viables durante varios años, crece en espacios limitados, es fácilmente manipulable para la polinización dirigida. Otra de las ventajas, es que cuenta con uno de los genomas más pequeños del reino vegetal, que codifica alrededor de 29,950 genes distribuidos en 5 cromosomas, además, es un organismo diploide ($2n$) (Adams et al., 2000; Chang et al., 2017).

Para el estudio de la biología molecular, *A. thaliana* es genéticamente manipulada a través de la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Los protocolos de transformación son sencillos y permiten generar plantas transgénicas al introducir genes exógenos provenientes de otras especies de plantas o bien genes endógenos de la misma planta. Además, actualmente se cuenta con una gran variedad de líneas insercionales de T-DNA con pérdida de función lo cual permite estudiar funcionalmente genes de interés (Adams et al., 2000; Chang et al., 2017).

El estudio de la señalización hormonal en plantas se ha enfatizado con mayor detenimiento en líneas transgénicas de *A. thaliana*. Dentro de la gama de hormonas producidas por las plantas, las auxinas son una de las más estudiadas debido a su participación biológica. La línea *DR5::GUS* se ha utilizado para monitorear sitios de acumulación de auxina, la cual constituye un promotor sintético altamente activo (AuxRE) denominado DR5 el cual contiene repeticiones directas en tándem de 11 pb del elemento TGTCTC como elementos de respuesta a auxinas (AuxRE) fusionada al la secuencia GGGGAATTCCCCTGTCTC del gen reportero GUS. La construcción *DR5::GUS* permite estudiar fácilmente el patrón de distribución de auxinas, observando qué zonas y qué tipos celulares son teñidos en azul por la tinción histoquímica de la β -glucuronidasa (Ulmasov et al., 1997).

Por otra parte, el desarrollo de pelos radiculares es esencial para el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*, los cuales ayudan a aumentar el consumo de agua, nutrientes y mejorar el anclaje al suelo. La línea mutante *Rhd6* de *A. thaliana* presenta un fenotipo defectuoso en el desarrollo de pelos radiculares. Estos defectos implican al gen *Rhd6* en la iniciación del pelo de raíz e indican que *Rhd6* está normalmente asociado con el establecimiento o la respuesta a la polaridad de la célula epidérmica de la raíz. Generalmente los pelos radicales son extensiones largas y tubulares de las células epidérmicas de la raíz. El inicio de un pelo de raíz requiere que se establezca un nuevo sitio de expansión celular dentro de la célula epidérmica. En *Arabidopsis*, los pelos radiculares emergen del extremo apical de las células epidérmicas (el extremo más cercano al meristemo de la raíz), lo que implica que estas células estén polarizadas. Se cree que el proceso general de iniciación del pelo de la raíz implica el establecimiento de polaridad dentro de la célula epidérmica, la selección del sitio de iniciación y el transporte dirigido de vesículas de Golgi secretoras que contienen enzimas hidrolíticas y componentes de la pared celular al sitio de iniciación (Masucci y Schiefelbein, 1994).

El fenotipo de la mutante *Rhd6* se revierte cuando se adiciona en el medio de crecimiento auxina (ácido indolacético) o un precursor de etileno (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico). Lo que indica que *Rhd6* normalmente está involucrado en dirigir la selección o ensamblaje del sitio de iniciación del pelo de raíz a través de un proceso que involucra auxina y etileno (Masucci y Schiefelbein, 1994; Feng et al., 2017).

2.7 Antecedentes directos

En México, el maíz es el cultivo de mayor importancia económica y social, tanto por el área cultivada como por su uso para alimentación humana, productos derivados y agroindustria. Actualmente en México, más del 80 % del área sembrada con maíz se encuentra en zonas de temporal, expuesto a condiciones adversas como la sequía, calor, cambios en la distribución de las lluvias entre otros. Como consecuencia de estos cambios climáticos, se han creado condiciones favorables para el desarrollo y reproducción de diversos organismos patógenos del maíz, dando lugar a brotes de plagas y enfermedades, provocando pérdidas de rendimiento del cultivo (SIAP, 2015; SMN, 2015).

El estudio de hongos del género *Fusarium* ha tomado importancia dado que es un patógeno importante del maíz. Las especies de *Fusarium* son parásitos facultativos, que pueden sobrevivir largos periodos como saprófitos en restos vegetales o en estado latente en forma de peritecios y producir esporas sexuales que constituyen el inóculo secundario, el cual es diseminado por el viento durante el cultivo (Niederhauser, 1949).

Con base a lo anterior Briones-Reyes (2017; comunicación personal) aisló a partir de tallo y raíz diversas colonias de hongos filamentosos provenientes de cultivos de maíz del estado de Aguascalientes, con manifestaciones de diferente grado de desarrollo de pudrición de tallo relacionada a *Fusarium* spp con la finalidad de identificar la variabilidad molecular y grado de virulencia de los posibles agentes

causantes de la enfermedad. Además, de hacer una posterior evaluación de germoplasma de maíz que permita identificar fuentes de resistencia genética a esta enfermedad, con las que mediante programas de mejoramiento se pueda obtener maíz resistente y así disminuir el riesgo de pérdidas de producción por efecto de esta enfermedad.

Posteriormente, Chavira-Villegas (2018) para determinar el grado de patogenicidad de las cepas aisladas en un total de 37 hongos filamentosos, realizó una interacción directa *in vitro* en cajas Petri de cada una de las cepas con *Arabidopsis thaliana* (Col-0) durante 12 días, en su estudio encontró que de las 35 cepas aisladas 21 no mostraron ser patógenas para *A. thaliana*, además observó que dichas cepas (no patógenas) promovieron el crecimiento vegetal, mostrando mayor desarrollo de raíz secundaria así como pilosas y un aumento en peso fresco en comparación con las plántulas no inoculadas. Además, en el mismo estudio se realizó la identificación molecular de las cepas aisladas, mediante la amplificación de los ITS (regiones interespaciadoras de los genes ribosomales), en donde encontró que la mayoría de las cepas pertenecen a *Fusarium* spp. A partir de los datos obtenidos de este estudio se seleccionaron dos cepas de hongos P85.T y M102.R, las cuales se identificaron como *Fusarium cf graminearum* y *Fusarium equiseti* respectivamente, mismos que mostraron ser posibles promotores de crecimiento para *A. thaliana* (Chavira-Villegas, 2018).

III. JUSTIFICACIÓN

La producción de alimentos para una población en crecimiento ha generado el uso excesivo de fertilizantes químicos para obtener mejores rendimientos, ocasionando además graves daños al medio ambiente, en base a ello se buscan estrategias que sean ecológicamente compatibles con el medio ambiente.

El uso de microorganismos rizosféricos como agentes de control biológico y estimuladores del crecimiento vegetal, representan una alternativa frente al uso de fertilizantes químicos para una agricultura sostenible. Sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos del mecanismo de acción de diversas moléculas ante la interacción planta-microorganismo relacionadas en el contexto de promoción de crecimiento vegetal.

En base a lo anterior este estudio implantará una visión más detallada sobre los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal de microorganismos (hongos) aislados de la rizosfera de maíz *Zea mays* L. bajo diferentes condiciones de cultivo en plantas dicotiledóneas.

IV. HIPÓTESIS

Las especies de *Fusarium* aisladas de la rizosfera de *Zea mays*, son capaces de estimular el crecimiento vegetal bajo diferentes condiciones de cultivo en *Arabidopsis thaliana* y *Capsicum annuum* var mirasol.

V. OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Evaluar la promoción de crecimiento vegetal de las especies de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) aisladas de la rizosfera de *Zea mays* en *Arabidopsis thaliana* y *Capsicum annuum*.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar morfológicamente las especies de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) aisladas de las plantas de maíz.
- 2) Analizar la promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en *A. thaliana* bajo diferentes condiciones de cultivo.
- 3) Evaluar el efecto de promoción de crecimiento vegetal en la línea *RD5* y *Rhd6* de *A. thaliana* durante la interacción con las especies de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T).
- 4) Caracterizar el fenotipo de promoción de crecimiento vegetal de las especies de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en Chile (*Capsicum annuum*) var. mirasol.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Caracterización morfológica de las especies de *F. equiseti* y *F. cf graminearum*

Para completar el estudio realizado por Chavira-Villegas (2018), se realizó la identificación morfológica de las especies de *Fusarium cf graminearum* (P85.T) y *Fusarium equiseti* (M102.R) como posibles promotores de crecimiento vegetal. La morfología colonial de los hongos se determinó partiendo de aislados en cultivo puro en diferentes medios de cultivo: PDA (por sus siglas en inglés *Potato Dextrose Agar*, Difco®), agar harina de maíz (CA) (Cifuentes-Romo, 1990), agar hojas de clavel (CLA) Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) (Leslie y Summerell, 2006) de los cuales se tomaron en cuenta características tales como: el color y matiz de la superficie en anverso y al reverso de la colonia, textura de la superficie colonial (algodonosa, resupinada, aterciopelada, polvosa (harinosa), crustácea, empapada, embebida, levaduriforme, pegajosa, homogénea o heterogénea, presencia o ausencia de elevación), margen de la colonia (suave, regular, irregular, restringido, difuso), patrón (radiado, en forma de flor o aracnoide), pigmentación y formación de estructuras de resistencia (esporodoquios) (Leslie y Summerell, 2006; Watanabe, 2010).

El análisis de las características microscópicas se realizó mediante la técnica de microcultivo. Finalmente, el análisis *in situ* de las estructuras de reproducción de los hongos, tipos de conidios y características fenotípicas de las hifas fueron observadas en microscopio de luz con objetivo de 100x. La observación se llevó a cabo tanto en microcultivos teñidos con colorante azul de algodón, así como sin teñir, tomándose registro fotográfico.

6.2 Análisis de la promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de los dos hongos de *Fusarium* spp en *Arabidopsis thaliana*

6.2.1 Esterilización y germinación de las semillas de *A. thaliana*

Inicialmente se lavaron las semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 con una solución de hipoclorito de sodio al 20 % (cloro comercial) por 5 min en agitación. Posteriormente, se decantó el cloro y se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril en agitación por 5 min. Las semillas desinfectadas se pusieron a 4 °C por tres días para vernalización (adquisición o aceleración de la germinación de la semilla con empleo de un tratamiento de frío).

Transcurrido el tiempo de vernalización de las semillas de *A. thaliana*, se colocaron en cajas de Petri que contenían medio sales MS 0.2X (Murashige y Skoog, 1962) (Phyto Technology Laboratories) con agar al 1 % y sacarosa al 0.6 % ajustado a un pH de 7. Las placas se colocaron verticalmente en un ángulo de 65° en cámaras bioclimáticas con un fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad a una temperatura de 23 °C durante siete días, con la finalidad de permitir el crecimiento de la parte de la raíz a lo largo de la superficie del agar y el crecimiento de la parte aérea.

6.2.2 Inoculación de las plántulas de *A. thaliana* con las especies de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T)

Para evaluar la promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de los hongos de las cepas P85.T y M102.R, se utilizó como modelo vegetal *A. thaliana* ecotipo Col-0. Las plántulas de 7 días de edad fueron trasplantadas a cajas divididas (5 plántulas por caja), las cuales se desarrollaron en diferentes condiciones: 1) Control, colocando en un lado de la caja Petri solamente las plántulas en medio MS sin el inóculo del hongo 2) Interacción directa (At-Mo), creciendo del mismo lado tanto plántulas como el hongo en medio sales MS, 3) Interacción indirecta (At/MS-Mo),

conteniendo en ambos lados de la caja Petri medio sales MS, desarrollándose en un lado las plántulas, y en el otro lado en el centro del extremo dividido se inocula al microorganismo (Mo) y 4) Interacción indirecta (At/PDA-Mo), colocando medio sales MS en un lado de la caja Petri en donde se desarrollaron las plántulas y en el otro lado colocando PDA en donde se inoculó el hongo (adición de esporas obtenidas de CA).

La densidad de inoculación del hongo P85.T y M102.R fue de 1×10^6 esporas/mL. Después de inocular cada una de las placas, estas se colocaron en las cámaras de crecimiento bajo las condiciones mencionadas anteriormente. La promoción de crecimiento vegetal se evaluó a los 7 dpi (días post-inoculación) transcurrido el tiempo de inoculación se prosiguió a realizar las mediciones de los parámetros vegetativos.

6.2.3 Análisis de los parámetros de crecimiento y desarrollo de las plantas inoculadas

El análisis de los diferentes parámetros vegetativos se realizó empleando tres réplicas de *A. thaliana* con 5 plántulas por caja a los 7 días post-inoculación (dpi) con los hongos. Los factores a evaluar fueron la interacción directa (At-Mo), indirecta en MS (At/MS-Mo) e interacción indirecta en PDA (At/PDA-Mo), así como el control (plántulas sin el inóculo del hongo). Los parámetros vegetativos (variables de respuesta) analizados fueron: longitud de raíz (cm), número de raíces secundarias y peso fresco (mg) (Figura 4). Además, se tomó registro fotográfico de la arquitectura de la raíz con un estereoscopio (LABOMED®).

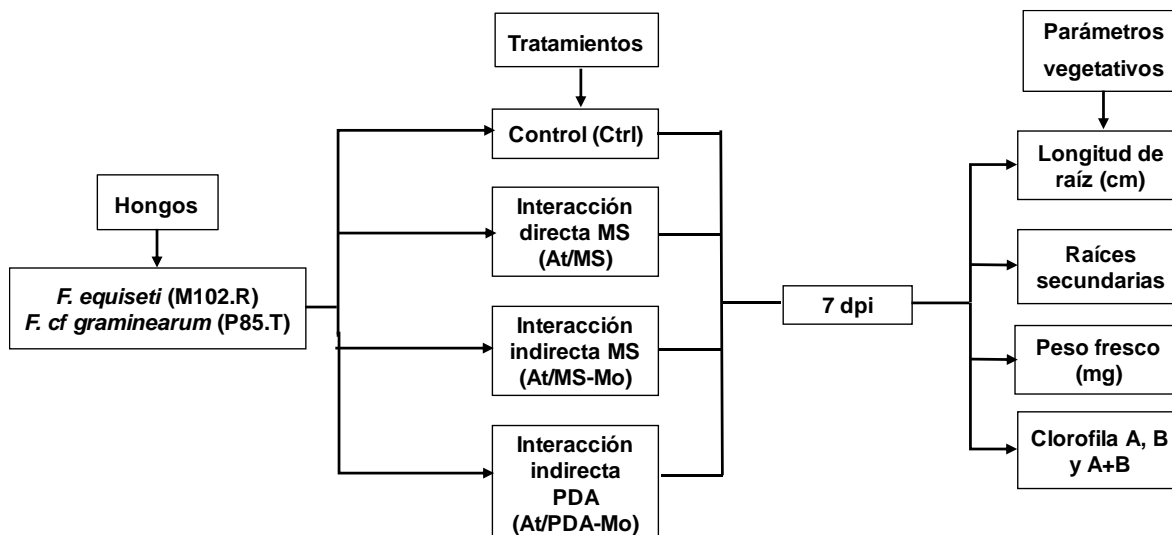


Figura 4. Diseño experimental de la interacción *A. thaliana*-*Fusarium* spp.

6.2.4 Extracción y cuantificación de clorofila

El ensayo para la medición de la clorofila se realizó en plántulas de *A. thaliana* que estuvieron inoculadas con las especies de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en la interacción directa (At-Mo) e indirecta en MS (At/MS-Mo) y PDA (At/PDA-Mo) después de los 7 dpi así como de los controles. El total de la clorofila fue extraído de las hojas de *A. thaliana* usando N, N-9 dimetilformamida (DMF) por 24 h en agitación orbital a 1,000 rpm a 4 °C en obscuridad, las concentraciones de clorofila a y b fueron medidas simultáneamente por espectrofotometría. Las mediciones se realizaron a 664 nm y 647 nm, respectivamente, el contenido de clorofila a y b, y clorofila total (a + b) se determinó mediante las siguientes formulas (Zhang y Huang, 2013):

$$\text{Clorofila A} = 12.7 \times A_{664} - 2.79 \times A_{647}$$

$$\text{Clorofila B} = 20.7 \times A_{647} - 4.62 \times A_{664}$$

$$\text{Clorofila total (A + B)} = 17.90 \times A_{647} + 8.08 \times A_{664}$$

Para la extracción y cuantificación de la clorofila de las plántulas de *A. thaliana* se tomaron de las interacciones directa (At-Mo), indirecta en MS (At/MS-Mo) e

interacción indirecta en PDA (At/PDA-Mo), así como el control (plántulas sin el inóculo del hongo).

6.4 Promoción del crecimiento vegetal mediante exudados (metabolitos) de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T)

6.4.1 Condiciones de cultivo de las cepas de *Fusarium* spp

Para analizar la promoción de crecimiento vegetal de los metabolitos (exudados), los cuales se obtuvieron a partir de cultivos en medio líquido PDB y MS de las cepas de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T). Inicialmente, se prepararon inóculos por separado con 1×10^6 esporas/mL en 200 mL de las dos cepas de *Fusarium* en medio líquido (PDB, Difco®) y medio sales MS (líquido) en agitación orbital a 200 rpm a 28 °C por 72 h.

6.4.2 Condiciones de cultivo vegetal con los exudados *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T)

Después del tiempo de incubación se recuperó el sobrenadante de cada condición de cultivo (PDB y MS) bajo condiciones de esterilidad. Inicialmente, los inóculos se pasaron por una gasa estéril para separar el micelio del sobrenadante, después se realizaron tres filtrados utilizando filtros de 0.22 μm (Milles-GP®) con la finalidad de evitar la contaminación con micelio o esporas. A partir de los filtrados recuperados (PDB y MS) se realizaron diluciones seriadas de 1:10, 1:100, y 1:1,000, para la dilución 1:10 se tomaron 10 mL del filtrado y/o metabolito concentrado ([]) mezclándolo con 90 mL de PDB (hongo) y/o MS (líquido) durante 1 min. Para las siguientes diluciones se llevó a cabo el mismo procedimiento, tomando 10 mL de la dilución anterior.

Para la preparación de las cajas con los filtrados, se tomaron 30 mL del cultivo concentrado (exudado) o de las diluciones de los filtrados y 30 mL de MS sólido

concentrado (preparado a una concentración para 60 mL ajustado a un pH 7). Posteriormente, una vez preparadas las cajas, se prosiguió a trasplantar 10 plántulas de 7 días de crecimiento a cada caja, los ensayos se hicieron por triplicado y como control se pusieron tres réplicas en MS sin la adicción de los filtrados como se indica en el cuadro de diseño experimental (Figura 5). A los 7 días de desarrollo en los medios, se analizaron los parámetros vegetativos mencionados en la sección 6.2.3.

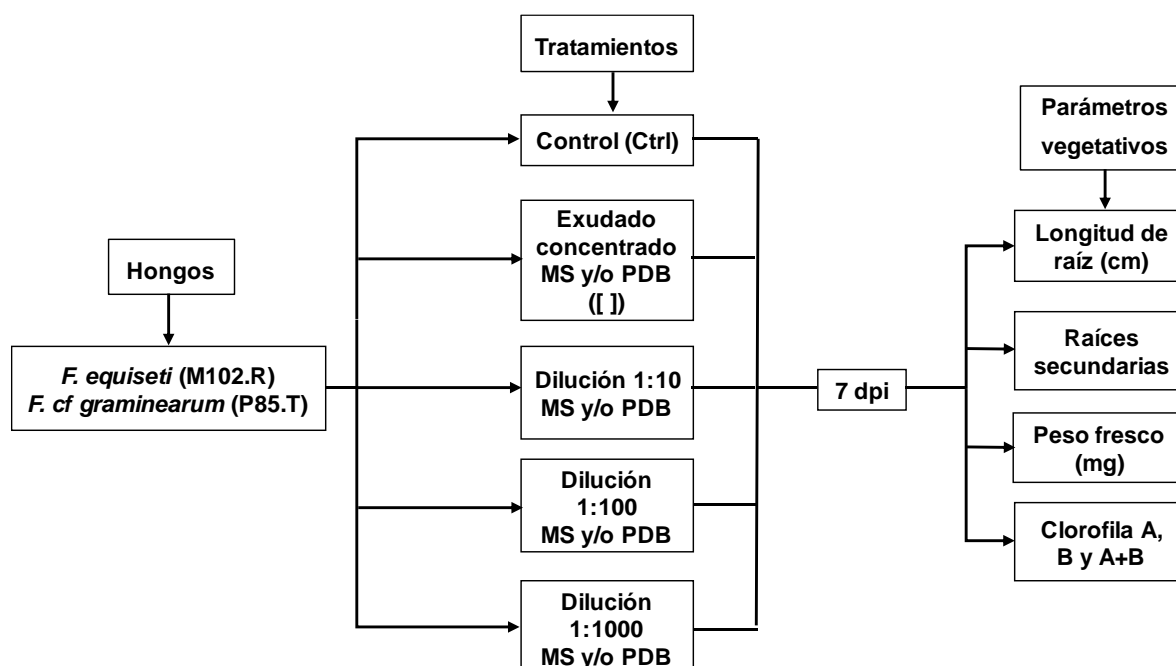


Figura 5. Diseño experimental de los exudados de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en plántulas de *A. thaliana*.

6.5 Análisis histoquímico de la actividad de la línea reportera *DR5::GUS* y *Rhd6*

Las semillas de la línea reportera *DR5::GUS* (monitoreo de respuestas a auxinas) se germinaron en medio MS 0.2X a pH7 y se vernalizaron 3 d a 4 °C, y a los 7 días de crecimiento se trasplantaron bajo las diferentes condiciones de interacción mencionadas en la sección 6.2.2. Después de los 5 días de la interacción con las cepas de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T), se recolectaron las

plántulas de la línea reportera y se incubaron durante 16 hrs a 37 °C en un buffer de reacción GUS, el cual contiene fosfato de sodio 1 M (pH 7.0), EDTA 0.5 M (pH 8), Triton-X, ferrocianuro de potasio 100 mM) y X-Gluc 100 mM (Jefferson et al.,1987). Después del periodo de incubación se retiró el reactivo de GUS y se agregó NaOH al 7 % y etanol al 60 % durante 20 min, después se retiró la solución anterior y se procedió a realizar distintos lavados con etanol (EtOH) a diferentes concentraciones en el siguiente orden: EtOH 70 % durante 1 h, EtOH 40 % durante 1 h, 20 % durante 1 h, EtOH 10 % durante 1 h, glicerol al 25 % y etanol al 5 % durante 1 h y finalmente se adicionó glicerol al 50 % (Malamy y Benfey 1997).

Por otra parte, para la línea reportera *Rhd6* (Masucci y Schiefelbein, 1994) se realizó el mismo procedimiento de germinación y transcurridos los 3 días de crecimiento se trasplantaron bajo las diferentes condiciones mencionadas en la sección 6.2.2. Posteriormente, después de los 5 días de la interacción con las dos cepas de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) se tomó registro fotográfico de la arquitectura de la raíz para observar la generación de pelos radiculares en las plántulas de la línea reportera *Rhd6* de cada tratamiento utilizando un microscopio estereoscópico (LABOMED). Para cada línea reportera y para cada tratamiento, se analizaron al menos 9 plantas.

6.6 Caracterización del fenotipo de promoción de crecimiento vegetal de *C. annuum* inoculados con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T)

Para caracterizar el fenotipo de promoción de crecimiento vegetal de las plantas de chile (*C. annuum* L.) variedad mirasol se llevó a cabo la inoculación con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T). Inicialmente, se esterilizaron las semillas de chile siguiendo la misma metodología aplicada a las semillas de *Arabidopsis* (sección 6.2.1). Posteriormente, las semillas de chile se sembraron en charolas de plástico con sustrato de Metro-Mix y Vermiculita (3:1). Una vez que las plántulas de chile desarrollaron las primeras hojas verdaderas, se trasplantaron a macetas con el mismo sustrato y se dejaron durante una semana para su etapa de

adaptación en cámaras bioclimáticas con un fotoperiodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad a una temperatura de 22 °C ± 2, y transcurrido el tiempo, se prosiguió a inocular con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T).

6.6.1 Inoculación de las plantas de chile con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T)

Para analizar la promoción de crecimiento en plantas de chile, se inocularon con ambas cepas de hongos, los cuales se crecieron inicialmente en cajas Petri en agar harina de maíz (CA) por 7 días a 28 °C. Posteriormente, las esporas fueron recolectadas en agua destilada estéril y se cuantificó la densidad total de estas; a partir de las cuales se tomó la cantidad necesaria para tener una densidad ajustada a 1×10^7 esporas/mL y se aplicó entre las raíces de cada plántula en las macetas. El análisis de la promoción de crecimiento vegetal se realizó con siete plantas de chile mirasol inoculadas con cada uno de los hongos. Después de la inoculación con la suspensión de esporas, las plantas de chile se pusieron en cámaras bioclimáticas con un fotoperiodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad a una temperatura de 22 °C ± 2.

6.8.2 Análisis estadístico de la promoción de crecimiento vegetal de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en *A. thaliana* y chile mirasol

El análisis estadístico de la promoción de crecimiento vegetal de las dos especies de hongos ante la interacción directas en MS e indirectas en MS y PDA, así como de los exudados se llevó a cabo por ANOVA de un factor, las variables de respuesta fueron: longitud de la raíz primaria, número de raíces secundarias y peso fresco. De igual manera el análisis estadístico se llevó a cabo para la cuantificación de clorofila, tomando como variables de respuesta la cuantificación de los niveles de clorofila a, b y clorofila total a + b.

Del mismo modo los parámetros vegetativos de la promoción de crecimiento de chile mirasol se monitorearon a distintos tiempos: 15, 30, 45 y 60 dpi (Figura 6)

bajo el mismo procedimiento estadístico tomado como variables de respuesta, longitud de tallo y raíz, número de hojas, botones, flores y frutos, así como la generación de peso fresco y seco (área foliar y raíz). Las letras indican diferencias significativas entre cada condición ($p < 0.05$), estas diferencias fueron determinadas mediante la prueba de Tukey en el programa GraphPad versión del *software* 6.0.

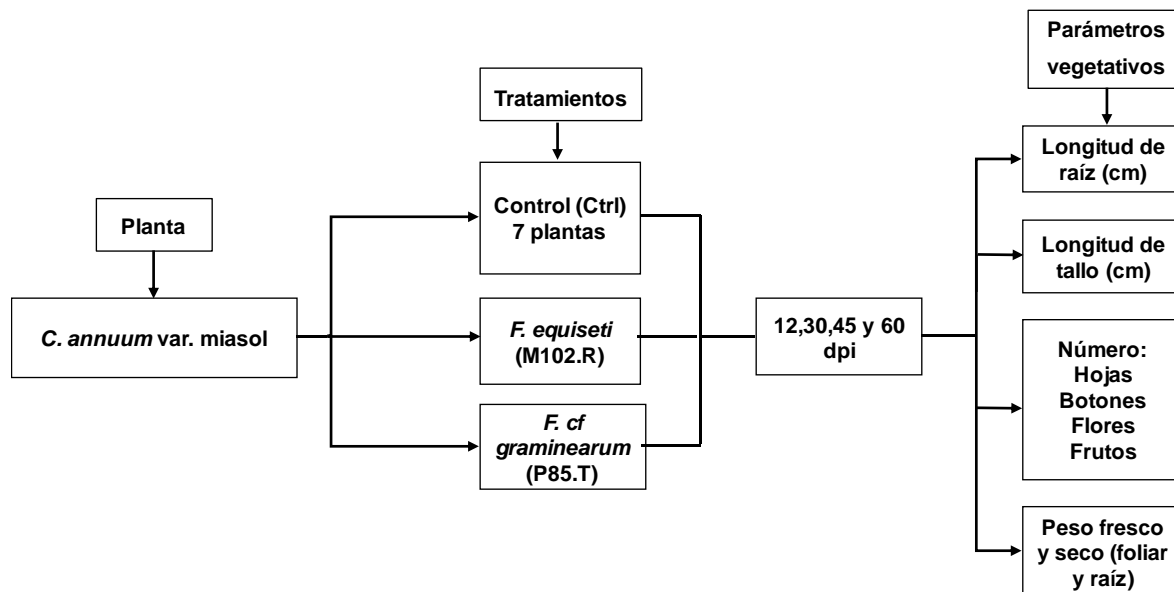


Figura 6. Diseño experimental de la promoción de crecimiento vegetal de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en chile mirasol.

