



**UNAP**



**FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**

**TESIS**

**“CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS HOMÓLOGOS  
F-RALF SECRETADOS POR *Fusarium oxysporum* f. sp  
*lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi*  
IMI 58289, y *Fusarium graminearum* CS3005”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERA AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR:  
KAREM CARLA PEREA ARMAS**

**ASESORES:  
ING. OCTAVIO DELGADO VASQUEZ, M.Sc.  
ING. JUAN CARLOS GUERRERO ABAD, Dr.**

**IQUITOS, PERÚ**

**2021**



ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS N° 003-CGYT-FA-UNAP-2021



En Iquitos, mediante la plataforma virtual de Google Meet, a los 16 días del mes de enero del 2021, a horas 10:00 a.m., se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: "CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE PÉPTIDOS HOMÓLOGOS F-RALF SECRETADOS POR *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289, y *Fusarium graminearum* CS3005", aprobado con Resolución Decanal N° 028-CGYT-FA-UNAP-2019, presentado por la Bachiller KAREM CARLA PEREA ARMAS, para optar el Título Profesional DE INGENIERO (A) AGRÓNOMO que otorga la Universidad de acuerdo a la Ley y Estatuto.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N° 026-CGYT-FA-UNAP-2020, está integrado por:

ING. ELIZABETH BOHABOT GOMEZ, Dra.  
ING. JOSE FRANCISCO RAMIREZ CHUNG, Dr.  
ING. JORGE YSAAC VILLACRES VALLEJO, M.Sc.

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: **SATISFACTORIAMENTE.**

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La Sustentación pública y la Tesis han sido: **APROBADO** con la calificación **MUY BUENA.**

Estando la Bachiller **APTO** para obtener el Título Profesional de **INGENIERO (A) AGRÓNOMO.**

Siendo las **12:00 m.**, se dio por terminado el acto **ACADÉMICO.**

  
ING. ELIZABETH BOHABOT GOMEZ, Dra.  
Presidente (a)

  
ING. JOSE FRANCISCO RAMIREZ CHUNG, Dr.  
Miembro

  
ING. JORGE YSAAC VILLACRES VALLEJO, M.Sc.  
Miembro

  
ING. OCTAVIO DELGADO VASQUEZ, M.Sc.  
Asesor

  
ING. JUAN CARLOS GUERRERO ABAD, Dr.  
Asesor

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**

Tesis presentada en sustentación pública el día 16 de enero del 2021; por el Jurado AD-HOC nombrado por el Comité de Grados y Títulos de la Facultad de Agronomía, para optar el título profesional de:

**INGENIERA AGRÓNOMO**

  
.....  
**ING. ELIZABETH BOHABOT GOMEZ, Dra.**  
**Presidente**

  
.....  
**ING. JOSE FRANCISCO RAMIREZ CHUNG, Dr.**  
**Miembro**

  
.....  
**ING. JORGE YSAAC VILLACRES VALLEJO, M.Sc.**  
**Miembro**

  
.....  
**ING. OCTAVIO DELGADO VASQUEZ, M.Sc.**  
**Asesor**

  
.....  
**ING. JUAN CARLOS GUERRERO ABAD, Dr.**  
**Asesor**

  
.....  
**ING. DARVIN NAVARRO TORRES, Dr**  
**Decano (e)**



## **DEDICATORIA**

### **A Dios.**

Por su infinita bondad en ofrecerme vida y salud que me permitieron llegar a mis objetivos, y brindarme paciencia en mis momentos de desasosiego. Por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

### **A mi madre Zoilita.**

Porque fuiste mi motivación, mi fortaleza, por el enorme esfuerzo que has hecho por mí en todo este tiempo.

### **A mi padre Ignacio.**

Por los ejemplos de perseverancia y constancia y por todos los consejos, me sirvieron para no rendirme.

### **A mis familiares.**

A mis tíos, Geiner y Cayo que fueron quienes me motivaron y me apoyaron incondicionalmente, a mi abuela Graciela una mujer con un carácter fuerte, pero de gran corazón, a mis hermanos Haris, Lina y Dámaris, que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

### **A Roger**

Por su paciencia y su tiempo, esta tesis en un logro más que llevo a cabo y sin lugar a duda ha sido en gran parte gracias a ti, no sé dónde me encontraría de no ser por tu apoyo, tu compañía y tu amor.

## AGRADECIMIENTO

- A** Dios por bendecirme para llegar hasta dónde he llegado, por hacer realidad este sueño anhelado.
- A** mis padres por sus consejos, enseñanzas, apoyo moral, a mis tíos por el apoyo económico a todos ellos que me formaron a ser una persona de bien con principios y valores para servir a la sociedad.
- A** la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional. También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado con un granito de arena a mi formación.
- AI** Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) del INIA, por los recursos brindados a través del Proyecto: **CONTRATO N° 024-2016-INIA PNIA/UPMSI/IE.**
- AI** Dr. Juan Carlos Guerrero Abad por su esfuerzo y dedicación, quien, con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mi estudio de tesis con éxito.
- AI** Ing. M. Sc. Eymer Mori Pinedo, por su asesoramiento en el proceso de desarrollo del trabajo de investigación.
- AI** Ing. M. Sc. Mike Anderson Corazon Guivin, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y ser parte del equipo de investigación del Programa Nacional de investigación Agraria - PNIA.
- A** los miembros del equipo de investigación del Laboratorio de Biología y Genética Molecular, son personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en

los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
PORTADA .....	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN .....	ii
JURADO Y ASESORES .....	iii
ÍNDICE GENERAL .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO .....	3
1.1. ANTECEDENTES .....	3
1.2. BASES TEÓRICAS .....	5
1.2.1. Aspectos generales de <i>Fusarium</i> spp. ....	5
1.2.2. Interacción Hongo – Planta .....	6
1.2.3. Modelo de sistemas para estudios de interacción planta- patógeno. ....	7
1.2.4. Péptidos hormonales en plantas .....	8
1.2.5. El Péptido CLV3. ....	10
1.2.6. Péptido hormonal RALF. ....	11
1.2.7. F-RALF en la colonización de <i>F. oxysporum</i> de tomate. ....	14
1.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS .....	15
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES .....	17
2.1. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS. ....	17
2.1.1. Hipótesis general .....	17
2.1.2. Hipótesis específica .....	17
2.2. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN .....	17
2.2.1. Variable Independiente .....	17
2.2.2. Variables Dependiente. ....	17
2.2.3. Operacionalización de las variables. ....	18
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA .....	19
3.1. TIPO Y DISEÑO. ....	19
3.1.1. Tipo de investigación .....	19
3.1.2. Diseño de investigación .....	19
3.2. DISEÑO MUESTRAL .....	19
3.2.1. Población .....	19
3.2.2. Muestra. ....	20

3.3. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS. ....	20
3.3.1. Descripción de los experimentos. ....	20
a. Efecto del pH, sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> spp. ....	20
b. Efecto de calcio extracelular sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> spp. ....	21
c. Péptidos homólogos de <i>Fusarium</i> spp., en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	22
3.3.2. Ubicación del ensayo. ....	23
3.3.3. Material biológico. ....	24
3.3.4. Conducción del experimento. ....	25
a. Sensibilidad de pH en tres cepas puras de <i>Fusarium</i> spp. ....	25
b. Ensayo de sensibilidad de calcio. ....	31
c. Actividad biológica de péptidos homólogos F-RALF en el crecimiento de hipocótilos y raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	33
3.3.5. Variables evaluadas. ....	43
a. Efecto del pH, sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> spp. ....	43
b. Efecto de calcio sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> sp. ....	44
c. Péptidos homólogos F-RALF, en el crecimiento de hipocótilos y raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	44
3.4. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS. ....	44
3.5. ASPECTOS ÉTICOS. ....	45
CAPÍTULO IV. RESULTADOS ....	46
4.1. CRECIMIENTO MICELIAL EN FUNCIÓN AL pH. ....	46
4.1.1. Cepa <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. ....	46
4.1.2. Cepa <i>Fusarium graminearum</i> IMI 58289 CS3005. ....	49
4.1.3. Cepa <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935). ....	52
4.2. CRECIMIENTO MICELIAL (SENSIBILIDAD DE CALCIO) ....	55
4.2.1. Cepa <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. ....	55
4.2.2. Cepa <i>Fusarium graminearum</i> CS3005. ....	59
4.2.3. Cepa <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935). ....	62
4.3. INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE RAÍCES DE <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	65
4.3.1. Cepa <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. ....	65
4.3.2. Cepa <i>Fusarium graminearum</i> CS3005. ....	67
4.3.3. Cepa <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935). ....	69
4.4. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE HIPOCÓTILO DE <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> . ....	70
4.4.1. Cepa <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. ....	70
4.4.2. Cepa <i>Fusarium graminearum</i> CS3005. ....	72
4.4.3. Cepa <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935). ....	74



CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....	76
5.1. PRUEBAS DE pH. ....	76
5.1.1. Cepa <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. ....	76
5.1.2. Cepa <i>Fusarium graminearum</i> IMI 58289 CS3005.....	76
5.1.3. Cepa <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935).....	77
5.2. PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE CALCIO.....	78
5.2.1. Cepa <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. ....	78
5.2.2. Cepa <i>Fusarium graminearum</i> CS3005. ....	79
5.2.3. Cepa <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935).....	80
5.3. INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE RAÍCES DE <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	82
5.3.1. Cepa <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. ....	82
5.3.2. Cepa <i>Fusarium graminearum</i> CS3005. ....	82
5.3.3. Cepa <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935).....	82
5.4. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE HIPOCÓTILO DE <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	84
5.4.1. Cepa <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. ....	84
5.4.2. Cepa <i>Fusarium graminearum</i> CS3005. ....	84
5.4.3. Cepa <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935).....	84
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....	86
CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES .....	87
CAPÍTULO VIII. FUENTES DE INFORMACIÓN .....	88
ANEXOS .....	104
Anexo 1: Pruebas de Normalidad, intervalo de confianza (ICC95%) para Crecimiento micelial en función al pH. ....	105
Anexo 2: Pruebas de Normalidad, intervalo de confianza (ICC95%), gráficos de distribuciones para crecimiento micelial (sensibilidad de calcio).....	108
Anexo 3: Pruebas de Normalidad, intervalo de confianza (ICC95%), gráficos de distribuciones para Inhibición de crecimiento de raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	111
Anexo 4: Pruebas de Normalidad, intervalo de confianza (ICC95%), gráficos de distribuciones para Inhibición del crecimiento de hipocótilo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	115

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de variables .....	18
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos para el estudio de modulación de pH en tres especies <i>Fusarium</i> . .....	21
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos para el estudio de calcio extracelular en tres especies <i>Fusarium</i> . .....	22
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos para inoculación de péptidos homólogos de <i>Fusarium</i> spp., en plántulas de <i>A. thaliana</i> . .....	22
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>F. fujikuroi</i> en función a tres concentraciones de pH y al tiempo. ....	46
<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>F. graminearum</i> en función a tres concentraciones de pH y al tiempo. ....	50
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>F. oxysporum</i> en función a tres concentraciones de pH y al tiempo. ....	52
<b>Tabla 8.</b> Análisis del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>F. fujikuroi</i> en función a cuatro concentraciones de EDTA y al tiempo prueba de Kruscal Wallis. ....	56
<b>Tabla 9.</b> Análisis del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>F. graminearum</i> en función a cuatro concentraciones de EDTA prueba de Kruscal Wallis. ....	59
<b>Tabla 10.</b> Análisis del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>F. oxysporum</i> en función a cuatro concentraciones de EDTA y al tiempo prueba de Kruscal Wallis. ....	63
<b>Tabla 11.</b> Análisis de crecimiento de raíces (cm) de <i>A. thaliana</i> en contacto con el péptido F-RALF de <i>F. fujikuroi</i> , prueba de Kruscal Wallis. ....	66
<b>Tabla 12.</b> Análisis del crecimiento de raíces (cm) de <i>A. thaliana</i> en contacto con el péptido F-RALF de <i>F. graminearum</i> , prueba de Kruscal Wallis. ....	68
<b>Tabla 13.</b> Prueba T3 Dunnett del crecimiento de raíces (cm) de <i>A. thaliana</i> en contacto con el péptido F-RALF de <i>F. oxysporum</i> , en tres concentraciones. ....	70

<b>Tabla 14.</b> Análisis de varianza del crecimiento de hipocótilo (cm) de <i>A. thaliana</i> en contacto con el péptido F-RALF de <i>F. fujkuroi</i> , en tres concentraciones.....	71
<b>Tabla 15.</b> Análisis de varianza del crecimiento de hipocótilo (cm) de <i>A. thaliana</i> en contacto con el péptido F-RALF de <i>F. graminearum</i> , en tres concentraciones.....	73
<b>Tabla 16.</b> Prueba de Kruscal Wallis del crecimiento de hipocótilo (cm) de <i>A. thaliana</i> en contacto con el péptido F-RALF de <i>F. oxysporum</i> , en tres concentraciones .....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM).....	23
<b>Figura 2.</b> Laboratorio de Fisiología y biotecnología vegetal (FISIOBEV) .....	23
<b>Figura 3.</b> Siembra de planta modelo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
<b>Figura 4.</b> Péptidos sintéticos de <i>Fusarium</i> sp.....	25
<b>Figura 5.</b> Preparación de medio de cultivo PDA, para prueba de pH. <b>A)</b> Pesado de papa. <b>B)</b> Obtención del caldo de papa. <b>C)</b> Pesado de dextrosa, agar. <b>D)</b> Pesado del tampón MES. <b>E)</b> Medición pH (5;6 y7). <b>F)</b> Frascos con medios preparados. <b>G)</b> Autoclavar los medios de cultivos preparados. ....	26
<b>Figura 6.</b> Siembra de las cepas de <i>Fusarium</i> sp. <b>A)</b> Tubos con cepas <i>Fusarium</i> sp. <b>B)</b> Siembra de las tres cepas <i>Fusarium</i> . <b>C)</b> Almacenamiento de la siembra en el Incubador BOD a 28°C. <b>D)</b> <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. <b>E)</b> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935). <b>F)</b> <i>Fusarium graminearum</i> CS3005.....	27
<b>Figura 7.</b> Instalación de ensayo de sensibilidad de pH. <b>A)</b> Preparación de la siembra. <b>B)</b> Inoculación de micelio. <b>C)</b> sellado con Parafilm. <b>D)</b> rotulación de placas. <b>E)</b> Almacenamiento en el Incubador BOD. <b>F)</b> Monitoreo de crecimiento de hifas en tiempo real, en el programa ZEN. <b>G)</b> Fotos guardadas de las tres cepas de <i>Fusarium</i> sp., serán utilizadas en el programa IMAGE J. ....	31
<b>Figura 8.</b> Preparación de E.D.T.A, a cuatro concentraciones diferentes. <b>A)</b> Se preparó el caldo de papa. <b>B)</b> Se pesaron (Dextrosa, agar y EDTA.). <b>C)</b> Pesado de cconcentraciones de EDTA, T0: Control sin E.D.T.A, T1: 1Mm, T2: 10mM. T3: 20mM, T5: 50mM. <b>D)</b> Se midieron el pH a 6,3. <b>E)</b> Se autoclavó a 121C° por 20 minutos a 15 PSI (15 atmósfera). <b>F)</b> Se plaquearon.....	32
<b>Figura 9.</b> Instalación de ensayo de sensibilidad de calcio <b>A)</b> Inoculación de micelio. <b>B)</b> Almacenamiento de las siembras. <b>C)</b> Monitoreo de crecimiento de hifas en tiempo real, en el programa ZEN. <b>D)</b> Fotos guardadas de las tres cepas de <i>Fusarium</i> sp., serán utilizadas en el programa IMAGE J.....	33
<b>Figura 10.</b> Preparación medio de cultivo para siembra de semillas de <i>A. thaliana</i> . <b>A)</b> Pesado de Medio, <b>B)</b> Homogenización de los medios.	

	<b>C)</b> Medición del pH. <b>D)</b> Dilución del agar. <b>E)</b> Autoclavar los medios de cultivo <b>F)</b> Plaqueo del medio de cultivo. ....	34
<b>Figura 11.</b>	Preparación de medio de cultivo líquido. <b>A)</b> Pesar Medio Murashigue & Skoog. <b>B)</b> Homognizar agua destilada y Murashigue & Skoog. <b>C)</b> Medición del pH. <b>D)</b> Autoclavar.....	35
<b>Figura 12.</b>	Esterilización de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . <b>A)</b> Semillas esterilizadas. <b>B)</b> Retiro del exceso de lejía. <b>C)</b> Aplicación de agarosa al 1%. <b>D)</b> Siembra de semillas. <b>E)</b> Después se colocaron en forma vertical.....	36
<b>Figura 13.</b>	Ensayo de inhiación de raíces. <b>A)</b> Semillas sembradas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . <b>B)</b> Traslado de semillas a las placas de 24 pozitos. <b>C)</b> Aplicación de Péptidos sintéticos de <i>Fusarium</i> sp. <b>D)</b> Colocación del tratamiento al aparato shaeker.....	41
<b>Figura 14.</b>	<b>A)</b> Fotos utilizadas en el programa Image J. <b>B)</b> Fotos tomadas en el programa ZEN. <b>C)</b> Resultado sobre la inhibición de crecimiento según los tratamientos. ....	41
<b>Figura 15.</b>	Ensayos de inhibición de crecimiento de hipocótilo. <b>A)</b> Colocación en placas de 24 pocillos las semillas de <i>Arabidopsis</i> . <b>B)</b> Aplicación de los péptidos. <b>C)</b> Envoltura de la placa con papel aluminio. <b>D)</b> Se guardaron los tratamientos en una caja de cartón.....	42
<b>Figura 16.</b>	Medición del hipocótilo. <b>A)</b> Colocación de hipocótilos. <b>B)</b> Fijación para las fotos. <b>C)</b> Resultado de fotos, utilizando el programa ZEN. ....	43
<b>Figura 17.</b>	Prueba de Tukey ( $\alpha= 0,01$ ) en las medias del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Fusarium fujikuroi</i> en tres concentraciones de pH. ....	47
<b>Figura 18.</b>	Sensibilidad al pH en <i>Fusarium fujikuroi</i> . <b>A)</b> Crecimiento micelial en tres concentraciones de pH, evaluado en intervalos de 5 minutos. <b>B)</b> pH 5. <b>C)</b> pH 6. <b>D)</b> pH 7. Barra blanca= 1 cm. ....	48
<b>Figura 19.</b>	Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en tres concentraciones de pH en <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289. ....	49
<b>Figura 20.</b>	Prueba de Tukey ( $\alpha= 0,01$ ) en las medias del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Fusarium graminearum</i> en tres concentraciones de pH. ....	50
<b>Figura 21.</b>	Sensibilidad al pH en <i>Fusarium graminearum</i> . <b>A)</b> Crecimiento micelial en tres concentraciones de pH, evaluado en intervalos de 5 minutos. <b>B)</b> pH 5. <b>C)</b> pH 6. <b>D)</b> pH 7. Barra blanca= 1 cm.....	51

<b>Figura 22.</b>	Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en tres concentraciones de pH en <i>Fusarium graminearum</i> CSCS3005. ....	52
<b>Figura 23.</b>	Prueba de Tukey ( $\alpha= 0,01$ ) en las medias del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Fusarium oxysporum</i> en tres concentraciones de pH.....	53
<b>Figura 24.</b>	Sensibilidad al pH en <i>Fusarium oxysporum</i> . <b>A)</b> Crecimiento micelial en tres concentraciones de pH, evaluado en intervalos de 5 minutos. <b>B)</b> pH 5. <b>C)</b> pH 6. <b>D)</b> pH 7. Barra blanca=1 cm.....	54
<b>Figura 25.</b>	Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en tres concentraciones de pH en <i>Fusarium oxysporum</i> (FGSC 9935).....	55
<b>Figura 26.</b>	Prueba de Kruscal Wallis crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Fusarium fujikuroi</i> en cuatro concentraciones de EDTA más un control sin EDTA. ....	56
<b>Figura 27.</b>	Sensibilidad de calcio en <i>Fusarium fujikuroi</i> . <b>A)</b> Crecimiento micelial en cuatro concentraciones de EDTA, evaluado en intervalos de 5 minutos. <b>B)</b> Control sin EDTA. <b>C)</b> 1 $\mu\text{M}$ . <b>D)</b> 10 $\mu\text{M}$ . <b>E)</b> 20 $\mu\text{M}$ y <b>F)</b> 50 $\mu\text{M}$ . Barra blanca= 1 cm.....	58
<b>Figura 28.</b>	Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en cuatro concentraciones de EDTA en <i>Fusarium fujikuroi</i> .....	58
<b>Figura 29.</b>	Prueba de Kruscal Wallis. crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Fusarium graminearum</i> en cuatro concentraciones de EDTA más un control sin EDTA.....	60
<b>Figura 30.</b>	Sensibilidad de calcio en <i>Fusarium graminearum</i> . <b>A)</b> Crecimiento micelial en cuatro concentraciones de EDTA, evaluado en intervalos de 5 minutos. <b>B)</b> Control sin EDTA. <b>C)</b> 1 $\mu\text{M}$ . <b>D)</b> 10 $\mu\text{M}$ . <b>E)</b> 20 $\mu\text{M}$ y <b>F)</b> 50 $\mu\text{M}$ . Barra blanca= 1 cm.....	61
<b>Figura 31.</b>	Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en cuatro concentraciones de EDTA en <i>Fusarium graminearum</i> .....	62
<b>Figura 32.</b>	Prueba de Kruscal Wallis. crecimiento micelial ( $\mu\text{M}$ ) de <i>Fusarium oxysporum</i> en cuatro concentraciones de EDTA más un control sin EDTA.....	63
<b>Figura 33.</b>	Sensibilidad de calcio en <i>Fusarium oxysporum</i> . <b>A)</b> Crecimiento micelial en cuatro concentraciones de EDTA, evaluado en intervalos de 5 minutos. <b>B)</b> Control sin EDTA. <b>C)</b> 1 $\mu\text{M}$ . <b>D)</b> 10 $\mu\text{M}$ . <b>E)</b> 20 $\mu\text{M}$ y <b>F)</b> 50 $\mu\text{M}$ . Barra blanca= 1 cm.....	64

<b>Figura 34.</b>	Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en cuatro concentraciones de EDTA en <i>Fusarium oxysporum</i> . .....	65
<b>Figura 35.</b>	Prueba de Kruscal Wallis. crecimiento de raíces de <i>A. thaliana</i> (cm) en exposición con el péptido de <i>F. fujikuroi</i> , en tres concentraciones. ....	66
<b>Figura 36.</b>	Prueba de Kruscal Wallis. del crecimiento de raíces de <i>A. thaliana</i> (cm) en exposición con el péptido de <i>F. graminearum</i> , en tres concentraciones. ....	68
<b>Figura 37.</b>	Prueba de Tukey ( $\alpha= 0,01$ ) en las medias del crecimiento de hipocótilo de <i>A. thaliana</i> (cm) en exposición con el péptido de <i>F. fujikuroi</i> , en tres concentraciones. ....	71
<b>Figura 38.</b>	Prueba de Tukey ( $\alpha= 0,01$ ) en las medias del crecimiento de hipocótilo de <i>A. thaliana</i> (cm) en exposición con el péptido de <i>F. graminearum</i> , en tres concentraciones. ....	73
<b>Figura 39.</b>	Prueba de Kruscal Wallis del crecimiento de hipocótilo de <i>A. thaliana</i> (cm) en exposición con el péptido de <i>F. oxysporum</i> , en tres concentraciones. ....	75

## RESUMEN

El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) – de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín y el Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biotecnología de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Con el objetivo de explorar su función biológica de especies *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005, así como sus péptidos homólogos F-RALF, secretados. Para ello, fueron desarrollados dos experimentos independientes, el primero consistió en evaluar la sensibilidad del crecimiento micelial de las especies *Fusarium* sobre un gradiente extracelular de pH y disponibilidad de calcio extracelular mediante la acción de un agente quelante; el segundo experimento consistió en evaluar la respuesta fisiológica de péptidos homólogos F-RALF de las especies *Fusarium* en estudio, empleándose diferentes concentraciones de 0 a 5  $\mu\text{M}$  en raíces e hipocótilos de *Arabidopsis thaliana*. Los resultados del estudio reportaron que existe efecto positivo en el crecimiento micelial de las especies *Fusarium* a medida que se incrementa el pH extracelular del medio de cultivo; contrariamente a ello se observa cuando existe un secuestro gradual del calcio extracelular con EDTA. Asimismo, el efecto de los péptidos homólogos F-RALF, demuestran que tienen un efecto negativo de la expansión celular en plantas. Finalmente, nuestros resultados concluyen que el crecimiento de *Fusarium* es dependiente de pH y calcio y la producción de sus péptidos homólogos sintéticos F-RALF durante la fase de crecimiento e invasión al hospedero, reducen el crecimiento celular de las plantas.

**Palabras clave:** Péptidos homólogos F-RALF, Inhibición, Hipocótilo, Raíces, sensibilidad, Ph,  $\text{Ca}^{++}$ .



## ABSTRACT

The research work was carried out in the Laboratory of Molecular Biology and Genetics (LBGM) - of the Faculty of Agricultural Sciences of the National University of San Martín and the Laboratory of Plant Physiology and Biotechnology of the National University Toribio Rodríguez de Mendoza of Amazonas. Aiming to explore its biological function, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 and *Fusarium graminearum* CS3005, as well as their secreted F-RALF peptides. For this, two independent experiments were developed, the first one was to evaluate the sensitivity of the mycelial growth of the *Fusarium* species on an extracellular pH gradient and the availability of extracellular calcium through the action of a chelating agent; the second experiment consisted of evaluating the physiological response of F-RALF synthetic homologous peptides of the *Fusarium* species under study, using different concentrations of 0 to 5  $\mu\text{M}$  in roots and hypocotyls of *Arabidopsis thaliana*. The results of the study reported that there is a positive effect on the mycelial growth of the *Fusarium* species as the extracellular pH of the culture medium increases; contrary to this, it is observed when there is a gradual sequestration of extracellular calcium with EDTA.

Likewise, the effect of F-RALF homologous peptides, demonstrate that they have a negative effect of cell expansion in plants. Finally, our results conclude that the growth of *Fusarium* is dependent on pH and calcium and the production of its F-RALF homologous peptides during the growth phase and invasion of the host, reduce plant cell growth.