VII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio se presentan en tres secciones: 1) Identificación morfológica de los hongos filamentosos aislados a partir de la rizosfera de maíz, 2) Análisis de la promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de las dos cepas fúngicas bajo diferentes condiciones de cultivo en *Arabidopsis thaliana* y 3) Caracterización del fenotipo de promoción de crecimiento vegetal de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en *Capsicum annuum* variedad mirasol.

7.1 Identificación fenotípica de los hongos filamentosos aislados de la rizosfera de maíz como promotores del crecimiento vegetal

Inicialmente las cepas M102.R y P85.T fueron identificadas molecularmente mediante la amplificación y secuenciación de los ITS como *F. equiseti* y *F. cf graminearum* respectivamente, por Chavira-Villegas (2018). Posteriormente, para completar la identificación de las dos cepas, se realizó la identificación morfológica con base en el crecimiento colonial que desarrollaron en los diferentes medios de cultivo PDA, CA, SNA y CLA.

Después de la caracterización morfológica colonial se hicieron microcultivos de las dos cepas fúngicas para observar las estructuras de reproducción *in situ* mediante microscopia de luz obteniendo fotografías de las estructuras de cada cepa, tomando imágenes en 100x. A partir de la observación y revisión bibliográfica se logró corroborar el género y/o especie al que pertenece cada uno de los aislados. A continuación, se describe la caracterización macroscópica y microscópica de cada una de las cepas de *Fusarium* sp.

7.1.1 Caracterización macro y microscópica de M102.R (*Fusarium equiseti*)

El crecimiento de la cepa M102.R (*Fusarium equiseti*) en medio PDA (Figura 7A), desarrolló una colonia de color blanco con un tono ligeramente amarillo en el centro por el lado anverso y color beige en el reverso. La textura de la superficie colonial es algodonosa con abundante micelio aéreo (cultivo posterior a 7 días), presentando un patrón floral de margen suave e irregular. Por otra parte, el desarrollo de M102.R en agar harina de maíz (CA) desarrolló una colonia de color blanco de rápido crecimiento con elevación desde el inicio del crecimiento mostrando un patrón radial y de margen regular y de textura algodonosa, presentando abundante micelio aéreo (Figura 7B). El crecimiento de M102.R en medio SNA mostró un rápido crecimiento (5 días) de color blanco anverso y reverso con una textura algodonosa presentando un patrón y margen radial (Figura 7C). En medio CLA (Figura 7D) el crecimiento es lento y de textura ligeramente aterciopelada presenta, además, un margen irregular y difuso sin desarrollo de esporodoquios.

Microscópicamente en medio CA se logró observar micelio hialino, liso, ramificado y septado estos últimos largos entre sí, por otro lado, el micelio aéreo es cenocítico y liso (Figura 7E). Simultáneamente en el mismo medio de cultivo fue posible apreciar la presencia de macroconidios (después de siete días de incubación a 28 °C) curvados en forma de canoa (4-5 septos transversales) los macroconidios se identificaron con una célula apical con extremo romo y una célula basal en forma de pie generadas a partir de una monofiálide (Figura 7G). La presencia de clamidosporas se observó en cultivos viejos después de dos semanas de incubación a 28 °C en medio CLA de aspecto rugoso agrupadas en pares o en racimos (Figura 7F y H). Por otra parte, en medio SNA se observó la presencia de microconidios globosos hialinos y lisos (Figura 7I).

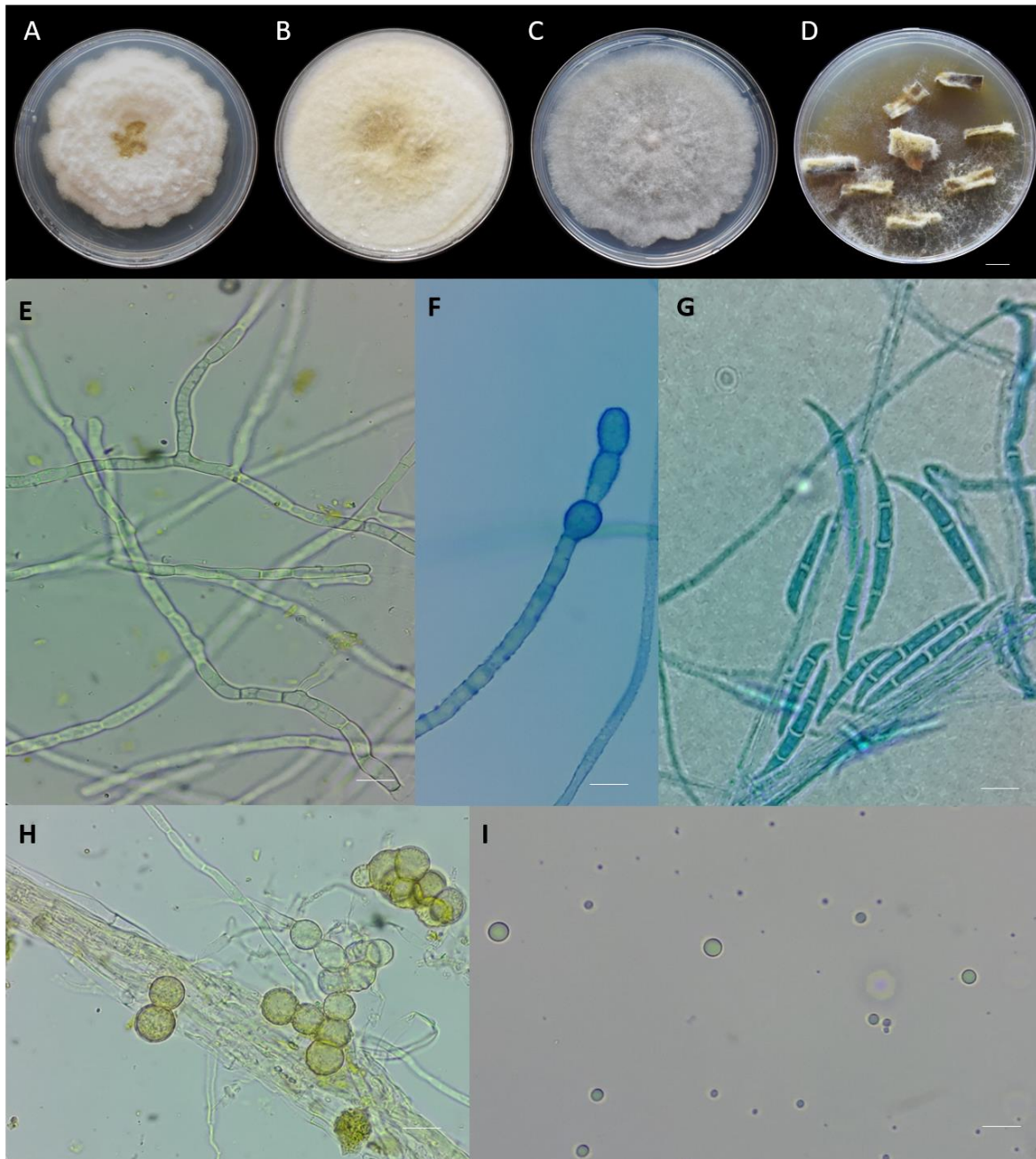


Figura 7. Caracterización macro y microscópica de M102.R (*F. equiseti*). **A)** Morfología colonial de M102.R en medio PDA (Barra 1 cm). **B)** Morfología colonial de M102.R en medio CA (Barra 1 cm). **C)** Morfología colonial de M102.R en medio SNA (Barra 1 cm). **D)** Morfología colonial de M102.R en medio SNA. (Barra 1 cm). **E)** Micelio hialino y septado en medio CA (100x en campo claro: Barra 10 μm). **F y H)** Clamidosporas terminales e intercalares en medio CLA (100x en azul de algodón y campo claro: Barra 10 μm). **G).** Macroconidios en medio OA (100x en azul de algodón). **G).** Microconidios en medio SNA (100x en campo claro: Barra 10 μm).

7.1.2 Caracterización macro y microscópica de P85.T (*Fusarium cf graminearum*)

El crecimiento de la cepa P85.T (*Fusarium cf graminearum*) en agar PDA (Figura 8A), desarrolló una colonia de lento crecimiento color rojo con un tono ligeramente naranja en la periferia de la colonia por el lado anverso. La textura de la superficie colonial es plana en cultivos jóvenes y ligeramente aterciopelada, conforme envejece el cultivo desarrolla micelio aéreo adquiriendo una textura algodonosa, mientras que el margen es irregular. El crecimiento de P85.T, en medio agar harina de maíz (CA) desarrolló una colonia de color rojo y naranja de rápido crecimiento (5 días) de textura aterciopelada y ligeramente algodonosa (Figura 8B), el crecimiento en agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) (Figura 8C), mostró una colonia de una tonalidad blanco y roja, planas y ligeramente aterciopeladas y con poco micelio aéreo. En medio CLA (Figura 8D) el crecimiento es lento y de textura ligeramente aterciopelada presenta, además, un margen irregular y difuso sin desarrollar esporodoquios.

Para la caracterización microscópica del aislado P85.T se partió de microcultivo en cultivo puro en medio CA logrando determinar la presencia de micelio hialino, liso y septado (Figura 8E), además, se observaron macroconidios principalmente septadas (4 septos) y curvadas en forma de canoa con una célula apical en forma roma y con una célula basal en forma de pie (Figura 8E), los macroconidios surgen a partir de polifialides ancladas directamente del micelio (Figura 8F y G).

Así mismo, conforme envejece la colonia (14 días) en medio CLA es posible apreciar la presencia de clamidosporas, un tipo de espora asexual que funcionan como esporas de resistencia y se encuentran localizadas de manera intercalar y terminal, generalmente solitarias o en cadena (Figura 8H), mientras que en medio SNA un medio de cultivo que permite determinar la presencia-ausencia de microconidios determinó que surgen principalmente del micelio aéreo, hialinos y globosos, aunque se presentan en menor cantidad que los macroconidios presentes mientras el cultivo es joven (Figura 8I).

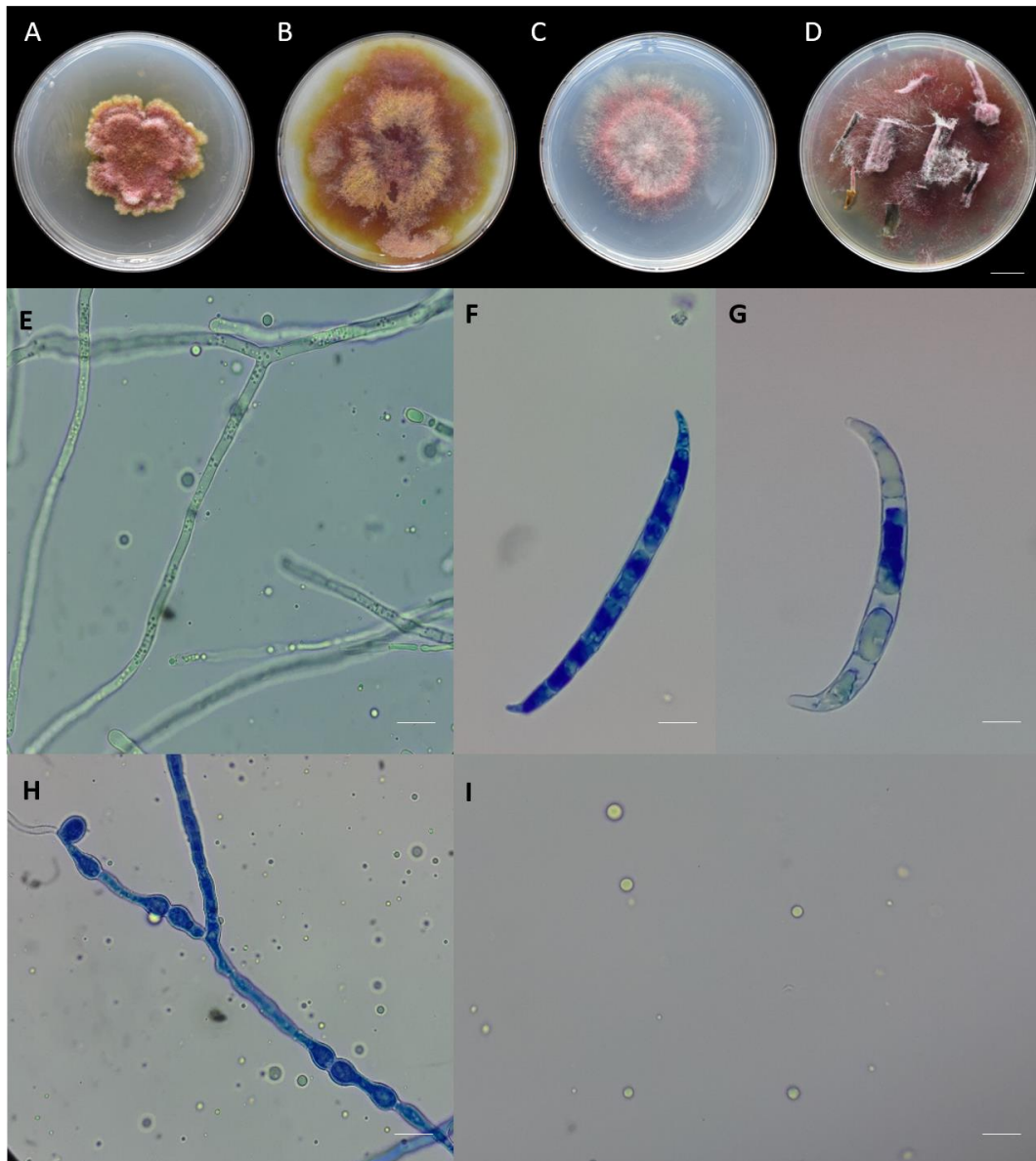


Figura 8. Caracterización macro y microscópica de P85.T (*F. cf. graminearum*). **A)** Morfología colonial P85.T en medio PDA. (Barra 1 cm) **B)** Morfología colonial P85.T en medio CA. (Barra 1 cm) **C)** Morfología colonial P85.T en medio SNA (Barra 1 cm). **D)** Morfología colonial en medio SNA (Barra 1 cm). **E)** Micelio hialino y cenocítico en medio CA (100x en campo claro: Barra 10 μ m). **F** y **G)** Macroconidios en medio CA (100x en azul de algodón: Barra 10 μ m). **H)** Clamidosporas intecalares y terminales en medio CLA (100x en azul de algodón Barra 10 μ m). Microconidios en medio SNA (100x en campo claro: Barra 10 μ m).

7.2 Promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en plántulas de *A. thaliana*

Con el fin de evaluar el efecto de la promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de los dos hongos de *F. equiseti* y *F. cf graminearum* (M102.R y P85.T, respectivamente) en *A. thaliana*, se analizaron en cuatro condiciones de crecimiento experimentales: (i) Interacción directa (At-Mo), (ii) Interacción indirecta en sistema dividido cultivando de un lado el hongo en medio MS (At/MS-Mo) (iii) Interacción indirecta en sistema dividido cultivando de un lado el hongo en medio PDA (At/PDA-Mo) y (iv) Plántulas de control cultivadas sin el inóculo del hongo (Ctrl). Los parámetros vegetativos se analizaron a los 7 dpi, con la finalidad de evaluar el efecto los dos hongos de *Fusarium* spp en plántulas de *A. thaliana*.

7.2.1 Promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de *Fusarium equiseti* (M102.R) en plántulas de *A. thaliana*

El efecto de promoción de crecimiento vegetal de *F. equiseti* (M102.R) en plántulas de *A. thaliana*, se evaluó a los 7 dpi bajo las condiciones mencionadas anteriormente. En la figura 9, se muestra el fenotipo de las plántulas de *A. thaliana* que fueron inoculadas directa e indirectamente con *F. equiseti*, las cuales no mostraron síntomas de marchitamiento u otros síntomas perjudiciales a pesar de que este hongo es considerado como un fitopatógeno. Además, se pudo observar visualmente un mayor desarrollo tanto de la longitud de raíz como de las raíces secundarias (Figura 9B, C y D), comparando con las plantas no inoculadas (Control; Figura 9A).

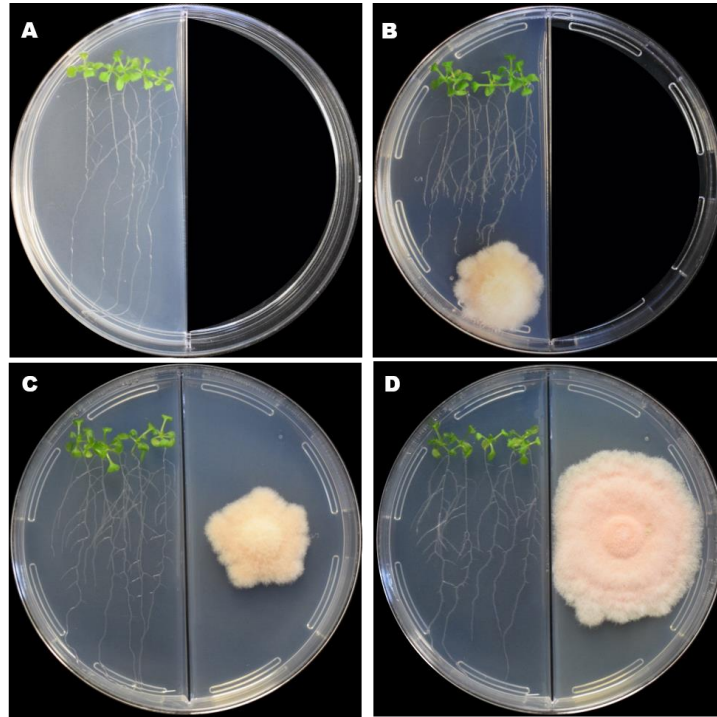


Figura 9. Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de *F. equiseti* (M102.R) en *A. thaliana* a los 7 dpi. **A)** Control, plántulas sin inocular, **B)** At-M102.R, Interacción directa, **C)** At/MS-M102.R, Interacción indirecta en MS y **D)** At/PDA-M102.R, Interacción indirecta en PDA.

Los resultados del análisis de los parámetros vegetativos a los 7 dpi de las plantas de *A. thaliana* inoculadas, así como las plantas control (sin inocular), se muestran en la figura 10. En el caso de la longitud de la raíz primaria, se puede observar que no hubo diferencias significativas comparando con las plántulas control (Figura 10A), sin embargo, en las raíces secundarias se generó en promedio un aumento de 14.8, 15.5 y 12.4 raíces en los sistemas de interacción At-M102.R, At/MS-M120.R y At/PDA-M102.R respectivamente, comparadas con el control donde solo se desarrollaron 7 raíces secundarias ($F=79.56$, $p<0.0001$) (Figura 10B).

En análisis del peso fresco, demostró que las plantas inoculadas en los tres sistemas de interacción At-M102.R, At/MS-M102.R y At/PDA-M102.R aumentaron un 38.71, 80.6 y 59.22 % respectivamente, a diferencia del control ($F=74.35$, $p<0.0001$) (Figura 10C). De esta manera, comparando cada uno de los sistemas de interacción, se observó que el sistema At/MS-M102.R mostró mayor efecto de

promoción de crecimiento sobre las plántulas de *A. thaliana*, en donde el hongo crece en medio sales MS, el cual no es un medio óptimo de crecimiento para el hongo, sin embargo, pudiera producir diferentes compuestos difusibles y/o compuestos volátiles, los cuales pudieran favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas de *A. thaliana* comparado con el sistema At/PDA-M102.R en donde crece en su medio óptimo de crecimiento.

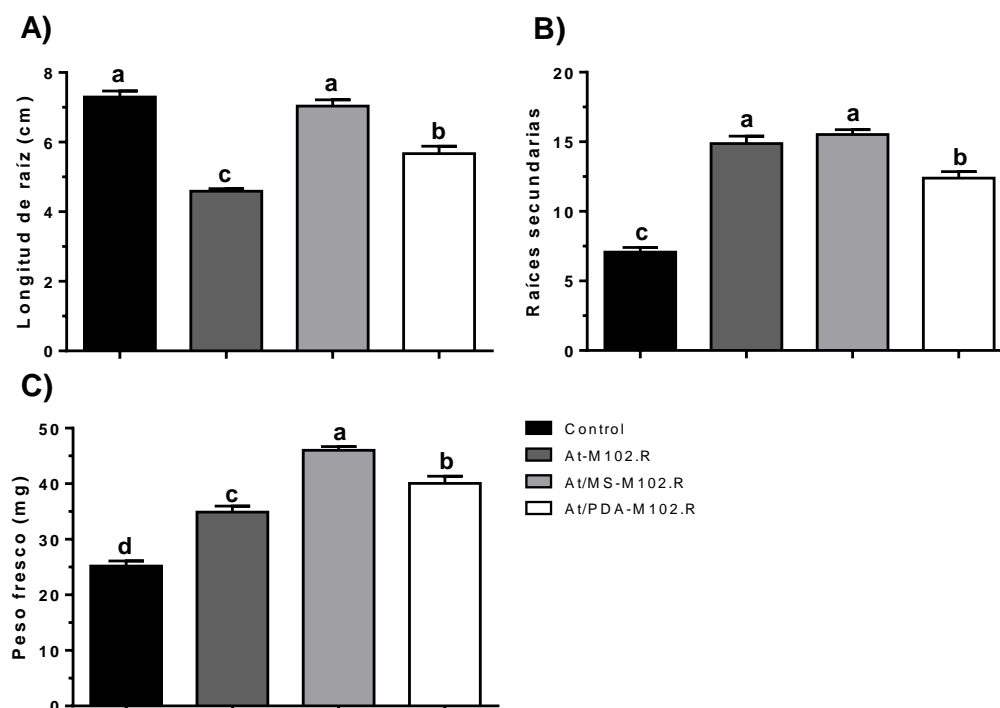


Figura 10. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de *A. thaliana* inoculada con *F. equiseti* (M102.R). **A)** Longitud de raíz, **B)** Raíces secundarias y **C)** Peso fresco. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Plántulas sin inocular (control), Interacción directa At-M102.R, Interacción indirecta en MS (At/MS-M102.R) e Interacción indirecta en PDA (At/PDA-M102.R). Las barras representan el promedio de 5 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p < 0.0001$).

El efecto de la inoculación de M102.R (*F. equiseti*) en la arquitectura de la raíz se muestra en todos los sistemas de interacción (Figura 11), en donde se puede observar que en las plantas inoculadas con el hongo en los tres sistemas mostraron un mayor número de raíces secundarias y de pelos radiculares, aunque

visualmente este efecto fue mucho mayor en la interacción indirecta (At/Ms-M102.R) en comparación del control (Figura 11C).

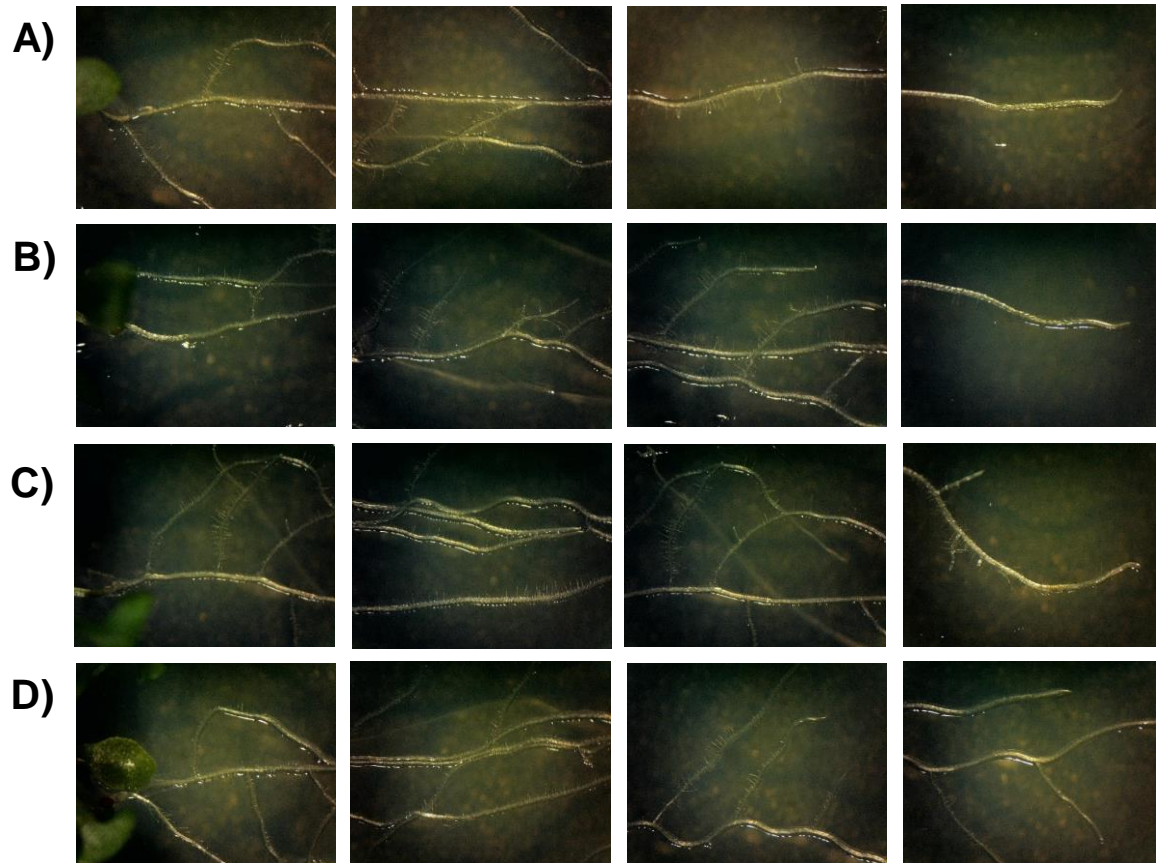


Figura 11. Arquitectura de la raíz de *A. thaliana* inoculada con *F. equiseti* (M102.R) a los 7 dpi. **A)** Control, **B)** At-M102.R, Interacción directa en MS, **C)** At/Ms-M102.R, Interacción indirecta en MS y **D)** At/PDA-M102.R, Interacción indirecta en PDA. Fotografías tomadas con un estereoscopio a los 7 dpi.

Además, otro dato el cual indicaría que hay algún efecto dañino o benéfico por parte del hongo hacia la planta es la producción de la clorofila. Después de los 7 dpi se realizó la extracción y cuantificación de la clorofila A, B y total A + B, en los tres sistemas de interacción At-M102.R, At/MS-M102.R y At/PDA-M102.R, así como en el control. En la figura 12A, B y C, se observa que en los tres sistemas de inoculación la producción de clorofila aumenta respecto al control ($F=14274$, $p<0.0001$).