**Key words:** F-RALF homologous peptides, Inhibition, Hypocotyl, Roots, sensitivity, Ph,  $\text{Ca}^{++}$ .

## INTRODUCCIÓN

Recientemente fue descubierto que *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, produce y secreta un péptido homólogo (F-RALF) originalmente encontrado en extractos proteicos en hojas de tabaco. Este péptido, así como su homólogo encontrado en tabaco causa una fuerte y rápida alcalinización extracelular. Un efecto que resulta fundamental para la invasión y colonización de *Fusarium* sobre sistemas radiculares en plantas. Cabe mencionar que este mecanismo tan sólo fue descubierto para *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate, desconociéndose para otras especies patógenas cómo *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 o *Fusarium graminearum* CS3005.

Los hongos fitopatógenos causan un efecto devastador en la pérdida de materia prima a nivel mundial, así mismo, contaminan los alimentos con toxinas nocivas. Durante, la fase invasiva muchos patógenos generan ambientes alcalinos o acidificantes como una condición favorable para su crecimiento, siendo algunos organismos acidificadores y otros alcalinizadores (Prusky; Yakoby, 2003). La acidificación a través de la secreción de ácidos orgánicos es una característica de patógenos necrotróficos que provocan la muerte celular de forma rápida y extensa, traduciéndose en una necrosis del tejido (Cessna, 2000). Contrariamente, la alcalinización extracelular se ha reportado para los organismos hemi-biotróficos como un evento fundamental durante su primera etapa de infección (Prusky et al., 2001). El uso de agro-tóxicos para disminuir el ataque de enfermedades fúngicas importantes en la agricultura peruana ha sido cada vez más creciente, ocasionando impactos económicos, sociales y ecológicos (Gomero, 1999). La escasa disponibilidad de estudios básicos sobre la interacción molecular planta-patógeno excluye la posibilidad de afrontar el control de enfermedades patógenas desde un punto de vista opuesto al empleo de agro-tóxicos. Una situación que retrasa la innovación de una agricultura sostenible ambientalmente como productiva para cultivos de agricultura familiar e intensiva. Estudios de interacción *Fusarium*-planta

demuestra que existe una compleja diafonía entre las vías de señalización durante los primeros eventos de respuesta inmune en plantas (Dinolfo et al., 2017). Demostrando, que aún quedan preguntas por responder durante los mecanismos de interacción. El escenario de péptidos homólogos (F-RALF), se torna interesante estudiarlos cuando estos son esenciales durante su fase invasiva de *Fusarium* sobre células vegetales.

La escasa disponibilidad de estudios básicos sobre la interacción molecular planta-patógeno, específicamente el estudio y exploración bioquímica de nuevos péptidos homólogos F-RALF, limita tener a la mano nuevos conocimientos que permitan ser utilizados en la elaboración de estrategias de control para el género *Fusarium*.

En el trabajo de investigación se ha propuesto los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Caracterizar la función biológica de péptidos homólogos F-RALF, secretados por *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005.

Objetivos específicos:

- Desarrollar experimentos de sensibilidad de pH y calcio en el crecimiento micelial de tres especies *Fusarium*: *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005.
- Determinar la actividad biológica de péptidos homólogos F-RALF en la inhibición del crecimiento de hipocótilos y raíces de *A. thaliana*.

## CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

### 1.1. ANTECEDENTES.

El género *Fusarium* tiene una amplia distribución en el mundo y una gran importancia desde el punto de vista agrícola y económica, con 70 especies descritas hasta la fecha agrupada en 12 secciones. Cada sección es única, con un conjunto de especies relacionadas entre sí (Leslie & Summerell, 2006). Al igual que otros fitopatógenos este hongo emplea diversas estrategias de infección para algunos casos emplea patrones moleculares de infección.

*Fusarium* tiene la capacidad de sobrevivir en el suelo como micelio o como esporas en ausencia de sus hospedante si se encuentra cerca de una planta hospedante la infección puede iniciar en las raíces (Ma, et al., 2013). Durante la fase invasiva muchos patógenos generan ambientes alcalinos o acidificantes como una condición favorable para su crecimiento, siendo algunos organismos acidificadores y otros alcalinizadores (Prusky, 2003). La acidificación a través de la secreción de ácidos orgánicos es una característica de patógenos necrotróficos que provocan la muerte celular de forma rápida y extensa, traduciéndose en una necrosis del tejido (Cessna, 2000). Contrariamente, la alcalinización extracelular se ha reportado para los organismos hemi-biotróficos como un evento fundamental durante su primera etapa de infección (Prusky et al., 2001).

Recientemente Masachis et al., (2016) demostraron que la alcalinización extracelular es fundamental para la colonización satisfactoria de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, el mismo que produce y secreta un péptido homólogo a los péptidos RALF (del inglés *Rapid Alkalinization Factor*) encontrado primeramente en extractos proteicos de hojas de tabaco (Pearce, 2001 a; Pearce, 2001 b) y en otras especies vegetales (Wu, 2007; Germain, 2005; Mingossi, 2010; Morato do Canto, 2014).

El papel biológico de péptidos RALF en plantas está asociado a una fuerte y rápida alcalinización extracelular, aumento de ondas de calcio citosólico. (Pearce, 2001 a; Haruta et al., 2008; Haruta et al., 2014) regulación negativa de la expansión celular (Covey, 2010; Mingossi, 2010; Matos, 2008; Srivastava, 2009) y crosstalk con ácido abscísico (Chen, 2016), así como mejorar la virulencia de especies patógenas como *Fusarium*, utilizando el mecanismo de alcalinización extracelular como una condición adecuada para su crecimiento (Masachis et al., 2016; Kamoun & Zipfel, 2016).

Estos péptidos son codificados a partir de secuencias génicas encontradas en la mayoría de especies vegetales y hongos (Moura & Silva-Filho 2006; Masachis et al., 2016; Thynne et al., 2016). Descubiertos primeramente en extractos proteicos de hojas de tabaco cuando se pretendía encontrar sistemina en otras solanáceas, otro péptido hormonal relacionado a defensa (Pearce et al, 2001a).

La disponibilidad de genomas en plantas, hongos, levaduras y bacterias actualmente ha facilitado la localización de genes sobre regiones específicas dentro de sus cromosomas. Numerosas herramientas de bioinformática se han tornado muy útiles para la busca de secuencias específicas y ampliamente conservadas entre cada reino. A partir de ello se ha encontrado secuencias génicas que codifican homólogos F-RALF en dos especies *Fusarium*: *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005, a partir de ellas surgió nuestro interés en estudiar la función biológica de proteínas F-RALF sintetizadas a partir de las secuencias codantes originarias de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005. Así mismo ser sometidas a experimentos de sensibilidad de pH y disponibilidad de calcio extracelular durante su crecimiento vegetativo (micelio).

## 1.2. BASES TEÓRICAS.

### 1.2.1. Aspectos generales de *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* es caracterizado por su crecimiento rápido, posee colonias de coloración pálida o colorida (violeta a púrpura oscura, o de crema a naranja), con micelio aéreo y difuso (Domsch *et al.*, 1980). La mayoría de las especies están compuestas por hongos del suelo con distribución cosmopolita y activa en la descomposición de sustratos celulósicos de las plantas, siendo que algunos que son aislados sean parásitos de las plantas. Estos *Fusarium* son conocidos comúnmente como saprófitos (Desjardins *et al.*, 2000; Leslie *et al.*, 2001; Zemankova; Lebeda, 2001; Godoy; Colombo, 2004) mencionados por (Kassawara, 2005) .

Las dos principales formas de esporas de *Fusarium* son conocidos como microconidias y los macroconidias. Las microconidias son de característica unicelular y uninucleada; contrariamente las macroconidias más comunes son multicelulares, con un solo núcleo (Puhalla, 1981). Según Puhalla (1981), las etapas sexuales de *Fusarium* son ascomicetos; la espora sexual es el ascósporo. Algunos estados perfectos tienen ascósporos bicelulares y se asignan al género *Nectria*. Cada célula de un ascósporo bicelular es uninucleada y ambos núcleos son genéticamente idénticos. Otros estados perfectos, como es el caso en *Gibberella*, forman ascósporos multicelulares.

El concepto de forma y especialidades fue aplicado por Snyder y Hansen (1953), para reconocer aislamientos patogénicos que fueron morfológicamente similares a aislamientos saprófitos de la misma especie, pero que se diferencian en su habilidad para parasitar hospederos específicos. Aislamientos patogénicos de *F. oxysporum* se clasifican dentro de más de 120 formas especiales y razas.

### **1.2.2. Interacción Hongo – Planta.**

Las interacciones entre las plantas y los hongos son de extremo interés para la humanidad, ya que gran parte de la economía mundial tiene como base la utilización de especies vegetales, las cuales pueden sufrir serios daños debido al ataque de hongos patógenos (Barbieri & Carvalho, 2001).

De las especies de hongos conocidas, aproximadamente el 10%, pueden causar enfermedades en plantas, siendo que algunos de estos hongos son considerados como parásitos obligatorios, estando asociados al huésped durante todo su ciclo de vida. Los hongos saprofitos pueden proliferar tanto en tejido vivo como en restos de material vegetal muerto, mientras que los parásitos no obligatorios dependen de la planta en algunas etapas de su ciclo de vida (Burdon y Silk, 1997).

En general, los hongos patógenos comprenden un amplio y heterogéneo grupo de microorganismos que ocupan posiciones de gran importancia tanto en la agricultura como en las comunidades naturales de la planta. Estos muestran una enorme diversidad dentro de su estrategia de vida y en el modo por el cual estos microorganismos interactúan con su huésped (Burdon y Silk, 1997).

La colonización de hongos patógenos en la planta hospedera se produce por medio del desarrollo de los haustorios, los cuales penetran en la célula vegetal y absorben los nutrientes de la planta. Además, la presencia de estas estructuras puede orientar el metabolismo de la planta hacia los requerimientos nutricionales del patógeno (Agrios, 1997). Durante el desarrollo de la patogénesis en la interacción entre hongos y plantas se expresan varios genes involucrados en la formación de estructuras de infección y síntesis de enzimas para la degradación de la

pared vegetal del huésped. Estos genes pueden expresarse durante las fases de contacto inicial con el huésped, como respuesta a la defensa de la planta, o en la fase de necrosis (Kahmann y Basse, 2001).

### **1.2.3. Modelo de sistemas para estudios de interacción planta-patógeno.**

El sistema más reconocido en plantas es el *Arabidopsis thaliana.*, que tiene varios atributos que lo hacen útil para el análisis molecular y genético (Dangl, 1993). Este modelo de sistema tiene ventajas a partir de las cuales se pueden distinguir 150 ecotipos diferentes y disponibles, su pequeño tamaño del genoma y la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales son algunas características que lo tornan interesante (Kunkel, 1996; Van Poecke; Dicke, 2004). Además, esta planta de polinización cerrada (autógama) produce muchas semillas de un individuo sencillo en un corto ciclo de vida de alrededor de 8 semanas de crecimiento (Somerville y Koornneef, 2002).

Todas estas características facilitan la manipulación del genoma de *Arabidopsis* proporcionando diferentes mutantes de vía de señalización y líneas transgénicas útiles para estudios de interacción planta-patógeno. El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta de cultivo ideal para estudios clásicos y moleculares cuyas secuencias genómicas están disponibles desde 2012 (*Tomato Genome Consortium 2012*). El tomate es también el objetivo de una amplia gama de hongos, bacterias y virus que lo posicionan como un sistema modelo favorable para estudiar las interacciones planta-patógeno (Arie *et al.*, 2007).



#### 1.2.4. Péptidos hormonales en plantas.

Los péptidos hormonales en plantas son pequeñas moléculas proteicas con participación importante en la defensa, reproducción, división y expansión celular. (Covey *et al.*,2010; Germain *et al.*, 2005; Matsubayashi, 2014; matsubayashi; Sakagami 1996; Mingossi *et al.*, 2010; Ryan; Moura, 2002).

Antes de la década de los 90, las hormonas vegetales eran conocidas como pequeñas moléculas, en su mayor parte derivadas de aminoácidos, siendo considerados clásicos muy conocidos como auxinas, citocininas, ácido giberélico, ácido abscísico y etileno, fueron y son destacados como reguladores de crecimiento vegetal participando de eventos básicos de la biología celular (Kende y Zeevaart, 1997.) sin embargo, (Pearce *et al.*, 1991) por primera vez, relataron el descubrimiento de una molécula de origen proteico responsable por la activación de la respuesta de defensa sistémica a la herbivoría o lesión. Esta molécula, denominada sistemina, es un péptido de 18 aminoácidos aislado de hojas de tomate que inicia una cascada de señalización, acarreado en la síntesis de ácido jasmónico y activación de genes de defensa (Ryan; Moura, 2002) Pequeñas cantidades, fmol / planta, llevan a la acumulación de inhibidores de proteinasas (Ryan; Pearce, 1998). Estos inhibidores de proteinasas una vez ingeridos por el insecto dificultan la digestión de proteínas, reduciendo el crecimiento y desarrollo del mismo (Ryan, 1990). Desde entonces una nueva área en la ciencia vegetal, involucra péptidos de característica hormonal (por actuar en bajas concentraciones) y sus respectivas vías de señalización y mecanismos de acción.

La disponibilidad del genoma de *Arabidopsis thaliana* en el año 2000, y la predisposición de datos transcriptómicos, herramientas de predicción génica y una mejora en los procedimientos de aislamiento bioquímico

facilitó la predicción de miles de péptidos hormonales potenciales (Simon y Dresselhaus, 2015). Entre ellos, una nueva familia de ocho péptidos endógenos llamados péptidos elicitores de *Arabidopsis* (AtPeps) relacionados a defensa fue descubierta. Los AtPeps son derivados de proteínas precursoras (PROPEP1-8) ubicados y activos en diferentes tejidos, donde actúan induciendo y amplificando el sistema inmune en plantas (Yamaguchi *et al.*, 2010). Los *AtPeps* son caracterizados como *DAMP* (*Damage associated molecular patterns*), desencadenando respuestas como el aumento de ondas de calcio intracelular, alcalinización extracelular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de *MAP quinasa* (MAPK), inducción de genes relacionados a la defensa, Inhibición de crecimiento de raíz e interacción con otras hormonas relacionadas con la defensa (Huffaker; Pearce; Ryan, 2006; Krol *et al.*, 2010; Ranf *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2014). Todos los *Peps* son percibidos por dos proteínas de membrana homólogas con dominios extracelulares ricos en leucina (LRR), *AtPEPR1* y *AtPEPR2*. Los estudios mostraron que el receptor *AtPEPR1* actúa como el primer receptor del *AtPep1*, un péptido de 23 aminoácidos derivado de la porción C-terminal de una proteína precursora de 92 aminoácidos *AtPROPEP1* (Huffaker *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2010; Krol *et al.*, 2010). La resolución cristalográfica de la estructura proteica del complejo formado por el dominio extracelular *LRR* del *PEPR1* con *AtPep1* fue demostrada, donde se muestra que los 10 aminoácidos de la porción C-terminal del péptido son responsables de la interacción con el dominio *LRR* (Tang *et al.*, 2015.)

Tanto la *sistemina* como los *AtPeps* promueven el flujo iónico de calcio  $Ca^{+2}$  y la interrupción del flujo de protones ( $H^+$ ). Esta última actividad de perturbación del flujo de protones generó un ensayo donde la

alcalinización del medio extracelular de células en suspensión se utiliza para detectar péptidos en otras especies (Felix; Boller, 1995; Pearce *et al.*, 2001a). En el intento de descubrir homólogos de *sistemina* en extractos proteicos de hojas de tabaco, se descubrió otro péptido que promueve una fuerte y rápida alcalinización del medio extracelular (Pearce *et al.*, 2001b). Estos nuevos péptidos están relacionados con el desarrollo y se han denominado factores de alcalinización rápida o simplemente RALF (*Rapid Alkalinization Factors*). Péptidos RALF no es el único péptido relacionado con el desarrollo que se conoce. *CLAVATA3* (CLV3), *Fitosulfoquinas* (PSKs), *Locus Estéril Rico en Cisteína / proteína11* (SCR / SP11), *Inflorescencia Deficiente en Abscisión* (IDA), *Rotundifolia4-Like / Devil* (ROT 4 / DVL1), *Polaris* (PLS), *Nodulina* (Butenko *et al.*, 2003; Casson *et al.*, 2002; Charon *et al.*, 1999; Fletcher *et al.*, 1999; Matsubayashi; Sakagami, 1996; Schopfer *et al.*, 1999; Sugano *et al.*, 2010; Takayama *et al.*, 2000; Whitford *et al.*, 2012). Son algunos péptidos que también están relacionados al desarrollo de plantas.

#### **1.2.5. El Péptido CLV3.**

El péptido CLV3 es producido y secretado en las capas de células epidérmicas *L1* y *L2* y se difunde a la camada *L3*, todo ello en la yema apical meristemática (Sablowski, 2007). El precursor de 96 aminoácidos sufre modificaciones post-traduccionales por glicosilación generando un péptido activo de 13 aminoácidos (Ohyama *et al.*, 2009). CLV3 activa el complejo de proteínas CLV1 / CLV2 desencadenando una vía de señalización en la zona central del meristema apical regulando la especificación y diferenciación de las células meristemáticas (Fiers *et al.*, 2007). La pérdida de función del péptido del gen CLV3 (*clv3*) resulta en

un mutante aberrante con acúmulos descontrolados de células meristemáticas en la región del meristema apical. Una vez que CLV3 activa el complejo de receptores de *CLV1/CLV2*, *WUSCHEL* (*WUS*), un factor transcripcional responsable de la actividad de las células meristemáticas, es negativamente regulado. Las plantas mutantes para *WUS* no presentan expresión del gen *CLV3*, indicando que *WUS* regula positivamente la expresión de *CLV3* y *CLV3* regula negativamente *WUS*, manteniendo una retroalimentación regulatoria necesaria para mantener el equilibrio óptimo de las células meristemáticas (Brand *et al.*, 2002; Hobe *et al.*, 2003).

#### **1.2.6. Péptido hormonal RALF.**

El péptido hormonal RALF, del *inglés Rapid Alkalinization Factor*, fue aislado de extractos proteicos de tabaco a través del ensayo de alcalinización en suspensiones celulares (Pearce *et al.*, 2001b). Se identificó, además de la inducción de una rápida alcalinización del medio extracelular, la activación de una *MAP* quinase en células de tabaco (Pearce *et al.*, 2001b). En tabaco, el péptido RALF posee 49 aminoácidos, se deriva de la porción C-terminal de una preproteína de 115 aminoácidos, presenta un péptido señal de 23 aminoácidos en la porción N-terminal y una porción entre el péptido señal y el péptido maduro de función aún desconocida con 43 aminoácidos. Por lo tanto, los péptidos RALF son derivados de las proteínas precursoras que son secretadas y que todavía sufren procesamiento posterior para la liberación del péptido maduro. En un estudio de transporte de proteínas en tabaco, se demostró que la fusión prepro RALF-GFP se visualiza primero en el retículo endoplasmático (RE) y después de 24 horas en el RE y en la pared celular (Escobar *et al.*, 2003).

Los péptidos RALF encontrados en todos los representantes del reino vegetal donde fueron investigados, caracterizándose como el primer péptido hormonal ubicuo en plantas (Moura, Silva-Filho, 2006). Los péptidos generalmente son encontrados y organizados en familias génicas que pueden presentar expresión tanto generalizada como en tejido específicas (Moura, Silva-Filho, 2006); (Germain *et al.*, 2005, Haruta; Constabel, 2003; Olsen *et al.*, 2002). En una búsqueda *in silico* por péptidos secretados menores que 200 aminoácidos, Olsen *et al.*, (2002) propusieron la existencia de una familia génica en *Arabidopsis* de 34 genes similares al RALF (RALFL, RALF-LIKE). A diferencia de (Pearce *et al.*, 2001b), estos autores consideraron como criterio para determinar miembros de esa familia, solamente la conservación de la región C-terminal donde reside el péptido activo. La presencia de otras regiones como péptidos señal, sitio dibásico, arreglo de cisteínas y residuos de ácidos glutámicos no fue tomada en consideración.

Pearce *et al.*, (2010) mostraron que el motivo YISY, presente en el extremo N-terminal del péptido RALF maduro, es altamente conservado entre RALFs, siendo que la sustitución de la *isoleucina* por una *alanina* en este motivo, causa una severa reducción de la alcalinización de células en suspensión celular y una baja Inhibición de crecimiento de raíz en tomate. (Matos *et al.*, 2008) demostraron que el *sitio dibásico*, formado por dos argininas en posición 68 y 69 del *preproRALF1*, posicionada sobre el péptido activo, es responsable del reconocimiento, procesamiento y liberación del péptido activo en *Arabidopsis*.

Las plantas transgénicas que super-expresan precursor mutado (sustitución de una arginina por una alanina en la posición 69) no presentan el fenotipo semi-enano característico de la super-expresión del precursor salvaje (precursor de naturaleza nativa) y el análisis de los

extractos proteicos de esas plantas revelan la acumulación del precursor no procesado y la no liberación del péptido activo. De manera similar, cuando la quimera *preproRALF23-myc* fue super-expresada en *arabidopsis* ésta generó un fenotipo semi-enano y raíces con capacidad reducida para acidificar la rizósfera (Srivastava *et al.*, 2009).

En cuanto a la función de los péptidos de la familia RALF en plantas, se sabe que no están relacionados con la defensa, pues no inducen la síntesis de inhibidores de proteínas (Pearce *et al.* 2001b) y tampoco están involucrados con la respuesta contra pógenos y lesiones (Haruta; Constabel, 2003; Olsen *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007). Cuando el péptido purificado de tomate fue aplicado exógenamente en medio de cultivo de plántulas de tomate y de *Arabidopsis* hubo inhibición del crecimiento de raíces, indicando su implicación en el crecimiento y desarrollo vegetal (Pearce *et al.*, 2001b). La superexpresión del prepropeptídeo *AtRALF23*, *AtRALF1* y *AtRALF8* en *Arabidopsis* resultan en fenotipos semi-enanos con raíces e hipocótilos menores, promoviendo menor densidad de raíces laterales y crecimiento de pelos radiculares (Atkinson, *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2009). Recientemente Bergonci *et al.* (2014) descubrieron que el silenciamiento génico del *AtRALF1* (*irAtRALF1*) presentaba un mayor crecimiento de la raíz principal y promovía una mayor densidad de raíces laterales, así como un mayor tamaño de las células del hipocótilo y de raíces, sugiriendo que el péptido *AtRALF1* estaría regulando la expansión celular. En la búsqueda por desvelar el papel fundamental del péptido *AtRALF1* en la expansión celular, análisis preliminares de la expresión génica en plantas de *Arabidopsis* que superexpresan el gen *AtRALF1*, mostraron que un grupo de genes involucrados con la reorganización de la pared celular tuvo su expresión alterada (NCBI, Gene Expression Omnibus, Series GSE641). Dos genes

que codifican proteínas ricas en prolina (*AtPRP1*, *AtPRP3*), un gen que codifica una glicoproteína rica en hidroxiprolina (*AtHRGP2*) y un gen que codifica la proteína xiloglucana endotransglucosilasa *TCH4* se alteran de forma positiva cuando existe la presencia del péptido AtRALF1 en las raíces (Bergonci *et al.*, 2014), la inducción de estos genes probablemente estaría modificando la estructura de la pared celular.

Con el fin de descubrir componentes de vía de señalización del *AtRALF1* que sufren modificaciones post-tradicionales (MPT), (Haruta *et al.*, 2014) empleando experimentos de fosfoproteoma descubrió entre todas las proteínas candidatas una proteína de membrana con dominio quinasa (FERONIA) como responsable por la interacción con *AtRALF1*, esa unión desencadena una cascada de fosforilación que resulta en la inhibición de la secreción de protones, aumento del pH apoplástico y reducción de la expansión celular. Las plantas con pérdida de función de FERONIA (*fer4*) presentan insensibilidad al péptido AtRALF1 en concentraciones inferiores a 1  $\mu\text{M}$  y sensible a dosis mayores. Este efecto podría atribuirse a los experimentos de binding que resulta en el ~40% para FERONIA y otros ~ 60% que probablemente estarían relacionados con un segundo receptor todavía desconocido. Entre las respuestas más rápidas promovidas por el péptido *AtRALF1* están las respuestas iónicas como  $\text{Ca}^{+2}$  y pH (Haruta *et al.*, 2008, Pearce *et al.*, 2001b).

#### **1.2.7. F-RALF en la colonización de *F. oxysporum* de tomate.**

La infección micótica de las plantas se asocia a menudo con cambios en el pH extracelular del tejido huésped (Prusky *et al.*, 2001, Prusky; Yakoby, 2003). Masachis, y colaboradores determinaron que la alcalinización extracelular aumenta la virulencia de *F. oxysporum* hacia las plantas de tomate. Este aumento del pH conduce a la activación de una proteína

quinasa (MAPK) activada por mitógenos fúngicos conservados, denominada *Fmk1*, que se requiere para patogenicidad fúngica. Esto los llevó a identificar el desencadenante de esta alcalinización impulsada por hongos. Inesperadamente, observaron que el genoma de *F. oxysporum* codifica un péptido con similitud a la secuencia de la hormona peptídica vegetal *RALF*, que se sabe que aumenta la alcalinización extracelular (Pearce *et al.*, 2001). Curiosamente, mientras que los péptidos *RALF* de plantas se producen por el clivaje de un pro-péptido mediado por una proteasa secretada, el *RALF* de hongos (*RALF*) no lleva una región pro-péptidica, indicando que ha evolucionado para ser activo independientemente del procesamiento enzimático mediado por plantas u hongos. *F-RALF*, un péptido sintético que coincide con la secuencia de *F. oxysporum*, tenía una actividad inductora de alcalinización similar en el tomate como péptido *RALF* de planta. Los análisis genéticos indicaron que *F-RALF* es importante para la colonización de *F. oxysporum* de tomate. *F-RALF* utiliza el receptor quinasa *FERONIA* (*FER*) encontrado en plantas, que recientemente se identificó como el receptor *RALF* (Haruta *et al.*, 2014). El mutante defectuoso en la producción de la proteína *FERONIA Arabidopsis* mostró una mayor resistencia a la infección de *F. oxysporum*.

## 1.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.

- a. **El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA):** es un quelante específico para iones divalentes como ion de calcio, la acción del EDTA puede involucrar la quelación y la privación de cationes divalentes esenciales necesarios para el crecimiento de microorganismos (Won *et al.*, 2015).



- b. PDA (*Potato Dextrose Agar*)** Es un medio de cultivo estándar utilizado en el aislamiento, cultivo y recuento de hongos y levaduras (Soria, 2009).
- c. Quelantes:** Un quelante considerado como un secuestrador de iones.
- d. RALF:** Es un pequeño polipéptido de peso molecular de 5 kDa (kilodaltons) que causa la alcalinización extracelular, puede detener el crecimiento de la raíz y activa quinasas del tipo MAPK (Pearce et al. 2001b; Germain et al.,2005).
- e. Inhibición:** El verbo “inhibir” deriva del latín *inhibere* que significa ‘retener, suspender, detener, impedir’ (Sauval, 2010).

## CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS.

#### 2.1.1. Hipótesis general.

El estatus iónico en pH y  $\text{Ca}^{++}$  regula el crecimiento micelial de especies *Fusarium*, asimismo durante la fase de su crecimiento en el hospedero reduce el crecimiento de las células del hospedero a través de sus péptidos homólogos F-RALF.

#### 2.1.2. Hipótesis específica.

H1: La disponibilidad de iones  $[\text{H}^+]$  y  $\text{Ca}^{+2}$  son necesarios para el crecimiento micelial de especies *Fusarium*

H2: La presencia exógena de péptidos homólogos F-RALF en la célula vegetal reduce su expansión celular.

### 2.2. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN.

#### 2.2.1. Variable Independiente.

X1 = Péptidos homólogos F-RALF, secretados por *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289, *Fusarium graminearum* CS3005.

#### 2.2.2. Variables Dependiente.

Y1 = Crecimiento micelial e inhibición:

- ✓ Crecimiento micelial en función al pH
- ✓ Crecimiento micelial (sensibilidad de calcio)
- ✓ Inhibición de crecimiento de raíces de *Arabidopsis thaliana*
- ✓ Inhibición de crecimiento de hipocótilos de *Arabidopsis thaliana*

### 2.2.3. Operacionalización de las variables.

**Tabla 1.** Operacionalización de variables

Variables	Niveles e indicadores
<p><b>Independiente</b>  <b>X<sub>1</sub>:</b> Péptidos homólogos F-RALF, secretados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287 (FGSC 9935), <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289, <i>Fusarium graminearum</i> CS3005.</p>	<p><b>Indicadores:</b>  Rangos de pH:  T<sub>1</sub>= pH 5  T<sub>2</sub>= pH 6  T<sub>3</sub>= pH 7</p> <p>Sensibilidad al calcio (Cantidad de E.D.T.A)  T<sub>0</sub>= PDA  T<sub>1</sub>= PDA+ 1mM EDTA  T<sub>2</sub>= PDA+ 10mM EDTA  T<sub>3</sub>= PDA+ 20mM EDTA  T<sub>4</sub>= PDA+ 50mM EDTA</p> <p>Concentración del péptido F-RALF en raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i>  T<sub>0</sub>= 0 µM de péptido  T<sub>1</sub>= 1µM de péptido  T<sub>2</sub>= 2µM de péptido  T<sub>3</sub>= 5µM de péptido</p> <p>Concentración del péptido F-RALF hipocótilo de <i>Arabidopsis thaliana</i>  T<sub>0</sub>= 0 µM de péptido  T<sub>1</sub>= 1µM de péptido  T<sub>2</sub>= 2µM de péptido  T<sub>3</sub>= 5µM de péptido</p>
<p><b>Dependiente</b>  <b>Y<sub>1</sub>:</b> Crecimiento micelial e inhibición</p>	<p><b>Indicadores</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento micelial en función al pH ((µm)</li> <li>• Crecimiento micelial (sensibilidad de calcio) (µm)</li> <li>• Inhibición de crecimiento de raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i> (cm)</li> <li>• Inhibición del crecimiento de hipocótilo de <i>Arabidopsis thaliana</i> (cm)</li> </ul>

**Fuente:** Elaboración propia

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. TIPO Y DISEÑO.

#### 3.1.1. Tipo de investigación.

El trabajo fue de investigación del tipo Experimental – Cuantitativo. El nivel de investigación es Descriptiva – Explicativa, ya que se describe y explica el efecto de *Fusarium* spp., y su interacción sobre la sensibilidad de pH y disponibilidad de calcio extracelular en condiciones de laboratorio, además de la acción de péptidos homólogos en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

#### 3.1.2. Diseño de investigación.

El diseño de la investigación es experimental, realizado en condiciones de laboratorio, estableciendo experimentos independientes para el estudio de cepas *Fusarium* sobre la sensibilidad de pH y disponibilidad de calcio extracelular y la acción de péptidos F-RALF secretados por *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289, *Fusarium graminearum* CS3005 en raíces de plántulas de *A. thaliana*.

### 3.2. DISEÑO MUESTRAL.

#### 3.2.1. Población.

La población para los experimentos de inhibición de crecimiento de raíces está dada por el total de plántulas *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*. Para los experimentos de sensibilidad de pH y disponibilidad de calcio extracelular está dado por discos de tres especies *Fusarium*.

### **3.2.2. Muestra.**

La muestra para los experimentos de inhibición de crecimiento de raíces e hipocótilos de *A. thaliana*, fue un n=30 por repetición/tratamiento. Para la evaluación de crecimiento micelial la muestra fue un disco de cultivo de una especie *Fusarium*, donde se registró un total de 3 micelios por repetición/tratamiento.

## **3.3. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.**

### **3.3.1. Descripción de los experimentos.**

#### **a. Efecto del pH, sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* spp.**

Para evaluar el efecto del pH sobre el crecimiento micelial de tres especies puras de *Fusarium*, se realizó experimentos de crecimiento micelial sobre un sistema de “*time lapse*” adaptado a un estereomicroscopio. Discos de inóculo a partir de cepas puras reactivadas fueron transferidos a medio semisólido de PDA (papa, dextrosa y agar) tamponado a diferentes valores de pH (5; 6 y 7) e incubados por 36 horas. Enseguida fueron llevados a observación al estereomicroscopio y una vez localizados los micelios a monitorear, estos fueron evaluados en un sistema de registro automático de imágenes secuenciales (time-lapse) por 0; 5; 10; 15; 20; 25 y 30 minutos. Las imágenes fueron adquiridas en formato “*tif*” y trabajadas en una computadora estacionaria de alto rendimiento usando el *software* de libre acceso Image J (<https://fiji.sc/>). La permanencia del pH ante cualquier eventualidad de cambio iónico fue garantizada mediante el tamponamiento del medio PDA con “ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico” (MES) a 1 mM (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tratamientos para el estudio de modulación de pH en tres especies *Fusarium*.

Especies	Tratamientos		
	T <sub>1</sub> = pH5	T <sub>2</sub> = pH6	T <sub>3</sub> = pH7
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287	X	X	X
<i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289	X	X	X
<i>Fusarium graminearum</i> CS3005	X	X	X

**Fuente:** Elaboración propia.

**b. Efecto de calcio extracelular sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* spp.**

Para evaluar el efecto del Ca<sup>++</sup> extracelular sobre el crecimiento micelial de tres especies puras de *Fusarium* spp., fueron realizados experimentos de crecimiento micelial sobre un sistema “time lapse” adaptado a un estereomicroscopio. Discos de inóculo a partir de cepas puras reactivadas fueron transferidos a medio semisólido de PDA (papa, dextrosa y agar), es aquí donde se realiza el secuestro del calcio del medio PDA sin tamponar, esto fue posible mediante la adición de diferentes concentraciones del agente quelante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Las concentraciones empleadas de EDTA fueron a razón de 0; 1; 10; 20 y 50 mM respectivamente e incubados por 36 horas. Enseguida fueron llevados a observación al estereomicroscopio y una vez localizados los micelios a monitorear, estos fueron evaluados en un sistema de registro automático de imágenes secuenciales (time-lapse) por 0; 5; 10; 15; 20; 25 y 30 minutos. Las imágenes fueron adquiridas en formato “tif” y trabajadas en una computadora estacionaria de alta gamma usando el software de libre acceso Image J (<https://fiji.sc/>) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Tratamientos para el estudio de calcio extracelular en tres especies *Fusarium*.

Especies	Tratamientos				
	T <sub>0</sub> = PDA	T <sub>1</sub> = PDA+ 1mM EDTA	T <sub>2</sub> = PDA+ 10mM EDTA	T <sub>3</sub> = PDA+ 20mM EDTA	T <sub>4</sub> = PDA+ 50mM EDTA
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>lycopersici</i> 4287	X	X	X	X	X
<i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289	X	X	X	X	X
<i>Fusarium</i> <i>graminearum</i> CS3005	X	X	X	X	X

**Fuente:** Elaboración propia.

### c. Péptidos homólogos de *Fusarium* spp., en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Para la inhibición del crecimiento de raíces e hipocótilos de *A. thaliana*, se consideró un testigo absoluto T0 solo con medio líquido, siendo los tratamientos T1; T2 y T3 los inoculados con péptidos sintéticos de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287, *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005 al momento de la emergencia de las plántulas. Para todos los tratamientos se utilizó péptidos sintéticos y plántulas germinadas de *Arabidopsis thaliana* (Tabla 4).

**Tabla 4.** Tratamientos para inoculación de péptidos homólogos de *Fusarium* spp., en plántulas de *A. thaliana*.

Tratamientos	Péptido de <i>Fusarium fujikuroi</i>	Péptido de <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	Péptido de <i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>
T0	-	-	-
T1	1µM de péptido	1µM de péptido	1µM de péptido
T2	2µM de péptido	2µM de péptido	2µM de péptido
T3	5µM de péptido	5µM de péptido	5µM de péptido

**Fuente:** Elaboración propia.

### 3.3.2. Ubicación del ensayo.

El trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM) – Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín y el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.



**Figura 1.** Laboratorio de Biología y Genética Molecular (LBGM)



**Figura 2.** Laboratorio de Fisiología y biotecnología vegetal (FISIOBEV)



### Ubicación Política

Distrito : Morales.  
Provincia : San Martín.  
Departamento : San Martín.

### Ubicación Geográfica

Latitud Sur : 06°35'28".  
Longitud Oeste : 76°18'47".  
Altitud : 230 - 330 m.s.n.m.m.

### 3.3.3. Material biológico.

Se contó con cultivos puros de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287, *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005. Además, de péptidos homólogos F-RALF de las mismas especies e incubados en plántulas de 48 h de *Arabidopsis thaliana*.



Figura 3. Siembra de planta modelo de *Arabidopsis thaliana*



**Figura 4.** Péptidos sintéticos de *Fusarium* sp.

#### **3.3.4. Conducción del experimento.**

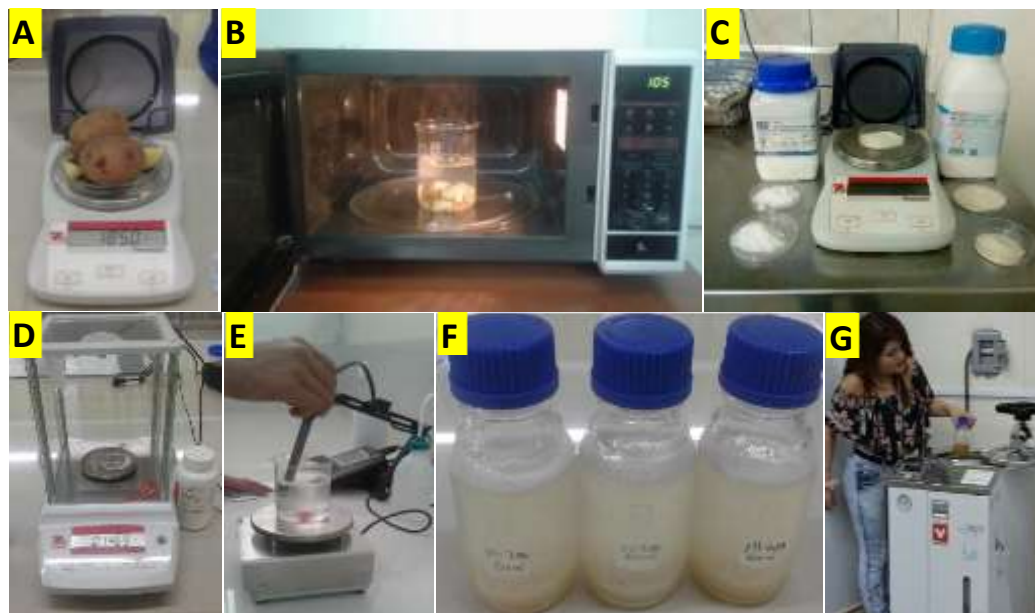
Este trabajo de investigación fue desarrollado en distintas fases tales como:

##### **a. Sensibilidad de pH en tres cepas puras de *Fusarium* spp.**

###### **❖ Preparación de medios de cultivo.**

Se preparó medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar), la cual se elaboró de acuerdo a la metodología propuesta por French & Herbert, (1982). Una vez obtenido el medio de cultivo, este fue tamponado con MES a 10 mM sobre condiciones fijas de pH (5; 6 y 7) el procedimiento del preparado consistió en pesar 187.5 gr de papa en 750 mL de agua destilada, se procedió a hervir el caldo de papa en el horno microondas, luego se pesó 15 gr de dextrosa se homogenizó con el caldo de papa preparado, también se pesó el tampón MES 0.14643 gr, el tampón ya pesado se mezcla con 10 mL de agua destilada para poder homogenizar y enseguida se mezcló en el caldo de papa, se utilizó tres frascos para cada pH diferente y se procedió a calibrar en el potenciometro, para así fijar

el pH (5;6 y 7), también se pesó 3.75 gr de agar para cada frasco de 250 mL de medio de cultivo ya preparado y calibrado, se procedió a calentar los frascos para que el agar se diluyera, por último se Autoclavó a 121C° por 20 minutos a 15 PSI (1 atmósfera) (Figura 5).



**Figura 5.** Preparación de medio de cultivo PDA, para prueba de pH. **A)** Pesado de papa. **B)** Obtención del caldo de papa. **C)** Pesado de dextrosa, agar. **D)** Pesado del tampón MES. **E)** Medición pH (5;6 y7). **F)** Frascos con medios preparados. **G)** Autoclavar los medios de cultivos preparados.

❖ **Reactivación de cepas.**

❖ **Siembra de las cepas de *Fusarium* sp.**

Antes de realizar aislamiento de *Fusarium* sp., se tuvo lo siguiente:

- ✓ Placas Petri (esterilizado en autocable)
- ✓ Tres cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289, *Fusarium graminearum* CS3005.
- ✓ Medio de cultivo PDA (semi sólido).

Para la reactivación de las cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005, que estaba guardado en la

refrigeradora a 4°C en tubos de ensayos, se volvió a sembrar con una correcta manipulación en la cámara de flujo laminar, para la siembra se utilizó un saca bucado (material para repicar), se realizó una medición circular (7mm) para obtener un crecimiento parejo, los repiques se realizó en placas petri con medio de cultivo de PDA ya calibrados en test de pH ( 5; 6 y 7), al final se selló con parafilm y se rotuló las placas para almacenarlas al Incubador BOD a 28°C por 2 días.



**Figura 6.** Siembra de las cepas de *Fusarium* sp. **A)** Tubos con cepas *Fusarium* sp. **B)** Siembra de las tres cepas *Fusarium*. **C)** Almacenamiento de la siembra en el Incubador BOD a 28°C. **D)** *Fusarium fujikuroi* IMI 58289. **E)** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 (FGSC 9935). **F)** *Fusarium graminearum* CS3005.

#### ❖ Instalación del experimento.

Una vez reactivados las cepas *Fusarium* sp., se realizó la prueba de pH para ello, las cepas fueron nuevamente sembrados de una manera uniforme (con un sacabucado) se trabajó en la cámara de flujo laminar con asepsia para la inoculación del *Fusarium* sp., se

realizó la inoculación del micelio sobre medio de cultivo (Papa Dextrosa Agar). Se selló con Parafilm y rotulación de placas. Para evaluar el crecimiento micelial de los tres *Fusarium* sp., y poder determinar en qué pH tiene un mejor crecimiento micelial, estos fueron sembrados en una cámara de crecimiento para hongos (Biochemical oxygen demand: BOD) durante 48 horas. Pasado este tiempo, se acondicionó un estéreomicroscopio anexo a una laptop, en la cual se instaló un sistema de crecimiento en tiempo automatizado, mediante la secuencia de imágenes (time-lapse), posteriormente se obtuvieron las imágenes en formato .tif, para ser trabajadas en el software de libre acceso Image J.

Para ello se siguieron los siguientes protocolos:

- **Protocolo de monitoreo de crecimiento de hifas en tiempo real.**

Las Imágenes en vivo es una técnica importante para el estudio de los procesos biológicos celulares, esto permite la formación de imágenes de alta resolución, y lo más importante, facilita el monitoreo de crecimiento en tiempo real.

Para la toma de fotos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287, *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005 en tiempo real, se elaboró el siguiente protocolo.

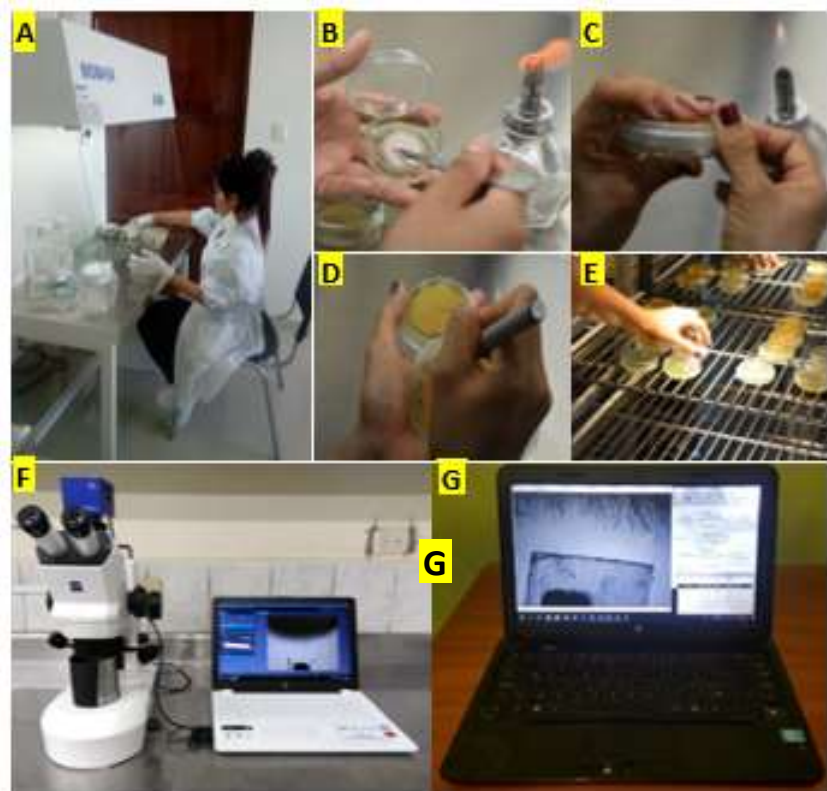
- ✓ El sistema *Time-lapse* debe estar configurado para el registro de imágenes cada 5 minutos, utilizando el script libre: <https://www.autoitscript.com/site/autoit/>.
- ✓ Hacer clic derecho en RUN SCRIPT y clic en EDIT SCRIPT (5 x 60 x 1000 = 300,000 milisegundos y está programado para 5 minutos).

- ✓ La computadora debe conectarse a un estereomicroscopio Carls Zeis modelo Stemi 508.
  - ✓ En el estereomicroscopio se procede a la observación de la muestra de la cepa *Fusarium* sp., coloque sobre la platina el espécimen, lleve el condensador a su posición más alta y bajándolo cuidadosamente enfoque/localice el espécimen y ajuste el ocular para una mejor imagen.
  - ✓ Se programa ZEN, luego crear una carpeta para guardar las fotos y de esta carpeta se copia su dirección, para guardar esta dirección regresar al programa ZEN buscar y dar clic en TOOL, elegir OPTIONS luego se selecciona SAVING y dar clic, lo siguiente será copiar la dirección en AUTO SAVE PATH y dar OK.
  - ✓ En el programa ZEN se configura la imagen, buscar y dar clic en LIVE, manipular AUTO EXPOSICIÓN y seleccionar en  $\mu$ s (microsegundo).
  - ✓ Minimizar el programa ZEN y dar clic en SCRIPT y luego clic en SNAP.
  - ✓ La foto está programada y cada 5 minutos tomará una foto.
- **Evaluación del crecimiento micelial de *Fusarium* spp.**

Para ello se realizó el siguiente protocolo:

    - ✓ Abrir la carpeta donde fueron guardadas las fotos, se selecciona y se arrastra hacia el programa image J.
    - ✓ Seleccionar IMAGE y clic en COLOR y elegir SPLIT CHANNELS, posteriormente seleccionar la foto más nítida y se guarda las siete fotos cómo JPG.

- ✓ Luego se arrastra la carpeta hacia el programa IMAGE J. y sale una ventana y se selecciona "Use Virtual Stack"
- ✓ Clic derecho en la foto y clic en DUPLICATE (escribir la cantidad de imágenes que va trabajar).
- ✓ Seleccionar TIFF permite guardar como TIFF la imagen seleccionada, si el fichero es una serie de imágenes se guardará toda la serie en un único fichero de imagen.
- ✓ Para calibrar una imagen podemos proceder de la siguiente manera: si tenemos marcada en la imagen una distancia conocida en este caso se dio clic en SEGMENTED LINE, marcamos la foto, y luego (control + m), te da la medición de la escala (longitud).
- ✓ Seleccionar PLUGIN-TRACKING y MANUAL TRACKING (con esta función se realiza la calibración de la imagen de manera que las medidas que hagamos se obtengan en unidades reales (micras, mm, cm, etc.).
- ✓ Presionar ADD TRACK para poder realizar el monitoreo de crecimiento de hifas.
- ✓ Todos los datos se copiaron y se trabajaron en EXCEL para poder realizar el promedio, frecuencia acumulada y su desviación estándar en un gráfico dónde nos determina el tiempo de crecimiento en tiempo real.



**Figura 7.** Instalación de ensayo de sensibilidad de pH. **A)** Preparación de la siembra. **B)** Inoculación de micelio. **C)** sellado con Parafilm. **D)** rotulación de placas. **E)** Almacenamiento en el Incubador BOD. **F)** Monitoreo de crecimiento de hifas en tiempo real, en el programa ZEN. **G)** Fotos guardadas de las tres cepas de *Fusarium* sp., serán utilizadas en el programa IMAGE J.

## **b. Ensayo de sensibilidad de calcio.**

### **❖ Preparación de E.D.T.A a cuatro concentraciones diferentes.**

Se preparó un litro de Caldo de papa, se necesitó 5 frascos para verter 200 mL de caldo de papa seguidamente se pesó 3 gramos de agar y 4 gramos de dextrosa y se vertió en cada frasco que contiene el caldo de 200mL así mismo se vertió las concentraciones de E.D.T.A, menos en el frasco 1 que es el control.

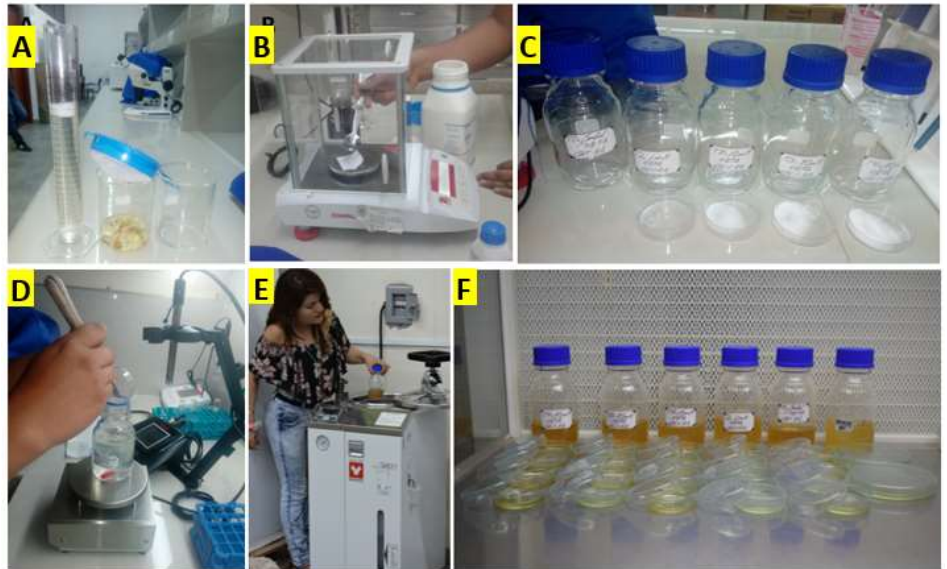
Estos son las concentraciones de E.D.T.A:

- a) T0: Control sin E.D.T.A.
- b) T1: 1mM se agregó 0,744g. de E.D.T.A
- c) T2: 10mM se agregó 0,7448 g de E.D.T.A,
- d) T3: 20mM se agregó 1,4889 g de E.D.T.A,



e) T5: 50mM se agregó 3,7224 g de E.D.T.A,

Los frascos se llevaron al potenciómetro, en el agitador orbital se colocó el frasco seguidamente se midió el pH a 6.3 a todos los tratamientos por último se autoclavó a 121C° por 20 minutos a 15 PSI (15 atmósfera). Luego se plaqueó y se sembraron.

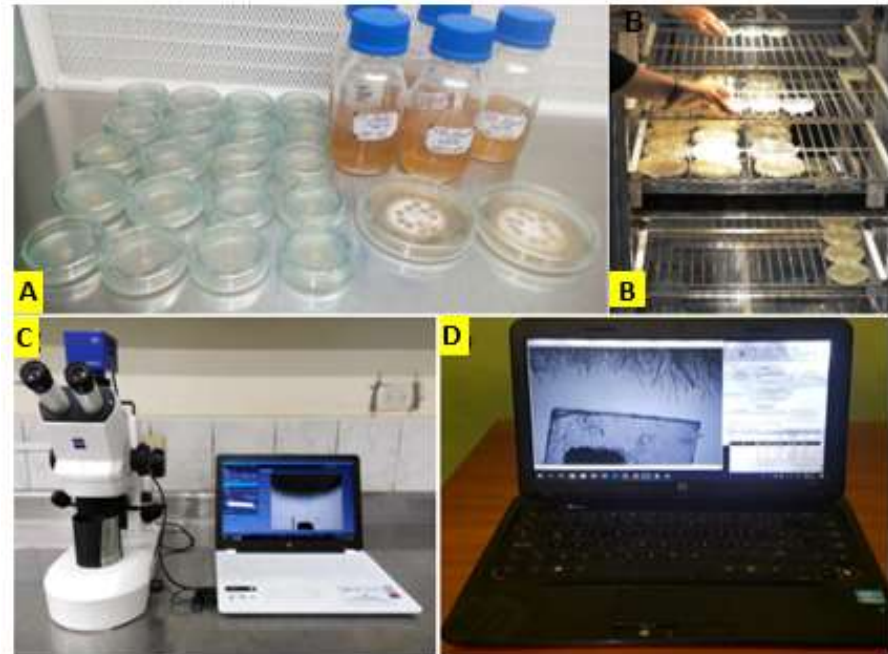


**Figura 8.** Preparación de E.D.T.A, a cuatro concentraciones diferentes. **A)** Se preparó el caldo de papa. **B)** Se pesaron (Dextrosa, agar y EDTA.). **C)** Pesado de cconcentraciones de EDTA, T0: Control sin E.D.T.A, T1: 1Mm, T2: 10mM. T3: 20mM, T5: 50mM. **D)** Se midieron el pH a 6,3. **E)** Se autoclavó a 121C° por 20 minutos a 15 PSI (15 atmósfera). **F)** Se plaquearon.

#### ❖ Instalación del experimento.

El medio de cultivo PDA fue quelado utilizando EDTA sobre diferentes condiciones: 0; 10; 20 y 50 mM. calibrados en test de pH (6,3); para la siembra se utilizó un sacabucado (material para repicar que tiene un modo circular de 7mm de diámetro), para obtener un crecimiento parejo, se rotuló las placas y se almacenó al Incubador BOD a 28°C por 2 días. La medición del micelio, se empleó nuevamente el sistema de monitoreo tipo *time-lapse* acoplado a un estereomicroscopio. Micelios de discos crecidos por 36 horas fueron medidos mediante registros fotográficos a cada 5

min y procesados mediante el software libre Image J (Figura 09). Para el proceso de monitoreo del crecimiento micelial y la medición se siguió el mismo protocolo empleado en las pruebas de pH.



**Figura 9.** Instalación de ensayo de sensibilidad de calcio **A)** Inoculación de micelio. **B)** Almacenamiento de las siembras. **C)** Monitoreo de crecimiento de hifas en tiempo real, en el programa ZEN. **D)** Fotos guardadas de las tres cepas de *Fusarium* sp., serán utilizadas en el programa IMAGE J.

### c. Actividad biológica de péptidos homólogos F-RALF en el crecimiento de hipocótilos y raíces de *Arabidopsis thaliana*.

#### ❖ Síntesis de péptidos homólogos.

Secuencias proteicas de péptidos activos fueron enviados para síntesis a un laboratorio especializado, los mismos que pasaron por un control de calidad en cuanto a la pureza y estabilidad. Verificado por su perfil cromatográfico de masas. Todos los péptidos generados por síntesis fueron utilizados en los ensayos planeados. Los péptidos son provenientes de las especies: *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287, *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005.

❖ **Preparación medios de cultivos para la siembra de semillas de *Arabidopsis thaliana*.**

Se preparó Medio Murashigue & Skoog, sólo sales minerales, su concentración total es 4.33g/L, sólo se utilizó media concentración  $4.33/2 = 2.165/2 = 1.0825\text{gr}$  para 500mL de agua destilada, en un matraz se colocó 450mL agua destilada y 1.0825 g. de medio Murashigue & Skoog, seguidamente en un potenciómetro se midió el pH a 5,75, enrazar a 500mL de agua destilada y se adicionó 4gr.de agar bacteriológico, y se calentó para que el agar se diluya. Autoclavar a 121C° por 20 minutos a 15 PSI (1 atmósfera). Por último, se plaqueó los medios de cultivo en placas Petri.



**Figura 10.** Preparación medio de cultivo para siembra de semillas de *A. thaliana*. **A)** Pesado de Medio, **B)** Homogenización de los medios. **C)** Medición del pH. **D)** Dilución del agar. **E)** Autoclavar los medios de cultivo **F)** Plaqueo del medio de cultivo.

❖ **Medio de cultivo líquido para el ensayo de inhibición de raíz e hipocótilo.**

Para la preparación de medio de cultivo líquido, se utilizó Medio Murashigue & Skoog, sólo sales minerales, su concentración total es 4.33g/L, sólo se utilizará media concentración  $4.33/2= 2.165/4= 0.541$  gr para 250mL de agua destilada. Colocar en un matraz 200mL de agua destilada y Murashigue & Skoog. Luego medir en el potenciómetro el pH a 5,75 y enrazar a 250mL de agua destilada, por último, se autoclavo a 121C° por 20 minutos a 15 PSI (1 atmósfera).

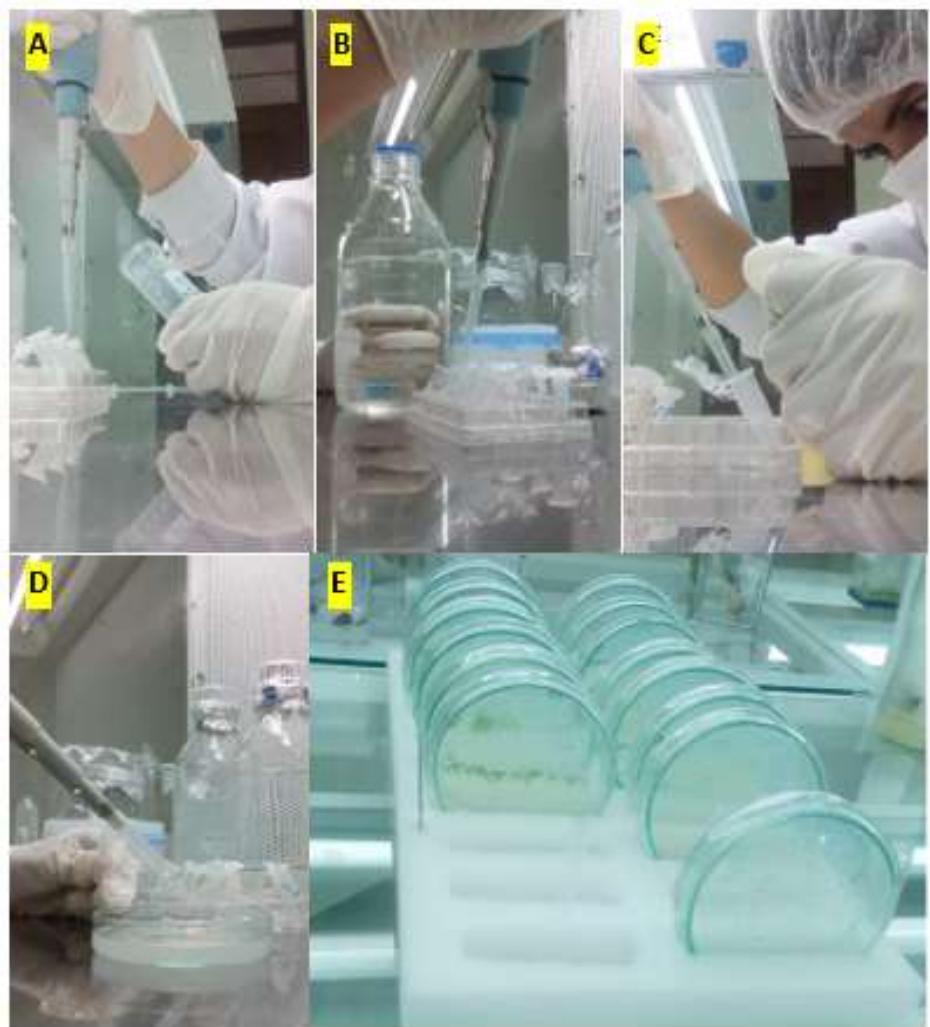


**Figura 11.** Preparación de medio de cultivo líquido. **A)** Pesar Medio Murashigue & Skoog. **B)** Homognizar agua destilada y Murashigue & Skoog. **C)** Medición del pH. **D)** Autoclavar.

❖ **Esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*.**

Las Semilla de *Arabidopsis thaliana* se esterilizó superficialmente en una solución de lejía al 50%(10mL) y 50%(10mL) de agua destilada, la solución se colocó en un tubo falcón, las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron puestas en un tubo Eppendorf de 1.5mL y se añadió 1mL de la solución del tubo falcón y luego se agitó por 10 minutos, después de los 10 minutos, se retiró la lejía con una pipeta de 1000 µL , luego se agregó 1mL de agua destilada estéril para enjuagar los restos de lejía, se agitó por un minuto y luego se retiró, el enjuague se realizó cuatro veces para poder retirar el exceso de lejía. Se aplicó ½

mL de solución de agarosa al 1%, luego se aseguró el tubo Eppendorf con Parafilm. Después de preparar y colocar en un tubo Eppendorf se llevó a la refrigeradora a 4°C, y se retiró a los 4 días. Pasado los 4 días se sembró las semillas en placas petri con medio de cultivo semi sólido que se preparó en la figura 5, seguidamente se colocó en forma vertical y permanecieron en condiciones de luz constante a 24°C [ $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (E, Einstein; 1 E  $\frac{1}{4}$  1 mol de fotones).



**Figura 12.** Esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*. **A)** Semillas esterilizadas. **B)** Retiro del exceso de lejía. **C)** Aplicación de agarosa al 1%. **D)** Siembra de semillas. **E)** Después se colocaron en forma vertical.

### ❖ Ensayo de inhibición de crecimiento de raíces.

Para este ensayo lo primero que se realizó es la medición de las concentraciones de los péptidos de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289, *Fusarium graminearum* CS3005

**T0=** No se utilizó péptido sintético de *Fusarium* sp. sólo se aplicó 1 mL de mili Q en un tubo Eppendorf de 1.5mL.

**T1=** Se utilizó 1µM en los péptidos sintéticos de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289, *Fusarium graminearum* CS3005.

## Universidad Nacional de San Martín

Customer report: 49271

Date :26<sup>th</sup> September 2018

Compound code	FFUJ_14827
Sequence	QSGEISYGALKHDGVPCSLRGASAANCRPGAEANFYNRGCSAIE KCRGGVGNN
N-terminus	Amine
C-terminus	Acid
Other modifications	None
Other/comments	
Counter Ion (if present):	TFA
Molecular mass (Av)	5364.898
Amount	10.0mg
Batch no	01
Purity (determined by HPLC - see enc)	>95-98%
Physical properties	Lyophilised off-white powdered solid
Storage conditions	Store lyophilised at ≤ -20°C

Concentration:

Formula Weight (daltons):

Volume:

Fuente: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Molarityform.cfm>

Para una solución de 400µM de péptido de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), en un volumen de 500 µl de agua mili-

Q, se necesita pesar 1.073mg, de esta solución homogenizada se calculó el volumen de lo que requiere para 1µM, 2µM y 5µM.

$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$
$400\mu M \cdot V_1 = 1000\mu l \cdot 1\mu M$	$400\mu M \cdot V_1 = 1000\mu l \cdot 2\mu M$	$400\mu M \cdot V_1 = 1000\mu l \cdot 5\mu M$
$V_1 = 2.5\mu l$	$V_1 = 5\mu l$	$V_1 = 12.5\mu l$

**T2=** Se utilizó 2µM en los péptidos sintéticos de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289, *Fusarium graminearum* CS3005.

## Universidad Nacional de San Martín

Customer report: 49270

Date :26<sup>th</sup> September 2018

Compound code	FOXG_21151
Sequence	PQSGEISYGALNRDHIPCSVKGASAANCRPGAEANPYRGCNAIE KCRGGVGGN
N-terminus	Amine
C-terminus	Acid
Other modifications	None
Other/comments	
Counter Ion (if present):	TFA
Molecular mass (Av)	5374.937
Amount	10.0mg
Batch no	01
Purity (Determined by HPLC - see enc)	>95-98%
Physical properties	Lyophilised off-white powdered solid
Storage conditions	Store lyophilised at ≤ -20°C

Concentration:  micromolar ▼

Formula Weight (daltons):

Volume:  microliter ▼

**Mass =**

Fuente: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Molarityform.cfm>

Para una solución de 400uM de péptido de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), en un volumen de 500 ul de agua mili Q, se necesita pesar 1.075mg.

**T3=** Se utilizó 5µM en los péptidos sintéticos de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289, *Fusarium graminearum*.

## Universidad Nacional de San Martín

Customer report: 49269

Date :26<sup>th</sup> September 2018

Compound code	FG05_30327
Sequence	PVQERTNYISYEGLKRDGTPCSLVTVSWQNCRPAAYANTWSRGC SPITRCRD
N-terminus	Amine
C-terminus	Acid
Other modifications	None
Other/comments	
Counter Ion (if present):	TFA
Molecular mass (Av)	5908.602
Amount	10.0mg
Batch no	01
Purity (determined by HPLC - see enc)	>95-98%
Physical properties	Lyophilised off-white powdered solid
Storage conditions	Store lyophilised at ≤ -20°C

Concentration:   ▾

Formula Weight (daltons):

Volume:   ▾

**Mass =**

Fuente: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/Molarityform.cfm>

500µL de agua mili Q ---- 2.36mg de péptido de *Fusarium graminearum*

X -----1.4mg de péptido de *Fusarium graminearum*

X = 296.61µL de agua Mili Q

Se pesó 296.61ul de agua Mili Q, se mezcló con 1.4mg del péptido, cómo el péptido de *Fusarium graminearum* estaba muy concentrado se aplicó una gota de HCl más 103.39 de agua Mili Q, para que llegara a una concentración de 400ul y se agregó una gota más de HCl.



$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$	$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$
$400\mu M \cdot V_1 = 1000\mu l \cdot 1\mu M$	$400\mu M \cdot V_1 = 1000\mu l \cdot 2\mu M$	$400\mu M \cdot V_1 = 1000\mu l \cdot 5\mu M$
$V_1 = 2.5\mu l$	$V_1 = 5\mu l$	$V_1 = 12.5\mu l$

Para el ensayo de inhibición se utilizó semillas de *Arabidopsis thaliana* germinadas en placas con medio de cultivo que se sembró hace dos días, se retiró con el palito de dientes, 20 semillas germinadas y se colocaron en cada pozo de la placa que contenían agua mili Q, con una pipeta de (1000ul). Se realizó las concentraciones del péptido de *Fusarium fujikuroi* (el mismo procedimiento se realizó para *Fusarium graminearum* y *Fusarium oxysporum*), estas concentraciones se aplicaron de la siguiente manera:

**T0=** No se utilizó péptidos, sólo en la fila de cuatro pozitos se aplicó 1mL de agua mili Q.

**T1=** En una fila de 4 pozitos se aplicó 1mL de agua Mili Q, en concentración de 1µM de péptido de *Fusarium* sp, se utilizó el volumen de 2.5 ul de la solución preparada de péptido del *Fusarium* sp. y se aplicaba en los pozitos que ya fueron colocados 1mL de agua Mili Q.

**T2=** En una fila de 4 pozitos se aplicó 1mL de agua Mili Q, en concentración de 2µM de péptido de *Fusarium fujikuroi* se utilizó el volumen de 5 ul de la solución preparada de péptido del *Fusarium* sp.

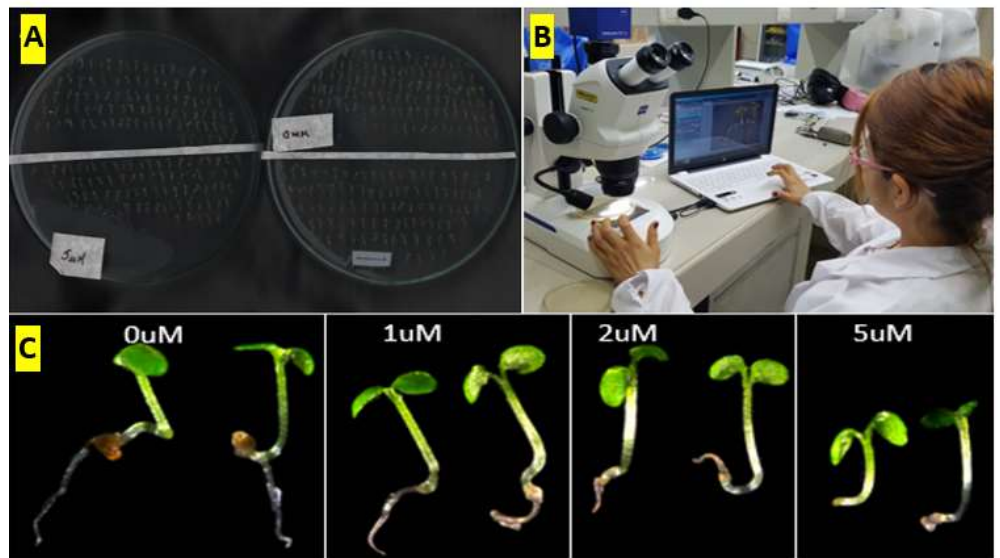
**T3=** En una fila de 4 pozitos se aplicó 1mL de agua Mili Q En concentración de 5µM de péptido de *Fusarium fujikuroi* se utilizó, el volumen de 12.5 ul de la solución preparada de péptido del *Fusarium* sp.

Después se colocaron los tratamientos en el aparato shaeker a 120 rpm/min, por dos días (48 h).



**Figura 13.** Ensayo de iniciación de raíces. **A)** Semillas sembradas de *Arabidopsis thaliana*. **B)** Traslado de semillas a las placas de 24 pozitos. **C)** Aplicación de Péptidos sintéticos de *Fusarium* sp. **D)** Colocación del tratamiento al aparato shaeker.

Se retiraron del aparato shaeker y se colocaron las plantitas en placas petri con cualquier medio de cultivo sólo para la toma de fotos, para luego ser medidas en el programa Image J, para obtener un resultado de las mediciones de las raíces. Seguidamente después se seleccionaron las raíces por tratamiento para las tomas de fotos en el programa ZEN.



**Figura 14.** **A)** Fotos utilizadas en el programa Image J. **B)** Fotos tomadas en el programa ZEN. **C)** Resultado sobre la inhibición de crecimiento según los tratamientos.

❖ **Ensayo de inhibición de crecimiento de hipocótilo.**

Se colocó en placas de 24 pocillos las semillas de *Arabidopsis* y luego se transfirieron a la sala de crecimiento en donde recibieron un shock de luz de 3 h seguido se añadieron péptidos recombinantes (concentración final de 0, 1, 2 y 5  $\mu\text{M}$ ) las mismas concentraciones que se utilizó en el ensayo de inhibición de crecimiento de raíces, luego se envolvieron las placa de 24 pocillos con las respectivas concentraciones con papel aluminio, se guardó en una caja de cartón, lugar dónde no tuvieron contacto con la luz, se evaluó el crecimiento 4 días después de la germinación.



**Figura 15.** Ensayos de inhibición de crecimiento de hipocótilo. **A)** Colocación en placas de 24 pocillos las semillas de *Arabidopsis*. **B)** Aplicación de los péptidos. **C)** Envoltura de la placa con papel aluminio. **D)** Se guardaron los tratamientos en una caja de cartón.



**Figura 16.** Medición del hipocótilo. **A)** Colocación de hipocótilos. **B)** Fijación para las fotos. **C)** Resultado de fotos, utilizando el programa ZEN.

### 3.3.5. Variables evaluadas.

#### a. Efecto del pH, sobre el crecimiento micelial de *Fusarium spp.*

Consistió en evaluar el crecimiento micelial en tres condiciones diferentes de pH (5; 6 y 7), la cual fue inducida en medio PDA y estabilizada por el agente tampón MES (ácido 2-etanosulfónico). Las evaluaciones iniciaron 36 horas después de la incubación, tomando fotografías automáticas cada 5 minutos hasta 30 minutos, mediante la manipulación de un script "Autoit" en un estereomicroscopio con cámara incorporada a una laptop. Siendo evidente el crecimiento micelial después de 36 horas para todas las cepas *Fusarium*. Al final se tuvieron 7 fotografías por tiempo de evaluación, en la cual una hifa representó una repetición, obteniendo gran cantidad de hifas que fueron secuenciales en su desarrollo. Al final se registró el crecimiento en  $\mu\text{M}$  por cada cepa estudiada.

**b. Efecto de calcio sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* sp.**

Al igual que en pH, consistió en evaluar el crecimiento micelial en tres condiciones diferentes de calcio, aplicando agente quelante EDTA (1; 10; 20 y 100  $\mu\text{M}$ ) más un control sin quelante, la cual fue inducida en medio PDA y estabilizada a pH 6,3. Las evaluaciones iniciaron 36 horas después de la incubación, tomando fotografías automáticas cada 5 minutos hasta 30 minutos, mediante la manipulación de un script "Autoit" en un estéreomicroscopio con cámara incorporado a una laptop. Fue evidente el crecimiento micelial a partir de 36 horas para todas las cepas *Fusarium*. Al final se tuvieron 7 fotografías por tiempo de evaluación, en la cual una hifa representó una repetición, obteniendo gran cantidad de hifas que fueron secuenciales en su desarrollo. Al final se registró el crecimiento en  $\mu\text{M}$  por cada cepa estudiada.

**c. Péptidos homólogos F-RALF, en el crecimiento de hipocótilos y raíces de *Arabidopsis thaliana*.**

Para las pruebas experimentales, se evaluó la inhibición del crecimiento de raíces e hipocótilos de *A. thaliana*, generada por la acción de péptidos homólogos obtenidos de las especies *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287, *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005.

**3.4. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS.**

Para los experimentos de determinación de rangos de pH y disponibilidad de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular en el medio, se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con tres tratamientos (T1; T2 y T3) para la prueba de pH y cinco tratamientos para la prueba de calcio (T0; T1; T2; T3 y T4). Cada especie

*Fusarium* fue sometida a estos tratamientos descritos anteriormente, y fueron realizados tres experimentos independientes con 30 repeticiones (1 repetición= 1 hifa). Los promedios de cada experimento (3 promedios/tratamiento). Para los experimentos de inhibición del crecimiento de raíces e hipocótilos, se empleó un diseño completamente al azar (D.C.A) con un mínimo de 30 repeticiones y cada experimento fue repetible tres veces de forma independiente. Todos los datos obtenidos en los experimentos, fueron tabulados en hojas de cálculo de Excel, siendo procesados y analizados mediante un análisis de varianza (ANVA), y un test de comparación de medias (Tukey,  $P < 0,01$ ), utilizando el paquete estadístico InfoStat (versión 2012e; Córdoba, Argentina).

### **3.5. ASPECTOS ÉTICOS.**

La investigación se desarrolló respetando los cuatro principios éticos básicos como son la autonomía, la beneficencia, la no maleficencia y la justicia, teniéndose en cuenta las normas que señalan del buen investigador, habiéndose usado instrumentos de mediciones adecuados; la transparencia y veracidad de los resultados, respeto al medio ambiente, a la propiedad intelectual, a la responsabilidad social y honestidad.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### 4.1. CRECIMIENTO MICELIAL EN FUNCIÓN AL pH.

#### 4.1.1. Cepa *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.

Realizando la prueba de normalidad (anexo 1) aplicando el estadístico Kolmogorov mediante los residuos de los datos obtenidos el p-valor significativo para Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) de *Fusarium Fujikuroi* sig. 0.72 es decir mayor de 0.05. por lo que se concluye una distribución normal (anexo 1 – grafica 1.1). Realizando la prueba de homogeneidad de varianzas señala igualdad es decir son mayores a 0.05. Los intervalos de confianza al 95% están entre un límite inferior de 110.18 y límite superior 118.35. con una varianza de 98.05.

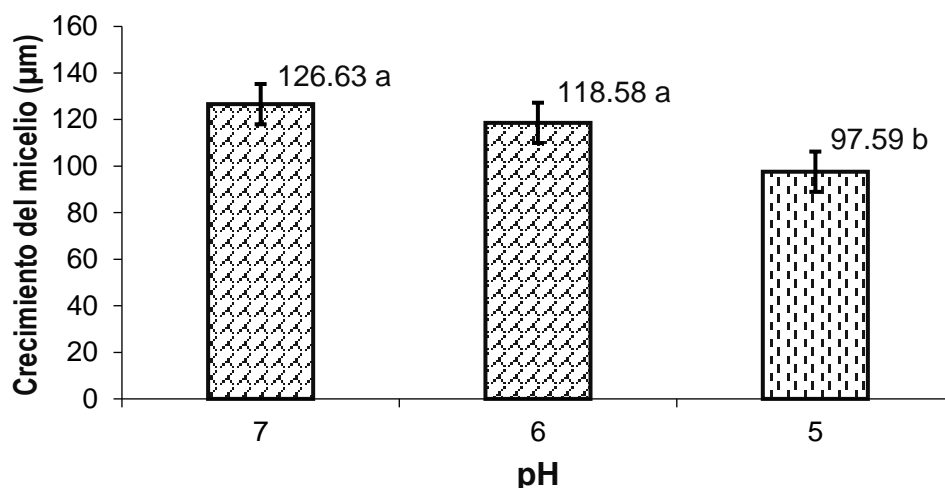
En la Tabla 5 y la Figura 17 se muestra el ANVA y la prueba de Tukey ( $p < 0,01$ ) para el crecimiento micelial ( $\mu\text{M}$ ) de *F. fujikuroi* en tres concentraciones de pH (5; 6 y 7), acondicionados en medio de cultivo PDA y evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente.

**Tabla 5.** Análisis de varianza del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. fujikuroi* en función a tres concentraciones de pH y al tiempo.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos pH	8989,25	2	4494,62	44,28	<0,0001**
Error	5785,19	57	101,49		
Total	14774,43	59			

\*\* = Altamente significativo

CV= 8.82%    R<sup>2</sup>= 59%



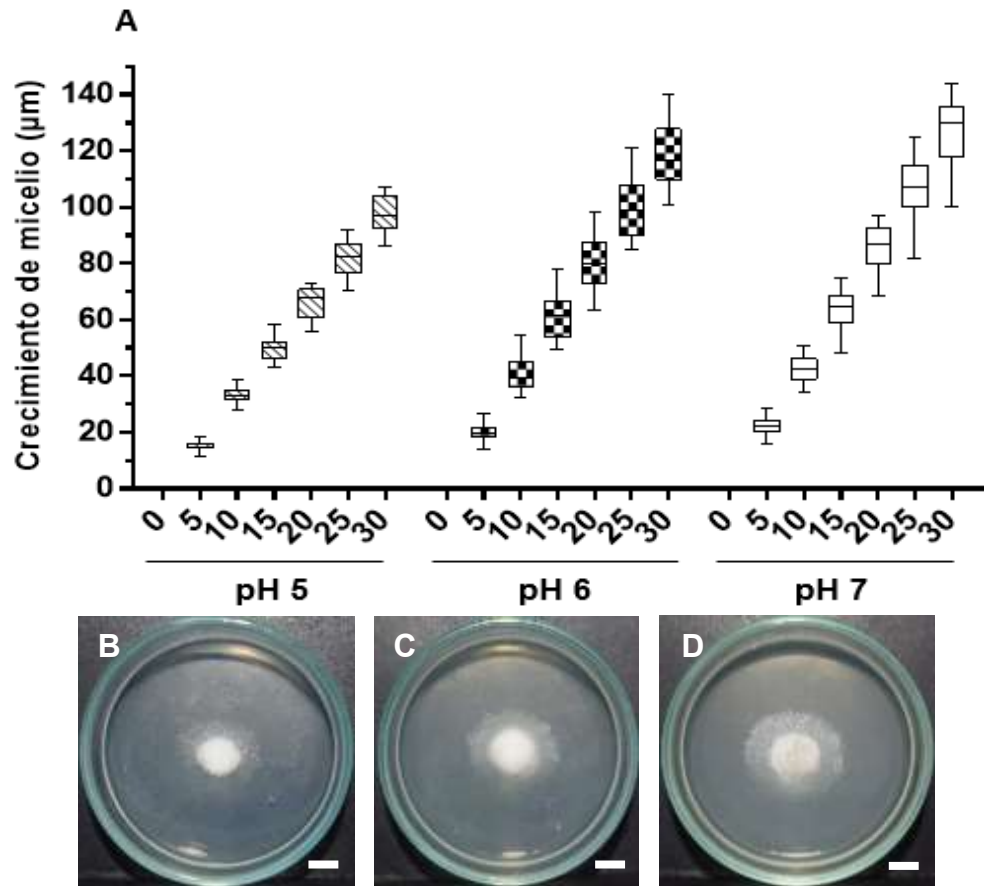
**Figura 17.** Prueba de Tukey ( $\alpha= 0,01$ ) en las medias del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *Fusarium fujikuroi* en tres concentraciones de pH.