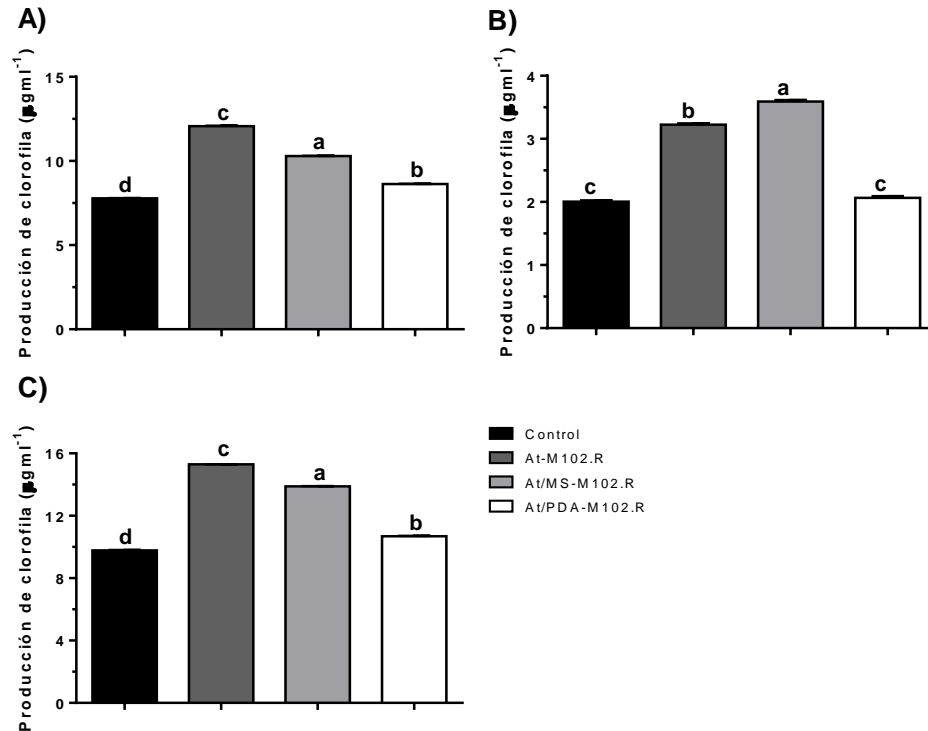


Figura 12. Cuantificación de clorofila de las plántulas de *A. thaliana* inoculadas con *F. equiseti* (M102.R). **A)** Clorofila A, **B)** Clorofila B y **C)** Clorofila total A + B. Las diferentes condiciones de crecimiento: Plántulas sin inocular (control), Interacción directa At-M102.R), Interacción indirecta en MS (At/MS-M102.R) e Interacción indirecta en PDA (At/PDA-M102.R). Las barras representan el promedio de 5 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. (Tukey, $p < 0.0001$).

7.2.2 Promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de *Fusarium cf graminearum* (P85.T) en plántulas de *A. thaliana*

Del mismo modo se analizó la promoción de crecimiento vegetal de *F. cf graminearum* (P85.T) en *A. thaliana* bajo las diferentes interacciones mencionadas anteriormente a los 7 dpi. La respuesta de *Arabidopsis* inoculada con la cepa de *F. cf graminearum* mostraron un efecto promotor en el desarrollo de las plantas. En la figura 13, se muestra el fenotipo de las plantas control, así como el de las plantas inoculadas con el hongo P85.T. En el sistema de interacción At-P85.T, se observó un efecto en la disminución en la longitud de la raíz primaria, sin mostrar efecto negativo en el desarrollo de raíces secundarias (Figura 13B). En lo que respecta a la longitud de la raíz durante esta interacción, se observó que las cofias de la raíz

de las plantas se doblaron, tratando de evitar el contacto con el micelio del hongo, lo cual pudiera deberse a algún compuesto difusible producido por el hongo, el cual hace que la planta evite el contacto con el hongo. Respecto, a los sistemas de interacción indirecta en medio MS o PDA, se puede observar el fenotipo de las plantas un aumento tanto en la longitud de la raíz como en las raíces secundarias (Figura 13C y D).

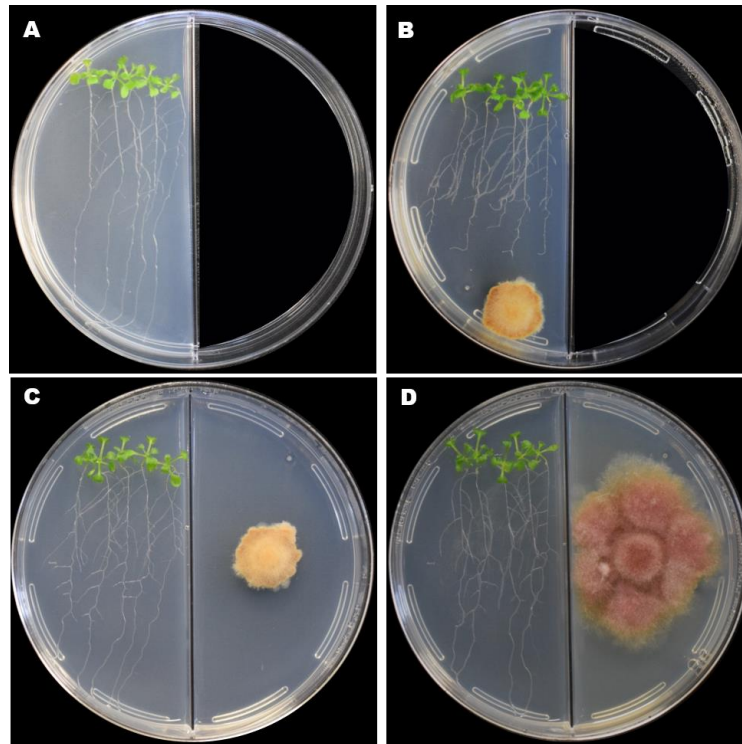


Figura 13. Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de *F. cf graminearum* (P85.T) en *A. thaliana* a los 7dpi. **A)** Control, plántulas sin inocular, **B)** At-P85.T, Interacción directa **C)** At/MS-P85.T, Interacción directa en MS y **D)** At/PDA-P85.T, Interacción indirecta en PDA.

En la figura 14A, se muestra los resultados del análisis de la longitud de raíz, en donde no hay diferencias entre la longitud de la raíz de las plantas control con las plantas en los tres sistemas de interacción, incluso en el sistema At-P85.T se mostró una disminución de la longitud de la raíz del 44.72 %. Sin embargo, en el número de las raíces secundarias aumento en los tres sistemas de interacción At-P85.T, At/MS-P85.T y At/PDA-P85.T en un promedio de 14.2, 14 y 12 raíces respectivamente, comparada con el control donde solo se desarrollaron en

promedio 7 raíces secundarias ($F=30.84$, $p<0.0001$) (Figura 14B). Los resultados del peso fresco de las plantas de *A. thaliana* inoculadas con la cepa de *F. cf graminearum* bajo las diferentes interacciones, mostraron que en las interacciones indirectas At/MS-P85.T y At/PDA-P85.T hubo un aumento del 70.7 y 42.1 %, respectivamente, comparadas con las plántulas del control ($F=114.1$, $p<0.0001$) (Figura 14C).

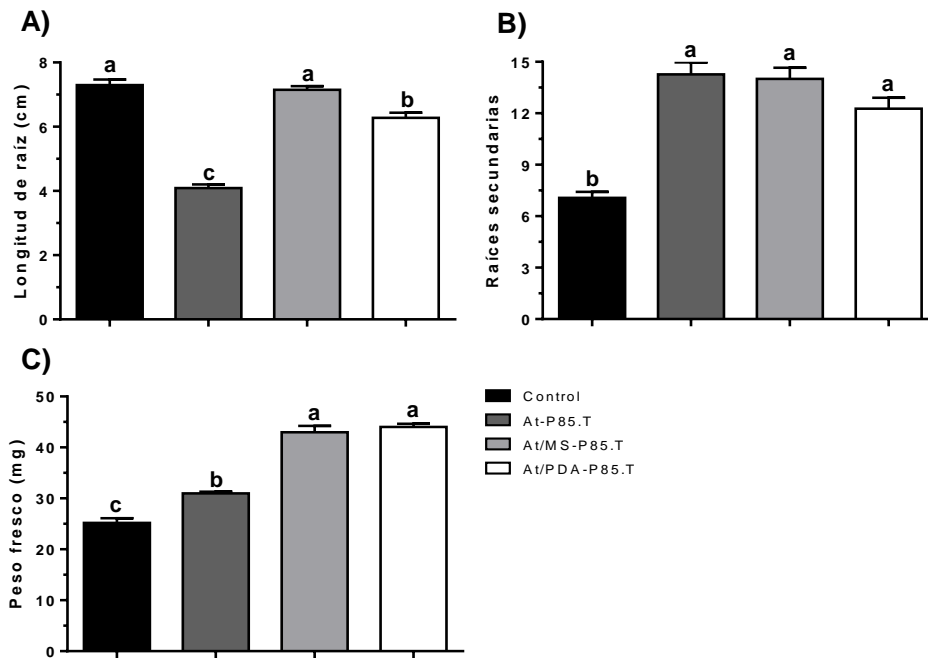


Figura 14. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de *A. thaliana* inoculada con *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** Longitud de raíz, **B)** Raíces secundarias y **C)** Peso fresco. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Plántulas sin inocular (control), Interacción directa At-P85.T), Interacción indirecta en MS (At/MS-P85.T) e Interacción indirecta en PDA (At/PDA-P85.T). Las barras representan el promedio de 5 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. (Tukey, $p<0.0001$).

La arquitectura de la raíz de las plantas de *A. thaliana* durante la interacción con *F. cf graminearum*, se muestra en la figura 15, en donde se puede observar claramente que, en los tres sistemas de interacción con el hongo, hay más desarrollo de raíces secundarias y de pelos radiculares y, mayormente en el sistema de interacción At/MS-P85.T (Figura 15C).

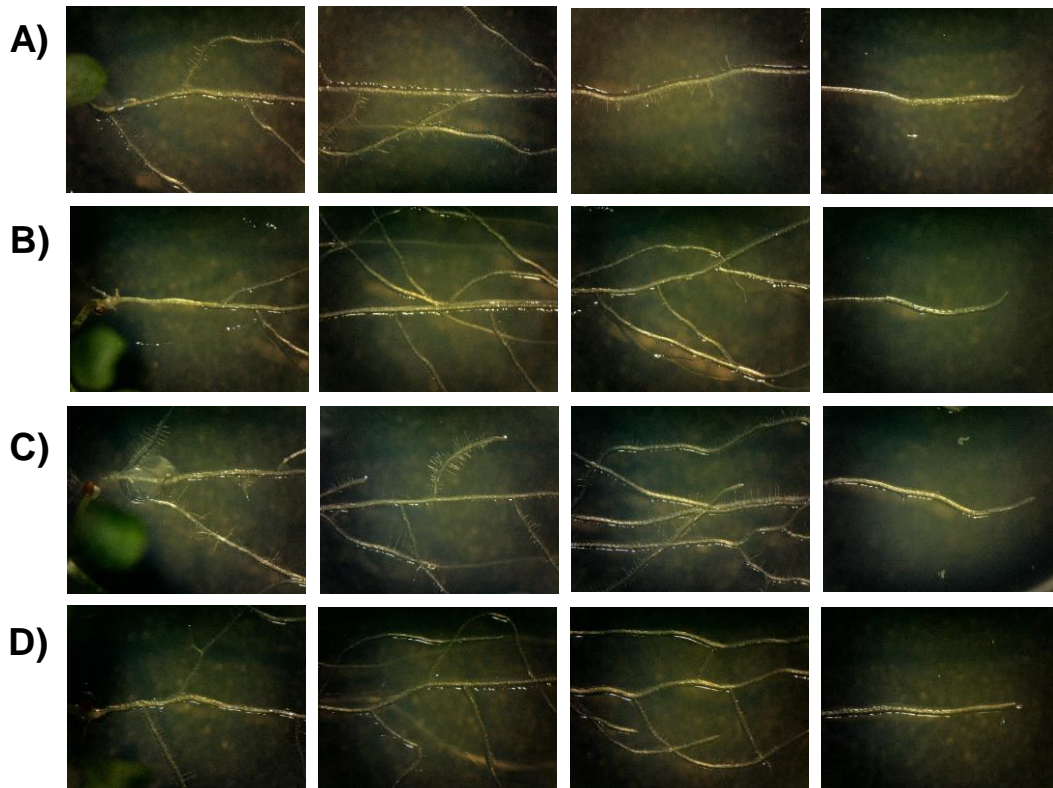


Figura 15. Arquitectura de la raíz de *A. thaliana* inoculada con *F. cf graminearum* (P85.T) a los 7 dpi. **A)** Control, **B)** At-P85.T, Interacción directa en MS, **C)** At/Ms-P85.T, Interacción indirecta en MS y **D)** At/PDA-P85.T, Interacción indirecta en PDA. Fotografías tomadas con un estereoscopio a los 7 dpi.

Además, en el análisis de la cuantificación de la clorofila A, B y total A + B, se observó una mayor producción de clorofila en los tres sistemas de interacción At-P85.T, At/MS-P85.T y At/PDA-P85.T, comparada con el control (Ctrl) ($F=6554$, $p<0.0001$), indicando que, durante la interacción de la planta con el hongo no hay un efecto negativo producido por este (Figura 16).

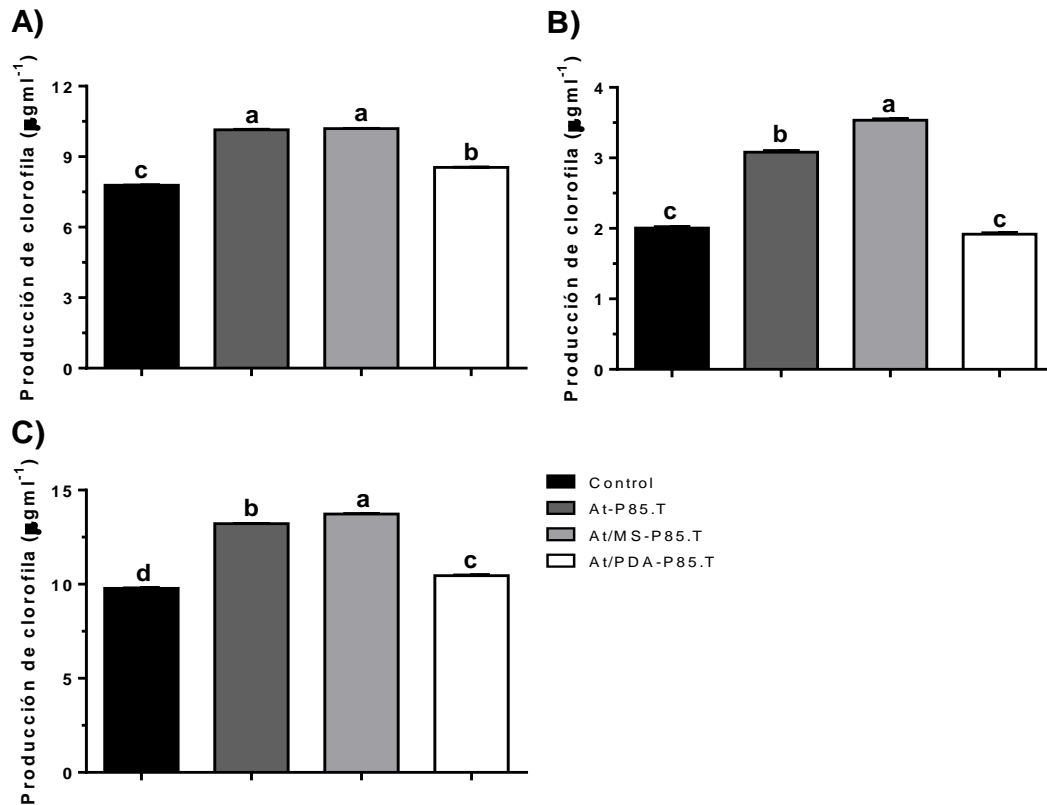


Figura 16. Cuantificación de clorofila de las plántulas de *A. thaliana* inoculadas con *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** Clorofila A, **B)** Clorofila B y **C)** Clorofila total A + B. Las diferentes condiciones de crecimiento: Plántulas sin inocular (control), Interacción directa At-P85.T), Interacción indirecta en MS (At/MS-P85.T) e Interacción indirecta en PDA (At/PDA-P85.T). Las barras representan el promedio de 5 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p < 0.0001$).

7.3 Promoción del crecimiento vegetal *in vitro* en los exudados de los dos hongos de *Fusarium* spp en plántulas de *A. thaliana*

Después de analizar el efecto de promoción de crecimiento vegetal *in vitro* ante la interacción directa e indirecta con las cepas de *Fusarium*, se prosiguió a analizar el mismo efecto de promoción mediante la adición de los metabolitos (exudados) de ambas cepas en *A. thaliana* obtenidos en medio líquido (MS y PDB).

7.3.1 Promoción del crecimiento vegetal con los exudados de *Fusarium equiseti* (M102.R)

Inicialmente, la cepa M102.R (*F. equiseti*) se creció en medio sales MS líquido, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1,000), a partir de los metabolitos concentrados ([]) con la finalidad de evaluar el efecto de los metabolitos producidos por el hongo en el desarrollo y crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis*. En la figura 17, se puede observar un efecto positivo en el fenotipo de las plantas bajo los metabolitos producidos por *F. equiseti* (M102.R), en donde el desarrollo de la longitud de la raíz, número de raíces y pelos radiculares, así como la parte área de las plántulas, se observó en todos los tratamientos probados tomando como base las plántulas control.

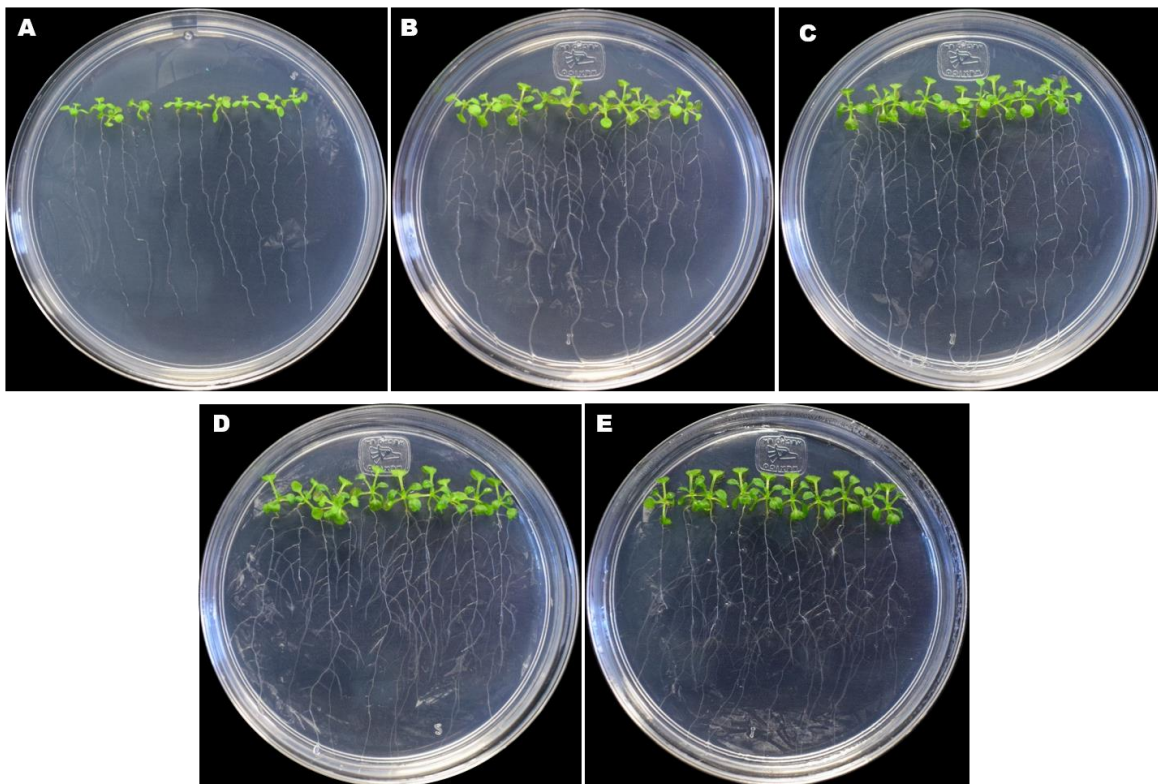


Figura 17. Promoción del crecimiento vegetal de los exudados de *F. equiseti* (M102.R) en *A. thaliana* a los 7 días de desarrollo. **A)** Control (Ctrl), **B)** Concentrado ([]) **C)** Dilución 1:10 en medio MS, **D)** Dilución 1:100 en medio MS y **E)** Dilución 1:1,000 en medio MS.

El efecto de la prolongación de la raíz primaria, la generación de raíces secundarias y el peso fresco de las plántulas (Figura 18A, B y C) tuvo un efecto positivo en todos los tratamientos con los exudados de la cepa de *F. equiseti*, aunque este efecto se mostró con mayor claridad en la generación de raíces secundarias conforme se probaron las diluciones [], 1:10, 1:100 y 1:1000 aumentando el número de raíces secundarias en promedio de 14, 17.4, 18.4 y 21.6 respectivamente, mientras que en las plántulas control solo se generaron en promedio 6 raíces ($F=54.22$, $p<0.0001$) (Figura 18B). Del mismo modo el efecto de los exudados producidos por M102.R en sales MS también se mostró en la acumulación de peso fresco favoreciendo un aumento progresivo en promedio de 71.8, 128.5, 136.11 y 146.9 mg en el tratamiento concentrado, diluciones 1:10, 1:100 y 1:1,000, respectivamente, comparado con el control donde se obtuvo un promedio de 35.8 mg ($F=1699$, $p<0.001$) (Figura 18C).

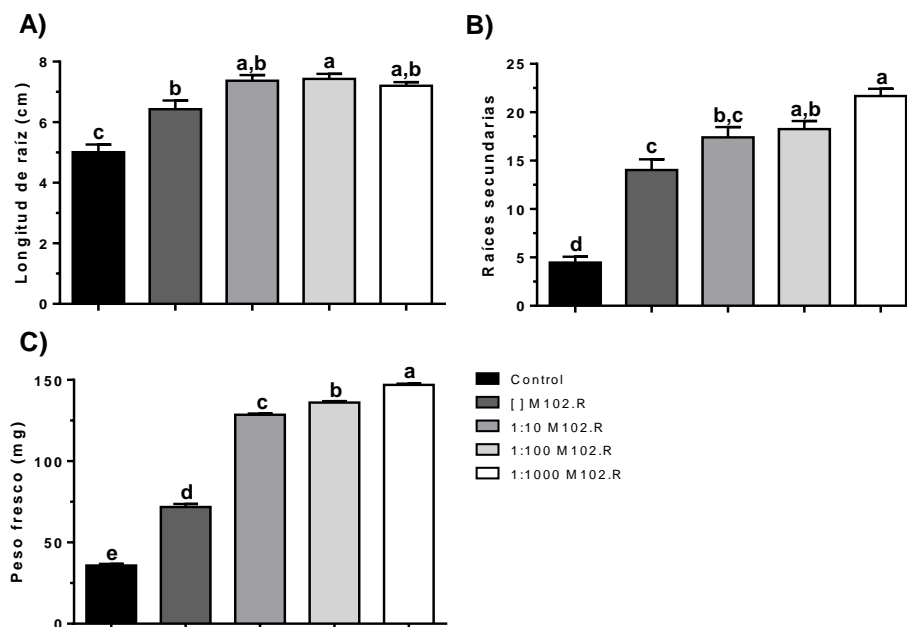


Figura 18. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de *A. thaliana* con los exudados de *F. equiseti* (M102.R). **A)** Longitud de raíz, **B)** Raíces secundarias y **C)** Peso fresco. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Control (Ctrl), Concentrado ([]), Dilución 1:10 en medio MS, Dilución 1:100 en medio MS y Dilución 1:1,000 en medio MS. Las barras representan el promedio de 10 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $P<0.0001$).

El efecto de los exudados de M102.R (*F. equiseti*) también se observó en la arquitectura de la raíz de las plantas de *A. thaliana*, aumentando el desarrollo de las raíces secundarias y pelos radiculares de las plantas que estuvieron creciendo en los exudados del hongo, este efecto es más notable en las diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1,000; Figura 19C, D y E, respectivamente), comparado con el control y el extracto concentrado (Figura 19A y B, respectivamente). Estos resultados sugieren la existencia de algunos metabolitos presentes en los exudados de *F. equiseti* en medio MS que influyeron significativamente en la generación de raíces secundarias y pelos radiculares.

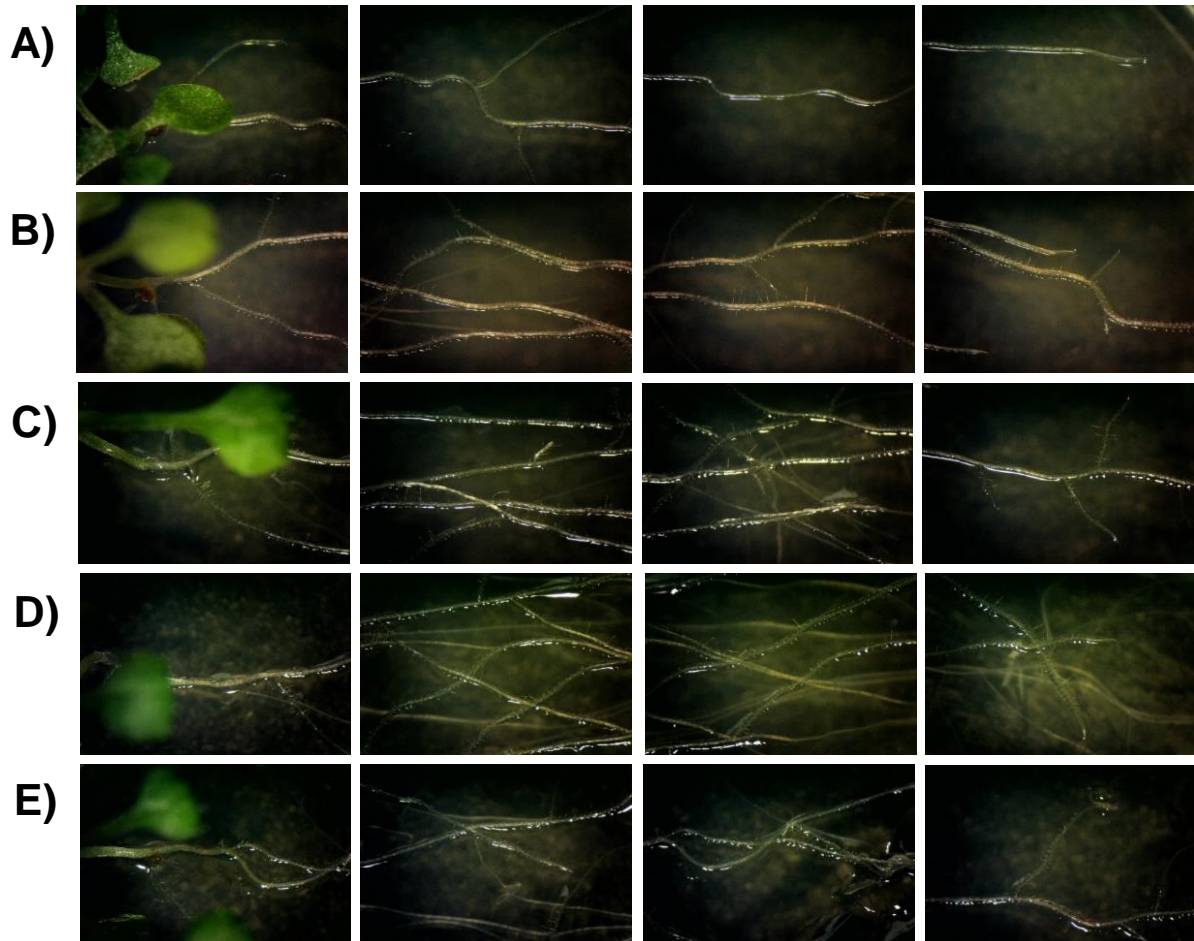


Figura 19. Arquitectura de la raíz de *A. thaliana* con los exudados de *F. equiseti* (M102.R). **A)** Control. **B)** Concentrado MS. **C)** Dilución 1:10 en medio MS. **D)** Dilución 1:100 en medio MS. **E)** Dilución 1:1000 en medio MS. Fotografías tomadas con un estereoscopio a los 7 dpi.

Además, también se realizó el análisis de la cuantificación de los niveles de clorofila A, B y total A + B de las plántulas expuestas a los exudados, así como del control, observando un aumento progresivo de los niveles de clorofila conforme se adicionaron los exudados a los cultivos de las plántulas de *Arabidopsis*, indicando que no hay efecto dañino de los exudados producidos por la cepa de *F. equiseti* (M102.R), en el aparato fotosintético de las plantas ($F=607.1$, $p<0.001$) (Figura 20).

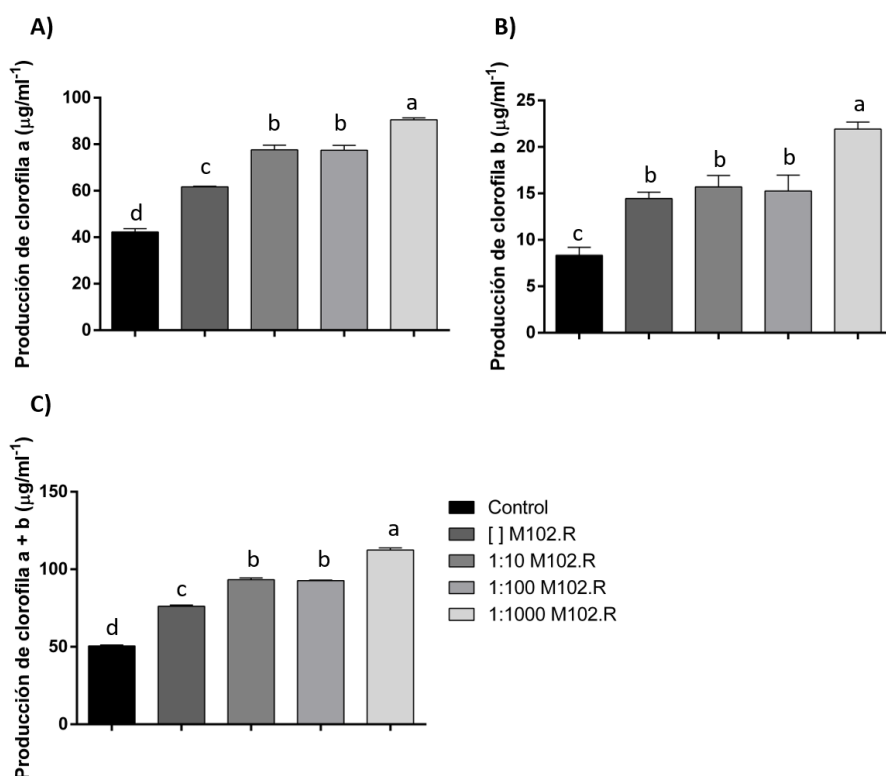


Figura 20. Cuantificación de clorofila de *A. thaliana* con los exudados de *F. equiseti* (M102.R). **A)** Clorofila A. **B)** Clorofila B y **C)** Clorofila total. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Control (Ctrl), Concentrado ([]), Dilución 1:10 en medio MS, Dilución 1:100 en medio MS y Dilución 1:1,000 en medio MS. Las barras representan el promedio de 10 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $P<0.001$).

Del mismo modo se analizó el efecto de los compuestos (metabolitos) producidos por *F. equiseti* (M102.R) en medio PDB (Figura 21). Notablemente el fenotipo de crecimiento y desarrollo de las plántulas de *A. thaliana* mostraron signos de

clorosis, sobre todo cuando se cultivaron con los metabolitos concentrados de PDB, singularmente el efecto de los metabolitos también mostró un secuela en el desarrollo de la longitud de la raíz primaria en todos los tratamientos probados a diferencia del control, sin embargo, a pesar de que las plántulas mostraron signos de clorosis, el efecto en la generación de raíces secundarias, pelos radiculares y aumento en el desarrollo de la parte aérea mostró un efecto contrario, principalmente a partir de la dilución 1:10 (Figura 21C).

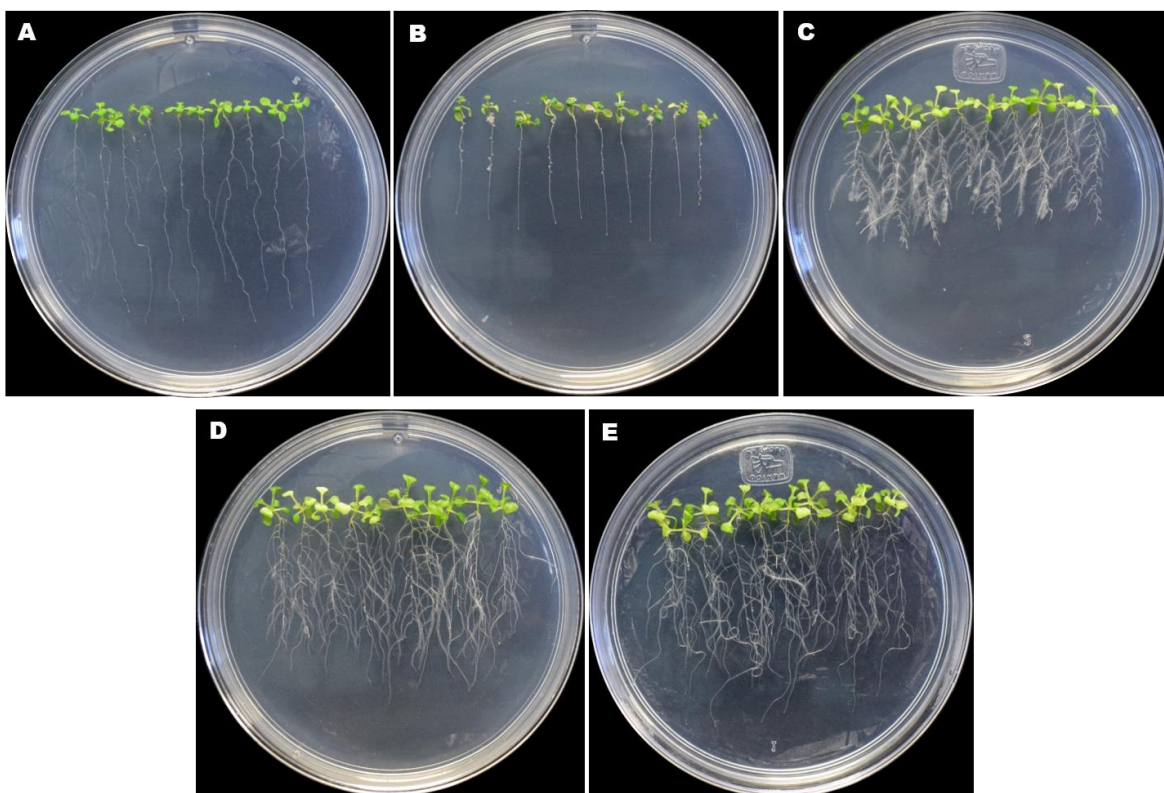


Figura 21. Promoción del crecimiento vegetal mediante los exudados de *F. equiseti* (M102.R) a los 7 días de desarrollo. **A)** Control. **B)** Concentrado. **C)** Dilución 1:10 en medio PDB. **D)** Dilución 1:100 en medio PDB. **E)** Dilución 1:1000 en medio PDB.

Los parámetros vegetativos analizados como la longitud de la raíz primaria en las condiciones de PDB, disminuyeron principalmente a partir del tratamiento concentrado y la dilución 1:10 con un 48.51 y 47.31 %, respectivamente, a comparación del control (Figura 22A). Mientras que en las raíces secundarias el efecto de los compuestos producidos en medio PDB, generaron un aumento del

número de raíces en promedio de 39.5, 25.9 y 26.2 en las diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1,00, respectivamente, a comparación del control ($F=107.7$, $p<0.0001$) (Figura 22B). Por otra parte, en análisis del peso fresco también mostró diferencias entre los tratamientos (Figura 22C). El resultado demostró que considerablemente hubo una disminución del 45.2 % en tratamiento concentrado comparándolo con el control, mientras que en las diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1,00) mostraron un aumento del peso fresco de 94, 101.9 y 106.9 mg respectivamente ($F=2843$, $p<0.0001$) (Figura 22C).

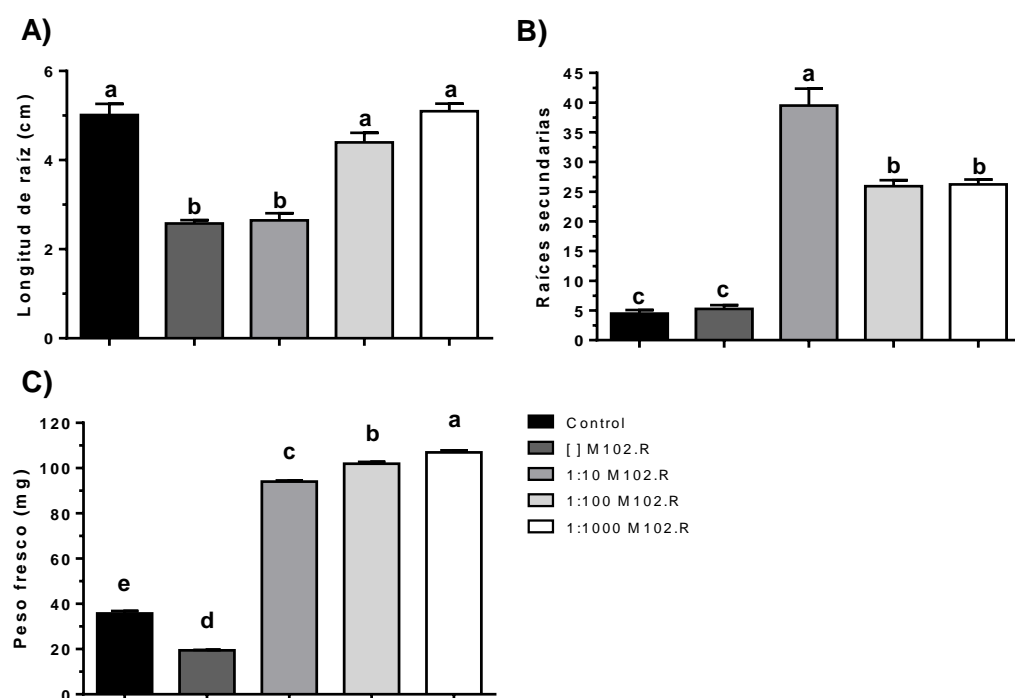


Figura 22. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de *A. thaliana* con los exudados de *F. equiseti* (M102.R). **A)** Longitud de raíz, **B)** Raíces secundarias y **C)** Peso fresco. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Control (Ctrl), Concentrado ([]), Dilución 1:10 en medio PDB, Dilución 1:100 en medio PDB y Dilución 1:1,000 en medio PDB. Las barras representan el promedio de 10 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p<0.0001$).

En lo que respecta a la arquitectura de la raíz de las plantas de *Arabidopsis* expuestas con los exudados en las diferentes condiciones. En la figura 23, se muestra que el desarrollo de las raíces secundarias y pelos radiculares es más

evidente en las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1,00 (Figura 23C, D y E, respectivamente). Estos datos sugieren la existencia de algún metabolito(s) presente en los exudados de *F. equiseti* (M102.R) en medio PDB que influyen en la generación de raíces secundarias y pelos radiculares.

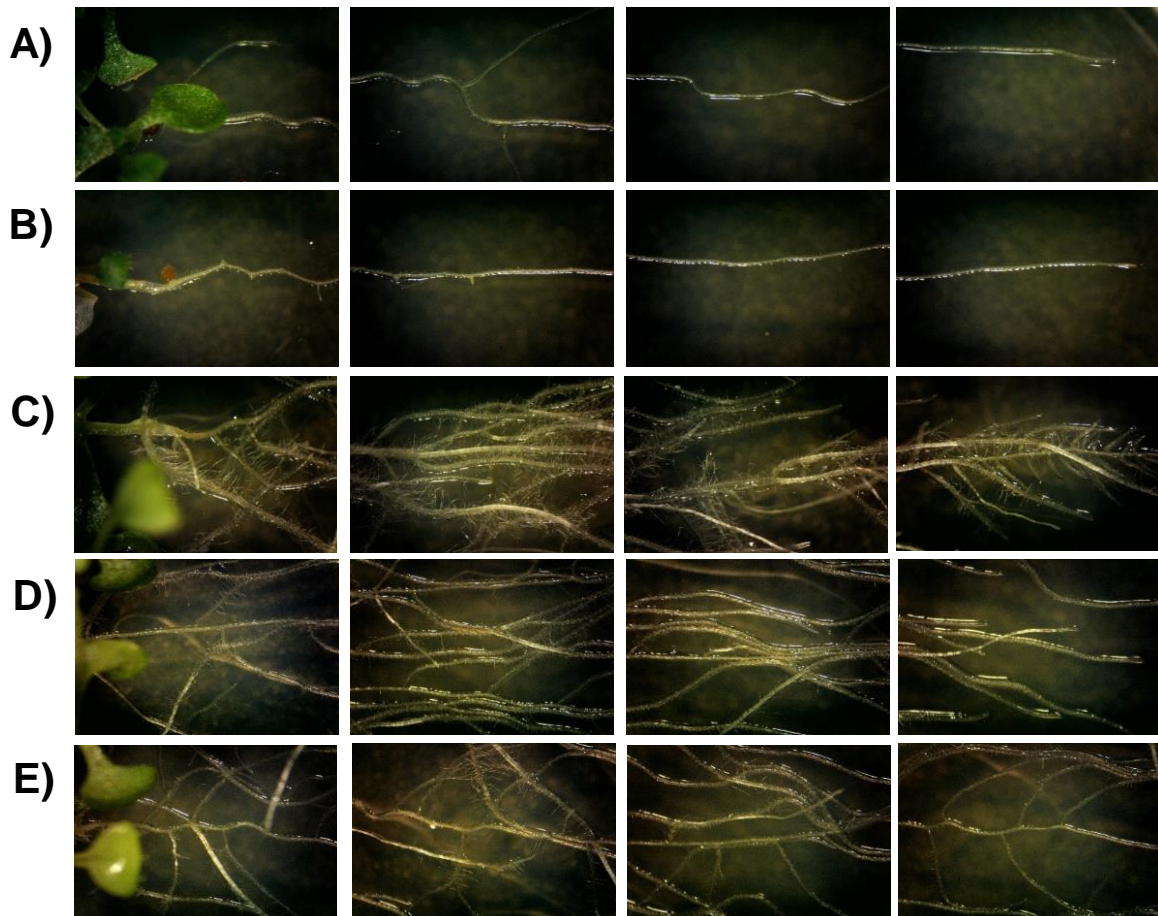


Figura 23. Arquitectura de la raíz de *A. thaliana* inoculada con los exudados de *F. equiseti* (M102.R). **A)** Control. **B)** Concentrado PDB. **C)** Dilución 1:10 en medio PDB. **D)** Dilución 1:100 en medio PDB. **E)** Dilución 1:1000 en medio PDB. Fotografías tomadas con un estereoscopio a los 7 dpi.

Después de analizar el desarrollo de las plántulas de *A. thaliana* en las diferentes condiciones, se persiguió a cuantificar los niveles de clorofila A, B y total A + B. En la figura 24, se observa que algunos de los compuestos que produce la cepa M102.R, altera el aparato fotosintético haciendo algún daño, el cual se puede observar con la disminución en la producción de la clorofila, y en el fenotipo de

clorosis que mostraron las plantas en crecimiento bajo los exudados producidos por la cepa en medio PDB.

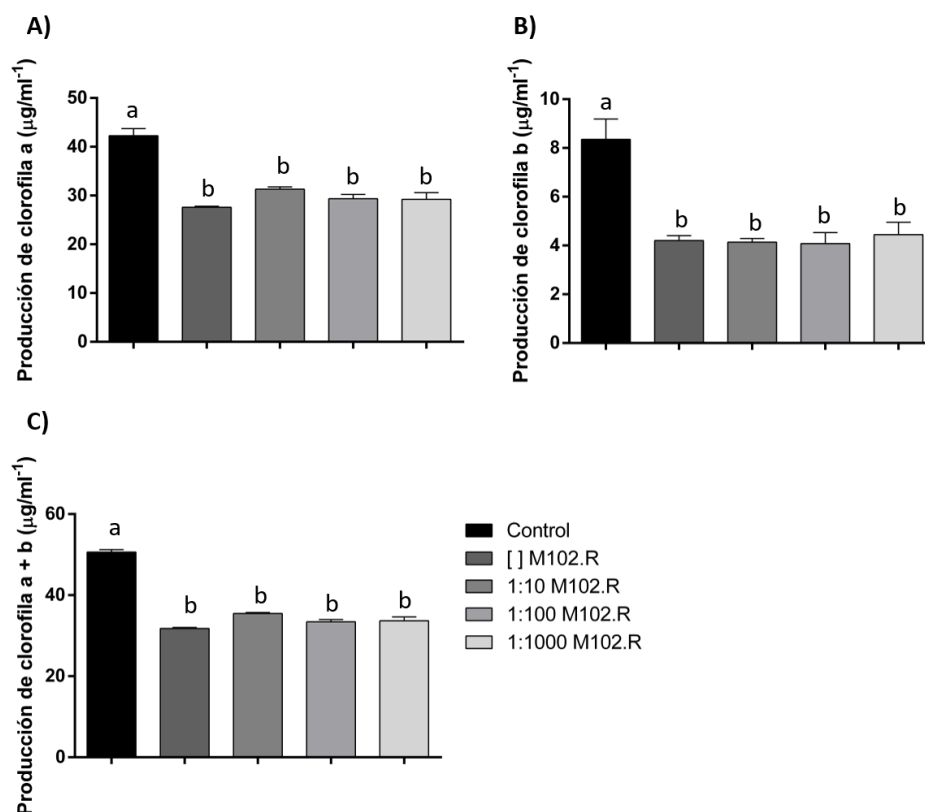


Figura 24. Cuantificación de clorofila de *A. thaliana* con los exudados de *F. equiseti* (M102.R). **A)** Clorofila A. **B)** Clorofila B y **C)** Clorofila total. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Control (Ctrl), Concentrado ([]), Dilución 1:10 en medio PDB, Dilución 1:100 en medio PDB y Dilución 1:1,000 en medio PDB. Las barras representan el promedio de 10 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p < 0.0001$).

7.3.2 Promoción del crecimiento vegetal con los exudados de *Fusarium cf graminearum* (P85.T)

La actividad de promoción de crecimiento vegetal de los metabolitos y/o exudados de *F. cf graminearum* (P85.T) generados en medio sales MS también se probó en plántulas de *Arabidopsis*, empleando el mismo procedimiento para *F. equiseti*

M102.R. En la figura 25, se puede observar el fenotipo de crecimiento y desarrollo de las plántulas de *A. thaliana*, particularmente en la condición del exudado concentrado, se observa que las plántulas se desarrollaron con signos de clorosis, además de la inhibición del crecimiento y desarrollo tanto de la parte aérea como de la raíz (Figura 25B). Sin embargo, el fenotipo de las plántulas desarrolladas en el resto de las diluciones (1:10, 1:100 y 1:1,000; Figura 25C, D y E, respectivamente), mostró un efecto positivo, en donde el desarrollo de la longitud de la raíz primaria y número de raíces secundarias así como la generación de pelos radiculares es mayor a diferencia del control y el tratamiento concentrado, además, también se observó un aumento del área foliar en las diluciones 1:100 y 1:1,000.

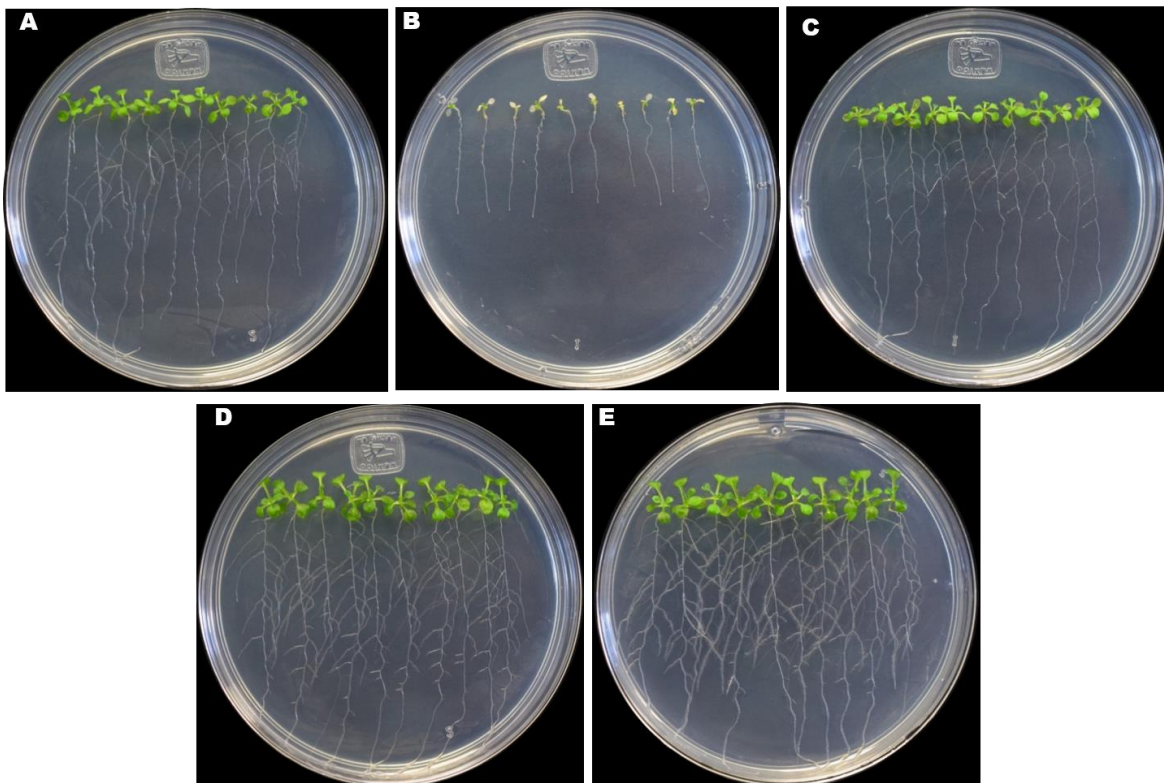


Figura 25. Promoción del crecimiento vegetal en los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T) en *A. thaliana* a los 7 días de desarrollo. **A)** Control (Ctrl), **B)** Concentrado ([]), **C)** Dilución 1:10 en medio MS, **D)** Dilución 1:100 en medio MS y **E)** Dilución 1:1,000 en medio MS.

En cuanto a los parámetros vegetativos, la longitud de la raíz primaria disminuyó un 37.18 % cuando las plántulas de *A. thaliana* se desarrollaron en los metabolitos concentrados de *F. cf graminearum* (P85.T) (Figura 26A), mientras que en el resto de las diluciones no hubo mucha diferencia en la longitud de la raíz. Respecto, a la generación de raíces secundarias disminuyó casi en su totalidad en la condición concentrado en un 24 %, mientras que no hubo diferencia entre el control y la dilución 1:10. Sin embargo este efecto se mejoró en las subsiguientes diluciones (Figura 26B) ($F=43.22$, $p<0.0001$). El mismo efecto se observó en el peso fresco, en donde disminuyó un 48 % en el concentrado y sin cambio en la dilución 1:10 en comparación con el control, mientras que en las diluciones 1:100 y 1:1,000 aumentó un 55 y 76 %, respectivamente ($F=63.34$, $p<0.0001$) (Figura 26C).

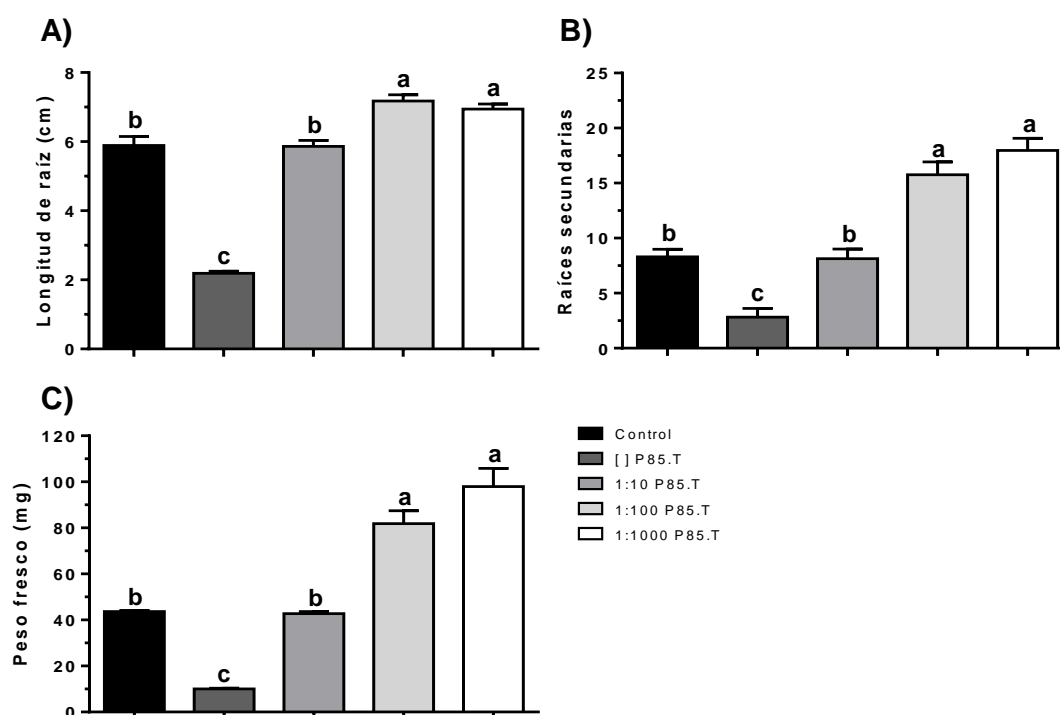


Figura 26. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de *A. thaliana* con los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** Longitud de raíz, **B)** Raíces secundarias y **C)** Peso fresco. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Control (Ctrl), Concentrado ([]), Dilución 1:10 en medio MS, Dilución 1:100 en medio MS y Dilución 1:1,000 en medio MS. Las barras representan el promedio de 10 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p<0.0001$).

El efecto de los exudados también se vio reflejado en la arquitectura de la raíz de las plántulas de *A. thaliana* evidenciando la existencia de un metabolito(s) que generaron un cambio en la estructura general de las plántulas y el desarrollo de las raíces secundarias y pelos radiculares. Sin embargo, se observó un efecto negativo en el tratamiento concentrado, mientras que en el resto de las diluciones se generó un efecto positivo con mayor desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares (Figura 27).