El análisis de varianza (tabla 5) del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. fujikuroi* en tres concentraciones de pH (5; 6 y 7), evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente, indica que existen diferencias altamente significativas (\*\*), con un coeficiente de variabilidad de 8,82% y un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 99%, estando dentro del rango de dispersión aceptable, para trabajos de laboratorio, según Calzada, (1982). En cambio, el análisis de comparación de medias de Tukey ( $p<0,01$ ) (Figura 17) muestra diferencias estadísticas significativas entre sí, siendo estadísticamente iguales en los rangos 7 y 6, donde alcanza 126,63  $\mu\text{m}$  y 118,58  $\mu\text{m}$  de crecimiento respectivamente, en cambio, a un pH 5 alcanza el menor crecimiento 97,59  $\mu\text{m}$ .

La Figura 18, muestra el crecimiento micelial de *Fusarium fujikuroi* en tres concentraciones de pH; resultados cada cinco hasta treinta minutos, en donde se muestran, el valor mínimo, valor máximo, mediana y cuartiles, de 30 repeticiones evaluadas (1 hifa= 1 repetición). Después de 30 minutos, se reporta un crecimiento ascendente (lineal positivo), lo que indica que, con el pasar del tiempo *F. fujikuroi* aumenta su crecimiento, siendo mayor

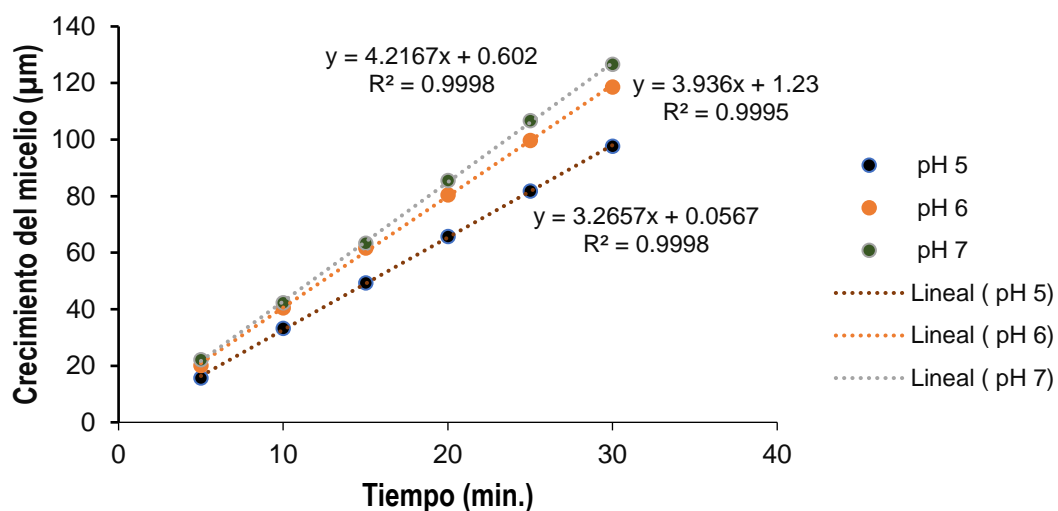


en el rango de pH 7(A). Además, es una característica visible que se dio en las placas de desarrollo, las cuales mostraron estructuras fúngicas más desarrolladas en la placa (D: pH 7), que en la placa (B: pH 5).



**Figura 18.** Sensibilidad al pH en *Fusarium fujikuroi*. **A)** Crecimiento micelial en tres concentraciones de pH, evaluado en intervalos de 5 minutos. **B)** pH 5. **C)** pH 6. **D)** pH 7. Barra blanca= 1 cm.

La Figura 19 muestra el análisis de correlación entre el crecimiento micelial en función de los intervalos de tiempo evaluados (cada cinco hasta treinta minutos), en tres concentraciones de pH, en donde se confirma la dependencia que tiene esta especie con la alcalinización de su medio circundante (pH 7) para un mejor desarrollo. Y podemos observar un comportamiento del crecimiento del micelio es lineal positivo



**Figura 19.** Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en tres concentraciones de pH en *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.

#### 4.1.2. Cepa *Fusarium graminearum* IMI 58289 CS3005.

Realizando la prueba de normalidad (anexo 1) aplicando el estadístico Kolmogorov mediante los residuos de datos obtenidos el p-valor significativo para Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) de *Fusarium graminearum* con sig. 0.97 es decir mayor de 0.05. por lo que se concluye una distribución normal (anexo 1 – grafica 1.2.). La prueba de homogeneidad de varianzas señala igualdad es decir son mayores a 0.05. Los intervalos de confianza al 95% están entre un límite inferior de 143.96 y límite superior 157.33. con una varianza de 120.23.

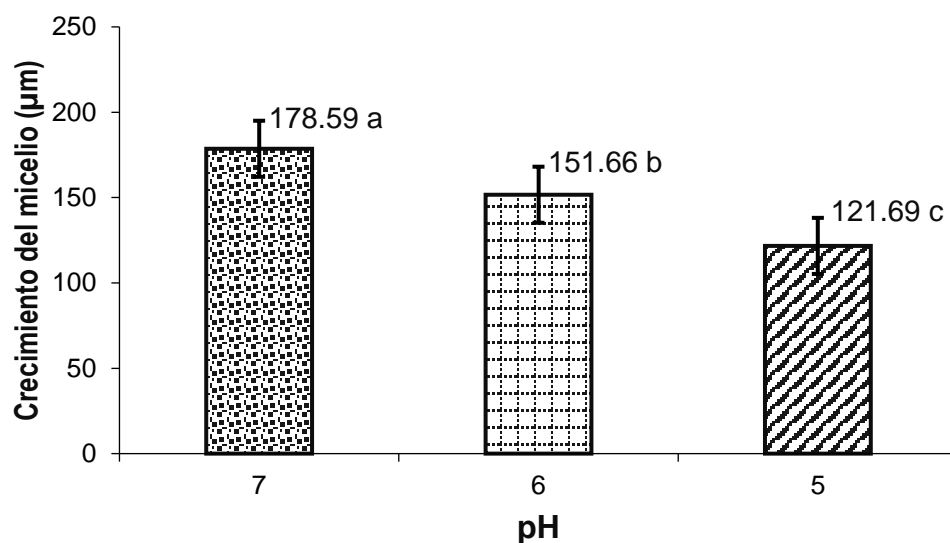
La Tabla 6 y la Figura 20 se muestra el ANVA y la prueba de Tukey ( $p < 0,01$ ) para el crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. graminearum* en tres concentraciones de pH (5; 6 y 7), acondicionados en medio de cultivo PDA y evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente.

**Tabla 6.** Análisis de varianza del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. graminearum* en función a tres concentraciones de pH y al tiempo.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos pH	32409,36	2	16204,68	130,21	<0,0001**
Error	7093,54	57	124,45		
Total	39502,90	59			

\*\* = Altamente significativo

CV = 7,41%  $R^2 = 82\%$

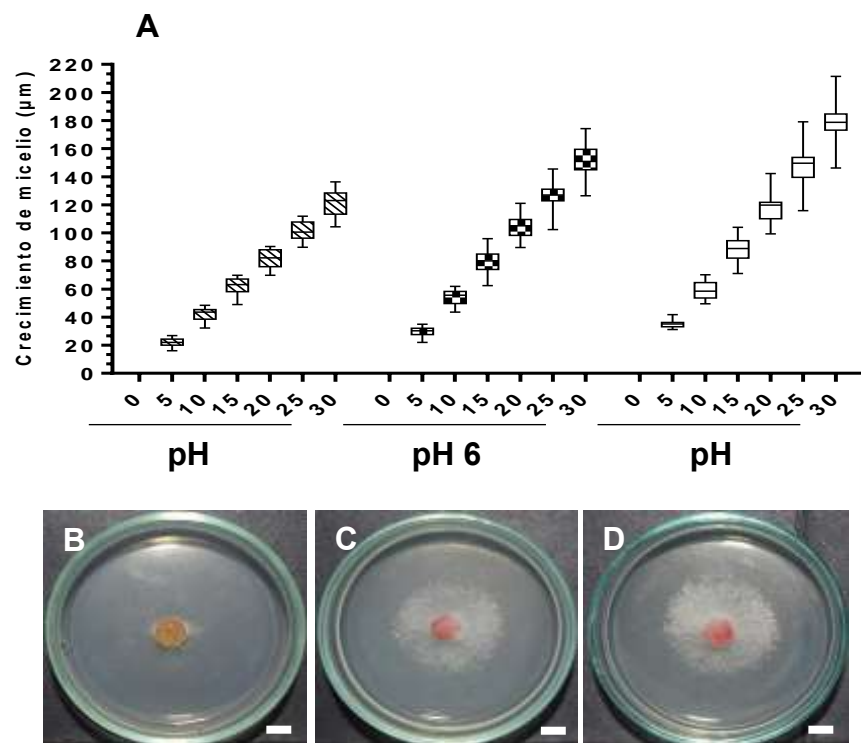


**Figura 20.** Prueba de Tukey ( $\alpha = 0,01$ ) en las medias del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *Fusarium graminearum* en tres concentraciones de pH.

El análisis de varianza (Tabla 6) del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. graminearum* en tres concentraciones de pH (5; 6 y 7), evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente, indica que existen diferencias altamente significativas (\*\*), con un coeficiente de variabilidad de 7,41% y un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 82%, estando dentro del rango de dispersión aceptable, para trabajos de laboratorio, según Calzada, (1982).

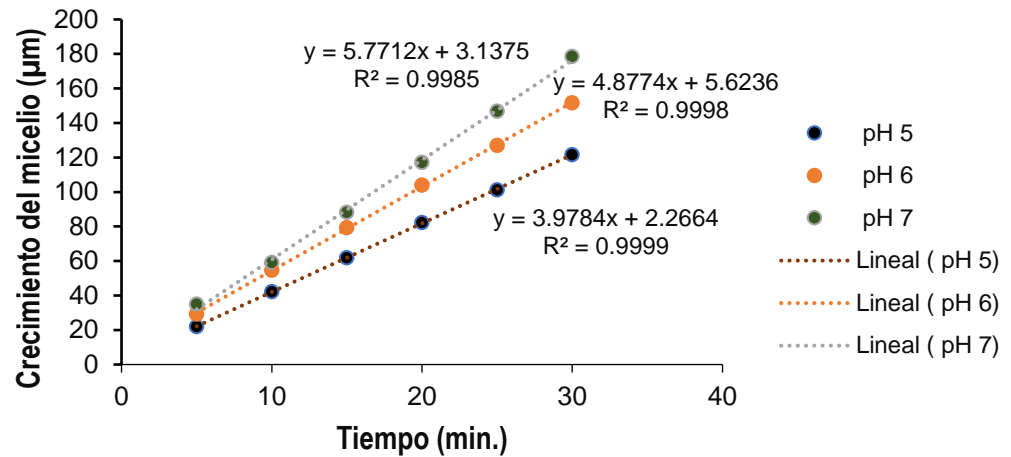
En cambio, el análisis de comparación de medias de Tukey ( $p < 0,01$ ) (Figura 20) muestra diferencias estadísticas significativas entre sí, siendo el rango 7 el mejor tratamiento con 178,59  $\mu\text{m}$ , seguido de los rangos 6 y 5, con 151,66 y 121,69  $\mu\text{m}$  de crecimiento respectivamente.

La Figura 21, muestra el crecimiento micelial de *Fusarium graminearum* en tres concentraciones de pH; resultados cada cinco hasta treinta minutos, en donde se muestran, el valor mínimo, valor máximo, mediana y cuartiles, de 30 repeticiones evaluadas (1 hifa= 1 repetición). Después de 30 minutos, se reporta un crecimiento ascendente (lineal positivo), lo que indica que, con el pasar del tiempo *F. graminearum* aumenta su crecimiento, siendo muy significativo en el rango 7 (A). Además, es una característica visible que se dio en las placas de desarrollo, las cuales mostraron estructuras fúngicas más desarrolladas en la placa (D: pH 7), que en la placa (B: pH 5).



**Figura 21.** Sensibilidad al pH en *Fusarium graminearum*. **A)** Crecimiento micelial en tres concentraciones de pH, evaluado en intervalos de 5 minutos. **B)** pH 5. **C)** pH 6. **D)** pH 7. Barra blanca= 1 cm.

La Figura 22 muestra el análisis de correlación entre el crecimiento micelial en función de los intervalos de tiempo evaluados (cada cinco hasta treinta minutos), en tres concentraciones de pH, en donde se confirma la dependencia que tiene esta especie con la alcalinización de su medio circundante (pH 7) para un mejor desarrollo.



**Figura 22.** Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en tres concentraciones de pH en *Fusarium graminearum* CSCS3005.

#### 4.1.3. Cepa *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935).

Realizando la prueba de normalidad (anexo 1) aplicando el estadístico Kolmogorov mediante los residuos de datos obteneos el p-valor significativo para Crecimiento (µm) de *Fusarium oxysporum* con sig. 0.97 es decir mayor de 0.05. por lo que se concluye una distribución normal (anexo 1 grafica 1.3). La prueba de homogeneidad de varianzas señala igualdad es decir son mayores a 0.05. Los intervalos de confianza al 95% están entre un límite inferior de 145.54 y límite superior 157.4 con una varianza de 160.81

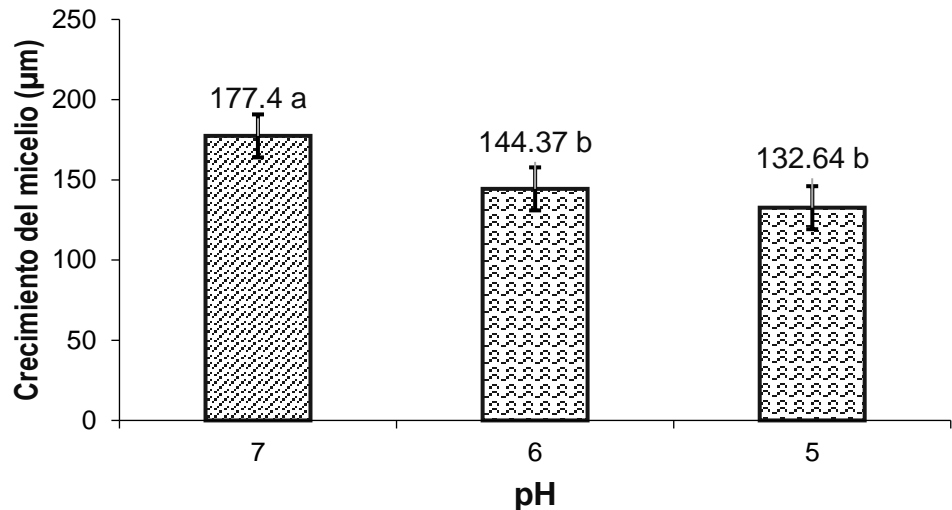
La Tabla 7 y la Figura 23 se muestra el ANVA y la prueba de Tukey ( $p < 0,01$ ) para el crecimiento micelial (µm) de *F. oxysporum* en tres concentraciones de pH (5; 6 y 7), acondicionados en medio de cultivo PDA y evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente.

**Tabla 7.** Análisis de varianza del crecimiento micelial (µm) de *F. oxysporum* en función a tres concentraciones de pH y al tiempo.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos pH	21553,95	2	10776,98	64,75	<0,0001**
Error	9487,78	57	166,45		
Total	31041,74	59			

\*\* = Altamente significativo

CV = 8,52%  $R^2 = 70\%$



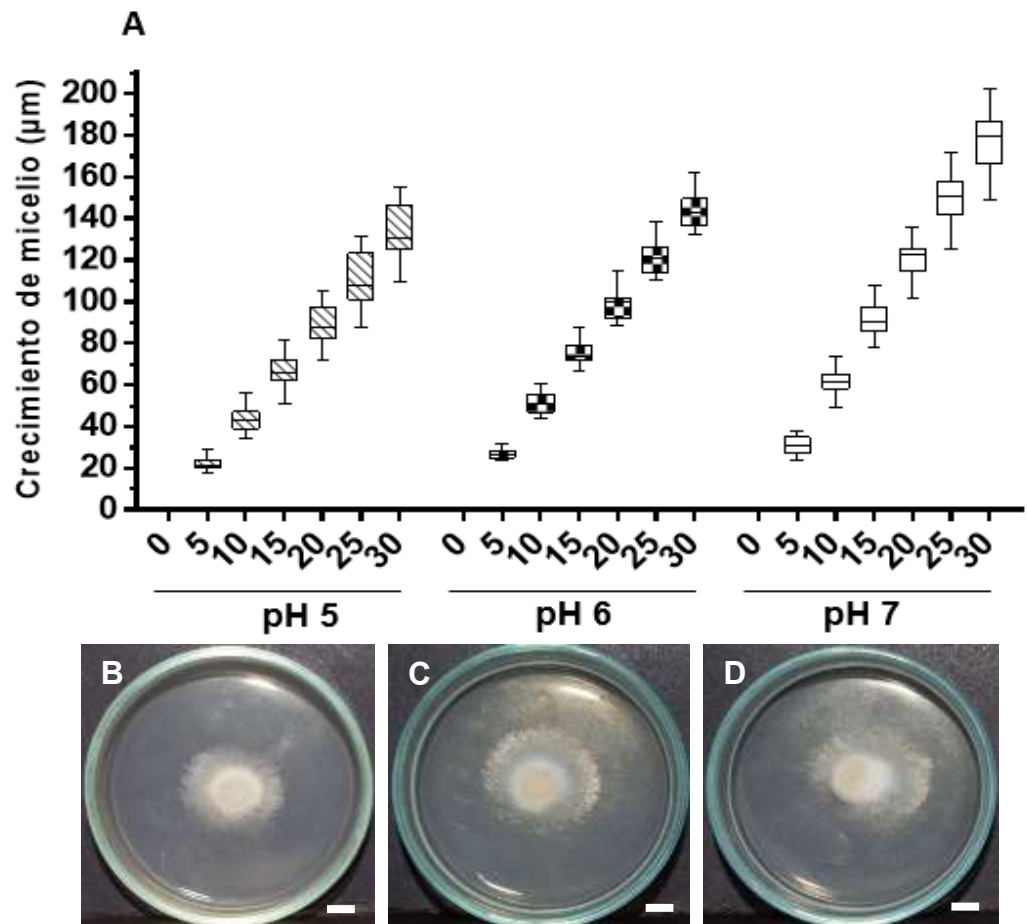
**Figura 23.** Prueba de Tukey ( $\alpha= 0,01$ ) en las medias del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *Fusarium oxysporum* en tres concentraciones de pH.

El análisis de varianza (Tabla 7) del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. oxysporum* en tres concentraciones de pH (5; 6 y 7), evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente, indica que existen diferencias altamente significativas (\*\*), con un coeficiente de variabilidad de 8,52% y un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 70%, estando dentro del rango de dispersión aceptable, para trabajos de laboratorio, según Calzada, (1982).

En cambio, el análisis de comparación de medias de Tukey ( $p < 0,01$ ) (Figura 23) muestra diferencias estadísticas significativas entre sí, siendo el rango 7 el mejor tratamiento con 177,4  $\mu\text{m}$ , seguido de los rangos 6 y 5, con 144,37 y 132,64  $\mu\text{m}$  de crecimiento respectivamente.

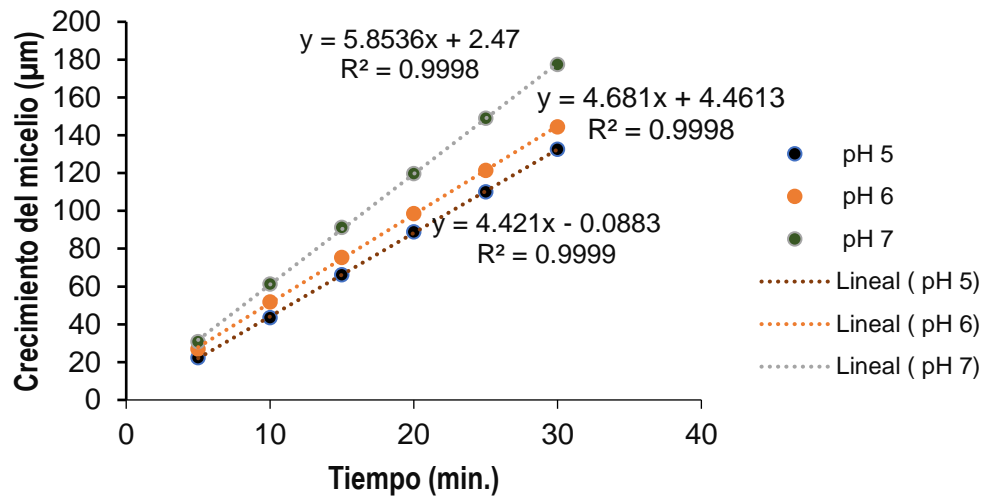
La Figura 24, muestra el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en tres concentraciones de pH; resultados (cada cinco hasta treinta minutos), en donde se muestran, el valor mínimo, valor máximo, mediana y cuartiles, de 30 repeticiones evaluadas (1 hifa= 1 repetición). Después de 30 minutos, se reporta un crecimiento ascendente (lineal positivo), lo que indica que, con el pasar del tiempo *F. oxysporum* aumenta su

crecimiento, siendo muy significativo en el rango 7 (A). Además, es una característica visible que se dio en las placas de desarrollo, las cuales mostraron estructuras fúngicas más desarrolladas en la placa (D: pH 7), que en la placa (B: pH 5).



**Figura 24.** Sensibilidad al pH en *Fusarium oxysporum*. **A)** Crecimiento micelial en tres concentraciones de pH, evaluado en intervalos de 5 minutos. **B)** pH 5. **C)** pH 6. **D)** pH 7. Barra blanca=1 cm.

La Figura 25 muestra el análisis de correlación entre el crecimiento micelial en función de los intervalos de tiempo evaluados (cada cinco hasta treinta minutos), en tres concentraciones de pH, en donde se confirma la dependencia que tiene esta especie con la alcalinización de su medio circundante (pH 7) para un mejor desarrollo.



**Figura 25.** Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en tres concentraciones de pH en *Fusarium oxysporum* (FGSC 9935).

Según los resultados obtenidos en la figura 23 se alcanzó un crecimiento de 177.40 µm en 30 minutos en pH7.

En el pH 7 para *Fusarium graminearum* el micelio alcanza un crecimiento de 178.59 µm en donde el crecimiento del micelio es mayor el cual supera a *Fusarium oxysporum* solo en 1.19 µm. En lo que corresponde a *Fusarium fujikuroi* el mayor desarrollo del micelio se obtiene a un pH 7 con 126.63 µm de crecimiento respectivamente el cual alcanzó el menor crecimiento comparado con los otros dos *fusarium*.

## 4.2. CRECIMIENTO MICELIAL (SENSIBILIDAD DE CALCIO).

### 4.2.1. Cepa *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.

Realizando la prueba de normalidad (anexo 2) aplicando el estadístico Kolmogórov-Smirnov para los datos obtenidos de las mediciones de crecimiento micelial de *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 resulta una sig. de 0.000 lo cual señala que no tiene distribución normal, es decir la sig es menor de 0.05. (anexo 2). Entonces se realizó pruebas no paramétricas, usamos la prueba de Kruscal Wallis. Los intervalos de confianza al 95%

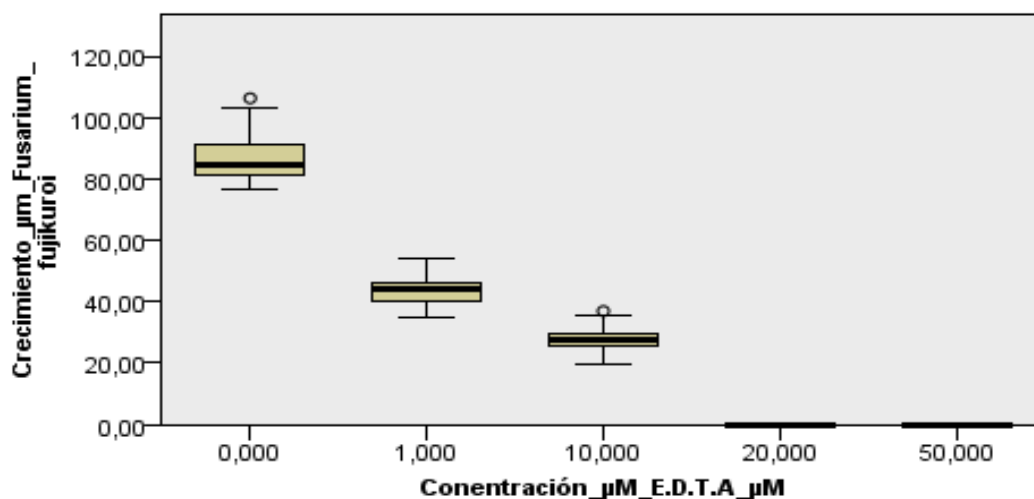


están entre un límite inferior de 25.16 y límite superior 38.18 con una varianza de 1076.4.

En la Tabla 8 y la Figura 26 se muestra la prueba de Kruskal Wallis para el crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. fujikuroi* en cuatro concentraciones de EDTA (1 $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) más un control sin adición de EDTA, acondicionados en medio de cultivo PDA y evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente.

**Tabla 8.** Análisis del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. fujikuroi* en función a cuatro concentraciones de EDTA y al tiempo prueba de Kruskal Wallis.

Hipótesis nula	prueba	Sig.	decisión
La distribución del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>F. fujikuroi</i> es la misma entre las categorías de concentración ( $\mu\text{M}$ ) de EDTA.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	0.000	Rechazo la hipótesis nula

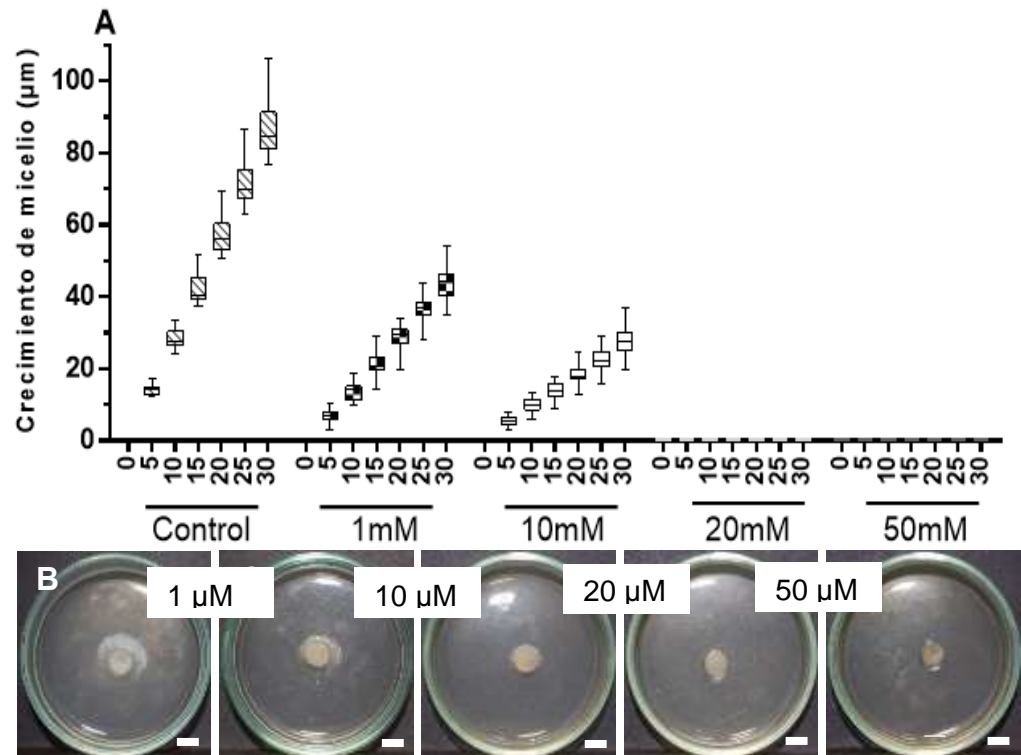


**Figura 26.** Prueba de Kruskal Wallis crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *Fusarium fujikuroi* en cuatro concentraciones de EDTA más un control sin EDTA.

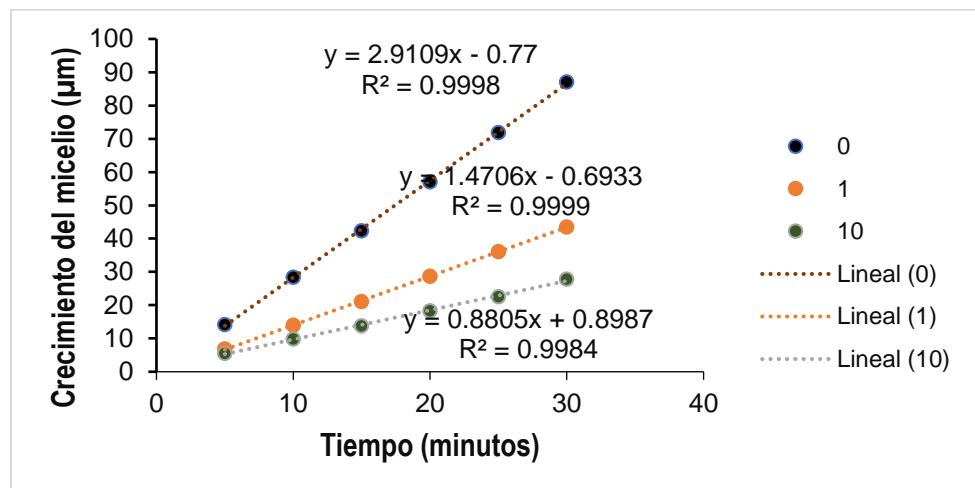
La prueba de Kruskal Wallis (Tabla 8) del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. fujikuroi* en cuatro concentraciones de EDTA (1 $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) más un control sin adición de EDTA (0), evaluados en intervalos de

5 hasta 30 minutos respectivamente, indica que existen una tendencia a aceptar la H1 que afirma que existe diferentes respuestas de crecimiento a distintas concentraciones.

La Figura 27, muestra el crecimiento micelial de *Fusarium fujikuroi* en cuatro concentraciones de EDTA; resultados cada cinco hasta treinta minutos, en donde se muestran, el valor mínimo, valor máximo, mediana y cuartiles, de 30 repeticiones evaluadas (1 hifa= 1 repetición). Después de 30 minutos, se reporta un crecimiento ascendente (lineal positivo), lo que indica que, con el pasar del tiempo *F. fujikuroi* aumenta su crecimiento, siendo significativo en el control sin EDTA (A), además, la cepa fue decreciendo su desarrolló hasta llegar a niveles nulos en presencia de 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$  de EDTA. Esto es una característica visible que se dio en las placas de desarrollo, las cuales mostraron estructuras fúngicas más desarrolladas en la placa (B), que en las placas (C, D, E y F).



**Figura 27.** Sensibilidad de calcio en *Fusarium fujikuroi*. **A)** Crecimiento micelial en cuatro concentraciones de EDTA, evaluado en intervalos de 5 minutos. **B)** Control sin EDTA. **C)** 1 µM. **D)** 10 µM. **E)** 20 µM y **F)** 50 µM. Barra blanca= 1 cm.



**Figura 28.** Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en cuatro concentraciones de EDTA en *Fusarium fujikuroi*.

La Figura 28 muestra el análisis de correlación entre el crecimiento micelial en función de los intervalos de tiempo evaluados (cada cinco hasta treinta minutos), en cuatro concentraciones de EDTA, en donde se

confirma la dependencia que tiene esta especie con la alcalinización de su medio circundante para un mejor desarrollo, ya que la acción de supresión del elemento Calcio (alcalino), que ejerció el EDTA hizo que esta cepa inhiba su desarrollo.

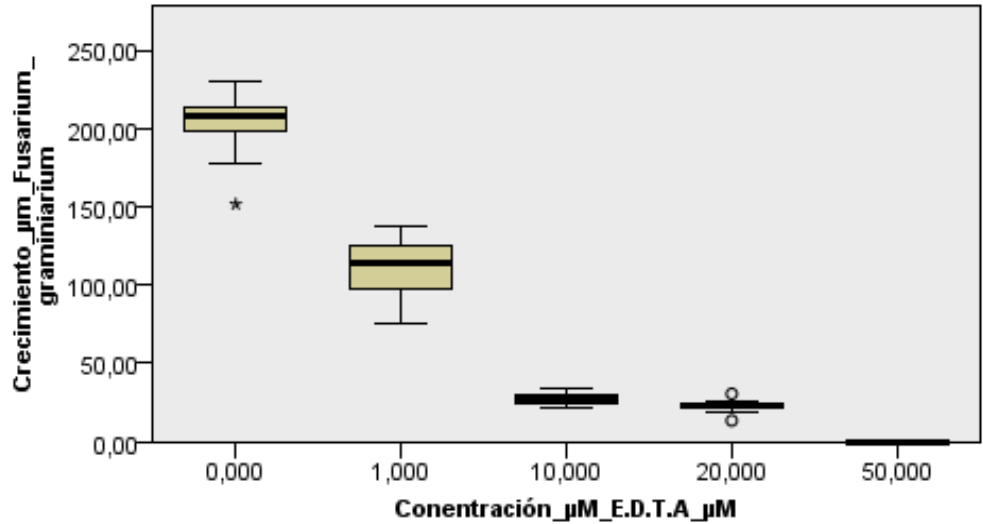
#### 4.2.2. Cepa *Fusarium graminearum* CS3005.

Realizando la prueba de normalidad (anexo 2) aplicando el estadístico Kolmogórov-Smirnov para los datos obtenidos de las mediciones de crecimiento micelial de *Fusarium graminearum* CS3005 resulta una sig. de 0.000 lo cual señala que no tiene distribución normal, es decir la sig es menor de 0.05. (anexo 2). Entonces se realizó pruebas no paramétricas, usamos la prueba de Kruscal Wallis. Los intervalos de confianza al 95% están entre un límite inferior de 57.74 y límite superior 88.24 con una varianza de 5905.28.

En la Tabla 9 y la Figura 29 se muestra el Kruscal Wallis para crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. graminearum* en cuatro concentraciones de EDTA (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) más un control sin adición de EDTA, acondicionados en medio de cultivo PDA y evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente.

**Tabla 9.** Análisis del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. graminearum* en función a cuatro concentraciones de EDTA prueba de Kruscal Wallis.

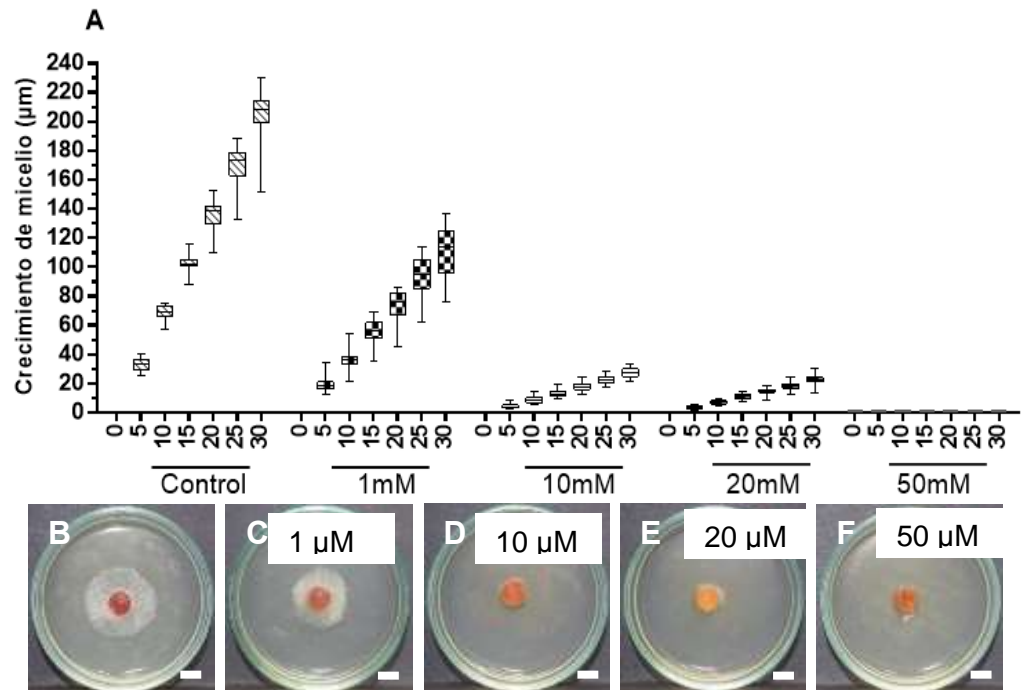
Hipótesis nula	prueba	Sig.	decisión
La distribución del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>F. graminearum</i> es la misma entre las categorías de concentración ( $\mu\text{M}$ ) de EDTA.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	0.000	Rechazo la hipótesis nula



**Figura 29.** Prueba de Kruskal Wallis. crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *Fusarium graminearum* en cuatro concentraciones de EDTA más un control sin EDTA.

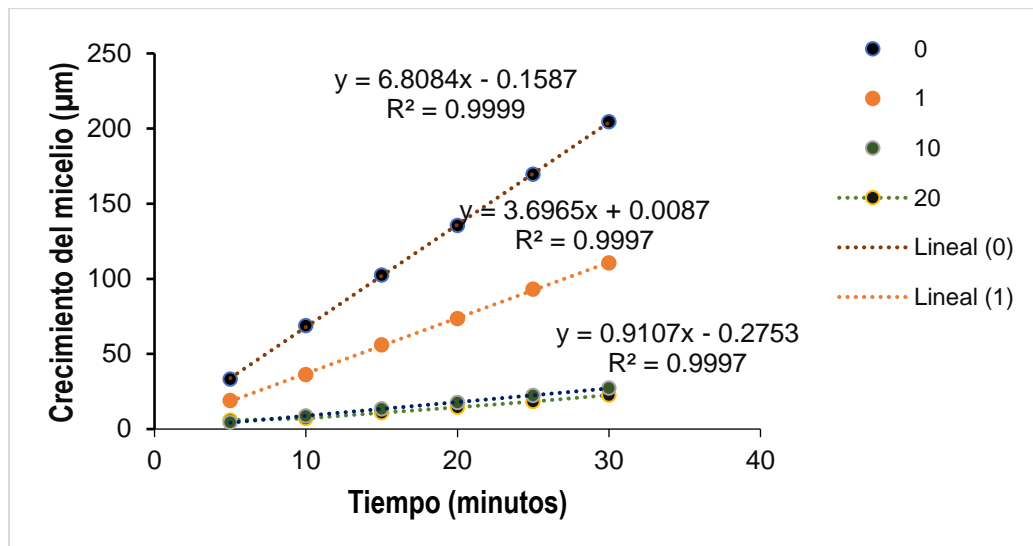
La prueba de Kruskal Wallis (Tabla 9) del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. graminearum* en cuatro concentraciones de EDTA (1  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) más un Control sin adición de EDTA (0), evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente, indica que existen diferencias altamente significativas sig. 0.000(\*\*). La H1 que afirma que existe diferentes respuestas de crecimiento a distintas concentraciones.

La Figura 30, muestra el crecimiento micelial de *Fusarium graminearum* en cuatro concentraciones de EDTA; resultados cada cinco hasta treinta minutos, en donde se muestran, el valor mínimo, valor máximo, mediana y cuartiles, de 30 repeticiones evaluadas (1 hifa= 1 repetición). Después de 30 minutos, se reporta un crecimiento ascendente (lineal positivo), lo que indica que, con el pasar del tiempo *F. graminearum* aumenta su crecimiento, siendo significativo en el control sin EDTA (A), además, la cepa fue decreciendo su desarrolló hasta llegar a niveles nulos en presencia de 50  $\mu\text{M}$  de EDTA. Esto es una característica visible que se dio en las placas de desarrollo, las cuales mostraron estructuras fúngicas más desarrolladas en la placa (B), que en las placas (C, D, E y F).



**Figura 30.** Sensibilidad de calcio en *Fusarium graminearum*. **A)** Crecimiento micelial en cuatro concentraciones de EDTA, evaluado en intervalos de 5 minutos. **B)** Control sin EDTA. **C)** 1  $\mu\text{M}$ . **D)** 10  $\mu\text{M}$ . **E)** 20  $\mu\text{M}$  y **F)** 50  $\mu\text{M}$ . Barra blanca= 1 cm.

La Figura 31 muestra el análisis de correlación entre el crecimiento micelial en función de los intervalos de tiempo evaluados (cada cinco hasta treinta minutos), en cuatro concentraciones de EDTA, en donde se confirma la dependencia que tiene esta especie con la alcalinización de su medio circundante para un mejor desarrollo, ya que la acción de supresión del elemento Calcio (alcalino), que ejerció el EDTA hizo que esta cepa inhiba su desarrollo.



**Figura 31.** Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en cuatro concentraciones de EDTA en *Fusarium graminearum*.

#### 4.2.3. Cepa *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 (FGSC 9935).

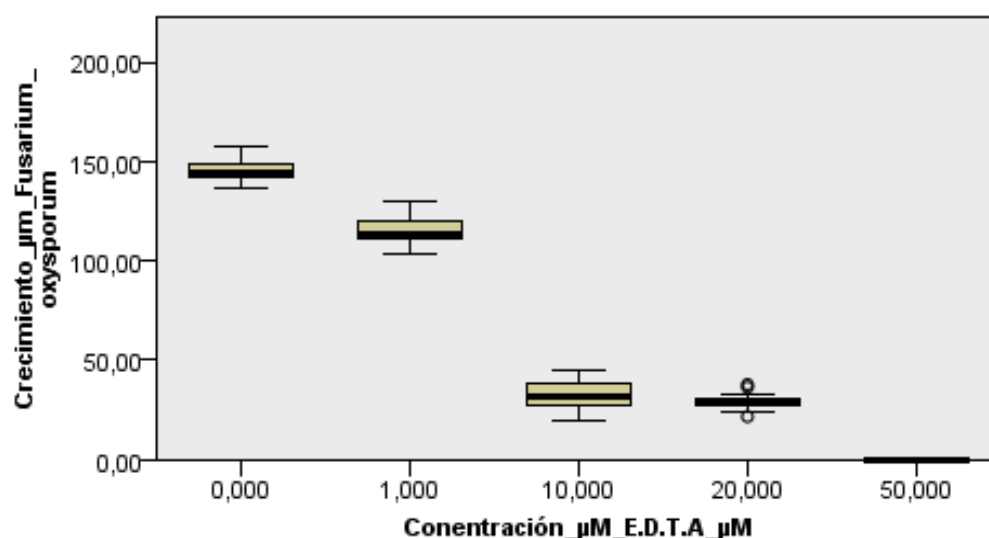
Realizando la prueba de normalidad (anexo 2) aplicando el estadístico Kolmogórov-Smirnov para los datos obtenidos de las mediciones de crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* resulta una sig. de 0.000 lo cual señala que no tiene distribución normal, es decir la sig es menor de 0.05. (anexo 2). Entonces se realizó pruebas no paramétricas, usamos la prueba de Kruscal Wallis. Los intervalos de confianza al 95% están entre un límite inferior de 53.13 y límite superior 75.46 con una varianza de 3165.8

En la Tabla 10 y la Figura 32 se muestra el análisis Kruscal Wallis del crecimiento micelial (µm) de *F. oxysporum* en cuatro concentraciones de EDTA (1 µM, 10 µM, 20 µM y 50 µM) más un control sin adición de EDTA, acondicionados en medio de cultivo PDA y evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente.

**Tabla 10.** Análisis del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. oxysporum* en función a cuatro concentraciones de EDTA y al tiempo prueba de Kruskal Wallis.

Hipótesis nula	prueba	Sig.	decisión
La distribución del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de <i>F. oxysporum</i> es la misma entre las categorías de concentración ( $\mu\text{M}$ ) de EDTA.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	0.000	Rechazo la hipótesis nula

\*\* = Altamente significativo



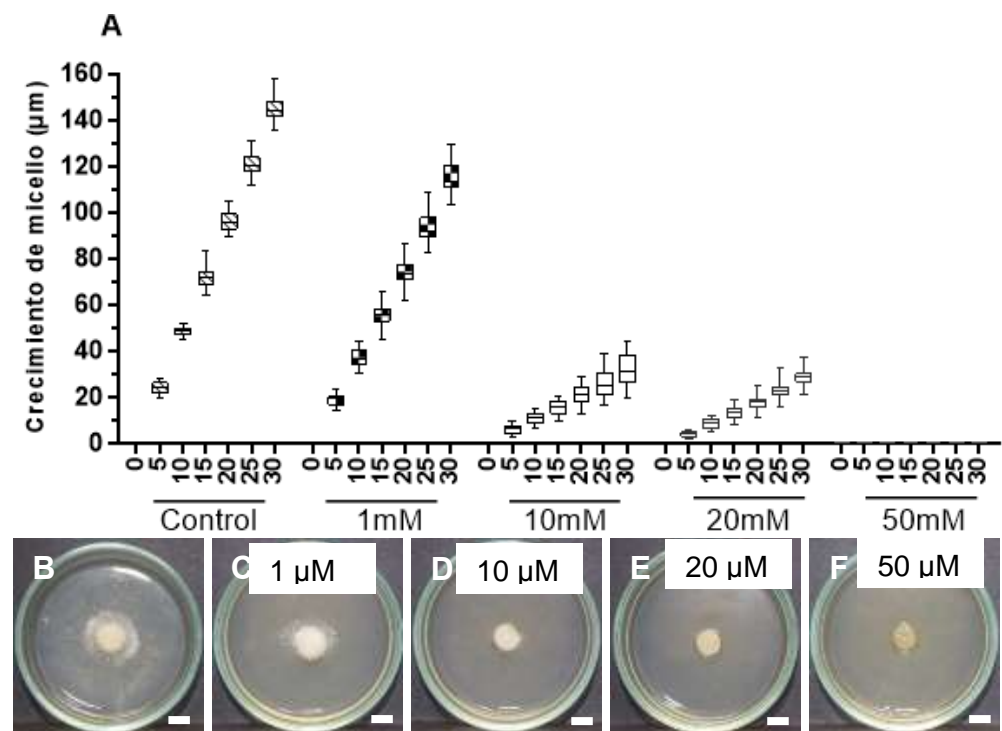
**Figura 32.** Prueba de Kruskal Wallis. crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *Fusarium oxysporum* en cuatro concentraciones de EDTA más un control sin EDTA.

La prueba de Kruskal Wallis (Tabla 10) del crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. oxysporum* en cuatro concentraciones de EDTA (1  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ) más un control sin adición de EDTA (0), evaluados en intervalos de 5 hasta 30 minutos respectivamente, indica que existen diferencias altamente significativas (\*\*), La H1 que afirma que existe diferentes respuestas de crecimiento a distintas concentraciones.

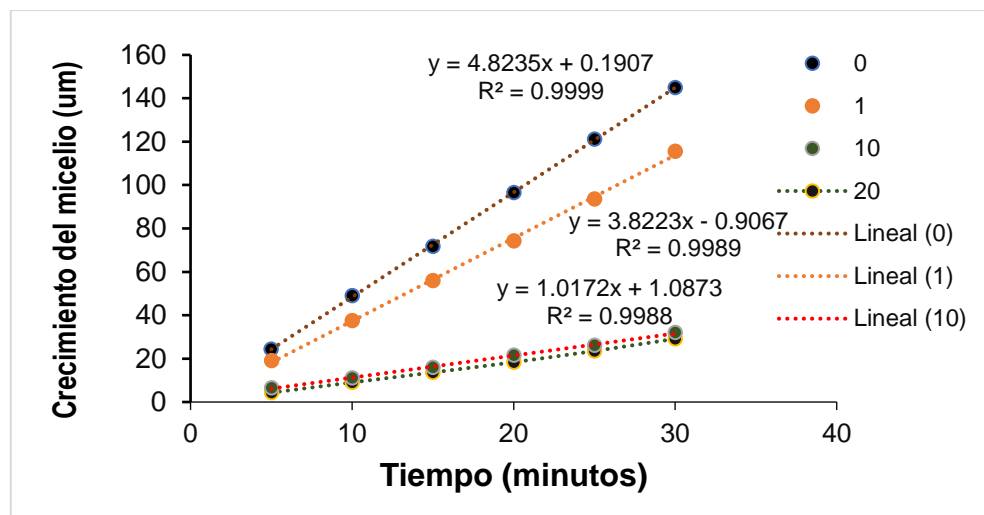
La Figura 33, muestra el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en cuatro concentraciones de EDTA; resultados cada cinco hasta treinta minutos, en donde se muestran, el valor mínimo, valor máximo, mediana y cuartiles, de 30 repeticiones evaluadas (1 hifa= 1 repetición). Después



de 30 minutos, se reporta un crecimiento ascendente (lineal positivo), lo que indica que, con el pasar del tiempo *F. oxysporum* aumenta su crecimiento, siendo significativo en el control sin EDTA (A), además, la cepa fue decreciendo su desarrolló hasta llegar a niveles nulos en presencia de 50 mM de EDTA. Esto es una característica visible que se dio en las placas de desarrollo, las cuales mostraron estructuras fúngicas más desarrolladas en la placa (B), que en las placas (C, D, E y F).



**Figura 33.** Sensibilidad de calcio en *Fusarium oxysporum*. **A)** Crecimiento micelial en cuatro concentraciones de EDTA, evaluado en intervalos de 5 minutos. **B)** Control sin EDTA. **C)** 1 μM. **D)** 10 μM. **E)** 20 μM y **F)** 50 μM. Barra blanca= 1 cm.



**Figura 34.** Prueba de correlación entre el crecimiento micelial en función del tiempo en cuatro concentraciones de EDTA en *Fusarium oxysporum*.

El crecimiento micelial ( $\mu\text{m}$ ) de *F. fujikuroi*, *F. graminearum* y *F. oxysporum* en tres concentraciones de EDTA ( $1 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $20 \mu\text{M}$  y  $50 \mu\text{M}$ ), en la cual se comprueba que en las placas control sin EDTA, *F. graminearum* creció mejor que las demás cepas evaluadas, seguido de *F. oxysporum*; en cambio, *F. fujikuroi* tuvo un crecimiento menor en todas las concentraciones, pero en la concentración  $50 \mu\text{M}$  no creció ninguna cepa. Además, se muestra el valor mínimo, valor máximo, mediana y cuartiles, de 30 repeticiones evaluadas (1 hifa= 1 repetición) en las tres cepas.