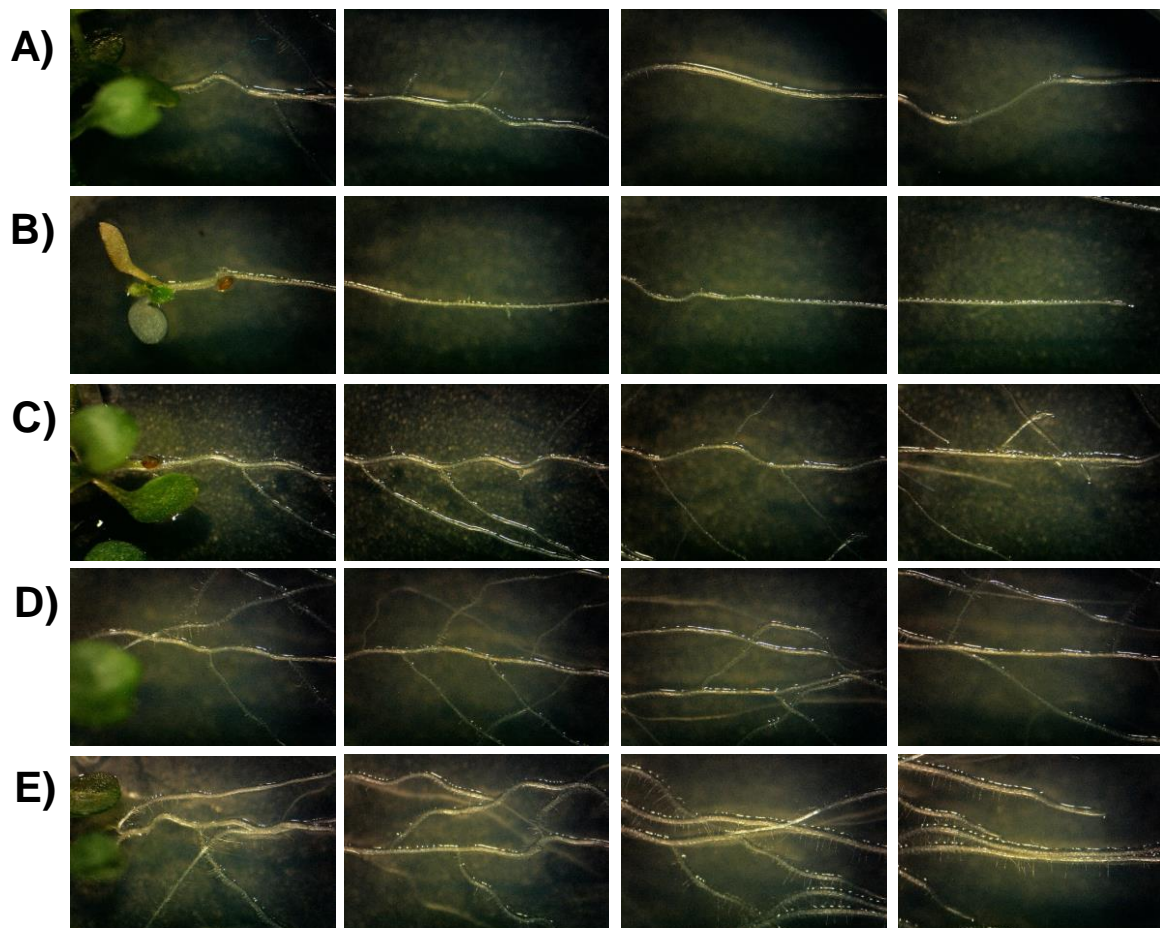


Figura 27. Arquitectura de la raíz de *A. thaliana* con los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** Control. **B)** Concentrado MS. **C)** Dilución 1:10 en medio MS. **D)** Dilución 1:100 en medio MS. **E)** Dilución 1:1000 en medio MS. Fotografías tomadas con un estereoscopio a los 7 dpi.

Además de observar el crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis* en los exudados del hongo de *F. cf graminearum* (P85.T) en medio MS, se cuantifico la clorofila en cada condición. En la figura 28, se puede observar que la

producción de clorofila presenta el mismo patrón comparado con los parámetros de la longitud de raíz, raíces secundarias y peso fresco. En donde hubo una disminución del contenido de clorofila en la condición del concentrado, mientras en las condiciones de 1:100 y 1:1,000 hubo un aumento en la producción de clorofila (a, b y a+b) ($F=407.9$, $p<0.0001$).

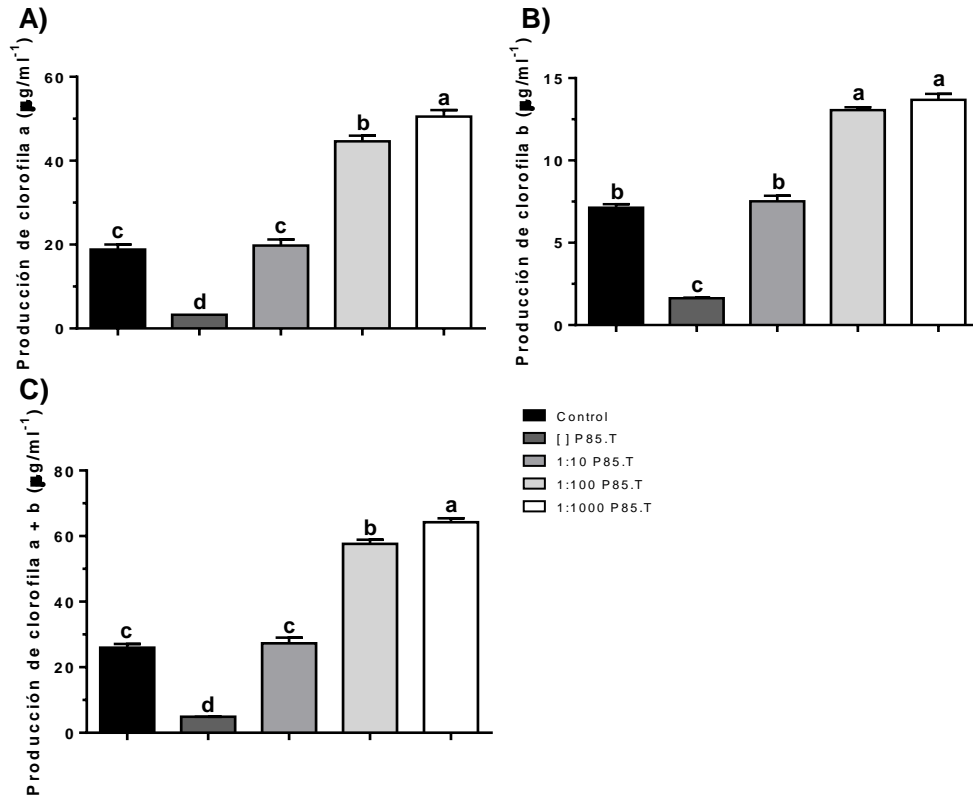


Figura 28. Cuantificación de clorofila de *A. thaliana* con los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** Clorofila A, **B)** Clorofila B y **C)** Clorofila total. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Control (Ctrl), Concentrado ([]), Dilución 1:10 en medio MS, Dilución 1:100 en medio MS y Dilución 1:1,000 en medio MS. Las barras representan el promedio de 10 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p<0.0001$).

Del mismo modo se prosiguió a realizar el mismo procedimiento con los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T) generados en medio PDB. El fenotipo de las plántulas a partir de las diluciones de los exudados (1:10, 1:100 y 1:1,000), mostraron un efecto mayor en el desarrollo de raíces secundarias y pelos

radiculares, a diferencia de las plántulas control. El efecto de los exudados de P85.T generados en PDB sobre las plántulas de *A. thaliana* también mostraron tener un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de la fisiología de las plántulas. Después de la exposición con los exudados a los 7 dpi, las plántulas mostraron signos de clorosis y disminución de la prolongación de las raíces en todos los tratamientos probados (Figura 29).

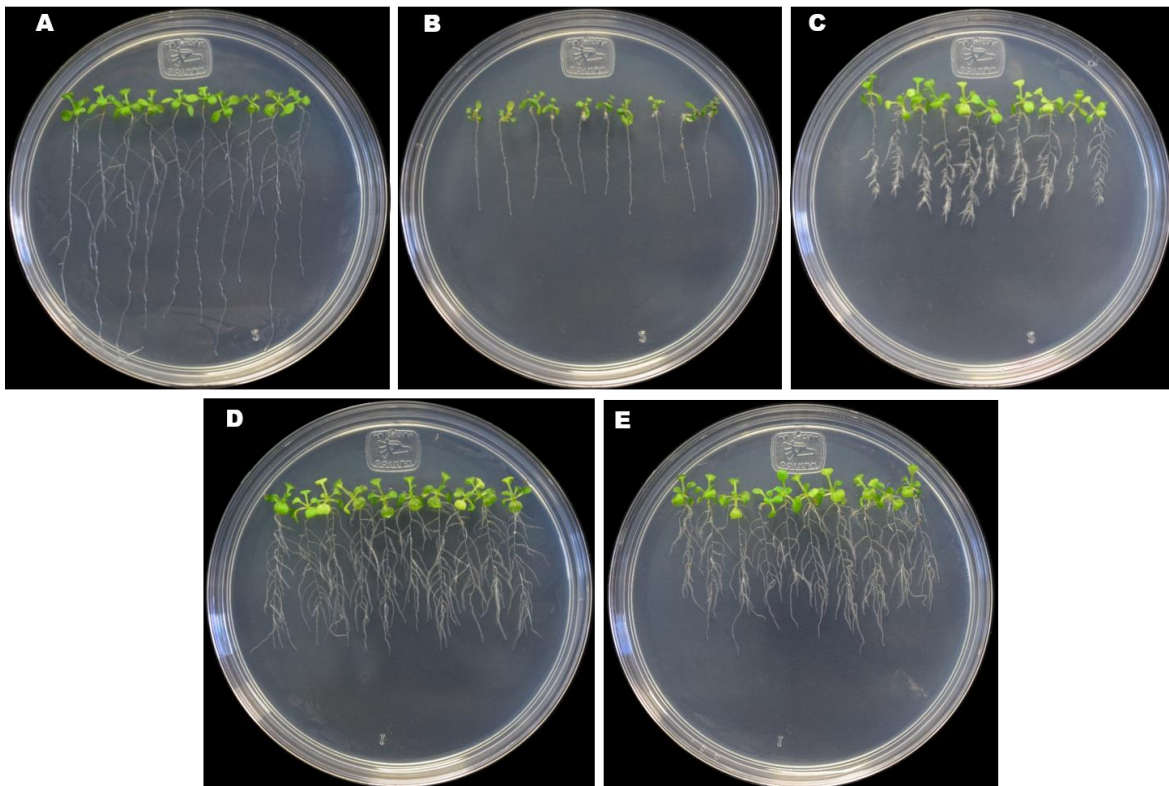


Figura 29. Promoción del crecimiento vegetal de los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T) en *A. thaliana* a los 7 días de desarrollo. **A)** Control (Ctrl), **B)** Concentrado ([]), **C)** Dilución 1:10 en medio PDB, **D)** Dilución 1:100 en medio PDB y **E)** Dilución 1:1,000 en medio PDB.

El efecto de los exudados mostró una inhibición del 65.4, 61, 50 y 45 % en la longitud de la raíz de *A. thaliana* en los tratamientos [], 1:10, 1:100 y 1:1,000, respectivamente, comparadas con las plántulas del control ($F=108.2$ $p<0.0001$) (Figura 30A), sin embargo, a partir de la dilución 1:100 y 1:1,000 las plántulas aumentaron un 89 y 115 % en raíces secundarias así como el desarrollo de pelos radiculares respectivamente, comparado en las condiciones control y concentrado

($F=89.46$, $p<0.0001$) (Figura 30B) Por otra parte el peso fresco de las plántulas de *Arabidopsis* desarrolladas en la dilución concentrado disminuyó en un 51.9 %, mientras que en las diluciones posteriores 1:10, 1:100 y 1:1,000 se generó un aumento del 21.5, 54.5 y 75 %, respectivamente comparado con el control y el concentrado ($F=133.5$, $p<0.0001$) (Figura 30C).

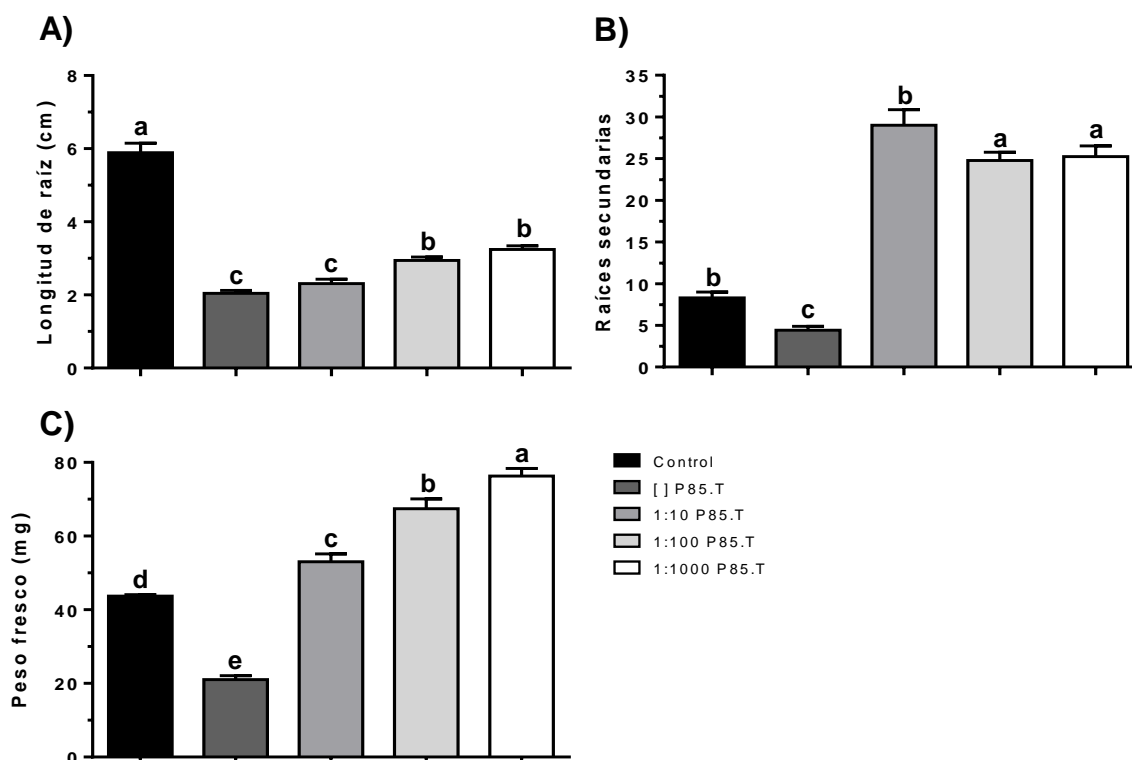


Figura 30. Evaluación de los parámetros vegetativos de las plántulas de *A. thaliana* con los exudados de *F. cf. graminearum* (P85.T). **A)** Longitud de raíz, **B)** Raíces secundarias y **C)** Peso fresco. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Control (Ctrl), Concentrado ([]), Dilución 1:10 en medio PDB, Dilución 1:100 en medio PDB y Dilución 1:1,000 en medio PDB. Las barras representan el promedio de 10 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p<0.0001$).

En la figura 31, se muestra con más detalle el efecto de los exudados en la arquitectura de la raíz evidenciando la existencia de un metabolito (s) que generan un cambio en el desarrollo de las raíces secundarias y de pelos radiculares particularmente en las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1,000 (Figura 31C, D y E,

respectivamente), observando que en las condiciones control y en el concentrado es casi nula el desarrollo de las raíces secundarias y pelos radiculares (Figura 31A y B, respectivamente).

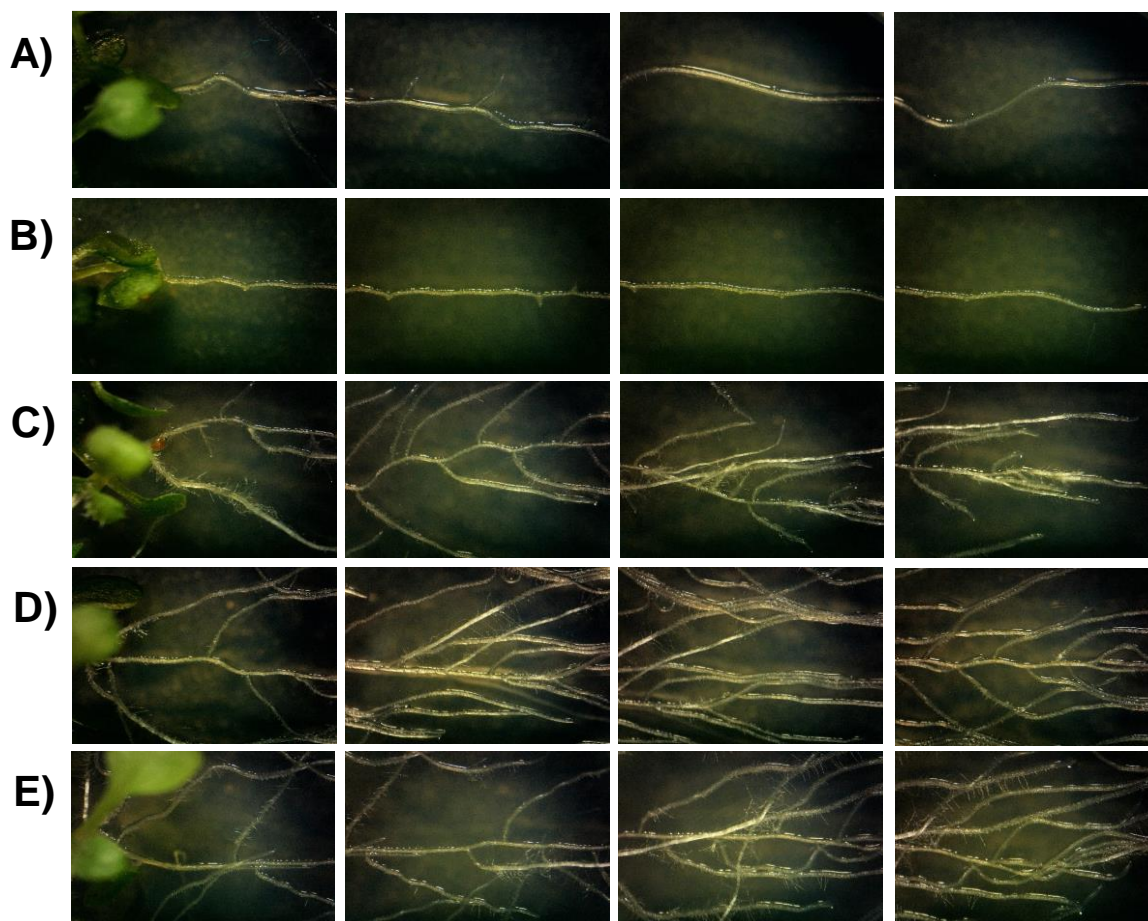


Figura 31. Arquitectura de la raíz de *A. thaliana* con los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** Control. **B)** Concentrado PDB. **C)** Dilución 1:10 en medio PDB. **D)** Dilución 1:100 en medio PDB. **E)** Dilución 1:1000 en medio PDB. Fotografías tomadas con un estereoscopio a los 7 dpi.

Después de los 7 días de estar en contacto con los tratamientos de los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T) en medio PDB, se extrajo y se cuantificó la producción de clorofila a, b y total de cada tratamiento (Figura 32), así como de las plántulas control. A pesar de que las plántulas mostraron signos de clorosis mostraron un ligero aumento en la producción de clorofila a excepción del tratamiento con los exudados concentrados en donde se mostró una disminución en la producción de clorofila a, b y total, lo que sugiere que el concentrado del

metabolito (s) es responsable(s) de la clorosis afectando considerablemente el aparato fotosintético de las plántulas de *A. thaliana* ($F=39.32$, $p<0.0001$).

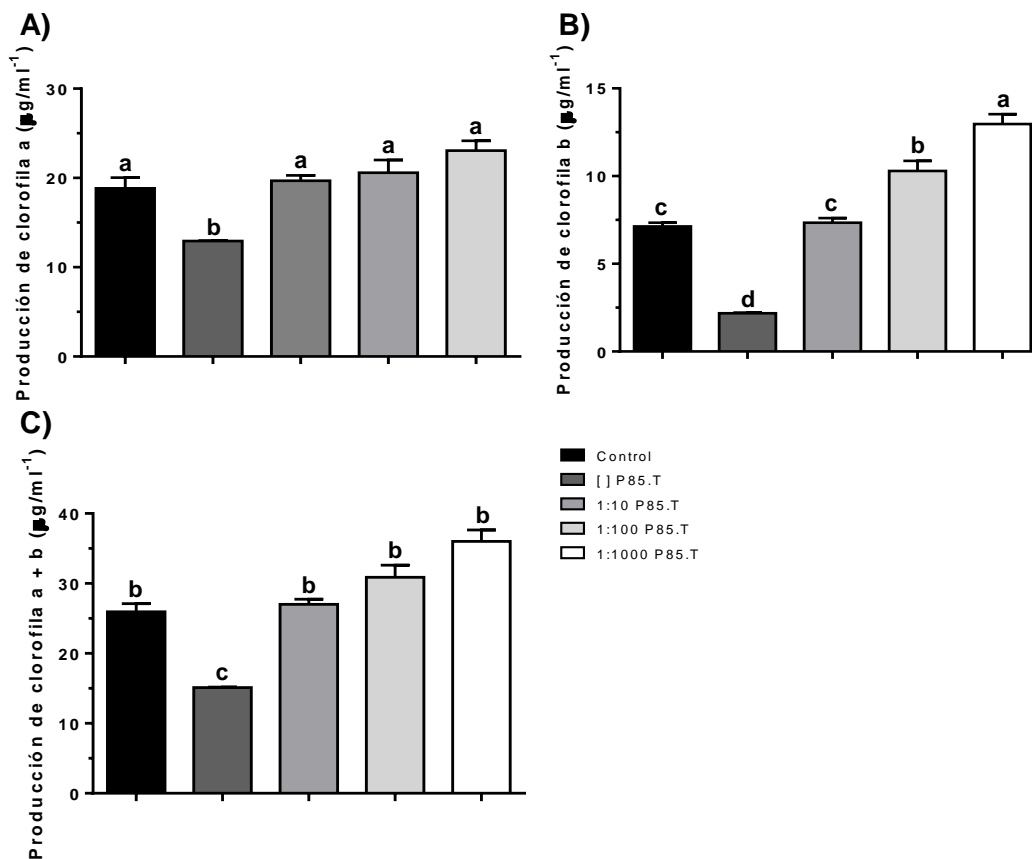


Figura 32. Cuantificación de clorofila de *A. thaliana* con los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** Clorofila A, **B)** Clorofila B y **C)** Clorofila total. Estos parámetros se evaluaron en las diferentes condiciones de crecimiento: Control (Ctrl), Concentrado en medio PDB ([]), Dilución 1:10 en medio PDB, Dilución 1:100 en medio PDB y Dilución 1:1,000 en medio PDB. Las barras representan el promedio de 10 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p<0.0001$).

7.4 Análisis de la actividad *DR5::GUS* y *Rdh6* de *A. thaliana* en su interacción con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T)

7.4.1 Monitoreo de respuesta auxinas mediante la actividad GUS de *A. thaliana* en su interacción con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T).

El análisis de la actividad β -glucoronidasa (GUS) en plántulas transgénicas de *A. thaliana* de la línea *DR5::GUS* en la ruta de respuesta auxinas se analizó por separado en las plántulas que estuvieron en interacción durante 5 días con ambas cepas de *Fusarium* spp así como de las plantas control (sin el inóculo de los hongos). En la figura 33A, se muestra visualmente la expresión basal de la fusión del gen *DR5::GUS* en las plántulas control, principalmente se observó en las hojas, raíces secundarias y en la cofia de la raíz primaria, mientras que en la roseta no se observó la actividad de GUS.

Por otra parte, las plántulas que estuvieron bajo los diferentes tratamientos de inoculación con la cepa M102.R de *F. equiseti* mostraron actividad de GUS en todos los tratamientos, en la interacción directa At-M102.R (Figura 33B) la actividad de GUS se observó con más intensidad en la parte apical y sobre la periferia de las hojas, así como también en las zona de crecimiento de las raíces secundarias y la cofia de la raíz primaria, además también se observó la actividad de GUS en la zona de la roseta lo que sugiere que durante este mecanismo de interacción el hongo produce auxinas promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Del mismo modo la actividad de GUS también se observó en las interacciones en sistema dividido At/MS-M102.R y At/PDA-M102.R, figura 33C y D respectivamente. Principalmente en las mismas zonas de crecimiento mencionadas anteriormente en la interacción At-M102.R. Sin embargo la expresión de la fusión del gen *DR5::GUS* en la interacción At/MS-M102.R en las hojas fue muy similar al control, mientras que en la interacción At/PDA-M102.R la expresión se extendió en gran parte de las hojas.

El análisis de la actividad de GUS también se evaluó en las plántulas inoculadas con la cepa P85.T de *F. cf graminearum*, visualmente se observó la actividad de GUS mayormente en las hojas en todos los sistemas de interacción; At-P85.T, At/MS-P85.T y At/PDA-P85.T, figuras 33E, F y G, respectivamente, del mismo modo la expresión de GUS también se observó en las zona de crecimiento de las raíces primarias y secundarias, aunque dicha actividad fue menor en la roseta a comparación de las plantas inoculadas con *F. equiseti* (M102.R).

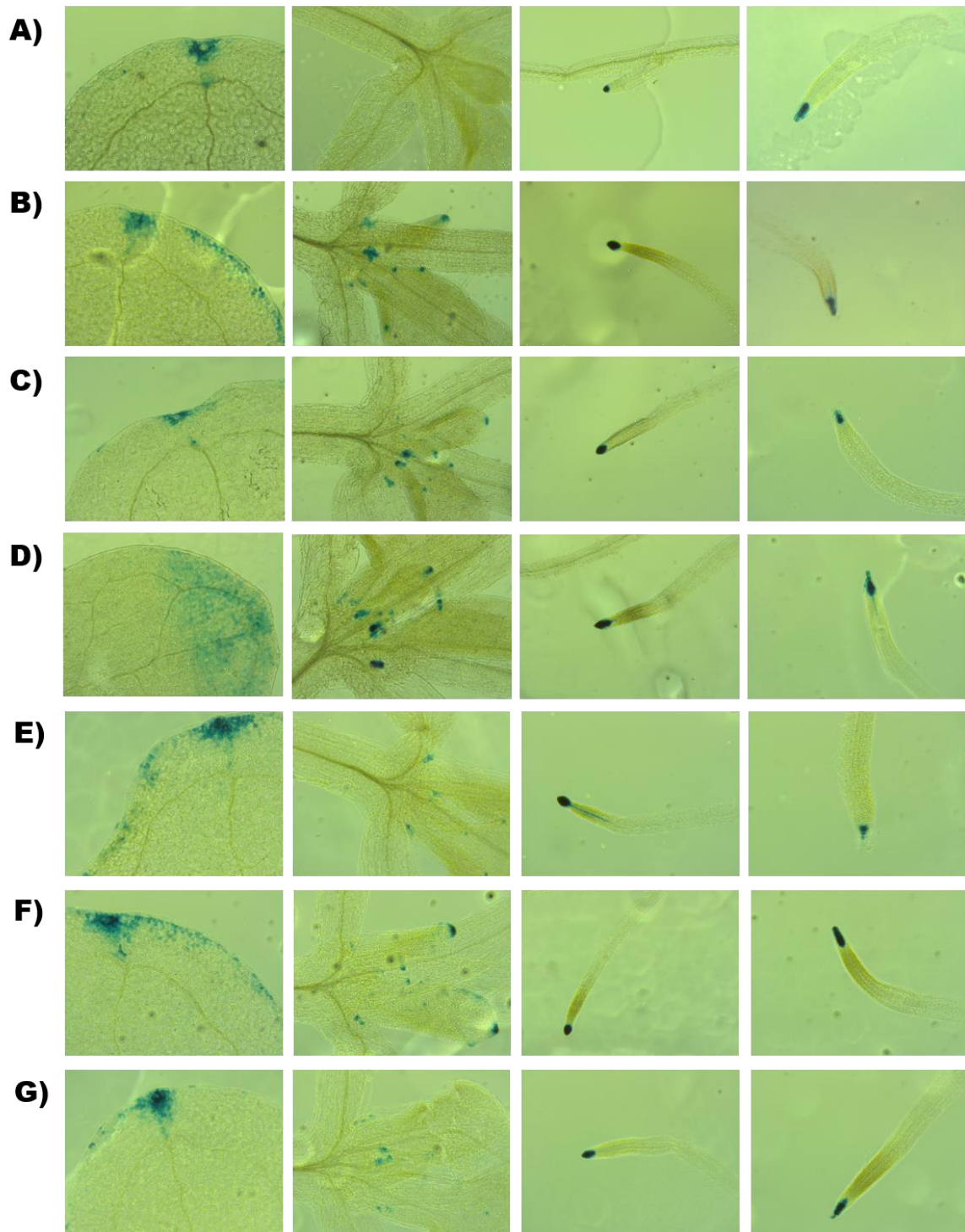


Figura 33. Expresión del gen de fusión *DR5::GUS* en plántulas de *A. thaliana* inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) a los 5 dpi. **A)** Control **B)** At-M102.R Interacción directa en MS **C)** At/MS-M102.R, Interacción indirecta en MD **D)** At-PDA-M102.R, Interacción indirecta en PDA **E)** At-P85.T Interacción directa en MS **F)** At/MS-P85.T interacción indirecta en MS **G)** At/PDA-P85.T Interacción indirecta en PDA.