#### 4.3. INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE RAÍCES DE *Arabidopsis thaliana*.

##### 4.3.1. Cepa *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.

Realizando la prueba de normalidad (anexo 3) aplicando el estadístico Kolmogórov-Smirnov para los datos obtenidos de las mediciones de crecimiento (cm) de raíces de *Arabidopsis thaliana* en contacto con *Fusarium Fujikuroi* resulta una sig. de 0.002 lo cual señala que no tiene distribución normal, la sig. es menor de 0.05. (anexo 3). Entonces se realizó pruebas no paramétricas, usamos la prueba de Kruskal Wallis. Los intervalos de confianza al 95% están entre un límite

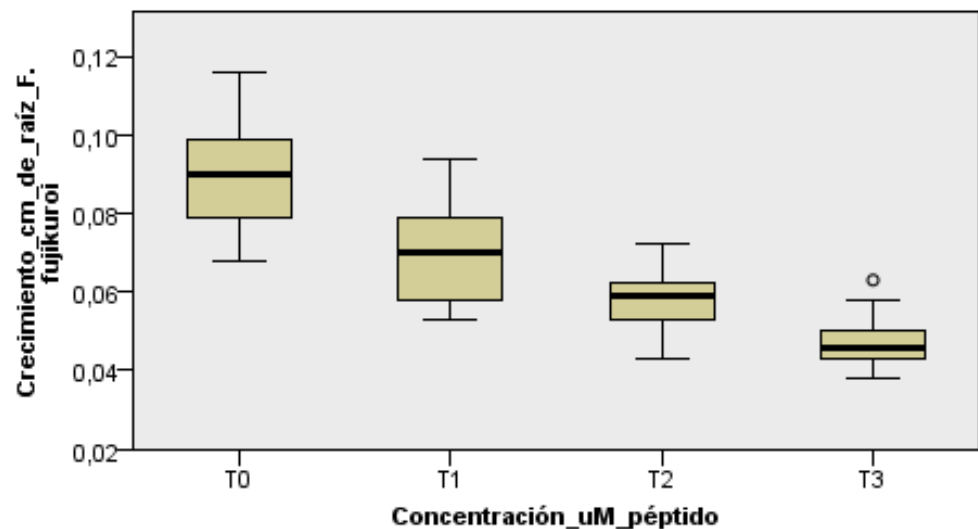
inferior de 0.0615 y límite superior 0.0698 con una desviación estándar de 0.02.

La Tabla 11 y la Figura 35 se muestra la prueba de Kruskal Wallis en función de las medianas para el crecimiento de raíces (cm) de *Arabidopsis thaliana* en exposición con el péptido F-RALF aislado de *F. fujikuroi* en tres concentraciones (1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M y 5  $\mu$ M) por 48 horas, posteriormente fueron evaluados en el programa imageJ respectivamente durante 30 min.

**Tabla 11.** Análisis de crecimiento de raíces (cm) de *A. thaliana* en contacto con el péptido F-RALF de *F. fujikuroi*, prueba de Kruskal Wallis.

Hipótesis nula	prueba	Sig.	decisión
La distribución del crecimiento de raíces (cm) de <i>A. thaliana</i> en contacto con el péptido F-RALF de <i>F. fujikuroi</i> , es la misma entre las categorías de concentración del péptido	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	0.002	Rechazo la hipótesis nula

\*\* = Altamente significativo



**Figura 35.** Prueba de Kruskal Wallis. crecimiento de raíces de *A. thaliana* (cm) en exposición con el péptido de *F. fujikuroi*, en tres concentraciones.

La prueba de Kruskal Wallis (Tabla 11) del crecimiento de raíces de *A. thaliana* (cm) en exposición con el péptido de *F. fujikuroi*, en tres concentraciones (1  $\mu$ M; 2  $\mu$ M y 5  $\mu$ M), evaluados en la figura 35, indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas (\*\*), La H1 que afirma que existe diferentes respuestas de crecimiento a distintas concentraciones.

La (Figura 35) muestra diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, siendo el control (0) sin péptido, el mejor tratamiento con 0,089 cm de crecimiento radicular, seguido de las concentraciones 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M y 5  $\mu$ M de péptido, con 0,069; 0,058 y 0,047 cm de crecimiento radicular respectivamente. Esto indica que, a medida que se subía la concentración del péptido, se inhibía el crecimiento radicular de plántulas de *A. thaliana*, en condiciones de laboratorio.

El crecimiento radicular de plántulas de *A. thaliana*, en exposición con el péptido F-RALF de *F. fujikuroi* en tres concentraciones, muestra resultados después de 30 min de tiempo de evaluación, en donde se aprecia, el valor mínimo, valor máximo de 30 repeticiones evaluadas (1 hifa= 1 repetición). Después de este tiempo, se reporta un crecimiento descendente a la concentración de péptido inoculada (mayor concentración menor crecimiento, correlación inversa positiva), siendo significativo el control sin péptido.

#### **4.3.2. Cepa *Fusarium graminearum* CS3005.**

Realizando la prueba de normalidad (anexo 3) aplicando el estadístico Kolmogórov-Smirnov para los datos obtenidos de las mediciones de crecimiento (cm) de raíces de *Arabidopsis thaliana* en contacto con *Fusarium graminearum* CS3005 resulta una sig. de 0.003 lo cual señala que no tiene distribución normal, la sig. es menor de 0.05. (anexo 3). Entonces se realizó pruebas no paramétricas, usamos la prueba de Kruskal Wallis. Los

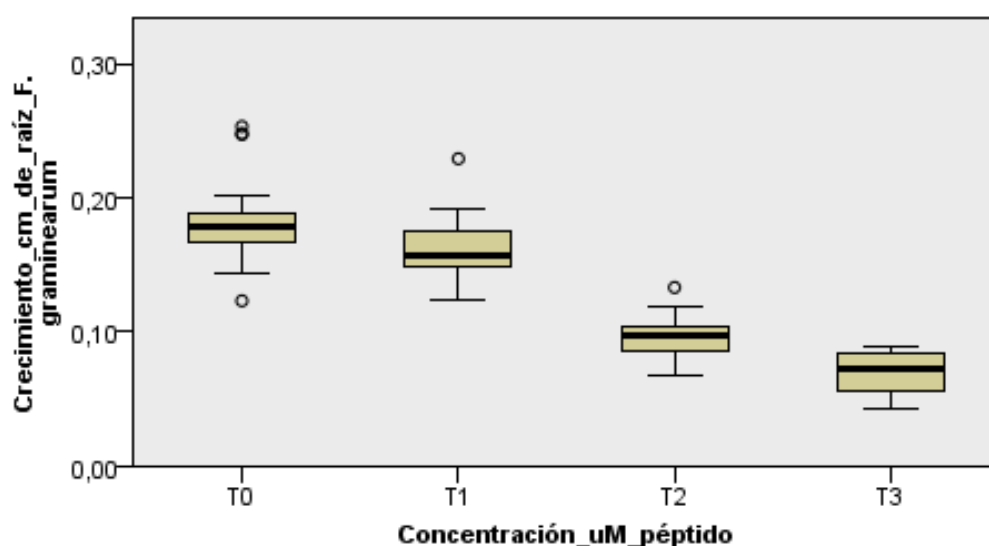
intervalos de confianza al 95% están entre un límite inferior de 0.116 y límite superior 0.139 con una desviación estándar de 0.05.

La Tabla 12 y la Figura 36 muestra la prueba de Kruskal Wallis en función de las medianas para el crecimiento de raíces (cm) de *Arabidopsis thaliana* en exposición con el péptido F-RALF aislado de *F. graminearum* en tres concentraciones (1µM, 2 µM y 5 µM), por 48 horas, posteriormente fueron evaluados en el programa imageJ respectivamente durante 30 min.

**Tabla 12.** Análisis del crecimiento de raíces (cm) de *A. thaliana* en contacto con el péptido F-RALF de *F. graminearum*, prueba de Kruskal Wallis.

Hipótesis nula	prueba	Sig.	decisión
La distribución del crecimiento de raíces (cm) de <i>A. thaliana</i> en contacto con el péptido F-RALF de <i>F. graminearum</i> , es la misma entre las categorías de concentración del péptido	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	0.003	Rechazo la hipótesis nula

\*\* = Altamente significativo



**Figura 36.** Prueba de Kruskal Wallis. del crecimiento de raíces de *A. thaliana* (cm) en exposición con el péptido de *F. graminearum*, en tres concentraciones.

La prueba de Kruscal Wallis (Tabla 12) indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas (\*\*), La H1 que afirma que existe diferentes respuestas de crecimiento a distintas concentraciones.

La (Figura 36) muestra diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, siendo el control (0) sin péptido, donde se alcanza un mayor crecimiento con 0,18 cm de crecimiento radicular, seguido de las concentraciones 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M y 5  $\mu$ M de péptido, con 0,16; 0,1 y 0,07 cm de crecimiento radicular respectivamente. Esto indica que, a medida que se subía la concentración del péptido, se inhibía el crecimiento radicular de plántulas de *A. thaliana*, en condiciones de laboratorio.

#### **4.3.3. Cepa *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935).**

Realizando la prueba de normalidad (anexo 3) aplicando el estadístico Kolmogórov-Smirnov para los datos obtenidos de las mediciones de crecimiento (cm) de raíces de *Arabidopsis thaliana* en contacto con *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 resulta una sig. de 0.184 lo cual señala que tiene distribución normal, la sig. es mayor de 0.05. (anexo 3- grafica 3.1.). Muestra Homogeneidad de varianzas sig. 0.017. Entonces se realizó pruebas paramétricas, usamos la prueba T3 Dunnett señala que todas concentraciones tienen efecto inhibitor.

La Tabla 13 de la prueba T3 Dunnett ( $p < 0,05$ ) para el crecimiento de raíces (cm) de *Arabidopsis thaliana* en exposición con el péptido F-RALF aislado de *F. oxysporum* en tres concentraciones (1mM, 2mM y 5mM) por 48 horas, posteriormente fueron evaluados en el programa imageJ respectivamente durante 30 min.

**Tabla 13.** Prueba T3 Dunnett del crecimiento de raíces (cm) de *A. thaliana* en contacto con el péptido F-RALF de *F. oxysporum*, en tres concentraciones.

Concentración (µm) de péptido	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
			Límite inferior	Límite superior	
T0	1	.014483	.003	.01520	.09580
	2	.013275	.000	.07587	.15063
	5	.013184	.000	.10297	.17733
T1	0	.014483	.003	-.09580	-.01520
	2	.010303	.000	.02909	.08641
	5	.010187	.000	.05629	.11301
T2	0	.013275	.000	-.15063	-.07587
	1	.010303	.000	-.08641	-.02909
	5	.008380	.016	.00371	.05009
T3	0	.013184	.000	-.17733	-.10297
	1	.010187	.000	-.11301	-.05629
	2	.008380	.016	-.05009	-.00371

\*\* = Altamente significativo

El análisis T3 Dunnett (Tabla 13) indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas (\*\*) para todas las concentraciones del repetido.

#### 4.4. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE HIPOCÓTILO DE *Arabidopsis thaliana*.

##### 4.4.1. Cepa *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.

Realizando la prueba de normalidad (anexo 4) aplicando el estadístico Kolmogórov-Smirnov para los datos obtenidos de las mediciones del crecimiento de hipocótilo (cm) de *A. thaliana* en contacto con *Fusarium Fujikuroi* resulta una sig. de 0.2 lo cual señala que tiene distribución normal (anexo 4- grafica 4.1), la sig. es mayor de 0.05. (anexo 4). Entonces se realizó pruebas paramétricas, usamos la prueba de homogeneidad de varianzas la cual muestra una sig. 0.153. la cual confirma la realización de la prueba de Tukey ( $p < 0,01$ ). Los intervalos de confianza al 95% están entre un límite inferior de 0.69 y límite superior 0.80 con una desviación estándar de 0.23.

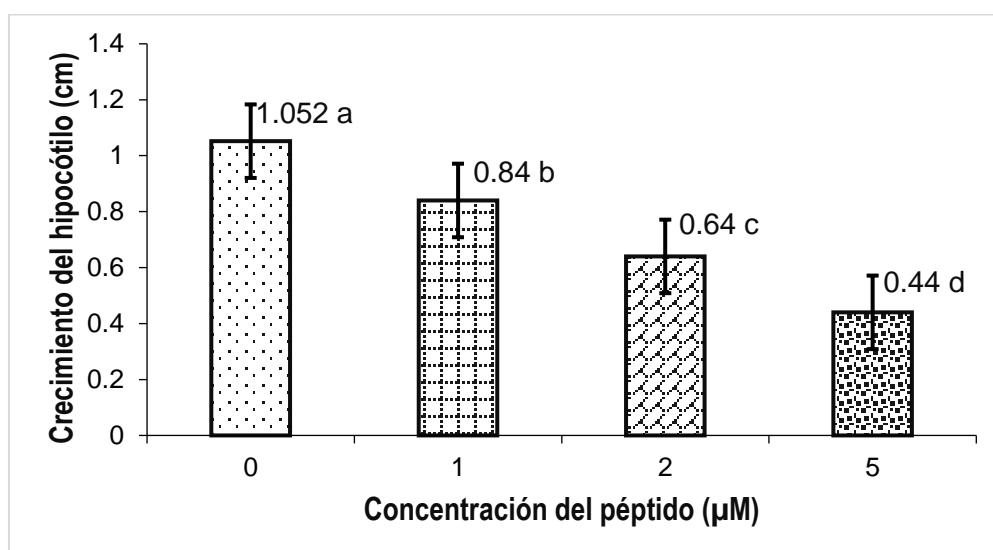
La Tabla 14 y la Figura 37 se muestra el ANVA y la prueba de Tukey ( $p < 0,01$ ) para el crecimiento de hipocótilo (cm) de *Arabidopsis thaliana* en exposición con el péptido F-RALF aislado de *F. fujikuroi* en tres concentraciones (1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M y 5 $\mu$ M) por 72 horas, posteriormente fueron evaluados en el programa imageJ durante 30 min.

**Tabla 14.** Análisis de varianza del crecimiento de hipocótilo (cm) de *A. thaliana* en contacto con el péptido F-RALF de *F. fujikuroi*, en tres concentraciones.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	4,04	3	1,347	354,89	<0,0001
Error	0,288	76	0,004		
Total	4,32	79			

\*\* = Altamente significativo

CV = 8,22 %  $R^2 = 93\%$



**Figura 37.** Prueba de Tukey ( $\alpha = 0,01$ ) en las medias del crecimiento de hipocótilo de *A. thaliana* (cm) en exposición con el péptido de *F. fujikuroi*, en tres concentraciones.

El análisis de varianza (Tabla 14) del crecimiento de hipocótilo de *A. thaliana* (cm) en exposición con el péptido de *F. fujikuroi*, en tres concentraciones (1 $\mu$ M; 2  $\mu$ M y 5  $\mu$ M), evaluados durante 30 min respectivamente, indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas (\*\*), con un coeficiente de variabilidad de 8,22% y un



coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 93%, estando dentro del rango de dispersión aceptable, para trabajos de laboratorio, según Calzada, (1982).

En cambio, el análisis de comparación de medias de Tukey ( $p < 0,01$ ) (Figura 37) muestra diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, siendo el control (0) sin péptido, el mejor tratamiento con 1,052 cm de crecimiento radicular, seguido de las concentraciones 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  de péptido, con 0,84; 0,64 y 0,44 cm de crecimiento radicular respectivamente.

#### **4.4.2. Cepa *Fusarium graminearum* CS3005.**

Realizando la prueba de normalidad (anexo 4) aplicando el estadístico Kolmogórov-Smirnov para los datos obtenidos de las mediciones del crecimiento de hipocótilo (cm) de *A. thaliana* en contacto con *Fusarium graminearum* CS3005 resulta una sig. de 0.2 lo cual señala que tiene distribución normal (anexo 4- grafica 4.2). Entonces se realizó pruebas paramétricas, usamos la prueba de homogeneidad de varianzas la cual muestra una sig. 0.153. la cual confirma la realización de la prueba de Tukey ( $p < 0,01$ ). Los intervalos de confianza al 95% están entre un límite inferior de 0.67 y límite superior 0.78 con una desviación estándar de 0.26.

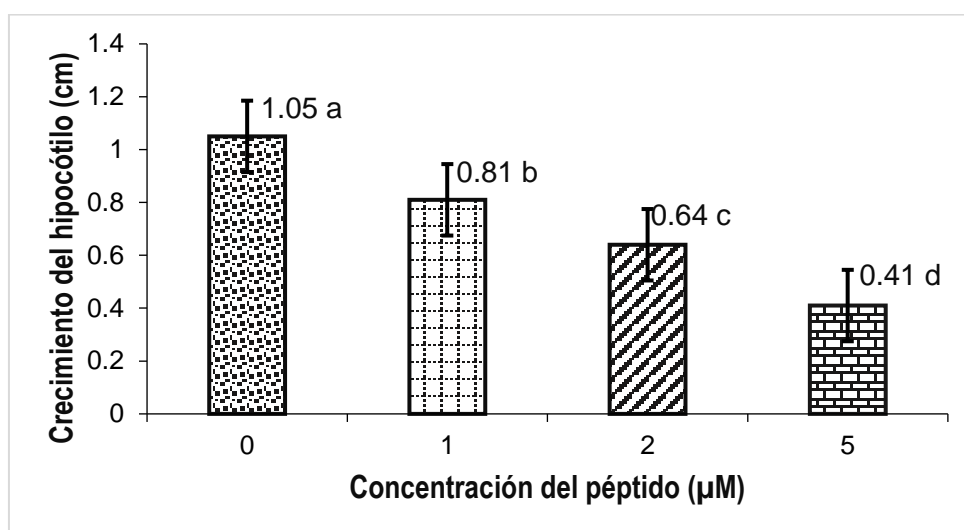
La Tabla 15 y la Figura 38 se muestra el ANVA y la prueba de Tukey ( $p < 0,01$ ) para el crecimiento de hipocótilo (cm) de *Arabidopsis thaliana* en exposición con el péptido F-RALF aislado de *F. graminearum* en tres concentraciones (1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ) durante 72 horas acondicionados en agua Mili-Q y evaluados durante 30 minutos en el software Image J.

**Tabla 15.** Análisis de varianza del crecimiento de hipocótilo (cm) de *A. thaliana* en contacto con el péptido F-RALF de *F. graminearum*, en tres concentraciones.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor
Tratamientos	4,33	3	1,44	94,96	<0,0001**
Error	1,15	76	0,02		
Total	5,48	79			

\*\* = Altamente significativo

CV = 6.9 % R<sup>2</sup> = 89%



**Figura 38.** Prueba de Tukey ( $\alpha = 0,01$ ) en las medias del crecimiento de hipocótilo de *A. thaliana* (cm) en exposición con el péptido de *F. graminearum*, en tres concentraciones.

El análisis de varianza (Tabla 15), indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas (\*\*), con un coeficiente de variabilidad de 6,9% y un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) de 89%, estando dentro del rango de dispersión aceptable, para trabajos de laboratorio, según Calzada, (1982).

En cambio, el análisis de comparación de medias de Tukey ( $p < 0,01$ ) (Figura 38) muestra diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, siendo el control (0) sin péptido, el mejor con 1,05 cm de crecimiento radicular, seguido de las concentraciones 1 µM, 2 µM y 5 µM de péptido, con 0,81; 0,64 y 0,41 cm de crecimiento radicular respectivamente.

#### 4.4.3. Cepa *Fusarium oxysporum f. sp lycopersici* 4287 (FGSC 9935).

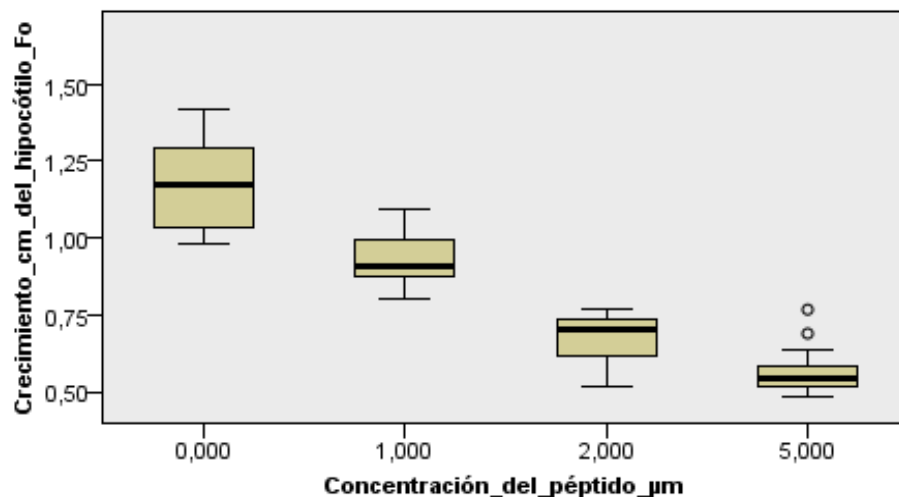
Realizando la prueba de normalidad (anexo 4) aplicando el estadístico Kolmogórov-Smirnov para los datos obtenidos de las mediciones de crecimiento de hipocótilo (cm) de *A. thaliana* en contacto con el péptido F-RALF de *F. oxysporum* resulta una sig. de 0.019 lo cual señala que no tiene distribución normal, la sig. es menor de 0.05. (anexo 4). Entonces se realizó pruebas no paramétricas, usamos la prueba de Kruskal Wallis. Los intervalos de confianza al 95% están entre un límite inferior de 0.779 y límite superior 0.893 con una desviación estándar de 0.26.

La Tabla 16 y la Figura 39 muestra la prueba de Kruskal Wallis para el crecimiento de hipocótilo (cm) de *Arabidopsis thaliana* en exposición con el péptido F-RALF aislado de *F. oxysporum* en tres concentraciones (1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M y 5  $\mu$ M), durante 72 horas acondicionados en agua Mili-Q y evaluados durante 30 minutos en el software Image J.

**Tabla 16.** Prueba de Kruskal Wallis del crecimiento de hipocótilo (cm) de *A. thaliana* en contacto con el péptido F-RALF de *F. oxysporum*, en tres concentraciones

Hipótesis nula	prueba	Sig.	decisión
La distribución del crecimiento de hipocótilo (cm) de <i>A. thaliana</i> en contacto con el péptido F-RALF de <i>F. oxysporum</i> , es la misma entre las categorías de concentración del péptido	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	0.019	Rechazo la hipótesis nula

\*\* = Altamente significativo



**Figura 39.** Prueba de Kruskal Wallis del crecimiento de hipocótilo de *A. thaliana* (cm) en exposición con el péptido de *F. oxysporum*, en tres concentraciones.

La prueba de Kruskal Wallis (Tabla 16) del crecimiento de hipocótilo de *A. thaliana* (cm) en exposición con el péptido de *F. oxysporum*, en tres concentraciones (1 μM; 2 μM y 5 μM), evaluados durante 30 min, indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas (\*\*). La H1 que afirma que existe diferentes respuestas de crecimiento a distintas concentraciones.

La (Figura 39) muestra diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados, siendo el control (0) sin péptido, el mejor tratamiento con 1,18 cm de crecimiento radicular, seguido de las concentraciones 1 μM, 2 μM y 5 μM de péptido, con 0,93; 0,68 y 0,57 cm de crecimiento radicular respectivamente. Esto indica que, a medida que se subía la concentración del péptido, se inhibía el crecimiento del hipocótilo de plántulas de *A. thaliana*, en condiciones de laboratorio.

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

### 5.1. PRUEBAS DE pH.

#### 5.1.1. Ceba *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.

Según los resultados obtenidos, *F. fujikuroi*, depende del medio alcalino para un mejor desarrollo. Lo que se corrobora con investigaciones realizadas por (López & López, 2004) en donde, encontraron que a través del estudio de pH en dos niveles comprobaron que los valores óptimos de crecimiento se encontraron entre los valores 5,5 - 6,5. Además, de que la mejor expresión de caracteres morfológicos útiles para el diagnóstico de especies *Fusarium*, se logró en el medio de cultivo de hojas de clavel-agar.

El crecimiento de todos los hongos estudiados se reduce significativamente con luz continua en comparación con el que crece en el período oscuro Mohsen et al., (2016).

#### 5.1.2. Ceba *Fusarium graminearum* IMI 58289 CS3005.

Según (López & López , 2004) menciona a (Bilai, 1955) el cual señala que los parámetros óptimos de cultivo para las especies del género *Fusarium* la autora acota que, la mayoría de éstas especie están capacitadas para crecer en un amplio rango de pH que va de 2,0 a 9,0. El crecimiento de *Fusarium graminearum* posee una tasa de crecimiento rápido y su buen desarrollo se produce en una temperatura de 29°C. estudios realizados por (Wheeler, Beverly, & Pitt, 1991) donde reportaron que las especies de *Fusarium* mostraron poca tolerancia de pH ácido, excepto para *F. graminearum* que pudo crecer a pH 2.1 a 30 ° C. El pH óptimo para *F. graminearum* a 25 ° C reportado aquí (pH 7.2). (Wheeler,

Beverly, & Pitt, 1991) menciona que con un pH óptimo de 7.5 para crecimiento y pH 6.5 para esporulación.

### 5.1.3. Cepas *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935).

En investigaciones realizadas por (López & López , 2004) obtuvieron un crecimiento micelial en *Fusarium oxysporum* de 200 µm a un pH entre los rangos de 5.5 a 6.5., además, que, en un pH 7 esta especie alcanza un mayor tamaño con 105.46 µm de igual manera en un pH 5 esta misma especie obtiene crecimiento micelial de menor longitud, investigación realizada por (Sandoval, L et al., 2002) demostraron que a los quince días se pudo apreciar que el hongo creció más en agar extracto de malta, donde alcanzó 51 mm donde a los 30 minutos alcanzó un crecimiento de 70 µm en agar de Sabouraud con una concentración de 4,4 x 10 con/mL. En investigaciones realizadas por (Wheeler, Beverly, & Pitt, 1991), señalan que el crecimiento se retrasa a pH ácido. Las especies de *Penicillium* mostraron una capacidad ligeramente mayor para el crecimiento a pH bajo que los otros géneros, siendo menos afectado por los valores de pH cercanos a 2. *P. tslandicum* fue una excepción, las tasas de crecimiento a pH 2 solo el 40% de las de pH 3.

Según (Masachis *et al.*, 2016) señalan que la alcalinización extracelular aumenta la virulencia de *F. oxysporum* hacia las plantas. Este aumento del pH conduce a la activación de una proteína quinasa (MAPK) activada por mitógenos fúngicos conservados, denominada Fmk1, que se requiere para patogenicidad fúngica.

Según (Coz , 2019) señala que varios trabajos de investigación se realizaron en *Fusarium*, verificando la dependencia hacia la alcalinización del medio circundante, es así que, la mayoría de autores se basan a

estudiar el comportamiento de *F. oxysporum*, quizás por el alto rango de hospederos que posee o por la gran capacidad de infección hacia plantas de importancia agrícola.

En la investigación realizada por (Rathore et al., (2015), testaron en crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp., en diferentes rangos de pH (5, 6, 7, 8 y 9) determinando que a los 7 días a pH básico de 8,0 se mostró un crecimiento máximo 9,0 cm seguido de un pH de 9,0 que tuvo un crecimiento mayor de 9,0 cm, mientras que se observó un crecimiento mínimo (4,56 cm) a un pH de 5,0. En la investigación realizada Figura 24 a un pH 7 al cabo de los 7 días aplicando la ecuación predictora  $y = 5.8536x + 2.47$  se alcanza un crecimiento de 5.94 cm. y en un pH 5 se alcanza un crecimiento de 4,45 cm.