7.4.2 Análisis de la generación de pelos radiculares en línea *Rhd6* de *A. thaliana* en su interacción con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T)

El análisis de la generación de pelos radiculares también se evaluó en plántulas de la línea transgénica *Rhd6* de *A. thaliana* después de los 5 días de interacción con las cepas de *Fusarium* spp. El análisis demostró el desarrollo de pelos radiculares en las plantas que estuvieron en interacción directa At-M102.R e indirecta At/MS-M102.R y At/PDA-M102.R con *F. equiseti*, figura 34B, C y D respectivamente, denotando mayor desarrollo en la interacción indirecta en medio PDA, el cual es el medio habitual para el desarrollo del hongo, mientras que en el control (plántulas sin el inóculo del hongo) no se observó desarrollo de pelos radiculares (Figura 34A).

El mismo efecto se denotó en las plántulas que se expusieron con la interacción de *F. cf graminearum* (P85.T) después de los 5 dpi. Sin embargo, el desarrollo de pelos radiculares fue menor en las interacciones directa en MS (At-P85.T) e indirecta en MS (At/MS-P85.T), figuras 34E y F respectivamente. Del mismo modo se observó la misma tendencia como ocurrió en la cepa M102.R en la interacción indirecta en PDA para P85.T en donde las plántulas generaron más pelos radiculares (Figura 34G). Lo anterior sugiere la generación y emisión de compuestos volátiles como los posibles responsables de la generación de pelos radiculares en los sistemas de interacción dividida para ambas cepas de *Fusarium*, dado que fue donde se observó más claramente este efecto.

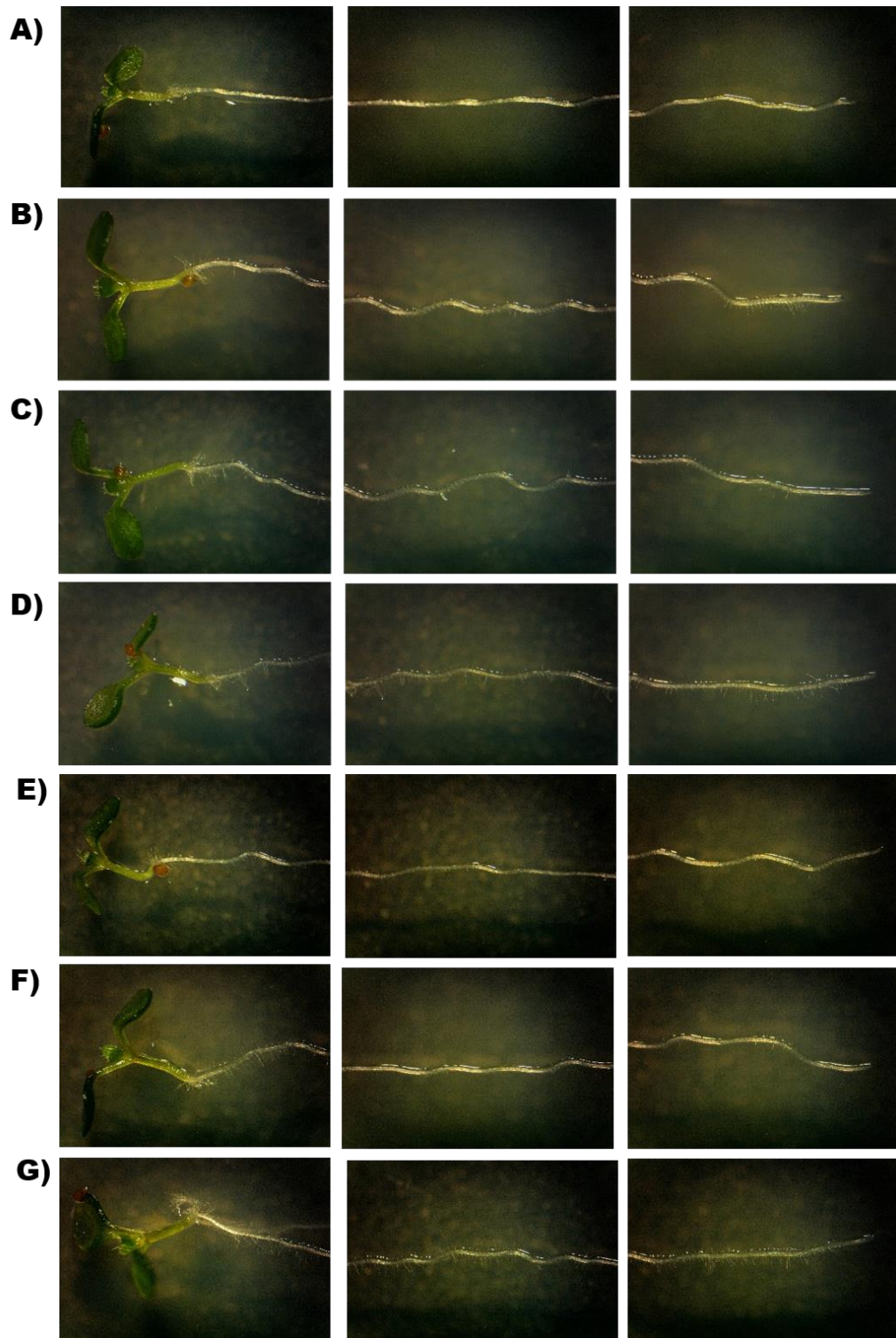


Figura 34. Análisis de la línea *Rdh6* de *A. thaliana* en su interacción con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** control **B)** At-M102.R Interacción directa en MS **C)** At/MS-M102.R Interacción indirecta en MS **D)** At/PDA-M102.R. **E)** At-P85.T Interacción directa en MS **F)** At/-MS-P85.T Interacción indirecta en MS **G)** At/PDA-P85.T Interacción indirecta en PDA.

7.5 Caracterización del fenotipo de promoción de crecimiento vegetal de *Fusarium equiseti* (M102.R) y *Fusarium cf graminearum* (P85.T) en plantas de *Capsicumm annum* L (var. mirasol)

La caracterización del fenotipo de promoción de crecimiento vegetal de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en chile mirasol se evaluó a distintos tiempos de inoculación (15, 30 y 45 dpi) mediante la cuantificación de diferentes parámetros vegetativos. En la figura 35, se muestra el fenotipo de crecimiento y desarrollo vegetal de las plantas inoculadas con los dos hongos de *Fusarium* a los 15, 30 y 45 dpi (Figura 35A, B y C, respectivamente). Concretamente las plantas de chile mirasol inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T), mostraron un mayor crecimiento y desarrollo comparadas con las plantas control (sin el inóculo del hongo).

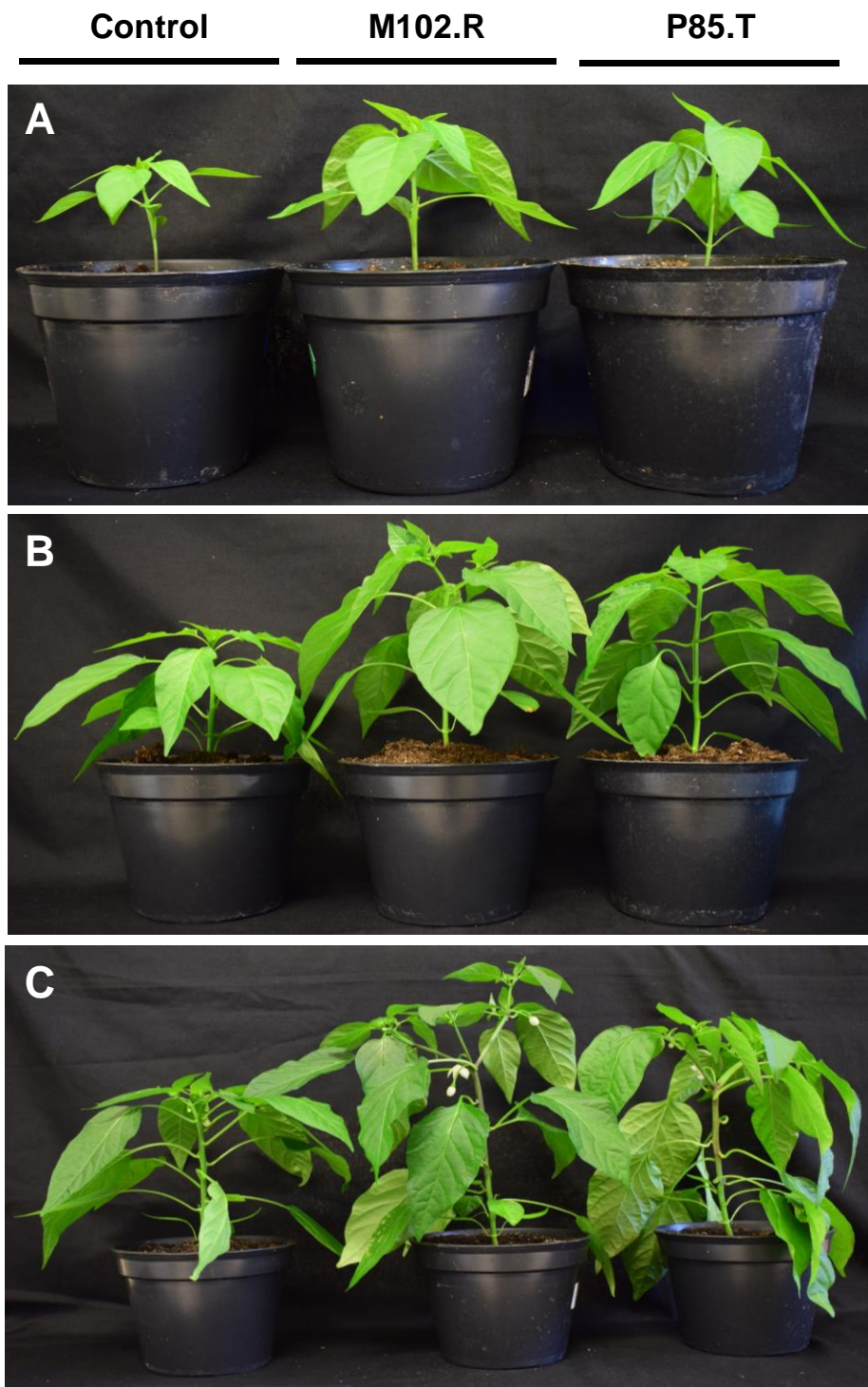


Figura 35. Fenotipo de crecimiento vegetal de *Capsicum annuum* inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** Fenotipo de crecimiento vegetal a los 15 dpi. **B)** Fenotipo de crecimiento vegetal a los 30 dpi. **C)** Fenotipo de crecimiento vegetal a los 45 dpi. **Ctrl)** Control, **M102.R)** *Fusarium equiseti*, **P85.T)** *Fusarium cf graminearum*.

El análisis de los parámetros vegetativos analizados a los 15, 30 y 45 dpi (altura de tallo, número de hojas, botones y flores) mostraron efectos positivos, similares en el crecimiento de las plantas inoculadas con *F. equiseti* y *F. cf graminearum* generando un aumento en la longitud del tallo en un 33 y 21.6 % respectivamente, respecto al control ($F=26.17$, $p<0.0001$) (Figura 36A). Además, dentro de los primeros 15 dpi las plantas inoculadas con ambas cepas de *Fusarium* desarrollaron más hojas (Figura 36B).

Después de los 30 dpi se realizó el segundo análisis de los parámetros vegetativos. Singularmente conforme progresó el cultivo de los chiles inoculados con *Fusarium* spp, el efecto en la promoción de crecimiento vegetal fue más evidente y muy similar entre *F. equiseti* y *F. cf graminearum* aumentando la longitud del tallo en un 24.5 y 16.5 % respectivamente ($F=10.18$, $p<0.0011$) (Figura 36A). Del mismo modo a los 30 dpi el desarrollo de hojas aumentó considerablemente en las plantas inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) en un 67.8 % mientras que en *F. cf graminearum* (P85.T) solo se generó un aumento del 23.6 % respecto a las plantas no inoculadas ($F=35.87$, $p<0.0001$) (Figura 36B).

Además, es importante señalar que a partir de los 30 dpi las plantas mostraron el desarrollo de los primeros botones florales. Particularmente las plantas de chile mirasol que fueron inoculadas con la cepa de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) presentaron el mayor número de botones florales 8 y 6 en promedio respectivamente, mientras que en el control solo se presentaron en promedio 4 botones florales ($F=17.04$, $p<0.0001$) (Figura 36C).

Transcurridos los 45 dpi se tomó el tercer registro de los parámetros vegetativos, durante este tiempo de inoculación las diferencias en el fenotipo de las plantas inoculadas con las cepas de los hongos, generaron un aumento de la longitud del tallo, hojas y botones en un 18.49, 33.8 y 61.67 %, respectivamente para *F. equiseti* (M102.R), mientras que este efecto se observó en un aumento del 10.95, 19 y 38.9 %, respectivamente para *F. cf graminearum* (P85.T) a diferencia de las plantas no inoculadas (Figura 36A, B y C) ($F=5.131$, $p<0.0172$) ($F=7.855$,

$p < 0.0035$) ($F = 8.350$, $p < 0.0027$). Además, durante este tiempo de inoculación las plantas presentaron la apertura de las primeras flores, aunque los resultados no presentaron diferencias entre los tratamientos probados y el control.

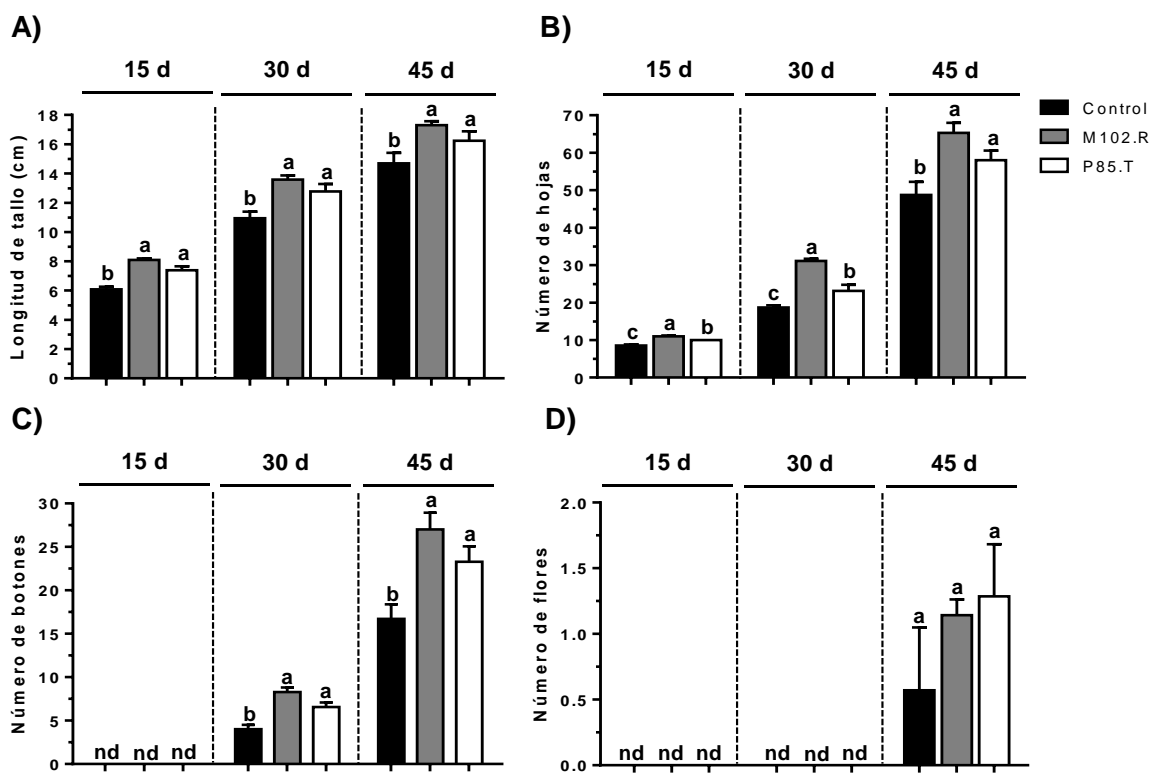


Figura 36. Cuantificación de los parámetros vegetativos de las plantas de chile mirasol inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) a los 15, 30 y 45 dpi. **A)** Longitud del tallo, **B)** Número de hojas, **C)** Número de botones y **D)** Número de flores. Las barras representan el promedio de 6 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las barras representan el promedio de 7 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p < 0.05$).

La caracterización del fenotipo de promoción de crecimiento vegetal de ambas cepas de *Fusarium* en chile mirasol se evaluó totalmente a los 60 dpi mediante la cuantificación de diferentes parámetros vegetativos. En la figura 34, se muestra el fenotipo de crecimiento y desarrollo vegetal de la parte aérea y de raíz de las plantas inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) a los 60 dpi, siendo que las plantas inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf*

graminearum (P85.T), mostraron un mayor crecimiento y desarrollo del área foliar y de raíz comparadas con el control.



Figura 37. Fenotipo de crecimiento vegetal de *Capsicum annuum* inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T). **A)** Fenotipo de crecimiento vegetal a los 60 dpi. **B)** Fenotipo de crecimiento vegetal de la parte aérea y de raíz a los 60 dpi. **Ctrl)** Control, **M102.R)** *Fusarium equiseti*, **P85.T)** *Fusarium cf graminearum*.

El análisis de los parámetros vegetativos después de los 60 dpi demostró que la cepa M102.R de *F. equiseti* fue la que generó mayor desarrollo y crecimiento en las plantas de chile mirasol. El efecto en la promoción de crecimiento vegetal fue más evidente y muy similar entre *F. equiseti* y *F. cf graminearum* aumentando la longitud del tallo en un 23.55 y 17.10 % respectivamente ($F=10.68$, $p<0.0009$) (Figura 38A). Además, al cabo de los 60 dpi se analizó el desarrollo del sistema de raíz de las plantas inoculadas y las no inoculadas. Particularmente las plantas inoculadas con *F. equiseti* y *F. cf graminearum* desarrollaron más raíces respecto al control, aumentando un 17.34 y 5.6 %, respectivamente a diferencia del control ($F=1.860$, $p<0.1844$) (Figura 38A).

Del mismo modo a los 60 dpi el desarrollo de hojas, botones y flores aumentó considerablemente en las plantas inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) en un 40.99, 70.06 y 100 %, respectivamente, mientras que en *F. cf graminearum* (P85.T) solo se generó un aumento del 29.19, 43.3 y 80 %, respectivamente a diferencia de las plantas no inoculadas. $F=8.123$, $p<0.0031$ (hojas) $F=7.224$, $p<0.0050$ (botones) $F=9.262$, $p<0.0017$ (flores) (Figura 38B).

Además, es importante mencionar que a partir de los 60 dpi se empezaron a observar los primeros frutos, aunque el número de estos no muy elevado, en las plantas inoculadas se presentó el mayor número de frutos. (Figura 38B). Del mismo modo se observó una mayor acumulación de biomasa en las plantas inoculadas con los hongos. La biomasa total (área foliar y raíz) de las plantas inoculadas con *F. equiseti* demostró un aumento del 42.6 %, mientras que las plantas inoculadas con *F. cf graminearum* generaron un aumento del 24.48 % ($F=12.17$, $P<0.0005$) (Figura 38C). La misma tendencia se observó cuando se cuantificó el peso seco total (área foliar y raíz), generándose el mayor aumento por *F. equiseti* (M102.R) en un 43.10 % y un 27.5 % por *F. cf graminearum* (P85.T) ($F=5.729$, $p<0.0119$) (Figura 38D).

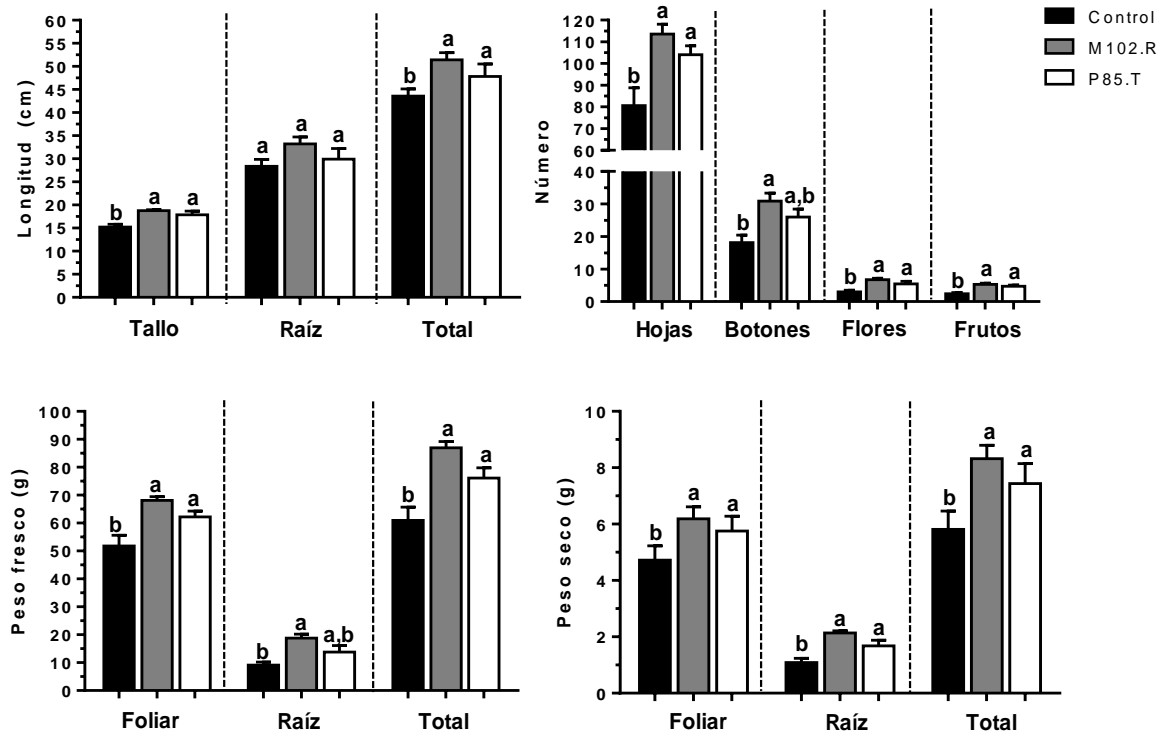


Figura 38. Cuantificación de los parámetros vegetativos de las plantas de chile guajillo inoculadas con *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) a los 60 dpi. **A)** Longitud del tallo, raíz y total **B)** Número de hojas, botones, flores y frutos **C)** Peso fresco área foliar, raíz y total **D)** Peso seco área foliar, raíz y total. Las barras representan el promedio de 10 plantas con su respectiva barra de error estándar y las letras indican diferencias significativas entre cada condición. Las letras indican diferencias significativas entre cada condición (Tukey, $p < 0.05$).

VIII. DISCUSIÓN

La agricultura es una de las actividades humanas más importantes para el desarrollo de las civilizaciones, el abastecimiento de alimentos para una población en aumento ha generado el uso intensivo de las tierras de cultivo para lograr dicho fin, por lo que, además, también se ha intensificado el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas químicos para lograr mayores rendimientos agrícolas, sin embargo, esto trae graves consecuencias para el medio ambiente, contribuyendo a la degradación del suelo y la pérdida de la biodiversidad con riesgos para la salud humana (Tilman et al., 2002; Bhardwaj et al., 2014; Vejan et al., 2016).

En este sentido, los esfuerzos se han canalizado en la búsqueda de estrategias más amigables con el medio ambiente. Una forma de desarrollar un método de producción de cultivos sostenible es mejorar el microbioma benéfico asociado con las plantas (Trivedi et al., 2017). Los microorganismos benéficos tienen la capacidad de aumentar el crecimiento y vigor de las plantas, la eficiencia en la absorción de nutrientes, tolerancia al estrés biótico y abiótico y la resistencia a enfermedades. Dentro de esta gama de microorganismos promotores del crecimiento vegetal se encuentran las rizobacterias y los hongos (Glick, 2012; Vejan et al., 2016).

Los hongos promotores de crecimiento vegetal más conocidos son las micorrizas que incluye a los Glomales, además, también se ha informado la actividad de otros géneros como promotores del crecimiento vegetal como lo son algunas especies de *Trichoderma* (Schuster y Schmoll, 2010). Por otra parte, los hongos del género *Fusarium* se caracterizan por ser un grupo importante de patógenos de una gran diversidad de plantas y generadores de micotoxinas. Sin embargo, existen algunas cepas no patógenas con actividad benéfica, aunque el estilo de vida de estas especies se conoce muy poco (Summerell et al., 2010).

En el presente trabajo se logró identificar morfológicamente dos cepas de hongos filamentosos M102.R y P85.T que previamente se habían aislado de la rizosfera de *Zea mays*. Además, también se analizó la capacidad de ambas cepas como promotores de crecimiento vegetal bajo diferentes sistemas de interacción en *A. thaliana* y *C. annuum* var. mirasol.

El análisis de la identificación molecular previamente realizado por Chavira-Villegas (2018) mediante la amplificación y secuenciación de los ITS reveló que las cepas pertenecen a *Fusarium equiseti* (M102.R) y *Fusarium cf graminearum* (P85.T), además, también encontró que ambas cepas mostraron actividad benéfica en *Arabidopsis thaliana*. Por lo que en el presente trabajo se analizó con mayor profundidad esta actividad.

A manera de complementación, con el fin de identificar taxonómicamente los hongos filamentosos aislados a partir de la rizosfera de maíz se empleó el concepto de especie morfológico propuesto por Cain en 1954, el cual define a la especie como el conjunto de individuos morfológicamente similares, generalmente asociados entre sí por una distribución geográfica definida y separados de otros conjuntos por discontinuidades morfológicas. (Gerlach y Nirenberg, 1982; Nelson et al., 1983; Bousquets y Aguirre, 2000; Sumeerell et al., 2010).

En lo que respecta, a la caracterización morfológica de la cepa M102.R se emplearon distintos medios de cultivo que permitieron distinguir el patrón de crecimiento de la colonia y la generación de estructuras de reproducción. Principalmente, en medio PDA se logró observar abundante micelio de color blanco y flocoso, tornándose posteriormente a marrón o durazno en cultivos viejos, estas características coloniales fueron muy similares en agar harina de maíz mismas que permitieron identificar a la cepa M102.R dentro del género *Fusarium*. Leslie y Summerell (2006) y Martínez-Fernández y col (2015), describen estas características coloniales para *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc (Teleomorfo *Gibberella intricans*) Wollenweber. Sin embargo, la generación de macroconidios

de M102.R en CA difiere morfológicamente a las reportadas para *F. equiseti*, normalmente esta especie se caracteriza por desarrollar macroconidios largos a muy largos y delgadas con una curvatura muy pronunciada, típico de las especies de *Fusarium* de la sección *Gibbosum* como lo describe Leslie y Summerell (2006). Además, los mismos autores describen la presencia de clamidosporas verrugosas y de color marrón pálido en cultivos viejos con presencia de cultivos de una apariencia dorada o marrón en medio CLA, estas características fueron observadas en la cepa de este estudio.

Por otra parte, cabe destacar que el medio SNA se emplea con frecuencia para cultivos de *Fusarium* con la finalidad de observar la presencia-ausencia de microconidios. Generalmente, este rasgo está ausente en *F. equiseti*, sin embargo, Nelson y col. (1983) señalan que algunos aislamientos de *F. equiseti* producen microconidios, pero, además, estos autores también incluyen a *F. scirpi* en su definición de *F. equiseti* cuando se presentan microconidios. Por otra parte, Gerlach y Nirenberg (1982) al igual que Leslie y Summerell (2006) aceptan a la especie de *F. equiseti* afirmando que solo forma macroconidios.

La cepa M102.R descrita en este estudio como *F. equiseti* y corroborada molecularmente por Chavira-Villegas (2018) genera abundantes microconidios en medio SNA como ocurre con la especie de *F. scirpi*. Es importante mencionar que con frecuencia *F. equiseti* se confunde con *F. scirpi* descrito por Wollenweber y sinonimizado por el mismo autor como *F. equiseti* var *bullatum*. Por otra parte, Nelson y col. (1983) y Gerlach y Nirenberg (1982) reconocen a *F. scirpi* como una especie separada, pero Gerlach y Nirenberg (1982) lo diferenciaron en una variedad dentro del complejo de especies de *F. equiseti*. Además, puede confundirse con otras especies como: *F. compactum* y *F. semitectum*.

De acuerdo, a las características coloniales y microscópicas que se observaron en la cepa M102.R es posible que pertenezca al complejo de especies de *F. equiseti*

var *bullatum* debido a la presencia de microconidios, sin embargo, se necesita realizar un estudio morfométrico para corroborar la variedad *bullatum*.

Por otra parte, la caracterización morfológica de la cepa P85.T en medio PDA y CA mostraron características muy similares con colonias de color rojo a naranja. Los cultivos producen pigmentos rojos que se difunden en los medios de cultivo, sensibles al pH, cambiando de rojo a amarillo. Estas características permitieron identificar a la cepa P85.T dentro del género *Fusarium* en base a lo reportado por Gordon (1960) y Leslie y Summerell (2006), quienes además agrupan a las especies de *Fusarium* con estas características dentro de la sección Discolor.

Por otra parte, la generación de macroconidios en medio CA, mostraron claramente una célula basal en forma de pie bien desarrollada, con septos de 5 a 6, moderadamente curvados o rectos. Mientras que en CLA las clamidosporas son intercalares y en cadena principalmente. Consecuentemente, esto permitió identificar a la cepa P85.T como *Fusarium graminearum* (Schwabe), *Gibberella zae* (Schwein) Petch que con anterioridad había sido identificada molecularmente como *Fusarium cf gramineraum* por Chavira-Villegas (2018).

Además, es importante mencionar que el cultivo de la cepa P85.T en medio SNA desarrolló microconidios que generalmente están ausentes en *F. graminearum*. Sin embargo, el dato obtenido por la identificación molecular indica que es una especie *com ferendum* (con forma a) de *gramineraum*.

Normalmente *F. graminearum* se ha clasificado en dos taxones conocidos como *F. graminearum* Grupo 1 y Grupo 2. Morfológicamente es muy difícil distinguir a los dos grupos, sin embargo, existen diferencias ecológicas (distribución) y patológicas (quimiotipo) que permiten diferenciar a los dos grupos. Aoki y O' Donnell (1999a) y Leslie y Summerell (2006), describen a la población del Grupo 1 como *F. pseudograminearum* asociado con la pudrición de la corona del trigo. Las especies de este grupo son heterotálicas con un teleomorfo distintivo, *Gibberella*

coronicola (Aoki y O' Donnell, 1999b). Mientras que el Grupo 2 conserva el nombre original de *F. graminearum* y el teleomorfo de *Gibberella zeae* asociado con el tizón de trigo y pudrición de maíz además de ser homotáticas.

Una forma de distinguir a los dos grupos es en función de su fertilidad en agar zanahoria, los miembros del Grupo 1 al ser heterotáticos en monocultivos no pueden formar peritecios, en cambio los del Grupo 2 al ser homotáticos con mucha facilidad desarrollan los peritecios (Leslie y Summerell, 2006; Leslie et al., 2007). Lo anterior podría ayudar a agrupar a la cepa P85.T dentro del Grupo 1, dado que en cultivos monospóricos en agar zanahoria no mostró desarrollo de peritecios (datos no mostrados) denotando ser una especie heterotática como ocurre con los miembros del Grupo 1.

Es importante mencionar que la cepa de este estudio (P85.T) desarrolló microconidias en medio SNA que generalmente están ausentes para *F. pseudograminearum* (Grupo 1) y *F. graminearum* (Grupo 2), sin embargo, aun así, comparte más rasgos microscópicos y fisiológicos del Grupo 1. Por lo que posiblemente podría calificarse taxonómicamente como *F. cf pseudograminearum*. Generalmente, las especies de ambos grupos suelen confundirse con mucha facilidad con *F. crookwellense* y *F. culmorum* y con especies de la sección *Sporotrichiella* como *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*, *F. poae* y *F. chlamydosporum*.

El género *Fusarium* tiene distribución mundial, y varias de sus especies son fitopatógenos e infectan a una amplia gama de cultivos, incluido el maíz (*Zea mays* L.) trigo (*Triticum* spp), avena (*Avena sativa* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.). La presencia de *Fusarium* representa un problema agrícola importante debido a que reduce la calidad y el rendimiento de los cultivos y, más importante, por producir micotoxinas (Nicolaisen et al., 2009).

En México, se ha reportado el aislamiento de *Fusarium* de diversas plantas de la familia Poaceae. Gilchrist-Saavedra y col (2005), reportaron el aislamiento de *F. graminearum*, *F. avenaceum* y *F. equiseti* como las especies asociadas a síntomas de pudrición de raíz y tizón de la espiga en algunas zonas trigueras de México, mientras que Leyva-Mir y col (2017), reportan el aislamiento de *F. proliferatum* y *F. graminearum* como las principales especies causantes de la pudrición de raíz en trigo cultivado en el Bajío de México.

En otro estudio realizado por Figueroa-Rivera y col (2010), reportan la presencia de *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *F. heterosporum*, *F. esquiseti*, *F. reticulatum*, en la raíz de maíz en el estado de Guanajuato donde *F. subglutinans* fue la especie con más prevalencia y en cuanto a patogenicidad, *F. verticillioides* y *F. subglutinans* fueron las especies más patogénicas. Félix y col (2018), aislaron *Fusarium* spp a partir de tallo y raíz de maíz de plantas jóvenes y adultas, así como de granos de mazorcas enfermas en los municipios de Ahome, Culiacán y Elota en el estado de Sinaloa, en su estudio identificaron *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *F. nygamai*, *F. cf bullatum* y *F. andiyazi*, en donde *F. verticillioides* fue la especie más predominante.

El aislamiento y la identificación de las especies de *F. equiseti* (posiblemente *F. var bullatum*) y *F. cf graminearum* (posiblemente *F. cf pseudograminearum*) de este estudio a partir de la rizosfera de maíz del estado de Aguascalientes concuerda con las especies aisladas a partir de plantas de la familia Poaceae.

En la naturaleza, las plantas interactúan con una extensa diversidad de microorganismos tanto benéficos como patógenos, se ha demostrado que algunos de estos microorganismos benéficos desempeñan algunas funciones biológicas cruciales mejorando el desarrollo de los cultivos vegetales.

La promoción de crecimiento vegetal de hongos del género *Fusarium* caracterizados principalmente por ser patógenos no está ampliamente descrita

como ocurre con algunas cepas del género *Trichoderma* (Benítez et al., 2004). Sin embargo, en este estudio se analizó la capacidad de promoción de crecimiento vegetal *in vitro* de *F. equiseti* (M120.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en *A. thaliana* (Col-0) bajo diferentes métodos de interacción (At-Mo, At/MS-Mo y At/PDB-Mo). Fue notable que la inoculación de ambas especies de *Fusarium* afectó positivamente el crecimiento y desarrollo de las plántulas bajo todos los sistemas de interacción.

Además, se mostró un aumento en el desarrollo de raíces secundarias y pelos radiculares, este efecto se denotó con mayor detenimiento en la interacción directa (At-Mo) e indirecta (At/MS-Mo) en MS para ambas cepas, de tal manera que se sugiere que los efectos están mediados por auxinas, la más abundante en plantas es el IAA (ácido indol-3-acético) que controla la regulación transcripcional de múltiples procesos incluidos el desarrollo y brote de raíces (Jiyoung et al., 2017). Además, esta hormona no solo se encuentra en el reino vegetal, sino que también es sintetizada por microorganismos como bacterias y hongos (Tian-Qiong et al., 2017).

El efecto de promoción de ambas cepas de *Fusarium* también se evaluó en sistema dividido cultivando los hongos en medio sales MS y PDA, el desarrollo de las plántulas bajo este sistema de inoculación fue muy similar, sin embargo, el efecto de promoción de crecimiento vegetal se observó con mayor precisión en la interacción indirecta en MS para ambas cepas. Las diferencias observadas en la promoción de crecimiento vegetal tanto en la interacción directa como indirecta se pueden atribuir a la generación y emisión de diferentes compuestos difusibles y volátiles en medio MS y PDA, los cuales pueden ejercer un efecto en el crecimiento y desarrollo de las plántulas de *A. thaliana*.

Algunos estudios han informado que los hongos pueden promover el crecimiento vegetal sin establecer un contacto físico con la planta mediante la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) con diversas funciones en las plantas

como por ejemplo modulando la arquitectura de la raíz y la comunicación entre plantas y microorganismos. En *Trichoderma atroviride*, se ha informado que la emisión de 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) promueve el crecimiento de las plantas, inhibiendo el crecimiento primario de la raíz e induciendo la formación lateral de la raíz (Garnica-Vergara et al., 2015).

Recientemente González-Pérez y col (2018) informaron la identificación de VOC's emitidos por *T. atroviride* y *T. virens* ante la interacción indirecta con *A. thaliana* cuando los hongos se cultivaron en medio sales MS y PDA encontrando es su mayoría sesquiterpenos. En su estudio, sugieren que las cepas de *Trichoderma* emiten diferentes tipos de compuestos orgánicos volátiles en relación con el medio de cultivo en el que creció el hongo, lo que resulta en efectos positivos en el crecimiento de las plantas. De tal manera que la forma en cómo se nutre el hongo determina e influye en los tipos de compuestos volátiles que estos pudieran emitir, dado que muchos de los compuestos volátiles se generan de la oxidación de la glucosa, además de la temperatura, la humedad y el pH.

Lo anterior podría ayudar a entender las diferencias que fueron observadas en las cepas de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) cuando se inocularon con *Arabidopsis* en sistema dividido determinando que los VOC emitidos cuando se cultivaron en MS y PDA influyeron en el crecimiento de las plántulas.

Sin embargo, se sabe poco sobre cómo los VOC's de los patógenos de plantas transmitidos por el suelo afectan el crecimiento y la resistencia de las plantas. Minerdi y col (2011), informan una cepa de biocontrol de *Fusarium oxysporum* capaz de mejorar el crecimiento vegetal de lechuga mediante la emisión de β -cariofileno, un sesquiterpeno volátil. En otro estudio Bitas y col (2015), encontraron el mismo compuesto volátil en cepas de *F. oxysporum* con efectos similares en *A. thaliana*.

De manera similar Thongkamngam y Jaenaksorn (2017), evaluaron la promoción de crecimiento vegetal de una cepa de *Fusarium oxysporum* (F221-B) en plantas de lechuga en un sistema hidropónico, además, también observaron la actividad antagónica de esta cepa frente a hongos fitopatógenos del mismo género. El efecto de los compuestos volátiles de otros hongos fitopatógenos con actividad promotora también se ha informado en *Phoma* sp, *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia solani* sobre el crecimiento del tabaco y *A. thaliana* (Nazinin et al., 2013; Sánchez-López et al 2016; Cordovez et al., 2017).

La promoción de crecimiento vegetal mediante la adición de los metabolitos a través de los exudados de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) en medio líquidos MS y PDB, fueron evaluados en plántulas de *A. thaliana*. Evidentemente, los efectos de los exudados de ambas cepas de *Fusarium* mostraron tener efectos positivos sobre el crecimiento de las plántulas generando un aumento de biomasa, raíces secundarias y pelos radiculares, así como de clorofila. Sin embargo, las plántulas expuestas a los exudados de PDB de ambas cepas de *Fusarium* provocaron signos de clorosis en las plántulas, aun así, se generó un aumento en el desarrollo de raíces secundarias.

Los hongos son productores eficaces de una extensa variedad de metabolitos secundarios, que generalmente no son esenciales para su ciclo de vida, sin embargo, su papel o actividad biológica es bastante versátil (Pérez-Nadales et al., 2014; Scharf et al., 2014). La capacidad de producir fitohormonas varía significativamente entre las especies de *Fusarium* generalmente todas las especies de este género pueden sintetizar auxinas por múltiples vías y es probable que tales diferencias afecten la especificidad del huésped induciendo respuestas únicas en las plantas (Vrabka et al., 2018).

La detección de fitohormonas en cultivos o exudados de *Fusarium* se detectó por primera vez en *Fusarium fujikuroi* (*Gibberella fujikuroi*) a partir del cual se aislaron e identificaron las giberelinas (AG) (Tudzynski y Hölder, 1998). La producción de

otras hormonas como las citoquininas (CK) y las auxinas por *Fusarium* se sugirió por primera vez hace más de 35 años basándose en su detección en exudados en cultivos líquidos (Mańka, 1980; Van Staden y Nicholson, 1989; Thakur y Vyas, 1983).

Sin embargo, es importante señalar que la producción de ácido giberílico (GA₃) está restringida hasta ahora al complejo de especies de *G. fujikuroi* conformado por las nueve especies sexuales y las especies anamórficas, generalmente este complejo de especies contiene todo el grupo de genes para la síntesis de GA. Sorprendentemente ninguna otra especie de los 20 complejos de *Fusarium* es capaz de sintetizar giberelinas (Malonek et al., 2005a; Malonek et al., 2005b).

Por el contrario Luo y col (2016) han informado que *F. graminearum* bajo condiciones de cultivo líquido puede usar triptamina (TAM) e indol-3-acetonitrilo (IAN) como intermedios biosintéticos para producir IAA, como vías dependientes de L-triptófano en lugar de las vías de ácido indol-3-acetamida o indol-3-pirúvico. Lo anterior pudiera sugerir que los exudados de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) empleados en los cultivos de *A. thaliana* pudieran contener fitohormonas como auxinas y citoquininas a excepción de las giberelinas que solo están presentes en el complejo de *F. fujikuroi* y ser los responsables del cambio en el desarrollo de las mismas, además también se sugiere que al igual que los volátiles, el contenido de nutrientes y las condiciones del cultivo influye en la síntesis de metabolitos como posibles reguladores de crecimiento vegetal.

La acumulación de auxinas o el aumento de respuesta a auxinas pueden conducir a diversos resultados en la planta, desde la patogénesis hasta la promoción del crecimiento. Para evaluar más a fondo el efecto de la acumulación de auxinas de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T), se analizó la línea transgénica DR5::GUS de *A. thaliana* bajo todos los sistemas de interacción (directa e indirecta en MS y PDA).

En las interacciones directas ambas cepas de *Fusarium* aumentaron la expresión de GUS en la zona meristemática de las hojas y en la punta de las raíces primarias y secundarias, así como en la roseta de las plántulas a diferencia del control donde no se observó esta expresión. A partir de estos resultados se puede sugerir que los compuestos difusibles son los responsables de la acumulación de auxinas. Por otra parte, en el sistema dividido, cuando ambos hongos se cultivaron en MS y PDA, se observó una mayor expresión de GUS en las hojas, roseta, en las puntas de las raíces primarias y secundarias. Sin embargo, la expresión de GUS fue más evidente con *F. equiseti* (M102.R) en medio PDB. En este sentido es posible que los VOC's emitidos por los hongos actúen como precursores de auxina o participar en alguna vía de señalización. Salas-Marina y col (2011), sugieren que estos efectos son el resultado de la participación de un mecanismo dependiente de auxina en el crecimiento de las plantas y los cambios en la arquitectura de la raíz, además observaron este mismo efecto en las plántulas de *Arabidopsis* empleando *Aspergillus ustus*.

Además, también se analizó el fenotipo de la línea mutante *Rhd6* de *A. thaliana* que carece de la generación de pelos radiculares y cuyo fenotipo de la raíz defectuosa puede recuperarse mediante la adición de IAA o por el precursor ET del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Masucci y Schiefelbein, 1994). En las interacciones a las que fueron sometidas las plántulas tanto directas en MS como indirectas en MS y PDA los dos hongos pudieron revertir el efecto de la mutante generando pelos radiculares. Particularmente cuando *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) se cultivaron en medio PDA mostraron la mayor densidad de pelos radiculares.

González-Pérez y col (2018), observaron efectos similares cuando inocularon la mutante *Rhd6* con cepas de *Trichoderma*, en sus resultados también demostraron que ante la interacción indirecta en PDA las plántulas generaron mayor desarrollo de pelos radiculares. En un estudio realizado por Contreras-Cornejo y col (2009), demostraron que, el fenotipo de la línea mutante *Rhd6* puede restaurarse

mediante la adición exógena de derivados de auxina como IAAId e IET aislados de *T. virens*. De manera similar Salas-Marina y col (2011), pudieron recuperar el fenotipo de la raíz de *Rhd6* cuando inocularon las plántulas con *Aspergillus ustus*. Por otra parte, se ha sugerido que además de la producción de auxinas en hongos, la liberación de etileno puede activar la vía de síntesis de auxinas en plantas, la producción de estas dos hormonas es esencial para promover el crecimiento de pelos radiculares como se ha demostrado en especies de *Trichoderma* y *Laccaria bicolor* (Contreras-Cornejo et al., 2009; Splivallo et al., 2009). En comparación estas observaciones sugieren que *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf gramineum* (P85.T) pudieran estar sintetizando y liberando ambas hormonas denotando un efecto en el desarrollo de *A. thaliana*.

Lo anterior refuerza el hecho de que la composición del medio de cultivo en el que crece el hongo es un factor determinante en la producción de compuestos difusibles y volátiles y, por lo tanto, puede estar involucrada en la biosíntesis, redistribución y transporte de auxinas y etileno.

Finalmente, en este estudio se demostró la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de ambas cepas de *Fusarium* en un cultivo de importancia económica *Capsicum annuum* var mirasol. El análisis se realizó a diferentes tiempos de inoculación (15, 30, 45 y 60 dpi). Los efectos en el crecimiento vegetal se empezaron a notar a partir de los 15 dpi, sin embargo, este efecto fue más evidente a partir de los 45 dpi. Las dos cepas de *Fusarium* mostraron importantes efectos de promoción del crecimiento en las plantas de chile a los 60 dpi, en donde hubo un aumento de biomasa, longitud de tallo, raíz, número de hojas, botones, flores y frutos.

Actualmente, se desconocen muchos aspectos del estilo de vida de las especies de *Fusarium* no patogénicas y/o asintomáticas que ejercen de alguna manera efectos benéficos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin embargo, existe evidencia de que algunas cepas de *Fusarium* actúan como colonizadores

asintomáticos de gramíneas silvestres como ha ocurrido con algunas especies del complejo de *Fusarium graminearum* (Lofgren et al., 2018).

De igual manera se ha reportado la efectividad como promotor de crecimiento vegetal de *Fusarium equiseti* en diversas plantas. Saldajeno y Hyakumachi (2011), informaron un mejoramiento en el crecimiento de las plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.), después de la inoculación con *F. equiseti*. Por otra parte, Šišić y col (2016), evaluaron la promoción de esta especie en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) y también observaron su actividad como agente de biocontrol frente a *Fusarium avenaceum* y *Peyronellaea pinodella*.

Se ha propuesto que las especies no patogénicas de *Fusarium* ejercen su efecto como promotores del crecimiento vegetal mediante la síntesis de reguladores de crecimiento mediante la producción de fitohormonas como el ácido indol acético (IAA) y el ácido abscísico (ABA), que pueden acelerar y modular el crecimiento de las plantas. Además, de la producción de otros metabolitos como la fumonisina por algunos *Fusarium* spp, pueden actuar como una potente micotoxina, aunque por otro lado se ha demostrado que mejora el desarrollo de la raíz de maíz (Yates et al., 1997).

La inoculación de especies de *Fusarium* en Chile no se ha reportado hasta el momento, sin embargo, en este estudio al igual que los reportes previos con *F. equiseti* demostraron aumentar el vigor de las plantas de Chile al igual que la cepa de *F. cf graminearum* (P85.T).

VIII. CONCLUSIONES

La identificación morfológica de cada una de las cepas fúngicas permitió corroborar el género y la especie al que previamente se habían identificado molecularmente como *Fusarium equiseti* (M102.R) y *Fusarium cf graminearum* (P85.T). Además, ambas cepas de *Fusarium* mostraron actividad como promotores del crecimiento y desarrollo vegetal *in vitro* cuando se inocularon en plantas de *A. thaliana* (Col-0) bajo diferentes sistemas de interacción directa e indirecta, mostrando más este efecto ante la interacción indirecta en MS (At/MS-Mo), además la actividad de promoción de crecimiento vegetal también se complementó mediante la extracción y cuantificación de clorofila observando un aumento en la acumulación de esta (clorofila) en todos los tratamientos probados.

Por otra parte, el análisis de la actividad de los exudados y/o metabolitos como promotores de crecimiento vegetal mostraron un efecto en la fisiología de las plántulas de *A. thaliana* principalmente cuando se adicionaron los metabolitos concentrados, consecuentemente el desarrollo de las plántulas mejoró cuando se realizaron diluciones seriadas de los exudados. Los metabolitos producidos por *F. equiseti* (M102.R) en MS manifestaron mejores efectos en la generación de raíces secundarias, pelos radiculares y acumulación de clorofila, mientras que los exudados en PDB generaron clorosis en las plántulas en todas las diluciones probadas.

De mismo modo los exudados de *F. cf graminearum* (P85.T) generados en MS mostraron tener un efecto promotor en las plántulas de *A. thaliana* principalmente en las diluciones. Además, los signos de clorosis en las plántulas también se observaron cuando se agregaron los exudados generados en PDB a los cultivos vegetales, sin embargo, aun así, se mostró un ligero aumento en la producción de clorofila.

Además de la promoción de crecimiento vegetal de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* (P85.T) también se analizó la respuesta a auxinas bajo los sistemas de interacción directa en MS e indirecta en MS y PDA, mediante la línea transgénica *DR5::GUS*, mostrando una mayor acumulación de auxinas en las puntas de las raíces primarias y secundarias, las hojas y la roseta de *A. thaliana* en los sistemas de inoculación directa, el mismo efecto se observó en las interacciones indirectas sugiriendo la existencia de compuestos volátiles como los responsables de la acumulación endógena de auxinas. Por otra parte, el fenotipo defectuoso en la generación de pelos radiculares de la línea mutante *Rhd6* de *A. thaliana* se revirtió con ambas cepas de *Fusarium* tanto en la interacción directa e indirecta.

La inoculación de las cepas de M102.R y P85.T en plantas de *C. annuum* tuvo un efecto positivo estimulando el crecimiento y desarrollo vegetal, particularmente la cepa M102.R de *Fusarium equiseti* mostró mayor actividad como promotor de crecimiento vegetal.

IX. PERSPECTIVAS

Corroborar la identificación molecular de las cepas de *F. equiseti* (M102.R) y *F. cf graminearum* empleando otros marcadores moleculares como el factor uno alfa de la elongación (*EF-1 α*) y Fg16 para el linaje de *F. cf graminearum* (P85.T).

Evaluar la solubilización de fosfatos y producción de sideróforos de ambas cepas fúngicas.

Analizar los VOC (compuestos orgánicos volátiles) de las cepas fúngicas ante la interacción indirecta en MS (At-/MS-Mo) y PDA (At/PDA-Mo).

Identificar los compuestos difusibles (auxinas) de los exudados de ambas cepas en medio MS y PDB por HPLC.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G.** 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287: 2185–2195.
- Akiyama, K., Hayashi, H.** 2006. Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of botany*. 97(6): 925–31.
- Aoki, T., O'Donnell, K.** 1999a. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia* 91: 597–609.
- Aoki, T., O'Donnell, K.** 1999b. Morphological characterization of *Gibberella coronicola* sp. nov., obtained through mating experiments of *Fusarium pseudograminearum*. *Mycoscience* 40: 443–453.
- Babu, A.G., Kim, S.W., Yadav, D.R., Hyum, U., Adhikari, M., Lee, Y.S.** 2015. *Penicillium menonorum*: A Novel Fungus to promote growth and nutrient management in cucumber plants. *Mycobiology*. 43(1): 49–56.
- Badri, D.V., Vivanco, J.M.** 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ*. 32(6): 666–681
- Badri, D.V., Weir, T.L., van der Lelie, D., Vivanco, J.M.** 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol*. 20(6): 642–650.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M.,** 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 233–266.
- Baldwin, I.T.** 2010. Plant volatiles. *Curr Biol* 20:392–397.
- Baldwin, I.T., Halitschke, R., Paschold, A., von Dahl, C.C., Preston, C.A.** 2006. Volatile signaling in plant plant interactions: 'Talking-Trees' in the genomics era. *Science* 311:812-815.

- Benítez, T., Delgado-Jarana, J., Rincón, A.M., Rey, M., Limón, M.C.** 1998. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. En: Pandalai SG (ed), pp. 129-150. Recent developments in microbiology. Vol. 2. Research Signpost, Trivandrum. India.
- Ben-Issa, R., Gomez, L., Gautier, H.** 2017. Companion plants for aphid pest management. *Insects*. 8(4): 112.
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., Tuteja, N.** 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*. 13: 66.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K.** 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agricultura. *World J Microbiol Biotechnol*. 28:1327–1350.
- Bhuvanewari, B., Reetha, S., Sivaranjani, R., Ramakrishnan, K.** 2014. Effect of AM fungi and *Trichoderma* species as stimulations of growth and morphological character of chilli (*Capsicum annuum*. L). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(3): 447-455.
- Bitas, V., McCartney, N., Li, N., Demers, J., Kim, J.E., Kim, H.S., Brown, K.M., Kang, S.** 2015. *Fusarium oxysporum* volatiles enhance plant growth via affecting auxin transport and signaling. *Frontiers in microbiology*. 6. 1248.
- Bonfante P, Anca I.A.** 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu Rev Microbiol*. 63: 363-383.
- Bonkowski, M.** 2004. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytol*. 162:617–631.
- Braga, R.M., Dourado, M.N., Araújo, W.L.** 2016. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian journal of microbiology* 47(1): 86-98.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L., Schulze-Lefert, P.** 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology*. (64): 807-838.

Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., Wanek, W. 2019. Root Exudation of Primary Metabolites: Mechanisms and Their Roles in Plant Responses to Environmental Stimuli. *Frontiers in plant science*, 10:157.

Castellón-Martínez, E., Chávez-Servia, J., Carrillo-Rodríguez, J.C., Vera-Guzman, A.M. 2012. Preferencias de consumo de chiles (*Capsicum annuum* L.) nativos en los valles centrales de Oaxaca, México. *Revista Fitotecnica Mexicana*. 35:5 27–35.

Chang, C., Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M. 2016. Field guide to plant model systems. *Cell*. 167(2): 325–339.

Chavira-Villegas, F. 2018. Identificación molecular de *Fusarium* spp y su uso benéfico en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Zacatecas.

Chen. Y., Yordanov, Y.S., Ma, C., Strauss, S., Busov, V.B. 2013. DR5 as a reporter system to study auxin response in *Populus*. *Plant Cell Rep.* 32(3):453–63.

Cifuentes-Romo, D. 1990. Prácticas de patología vegetal. Ediciones Universidad de Murcia. 53p.

Cohen, B.A., Amsellem, Z., Maor, R., Sharon, A., Gressel, J. 2002. Transgenically enhanced expression of indole-3-acetic acid confers hypervirulence to plant pathogens. *Phytopathology*. 92;590–6.

Collemare J., Billard A., Böhnert H.U., Lebrun M.H. 2008. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. *Mycol. Res.* 112: 207–215.

Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., López-Bucio J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149: 1579–1592.

Contreras-Cornejo, H.A., Macias-Rodriguez, L., del-Val, E., Larsen, J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 92: 1–17.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 149(3): 1579–1592.

Cordovez, V., Mommer, L., Moisan, K., Lucas-Barbosa, D., Pierik, R., Mumm, R., Raaijmakers, J. M. 2017. Plant phenotypic and transcriptional changes induced by volatiles from the fungal root pathogen *Rhizoctonia solani*. *Frontiers in plant science*. 8: 1262.

Dayle E.S., Polans N.O., Paul D.S., Melvin R.D. 2001. Angiosperm DNA contamination by endophytic fungi: detection and methods of avoidance. *Plant Mol. Biol. Rep.*19: 249–260.

Delory, B.M., Delaplace, P., Fauconnier, ML., du Jardin, P. 2016. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? *Plant Soil* 402: 1–26.

Dobbelaere. S., Vanderleyden, J., Okon, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 22:107–149.

Doornbos, R., van Loon, L., Bakker, P. 2012. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 32: 227–243.

Dudareva N, Negre F, Nagegowda D.A, Orlova I. 2006 Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci* 25:417–440.

Dudareva N, Klempien A, Muhlemann K, Kaplan I. 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol* 198:16–32.

Effmert U, Kalderás J, Warnke R, Piechulla B. 2012. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J Chem Ecol.* 38(6): 665–703.

Farmer, E.E. 2001. Surface-to-air signals. *Nature* 411:854–856.

Feng, Y., Xu, P., Li, B., Li, P., Wen, X., An, F., Gong, Y., Xin, Y., Zhu, Z., Wang, Y., Guo, H. 2017. Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 114(52): 13834–13839.

Figuroa-Rivera M.G., Rodríguez-Guerra R., Guerrero-Aguilar B.Z., González-Chavira, M.M, Pons-Hernández J.L., Jiménez-Bremont, J.F., Ramírez-Pimentel, J.G., Andrio-Enríquez, E., Mendoza-Elos, M. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Rev. mex. Fitopatol.* 28(2): 124-134.

Fu, S. F., Wei, J. Y., Chen, H. W., Liu, Y. Y., Lu, H. Y., Chou, J. Y. 2015. Indole-3-acetic acid: A widespread physiological code in interactions of fungi with other organisms. *Plant signaling & behavior.* 10(8): e1048052.

Garnica-Vergara A., Barrera-Ortiz, S., Muñoz-Parra, E., Raya-González, J., Méndez-Bravo, A., Macías-Rodríguez, L., Ruiz-Herrera, L.F, López-Bucio, J. 2015. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytol.* 209(4):1496-512.

Gerlach, W., and H. Nirenberg. 1982. The genus *Fusarium*– A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)* 209: 1-405.

Gilchrist-Saavedra, L., Fuentes-Dávila, G., Martínez-Cano, C., López-Atilano, R.M., Duveiller, E., Singh, R.P., M. Henry, M., García, A.I., 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 68 p. 2a. ed. CIMMYT, México, D.F., México.

Glick B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. 1–15.

González-Pérez, E., Ortega-Amaro, M. A., Salazar-Badillo, F. B., Bautista, E., Douterlungne, D., Jiménez-Bremont, J. F. 2018. The *Arabidopsis-Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. Scientific reports. 8(1): 16427.

Gordon. W.L. 1960. The taxonomy and habitats of *Fusarium* species from tropical and temperate regions Can. J. Botany. 38: 643-658.

Heil, M. and Ton, J. 2008. Long-distance signalling in plant defence. Trends Plant Sci. 13:264–272.

Hung, R., Lee, S., Bennett, J.W. 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma volatile* organic compounds. Fungal Ecol. 6 19–26.

Igiehon, N.O., Babalola, O.O. 2018. Below-ground-above-ground plant-microbial interactions: focusing on soybean, rhizobacteria and mycorrhizal fungi. The open microbiology journal. 12: 261–279.

Insam, H. and Seewald, M.S.A. 2010. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. Biol. Fertil. Soils 46:199–213.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO journal. 6(13), 3901–3907.

Kai M., Haustein M., Molina F., Petri A., Scholz B., Piechulla B. 2009. Bacterial volatiles and their action potential. Appl. Microbiol. Biotechnol. 81: 1001–1012.

Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Maffei, M.E. 2015. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. Frontiers in plant science, 6, 151.

- Korpi, A., Jarnberg, J., Pasanen, A.L.** 2009. Microbial volatile organic compounds. *Crit Rev Toxicol* 39: 139–193.
- Lareen, A., Burton, F., Schäfer, P.** 2016. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant molecular biology*. 90(6): 575–87.
- Leslie, J.F., Anderson, L.L., Bowden, R.L., Lee, Y.W.** 2007. Inter-and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 119: 25–32.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A.** 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Professional, Ames, Iowa.
- Leyva-Mir, S.G., Vega-Portillo, H.E., Villaseñor-Mir, H.E., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M., Tovar-Pedraza, J.M.** 2017. Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz del trigo en el bajío, México. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*. 33(2), 142-151.
- Link, H.F.** 1809. *Observationes in ordines plantarum naturalis, Dissetatio I*. *Mag. Ges. Naturf. Freunde, Berlin* 3: 3–42.
- Lofgren, L.A., LeBlanc, N.R., Certano, A.K., Nachtigall, J., LaBine, K.M., Riddle, J., Broz, K., Dong, Y., Bethan, B., Kafer, C.W., Kistler, H. C.** 2018. *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses?. *The New phytologist*. 217(3): 1203–1212.
- Lugtenberg, B., Kamilova, F.** 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63: 541–556.
- Luo, K., Rocheleau, H., Qi, P.F., Zheng, Y.L., Zhao, H.Y., Ouellet, T.** 2016. Indole-3-acetic acid in *Fusarium graminearum*: Identification of biosynthetic pathways and characterization of physiological effects. *Fungal Biol*. 120(9):1135-1145.

Macias-Rubalcava, M.L., Hernandez-Bautista, B.E., Oropeza, F., Duarte, G., Gonzalez, M.C., Glenn, A.E. 2010. Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from muscodor yucatanensis, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. J. Chem. Ecol. 36 1122–1131.

Maffei M.E. 2010. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. South African J Bot. 76:612–631.

Malamy, J.E and Benfey, P.N. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development. 124(1):33–44.

Malonek, S., Bömke, C., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Bornberg-Bauer, E., Tudzynski, B. 2005. Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Phytochemistry 66:1296-1311.

Malonek, S., Rojas, M.C., Hedden, P., Hopkins, P., Tudzynski, B. 2005. Restoration of gibberellin production in *Fusarium proliferatum* by functional complementation of enzymatic blocks. Applied and Environmental Microbiology. 71(10): 6014–6025.

Mañka M. 1980. Auxin and gibberellin-like substances synthesis by *Fusarium* isolates pathogenic to corn seedlings. Acta Microbiol. Pol. 29: 365–374.

Martínez-Fernández, E., Martínez-Jaimes, P., Sánchez, D.G., Peña-Chora, G., Hernández-Hernández, V.M. 2015. Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. Revista Mexicana de Micología. 42: 33-43.

Martinez-Viveros O, Jorquera M.A, Crowley D.E, Gajardo G, Mora M.L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. J Soil Sci Plant Nutr. 10:293–319.

Masucci, J.D., Schiefelbein, J.W. 1994. The *rhd6* mutation of *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. Plant physiology. 106(4): 1335–1346.

McNear, Jr., D.H. 2013. The Rhizosphere-Roots, Soil and Everything In Between. Nature Education Knowledge. 4(3):1

Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M. 2013. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS Microbiol. Rev. 37(5):634–663.

Minerdi, D., Bossi, S., Maffei, M.E., Gullino, M.L., Garibaldi, A. 2011. *Fusarium oxysporum* and its bacterial consortium promote lettuce growth and expansin A5 gene expression through microbial volatile organic compound (MVOC) emission. FEMS Microbiol. Ecol. 76: 342–351.

Minnich, M. and Schumacher, B. 1993. Behavior and determination of volatile organic compounds in soil: A literature review. US Environmental Protection Agency. EPA 600/R-93/140:1–104.

Moretti, A. N. 2009. Taxonomy of *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad. 117: 7–13.

Mukherjee, M., Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Zachow, C., Berg, G., Zeilinger, S. 2012. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions: advances in genetics of biological control. Indian Journal of Microbiology. 52(4): 522–529.

Murashige, T and Skoog, F. 1962 A revised médium for rapid growth and bio assay with tobacco cultiures. Physiologia plantarum, 15:473-497.

Naznin H. A., Kimura M., Miyazawa M., Hyakumachi M. 2013. Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungus *Phoma* sp GS8-3 for growth promotion effects on tobacco. Microbes Environ. 28: 42–49.

Nelson, P.E., Dignani, M.C., Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. Clinical microbiology reviews. 7(49): 479–504.

Nelson, P.E, Toussoun, T.A, Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park.

Nicolaisen, M., Supronienė, S., Kærsgaard, N.L., Lazzaro, I., Henrik, S.N., Fejer, J.A. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *J. Microbiol. Meth.* 76: 234-240.

Niederhauser, S. J. 1949. Enfermedades del maíz en México. Folleto de divulgación No. 9. Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D. F. 39p.

Niinemets, Ü., Fares, S., Harley, P., Jardine, K.J. 2014. Bidirectional exchange of biogenic volatiles with vegetation: emission sources, reactions, breakdown and deposition. *Plant, cell & environment.* 37(8): 1790–1809.

Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World journal of microbiology & biotechnology.* 33(11), 197.

Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Ias-Rodriguez L., Lopez-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Sign. Behav.* 4: 701–712.

Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 6(10):763–775.

Park, J., Lee, Y., Martinoia, E., Geisler, M. 2017. Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know. *BMC biology.* 15(1): 93.

Patkar, R.N., Naqvi, N.I. 2017. Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. *PLoS pathogens,* 13(6): e1006334.

Peñuelas, J., Asensio, D., Tholl, D., Wenke, K., Rosenkranz, M., Piechulla, B. 2014. Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant Cell Environ* 37: 1866–1891.

Perez-Nadales E., Almeida Nogueira M. F., Baldin C., Castanheira S., El Ghalid M., Grund E., Lengeler, K., Marchegiani, E., Mehrotra, P.V., Moretti, M.,

Naik, V., Oses-Ruiz, M., Oskarsson, T., Schäfer, K., Wasserstrom, L., Brakhage, A.A., Gow, N.A., Kahmann, R., Lebrun, M.H., Perez-Martin, J., Di Pietro, A., Talbot, N.J., Toquin, V., Walther, A., Wendland, J. 2014. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet. Biol.* 70, 42–67.

Piechulla B, Degenhardt J. 2014. The emerging importance of microbial volatile organic compounds. *Plant Cell Environ* 37: 811–812.

Pieterse, C.M.J., van Pelt J.A., Verhagen, B.W.M., Ton, J., van Wees, S.C.M., Leon-Kloosterziel, K.M., van Loon, L.C. 2003. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis*. 35:39–54.

Pusztahelyi, T., Holb, I. J., Pócsi, I. 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*. 6, 573.

Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moënne-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*. 321: 341–361.

Rasmann S., Turlings T.C. 2016. Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. *Curr. Opin. Plant Biol.* 32:62–68.

Richardson, A.E., Barea, J.M., Mcneill, A.M., Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339.

Rillig., M.C., Aguilar-Trigueros, C.A., Bergmann, J., Verbruggen, E., Veresoglou, S.D., Lehmann, A. 2014. Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytologist*. 205: 1385–1388.

Ruiz, R., Bilbao, R., Murillo, M.B. 1998. Adsorption of different VOC onto soil minerals from gas phase; Influence of mineral, type of VOC, and air humidity. *Environ. Sci. Technol.* 32:1079–1864.

Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Cervantes-Badillo, M.G., Rosales-Saavedra, M.T., Islas-Osuna M.A., Casas-Flores, S. 2011. The plant growth-

promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. J Microbiol Biotechnol. 21(7): 686-696.

Saldajeno, M.G.B., Hyakumachi, M. 2011. The plant growth-promoting fungus *Fusarium equiseti* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* stimulate plant growth and reduce severity of anthracnose and damping-off diseases in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings. Annals of Applied Biology. 159(1): 28–40.

Sánchez-López, A. M., Bahaji, A., De Diego, N., Baslam, M., Li, J., Muñoz, F. J., Almagro, G., García-Gómez, P., Ameztoy, K., Ricarte-Bermejo, A., Novák, O., Humplík, J. F., Spíchal, L., Dolezal, K., Ciordia, S., Mena, M. C., Navajas, R., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero J. 2016. Arabidopsis responds to *Alternaria alternata* volatiles by triggering plastid phosphoglucose isomerase-independent mechanisms. Plant Physiology. 172; 1989–2001.

Sarkar, S.C., Wang, E., Wu, S., Lei, Z. 2018. Application of trap cropping as companion plants for the management of agricultural pests: a review. Insects. 9(4): 128.

Scharf D. H., Heinekamp T., Brakhage A. A. 2014. Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. PLoS Pathog. 10(1): e1003859.

Schimel, J.P., and Bennett, J. 2004. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. Ecology 85:591–602.

Schmidt, R., Cordovez, V., de Boer, W., Raaijmakers, J., Garbeva, P. 2015. Volatile affairs in microbial interactions. The ISME journal. 9(11), 2329–2335.

Schüssler. A., Schwarzott. D., Walker. C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. Mycological Research.105(12): 1413–1421

Schuster, A., Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Applied microbiology and biotechnology. 87(3): 787–799.

- Shi, T. Q., Peng, H., Zeng, S. Y., Ji, R. Y., Shi, K., Huang, H., Ji, X. J.** 2017. Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. *Bioengineered*. 8(2): 124–128.
- Singh, S.K., Strobel, G.A., Knighton, B., Geary, B., Sears, J., Ezra, D.** 2011. An endophytic phomopsis sp possessing bioactivity and fuel potential with its volatile organic compounds. *Microb. Ecol.* 61 729–739.
- Šišić, A., Baćanović, J., Finckh, M.R.** 2017. Endophytic *Fusarium equiseti* stimulates plant growth and reduces root rot disease of pea (*Pisum sativum* L.) caused by *Fusarium avenaceum* and *Peyronellaea pinodella*. *Eur J Plant Pathol.* 148(2): 271–282.
- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M.** 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol.* 30:205–240.
- Souza, R.D., Ambrosini, A., Passaglia, L. M.** 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38(4): 401–419.
- Splivallo, R., Fischer, U., Gobel, C., Feussner, I., Karlovsky, P.** 2009. Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol.* 150: 2018–2029.
- Summerell, B.A., Laurence, M.H., Liew, E.C.Y., Leslie, J.F.** 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity.* 44:3–13.
- Thakur M. S., Vyas K. M.** 1983. Production of plant growth regulators by some *Fusarium* species. *Folia Microbiol.* 28: 124–129.
- Thongkamngam. T., and Jaenaksorn. T.** 2017. *Fusarium oxysporum* (F221-B) as biocontrol agent against plant pathogenic fungi in vitro and in hydroponics. *Plant Protect. Sci.* 53(2): 85–95.
- Tian-Qiong, S., Hui, P., Si-Yu, Z., Rong-Yu, J., Kun, S., He, H. Xiao-Jun, J.** 2017. Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. *Journal Bioengineered.* 8(2);124–128.

- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S.** 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 418: 671–677.
- Trivedi, P., Schenk, P.M., Wallenstein, M.D., Singh, B.K.** 2017. Tiny microbes, big yields: enhancing food crop production with biological solutions. *Microbial biotechnology*. 10(5): 999–1003.
- Tsavkelova, E., Oeser, B., Oren-Young, L., Israeli, M., Sasson, Y., Tudzynski, B., Sharon, A.** 2012. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genet Biol* 49:48–57.
- Tudzynski B., Hölter K.** 1998. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* 25: 157–170.
- Turner, T.R., James, E.K and Poole, P.S.** 2013. The plant microbiome. *Genome Biology*. 14(6): 1–10.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J.** 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant cell*: 9(11): 1963–1971.
- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., Van Straalen, N.M.** 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11:296–310.
- Van Staden J., Nicholson R. I. D.** 1989. Cytokinins and mango flower malformation II. the cytokinin complement produced by *Fusarium moniliforme* and the ability of the fungus to incorporate [8-14C] adenine into cytokinins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35: 423–431.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Nasrulhaq Boyce, A.** 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-a review. *Molecules*. 21(5): 573.

Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L.R., Mauricio-Castillo, J.A., Mena-Covarrubias, J., Amador-Ramírez, M.D., Salas-Muñoz, S., Reveles-Hernández, M., Creamer, R., Chew-Madinaveitia, Y LI., Chapa-Oliver, A.M., Mejía-Teniente, L., González-Chavira, M.M., Cid-Ríos. J.A. 2014. Virus y fitoplasmas de Chile: una perspectiva regional. Libro técnico No. 10. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP, 279 p.

Velarde-Félix, S., Valdez-Rubio, N., Zamora-Galván, F., López-Molina, R., Melgoza-Villagómez, C.M., Garzón-Tiznado, J.A. 2018. Identificación molecular de *Fusarium* spp aislados de maíz en Sinaloa, México Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 9(8): 1675–1689.

Vespermann, A., Kai, M., Piechulla, B. 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 5639–5641.

Vrabka, J., Niehaus, E. M., Münsterkötter, M., Proctor, R. H., Brown, D. W., Novák, O., Pěňčík, A., Tarkowská, D., Hromadová, K., Hradilová, M., Oklešť'ková, J., Oren-Young, L., Idan, Y., Sharon, A., Maymon, M., Elazar, M., Freeman, S., Güldener, U., Tudzynski, B., Galuszka, P., Bergougnoux, V. 2019. Production and role of hormones during interaction of *Fusarium* species with maize (*Zea mays* L.) seedlings. Frontiers in plant science, 9, 1936.

Watanabe, T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd Edition. CRC press. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C. 506 p.

Yang, C.H., Crowley, D.E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. Applied and environmental microbiology. 66(1): 345-51.

Yuan, Z., Chen, Y., Xu, B., Zhang, C. 2012. Current perspectives on the volatile-producing fungal endophytes. Crit. Rev. Biotechnol. 32: 363–373.

Yates, I.E., Bacon, C.W., Hinton, D.M. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Disease*. 81(7): 723–728.

Zhang, Z. and Huang, R. 2013. Analysis of Malondialdehyde, Chlorophyll Proline, Soluble Sugar, and Glutathione Content in *Arabidopsis* seedling. *Bio-protocol* 3(14): e817.

Zhou, L.S., Tang, K., Guo, S.X. 2018. The plant growth-promoting fungus (PGPF) *Alternaria* sp. A13 markedly enhances salvia miltiorrhiza root growth and active ingredient accumulation under greenhouse and field conditions. *International journal of molecular sciences*. 19(1): 270.

XI ANEXOS

Agar Hojas de Clavel (CLA)

El medio de cultivo CLA se prepara a partir de trozos de hojas de clavel libres de fungicida o insecticida. Después de la recolección, las hojas se cortan en piezas de 1.5 cm aproximadamente (se encogen cuando se secan). Posteriormente se realiza un lavado con cloro al 20 % en agitación constante por 5 min., seguido de 5 lavados con agua destilada estéril para remover los restos de cloro, después los trozos de clavel se deshidratan (secado) en un horno (~ 50 ° C) durante 3-4 horas hasta que queden completamente secas, o en un horno de microondas. Las hojas secas se envuelven en papel aluminio y se esterilizan por autoclave o por luz UV por media hora.

El CLA es un medio de sustrato natural preparado al colocar asépticamente trozos de hojas de clavel estériles, en una caja de Petri con agar agua al 1.5 %. Por lo general, se agregan de 4 a 6 trozos de clavel por caja antes de que gelifique para que queden adheridos al sustrato.

Una vez preparado el medio CLA se procede a inocular con la cepa de *Fusarium* de interés, además, para obtener mejores resultados se recomienda poner el

cultivo bajo fotoperiodos de luz/obscuridad a temperatura ambiente a un ángulo de 45 °.

La mayoría de las especies de *Fusarium* esporulan en CLA en 6-10 días. Los cultivos que crecen en CLA producen macroconidia que son más uniformes en tamaño y forma, que los cultivos que crecen en medios ricos en carbohidratos como el PDA. Los macroconidios se forman principalmente en esporodoquios (estructura de resistencia) que suelen desarrollarse sobre las piezas foliares. Los macroconidios formados en esporodoquios son preferidos para la identificación ya que son más consistentes en forma y longitud que los macroconidios formados a partir de fialides más aislados. El modo de la formación de las microconidias, es decir, monofialidas o polifialidas, la presencia de cabezas o cadenas de microconidios falsas y la presencia de clamidiosporas se puede determinar mediante examen directo con un microscopio compuesto (100X).

Agar Harina de Maíz (CA)

El agar harina de maíz es un medio de cultivo empleado para preservar cepas de *Fusarium*, además permite el desarrollo apropiado de microconidias y macroconidias, generalmente son más estables que en PDA.

Preparación

80 gr Maíz-----1000mL

Agar 15 gr-----1000mL

1. Colocar el maíz molido en agua y dejar reposar durante una noche (de acuerdo al volumen que se dese preparar), transcurrido el tiempo de reposo, se recupera únicamente la fase acuosa (lechosa) sin llevarse maíz. (ejemplo para 100 mL: 60 mL de maíz y 40 mL de agar al 1.5%).
2. Después el sobrenadante recuperado se pone en una plancha caliente hasta el punto de ebullición y retirar los grumos formados, hacer este procedimiento hasta que no se formen grumos, si se pierde volumen se

afora con agua destilada estéril de tal manera que se obtenga un volumen de 60 mL.

3. Ajustar el pH del maíz a $5.5 \pm .2$
4. Preparar por separado el agar al 1.5 % (40 mL a una concentración para 100 mL) y esterilizar por autoclave maíz y agar
5. Después de la esterilización por autoclave se mezclan el agar y el maíz y se vacía en cajas Petri.

Es recomendable poner los cultivos bajo fotoperiodos de luz/obscuridad a temperatura ambiente para fomentar la esporulación (colocar las cajas en un ángulo de 45°).

Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA)

El agar SNA es un medio mineral utilizado para la identificación y mantenimiento de cepas de *Fusarium*. Además, permite el desarrollo de microconidias.

Preparación para 1 L

KH₂PO₄-----1 gr
KNO₃-----1 gr
MgSO₄•7H₂O-----0.5 gr
KCl-----0.5 gr
Glucosa-----0.2 gr
Sacarosa-----0.2 gr
Agar-----15 gr

Después del vaciado del medio en las cajas Petri, colocar de 1-2 piezas de papel filtro estéril (Whatman № 1), aproximadamente 1 cm² (opcional), sobre la superficie de agar después de que el medio haya gelificado (aumenta la esporulación). El medio promueve la esporulación y el buen desarrollo de esporas; sin embargo, debido a que la formación de esporodocios es limitada, la morfología macroconidial no es tan uniforme ni tan confiable como se ve con el CLA. Los cultivos que crecen en SNA a menudo son valiosos para examinar microconidias, ya que este medio apoya la formación de una gama de diferentes microconidias. En algunos casos, las microconidias desarrolladas en SNA difieren

morfológicamente de los observados en el CLA o CA. Muchas cepas también forman clamidosporas más fácilmente en SNA que en CLA. El medio SNA es transparente, por lo que los cultivos se pueden ver directamente con un microscopio compuesto (hasta 100X).

Es recomendable poner los cultivos de SNA bajo fotoperiodos de luz/obscuridad a temperatura ambiente para fomentar la esporulación (colocar las cajas en un ángulo de 45°).



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 22 de octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Tutor)
Dra. Silvia Salas Muñoz (Co Tutor)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Edgar Martínez Fernández

Tesis: "Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de *Fusarium spp* aislados de la rizosfera de *Zea mays* L.

Alumno que la presenta a revisión: CANDELARIO RODRIGUEZ SERRANO

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 22 de octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Tutor)
Dra. Silvia Salas Muñoz (Co Tutor)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Edgar Martínez Fernández

Tesis: "Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de *Fusarium spp* aislados de la rizosfera de *Zea mays* L.

Alumno que la presenta a revisión: **CANDELARIO RODRIGUEZ SERRANO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. SILVIA SALAS MUÑOZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 25 de octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Tutor)
Dra. Silvia Salas Muñoz (Co Tutor)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Edgar Martínez Fernández

Tesis: "Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de *Fusarium spp* aislados de la rizosfera de *Zea mays* L.

Alumno que la presenta a revisión: CANDELARIO RODRIGUEZ SERRANO

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 25 de octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Tutor)
Dra. Silvia Salas Muñoz (Co Tutor)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Edgar Martínez Fernández

Tesis: "Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de *Fusarium spp* aislados de la rizosfera de *Zea mays L.*

Alumno que la presenta a revisión: **CANDELARIO RODRIGUEZ SERRANO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. SUSANA VALENCIA DIAZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 24 de octubre de 2019

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (Tutor)
Dra. Silvia Salas Muñoz (Co Tutor)
Dr. Ramón Suárez Rodríguez
Dra. Susana Valencia Díaz
Dr. Edgar Martínez Fernández

Tesis: "Análisis de la promoción de crecimiento vegetal de *Fusarium spp* aislados de la rizosfera de *Zea mays* L.

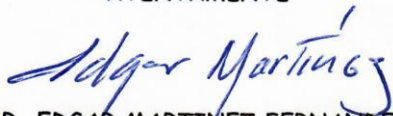
Alumno que la presenta a revisión: **CANDELARIO RODRIGUEZ SERRANO**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DR. EDGAR MARTINEZ FERNANDEZ