## **5.2. PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE CALCIO.**

### **5.2.1. Cepa *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.**

El EDTA posee una acción inhibidora o bloqueadora de calcio extracelular, por lo tanto, se puede mencionar que la disponibilidad de calcio extracelular en el medio es primordial para el desarrollo de las especies del género *Fusarium* sp. estudiadas en el presente trabajo de investigación.

Según la figura 27 se puede afirmar que al incrementarse la cantidad de EDTA se incrementa la producción de etileno y causa la disminución del nivel de ácido abscísico, en las plántulas causa la reducción del crecimiento y el desarrollo de patógeno y, como resultado, disminuye el grado de infección del hongo. Estudios realizados por (Zielińska & Michniewicz, 2001) donde estudió “El efecto del calcio en la producción de etileno y ácido abscísico por el hongo *Fusarium culmorum* y por las plántulas de trigo infectadas con ese patógeno” en el cual reporta que las

plántulas de trigo infectadas y no infectadas con *Fusarium culmorum* se cultivaron en medios con diferente contenido de calcio (0, 2, 4, 8 mM). Se descubrió que cuanto mayor era el contenido de calcio en el medio, mayores eran las cantidades de etileno producidas tanto en las plántulas de trigo infectadas como no infectadas, mientras que el nivel de ABA en sus tejidos disminuía. Por lo tanto, la influencia inhibidora del calcio sobre la lesión de las plántulas de trigo por *Fusarium culmorum* puede ser causada por la influencia de este catión en el equilibrio hormonal en la planta.

Según (Seung, Kweon, Lee, & Hahn, 2015) afirman que el EDTA actúa como un agente fungistático a través de la inhibición reversible del crecimiento en *F. fujikuroi*, Por lo tanto, la acción del EDTA podría estar mediada por interacciones con moléculas específicas relacionadas con Calcio donde se produce una homeostasis en células *F. fujikuroi*.

### **5.2.2. Cepa *Fusarium graminearum* CS3005.**

Investigación realizada por (Seung, Kweon, Lee, & Hahn, 2015) para *F. fujikuroi* obtuvo mayor control en comparación con *Fusarium graminearum* CS3005 por el modo de acción es diferente.

De igual modo en la investigación realizado por (Coz, 2019) menciona que observó que cada especie del género *Fusarium* tiende a mostrar tendencias diferentes durante el desarrollo micelial de las colonias en los diferentes tratamientos con EDTA; algunas especies son más sensibles que otras a la menor disponibilidad de calcio.



### 5.2.3. Ceba *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935).

La Figura 34 muestra el análisis de correlación entre el crecimiento micelial en función de los intervalos de tiempo evaluados (cada cinco hasta treinta minutos), en cuatro concentraciones de EDTA, en donde se confirma la dependencia que tiene esta especie con la alcalinización de su medio circundante para un mejor desarrollo, ya que la acción de supresión del elemento Calcio (alcalino), que ejerció el EDTA hizo que esta cepa inhiba su desarrollo.

El EDTA es un ligante muy usado para ablandar aguas, puesto que atrapa los iones metálicos como el  $\text{Ca}^{++}$  en las aguas duras. Es un quelato formado a partir de un ligante orgánico saturado, como el etilendiamino, un anillo de cinco miembros puede plegarse con una geometría tetraédrica en el interior del ligante y conseguir con sí mismo un ángulo de  $90^\circ$  Pérez Didier (s.a). EDTA actúa como un agente fungistático a través de la inhibición reversible del crecimiento en *F. fujikuroi* (Won Kim et al., 2015), en la especie de *F. fujikuroi* Figura 26 tiene mayor efecto de inhibición en comparación con las 2 especies estudiadas las cuales a una concentración de  $20 \mu\text{M}$  todavía se desarrolla de manera leve.

El EDTA es utilizado para evitar la precipitación de sales en aguas duras, es decir, secuestran las sales del calcio y magnesio, además, previenen la formación de espuma. Se conocen secuestrantes orgánicos o llamados también quelantes como el ácido etilendiamintetracético (EDTA) y el ácido nitiloacético (NTA) (Rodríguez, Mayavales, & Álvarez, 2001). En la investigación realizada por (Abrunhosa y Armand, 2008) mostraron que EDTA puede reducir significativamente las tasas de crecimiento de hongos. El EDTA también es reconocido como un agente antibacteriano que interrumpe la integridad de la membrana y como un potenciador de otros agentes letales (Oita, 2003) citado por (Abrunhosa & Armando,

2008). El efecto del  $\text{Na}^2$  EDTA sobre el crecimiento de las cepas probablemente se deba a una construcción defectuosa de la pared celular mediada por su capacidad de unión al zinc según lo presentado por Brulet al., (1997). Las propiedades antifúngicas de EDTA se probaron principalmente en levaduras (Siqueira y Sen, 2004; Kubo et al., 2005) citados por (Abrunhosa & Armando, 2008). En la investigación realiza por (Kim, Park, Lee, Bum, & Koo, 2016) investigo las propiedades antimicrobianas de los oligosacáridos de quitosano (COS) y EDTA contra *Fusarium fujikuroi* donde COS exhibió un rápido efecto fungicida sobre las células en crecimiento hifal en 5 minutos, EDTA tuvo un efecto fungistático sobre la inhibición reversible del crecimiento, el EDTA no causó cambios morfológicos significativos y la acción de EDTA se suprimió en gran medida por  $\text{Mn}^{(2+)}$  y ligeramente por  $\text{Ca}^{(2+)}$ , respectivamente, por lo tanto se concluyó que dos agentes quelantes, COS y EDTA, tienen diferentes modos de acción antimicrobiana en *F. fujikuroi*. (De Lucca, 2006) en su investigación de las propiedades inhibitorias y fungicidas in vitro de EDTA para especies de *Aspergillus* y *Fusarium*. señala que el EDTA inhibió a las 48 h el crecimiento conidial no germinal a concentraciones de: *F. moniliforme* (25  $\mu\text{g/ml}$ ) y *F. solani* (400 $\mu\text{g/ml}$ ) donde llega a la conclusión que, en condiciones de prueba, el EDTA no es fungicida, pero inhibe el desarrollo de hifas en conidios no germinados y germinados.

Según (Haruta M. , Monshausen, Gilroy, & Sussman, 2008) Los aumentos transitorios en la concentración de  $\text{Ca}^{(2+)}$  citoplasmático son eventos clave que inician muchas vías de señalización celular en respuesta a las señales ambientales y de desarrollo en las plantas.

### **5.3. INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE RAÍCES DE *Arabidopsis thaliana*.**

#### **5.3.1. Cepa *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.**

Según los resultados obtenidos (Gerhard, y otros, 2015) señala que los resultados también pueden depender en gran medida del cultivar de plantas utilizado. Una tarea para el futuro es el desarrollo de técnicas que permitan una más cuantificación confiable de síntomas de la enfermedad y detección de pequeñas diferencias en virulencia.

#### **5.3.2. Cepa *Fusarium graminearum* CS3005.**

Investigación realizada por (Gerhard, y otros, 2015) Según la virulencia de *Fusarium graminearum* y otros *Fusarium* las secuencias del genoma fúngico, parecen tener la capacidad biosintética de producir en la planta una cantidad de compuestos aún desconocidos, además de las micotoxinas identificadas hasta ahora, solo unos pocos casos de pruebas funcionales por disrupción génica dieron como resultado resultados claros sobre el papel de las micotoxinas en la virulencia, la mayoría de los experimentos apuntan a contribuciones cuantitativas. Probablemente esto no solo se deba a la redundancia funcional de los metabolitos y otros efectores, sino también a las respuestas de las plantas en gran medida. En consecuencia, los metabolitos secundarios actúan como supresores de la inmunidad activada por el efector (proteína), pero las plantas pueden recuperar la resistencia antagonizando los efectores de las moléculas.

#### **5.3.3. Cepa *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 (FGSC 9935).**

Según investigación realizada por (Haruta M. , Monshausen, Gilroy, & Sussman, 2008) afirma que solo se conocen unos pocos mediadores extracelulares que regulan la concentración de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático.

La inhibición del crecimiento radicular en el péptido de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935) se obtiene el mayor crecimiento en 1  $\mu$ M y las concentraciones de 2 y 5  $\mu$ M son estadísticamente iguales, donde se muestra un mayor grado de inhibición. Investigaciones realizadas por (Germain et al., 2005) donde señalan que F- RALF es un pequeño polipéptido de peso molecular de 5 kDa (kilodaltons) que causa la alcalinización del medio, puede detener el crecimiento de la raíz y activa las MAPK intracelulares. Las vías no solo participan en la regulación de la proliferación celular, sino también en la regulación de la diferenciación y de la muerte celular. Las vías MAPK son clásicamente las vías de señalización más importantes que regulan la proliferación celular. Esto implica que las vías MAPK corresponden en conjunto a un sistema de cientos de proteínas (muchas de ellas corresponden a isoformas producidas por el procesamiento de la expresión génica de las MAPK) las cuales regulan diferentes funciones fisiológicas celulares al actuar como factores de transcripción o activar enzimas nucleares/citoplasmáticas (Shaul y Seger, 2007). Gregory Pearce et al., (2001) señala que RALF causó una detención sorprendente del crecimiento de las raíces recién desarrolladas que emergen de las semillas de tomate, Debido al comportamiento del genoma de *F. oxysporum* codifica un péptido con una similitud a la secuencia de la hormona peptídica vegetal RALF, que se sabe que aumenta la alcalinización extracelular.

#### **5.4. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE HIPOCÓTILO DE *Arabidopsis thaliana*.**

##### **5.4.1. Cepa *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.**

En la figura 38 indica que, a medida que se subía la concentración del péptido, se inhibía el crecimiento del hipocótilo de plántulas de *A. thaliana*, en condiciones de laboratorio.

##### **5.4.2. Cepa *Fusarium graminearum* CS3005.**

En la figura 39 indica que, a medida que se subía la concentración del péptido, se inhibía el crecimiento del hipocótilo de plántulas de *A. thaliana*, en condiciones de laboratorio.

##### **5.4.3. Cepa *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935).**

Según estudios realizados por (Masachis et al., 2016) en su investigación “Un patógeno fúngico secreta péptidos alcalinizantes de plantas para aumentar la infección” afirman que los patógenos fúngicos utilicen homólogos funcionales de péptidos alcalinizantes encontrados en sus plantas huésped para aumentar su potencial infeccioso y suprimir la inmunidad del huésped.

Según datos reportados por (Masachis, y otros, 2016) demuestran que una alcalinización extracelular es muy importante para la colonización satisfactoria de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*, el mismo que produce y secreta un péptido homólogo a los péptidos RALF (del inglés Rapid Alkalinization Factor) encontrado primeramente en extractos proteicos de hojas de tabaco (Pearce, 2001 a; Pearce, 2001 b) y en otras especies vegetales (Wu, 2007; Germain, 2005; Mingossi, 2010; Morato do Canto, 2014).

Un nuevo estudio realizado por (Kamoun & Zipfel, 2016) describe un nuevo mecanismo mediante el cual los patógenos de las plantas interfieren con la fisiología de las plantas. Descubrieron que el hongo que infecta las raíces *F. oxysporum* secreta un péptido similar al péptido regulador de la planta RALF (factor de alcalinización rápida) para inducir la alcalinización del tejido del huésped y mejorar la colonización de la planta. Con la utilización del péptido de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935) se obtiene una menor inhibición del crecimiento en comparación con las dos especies de fusarium. Investigaciones realizadas por Murphy, (2014) y Gregory Pearce et al., (2001) mencionados por Kamoun & Zipfel (2016) señalan que se cree que la alcalinización extracelular contribuye a la patogénesis fúngica, pero los mecanismos subyacentes son poco conocidos. Aquí, mostramos que el hongo que infecta las raíces *Fusarium oxysporum* utiliza un homólogo funcional del péptido regulador de la planta RALF (factor de alcalinización rápida).

El papel de los péptidos RALF se ha investigado en numerosas especies de plantas Juntas, estas observaciones sugieren que los péptidos RALF impactan en la acidificación y la expansión celular durante el crecimiento y el desarrollo. (Murphy & De Smet, 2014).

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- ✓ La sensibilidad al pH en el crecimiento micelial de las especies *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005, se produce a un pH 7 en la cual el mayor desarrollo micelial se presentó en la especie *F. graminearum*, seguido de *F. oxysporum* f. sp *lycopersici* y *F. fujikuroi*. De esta manera, se demuestra que estas especies dependen del pH, especialmente alcalino, para poder desarrollarse.
- ✓ El crecimiento micelial de las especies *Fusarium* en función del pH gracias a la generación de un modelo matemático se logró determinar el comportamiento, el cual es lineal positivo para cada especie estudiada y podemos ir realizando pruebas en función del modelo matemático.
- ✓ La supresión de disponibilidad de calcio extracelular por el agente quelante (EDTA), reduce el crecimiento micelial de las especies *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005, siendo la concentración 50  $\mu\text{M}$  de EDTA quien inhibió el crecimiento en las tres especies. La concentración de 20  $\mu\text{M}$  solo inhibió para la especie *Fusarium fujikuroi* IMI 58289.
- ✓ Utilizando los péptidos sintéticos de las especies *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* 4287 (FGSC 9935), *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 y *Fusarium graminearum* CS3005, aplicados en tres concentraciones (1 $\mu\text{M}$ , 2 $\mu\text{M}$  y 5 $\mu\text{M}$ ) en el agua milli-Q con plántulas de *Arabidopsis thaliana*, se obtuvo que, a mayor concentración, se inhibieron su desarrollo radicular y de hipocótilos. en el crecimiento radicular a la concentración de 5 $\mu\text{M}$  con la especie *Fusarium fujikuroi* se obtuvo una mayor inhibición del crecimiento de radicular, y para el crecimiento de Hipocótilo el péptido de *Fusarium graminearum* es el que presento mayor efecto.

## CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Profundizar en las investigaciones relacionado a la producción de péptidos F-RALF en otras especies *Fusarium* con el fin de seguir descubriendo si ejercen alguna modulación en su huésped.
- ✓ Continuar con las evaluaciones de pruebas de senilidad de pH, para poder determinar hasta que tiempo estas especies tienen un comportamiento lineal positivo, y así poder determinar un tiempo exacto cuando se detiene su crecimiento.
- ✓ Para futuros trabajos de investigación se puede aislar *Fusarium* de plantas como hospederas como *Zea mays* (*F. graminearum*), *Oryza sativa* (*F. fujikuroi*), *Solanum lycopersicum* (*F. oxysporum*).



## CAPÍTULO VIII. FUENTES DE INFORMACIÓN

- Abrunhosa, L., & Armando, V. (2008). *Efecto antifúngico in vitro de la sal disódica de EDTA en Aspergilli negro probado*. *Asian Journal of Biochemistry*, 3: 176-181.
- Abubakar, A., Suberu, H., Bello, I., Abdulkadir, R., Daudu, O., & Lateef, A. (2013). Effect of pH on mycelial growth and sporulation of *Aspergillus parasiticus*. *Plant Sciences*, 64-67.
- Adie B.A.T., P.-P. J.-P.-S. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19, 1665 - 1681.
- Agrios, G. (1997). Plant disease caused by fungi. *Plant Pathology*. London: Academic Press, p.245-406.
- Aoki, t., O'Donnell, K., Homma, Y., & Lattanzi, A. (2003). Sudden-death syndrome of soybean is caused by two morphologically and phylogenetically distinct species within the *Fusarium solani* species complex - *F. virguliforme* in North America and *F. tucumaniae* in South America. *Mycologia*, v.95,, 660 - 638.
- Arie T., T. H. (2007). Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*, 24, 135–147.
- Asselbergh B., D. V. (2008). Global switches and fine-tuning-ABA modulates plant pathogen defense. *Molecular Plant Pathology Interactions*, 21, 709–719.
- Atkinson, N., Lilley, C., & Urwin, P. (2013). Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, Lancaster,. v. 162, p. 2028-2041.
- Azevedo, J. (1998). Microorganismos endofíticos. In Melo, I.S.; Azevedo. (Ed.) *Ecologia Microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA-Meio Ambiente*, p.117-137.
- Azevedo, J., Maccheroni, J. W., Pereira, J., & Araújo, W. (2000). Endophytic microorganisms: a review insect control and recent advances on tropical plants. <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4> (28/. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.3.
- Backues, S., Korasick, D., Heese, A., & Bednarek, S. (2010). The *Arabidopsis* dynamin-related protein2 family is essential for gametophyte development. *The Plant Cell*, Rockville,. v. 22, p. 3218-3231.

- Baldwin I.T. (2001). An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiology*, 127, 1449–1458.
- Barbieri, R., & Carvalho, F. (2001). Coevolução de plantas e fungos Patogénicos. *Revista Brasileira de Agrociência* v.7, p. 79-83.
- Bari R., J. J. (2009). Role of plant hormones in plant defense responses. . *Plant Molecular Biology*, 69 , 473–488.
- Bednarek, R., & Carbalho, F. (2001). Coevolução de plantas e fungos patogénicos. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.7, p. 79-83.
- Bergonci, T., Ribeiro, B., Ceciliato, P., Guerrero-Abad, J., Silva-Filho, M., & Moura, D. (2014). Arabidopsis thaliana RALF1 opposes brassinosteroid effects on root cell elongation and lateral root formation. *Journal of Experimental Botany*, Oxford,. v. 65,, p. 2219 - 2230.
- Bilai, V. (1955). *The Fusaria (Biology and Systematics)*, Kiev: Akad. Nauk.Urk.
- Bombarely , A., Rosli, H., Vrebalov, J., & Moffett, P. (2012). A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 25, 1523–1530.
- Bostock R.M., P. M. (2014). redispotion in plant disease: exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annual Reviews of Phytopathology*, 52, 23.1–23.33.
- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M., & Simon, R. (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, Lancaster,. v. 129, p. 565–575.
- Burdon, J., & Silk, J. (1997). Sources and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, v. 87, p.664-669.
- Butenko, M., Patterson, S., Grini, P., Stenvik, G., Amundsen, S., Mandal, A., & Aalen, R. (2003). Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in Arabidopsis and identifies a novel family of putative ligands in plants. *The Plant Cell*, Rockville,. v. 15, p. 2296 - 2307.
- Carrol, G. (1986). The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema, N.J.; Heuvel, J. van den. *Microbiology of Phyllospher*, v.1, p.205-22.

- Casson, S., Chilley, P., Topping, J., Evans, I., Souter, M., & Lindsey, K. (2002). The polaris gene of Arabidopsis encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning. *The Plant Cell*, Rockville,. v.14, p. 1705-1721.
- Cessna, S., Sears, V., Dickman, M., & Low, P. (2000). Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* 12, 2191–2200.
- Charon, C., Sousa, C., Crespi, M., & Kondorosi, A. (1999.). Alteration of enod40 expression modifies *Medicago truncatula* root nodule development induced by *sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell*, Rockville,. v.11, p. 1953-1966.
- Chasan, R. (1994). Plant-pathogen encounters in edinburgh. *Plant Cell*, v.6, p.1332-1341.
- Chen, J. e. (2016). FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk between abscisic acid and RALF peptide in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*,.
- Chen, Y., Matsubayashil, Y., & Sakagamil, Y. (2000.). Peptide growth factor phytosulfokine- $\alpha$  contributes to the pollen population effect. *Planta*, Berlin. v. 211, p. 752–755.
- Chilley, P., Casson, S., Tarkowski, P., Hawkins, N., Wang, K., P.J., H., . . . Lindsey, K. (2006). The Polaris peptide of Arabidopsis regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling. *The Plant Cell*.Rockville. v. 11, p. 3058 - 3072.
- Cho, S., Larue, C., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T., Zhang, S., & Walker, J. (2008). Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unite States of America*, Washington, , p. 15629. v.105, p. 1805-1817.
- Choi J., C. D.-M. (2011). Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends?. *Trends in Plant Science*, 18, 388–394.
- Consortium, T. G. (2012). The tomato genome sequence provides insights into freshly fruit evolution. *Nature*, 485, 635–641.
- Covey, P., Subbaiah, C., Parsons, R., Pearce, G., Lay, F., Anderson, M., . . . Bedinger, P. (2010). A pollen-specific RALF from tomato that regulates pollen tube elongation. *Plant Physiology*, Lancaster,. v. 153, p. 703-715.

- Coz , G. H. (2019). *Influencia del pH y calcio, sobre el crecimiento micelial de Fusarium spp., aislados en cultivos agrícolas de importancia en la región San Martín*. Tarapoto.
- Dangl J.L. (1993). Application of *Arabidopsis thaliana* to outstanding issues in plant–pathogen interactions. *International Review of Cytology*, 144, 53–83.
- De Lucca, A. (2006). *Propiedades inhibitorias y fungicidas in vitro de EDTA para especies de Aspergillus y Fusarium*. Nueva Orleans, LA.: 46ª Conferencia Interscience sobre agentes antimicrobianos y quimioterapia.
- Dean, R. e. (2012.). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, . 13(4): , 414-30.
- Desjardins, A., Manandhar, G., Plattner, R. M., Shrestha, K., & McCormick, S. (2000). Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, 1377-1383.
- Desjardins, A., Manandhar, G., Plattner, R., Maragos, C., Shrestha, K., McCormick, S. L., . . . Godoy & Colombo, 2. (2000). Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. *Journal of Agricultural and* , v.48, p.1377-1383.
- Di Pietro, A. G.-M. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. . *Mol. Microbiol.* 39, 1140–1152.
- Didier, A., & Pérez, Á. . (s.a). Formación de complejos: EDTA y quelatos.
- Dinolfo, M., Castañares, E., & Stenglein, S. (2017). *Fusarium–plant interaction: state of the art – a review*. *Plant Protect. Sci*, p. 53: 61–70.
- Domsch, K., Gams, W., & Anderson, T. (1980). *Compendium of soil fungi*. New York: *Academic Press*, p 859.
- Donnelly, P., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R., & Dengler, N. (1999.). Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Development Biology*, San Diego,. v. 215, p. 407-419.
- Duggal, A., Dumas, M., Jeng, R., & Hubbes, M. (1997). Ribosomal variation in six species of *Fusarium*. *Mycopathologia*. v.140, p.35-49.

- Durrant W.E., D. X. (2004). Systemic acquired resistance. . *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185–209.
- Escobar, N., Haupt, S., Thow, G., Boevink, P., Chapman, S., & Oparka, K. (2003). High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. *The Plant Cell*. Rockville,. v.14, p. 1507 - 1523.
- Felix, G., & Boller, T. (1995.). Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *The Plant Journal*, Oxford,. v. 7, p. 381–389.
- Fiers, M., Ku, K., & Liu, C.-M. (2007). CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 10, p. 39 - 43.
- Fletcher, J., Brand, U., Running, M., Simon, R., & Meyerowitz, E. (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science*, Washington, v. 283, p. 1911-1914.
- Ganapathi, T., Suprasanna, P., Rao, P., & Bapt, V. (2004). Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) – a model system for tissue cultive interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 171–184.
- Geisere, D., Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T., . . . O'Donnell, K. (2004). Fusarium-id v. 1.0: A DNA sequence database for identifyng Fusarium. *European Journal of Plant Pathology*, v.110, p. 473 - 479.
- Gerhard, A., Wiesenberger, G., Ulrich, G., Zeilinger, S., García, M., & Estrada, C. (2015). *Fusarium Mycotoxins and Their Role in Plant–Pathogen Interactions*. New York: Springer Obtenido de [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2531-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2531-5_10).
- Germain, H., Chevalier, E., Caron, S., & Matton, D. (2005.). Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. *Planta*, Berlin,. v. 220, p. 447-454.
- Goddin M.M., Z. D. (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Molecular Plant Pathogen Interactions*, 21, 1015–1026.
- Godoy, P., & Colombo, A. (2004). Biología e relevância clínica do gênero *Fusarium* spp. *Prática Hospitalar*, v.34, p.136-140.

- Gomero, L. (1999.). Pesticides in Peru's Highlands. LEISA Magazine. 15 n° 1/2.
- Grosskinsky D.K., v. d. (2014). Abscisic acid–cytokinin antagonism modulates resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco. . *Phytopathology*, 104, 1283–1288.
- Hanai, H., Matsuno, T., Yamamoto, M., Matsubayashi, Y., & Kobayashi, T. (2000). A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant Cell Physiology*, Tokyo,. v. 41, p. 27–32.
- Haruta, M., & Constabel, C. (2003). Rapid alkalization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells. *Plant Physiology*, Lancaster,. v. 131, p. 814-823.
- Haruta, M., Monshausen, G., Gilroy, S., & Sussman, M. (2008). A cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide. *Biochemistry*, Washington, p. 631. v. 47, p. 6311 - 6321.
- Haruta, M., Monshausen, G., Gilroy, S., & Sussman, M. (2008). Un ensayo funcional citoplasmático de Ca<sup>2+</sup> para identificar y purificar péptidos de señalización de células endógenas en plántulas de *Arabidopsis*: identificación del péptido AtRALF1. *Biochemistry*, 47, 6311–6321.
- Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K., Minkoff, B., & Sussman, M. (2014). A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science* 343, 408–411.
- Hobe, M., Muller, R., Grunewald, M., Brand, U., & Simon, R. (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in *Arabidopsis*. *Development Genes and Evolution*, Berlin,. v. 213, p. 371–381.
- Huffaker, A., Pearce, G., & Ryan, C. (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington,. v. 103, p. 10098-10103.

- Igasaki, T., Akashi, N., Ujino-ihara, T., Tatsubayashi, Y., Sakagami, Y., & Shinohara, K. (2003). Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *The Plant Cell Physiology*, Tokyo,. v. 44, p. 1412–1416.
- Ikeuchi, M., Yamaguchi, T., Kazama, T., Ito, T., Horiguchi, G., & Tsukaya, H. (2011). *Rotundifolia* regulates cell proliferation along the body axis in *Arabidopsis* shoot. *Plant and Cell Physiology*, Tokyo,. v. 1, p. 59-69.
- Jinn, T., Stone, J., & Walker, J. H. (2000). *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes & Development*, New York, v. 14, , p. 108-117.
- Kahmann, R., & Basse, C. (2001). Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, p.374-380.
- Kamoun, S., & Zipfel, C. (2016). Host modulation every which way. *Fungal pathogenesis*, 1-2.
- Kassawara, M. (2005). Variabilidade genética de Isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. *Universidade de São Paulo*, 1-124 pp.
- Kende, H., & Zeevaart, J. (1997). The Five "Classical" Plant Hormones. *The Plant Cell*, Rockville,. v. 9, p. 1197-1210.
- Kim, S., Park, J., Lee, C., Bum, S., & Koo, J. (2016). *Comparison of the Antimicrobial Properties of Chitosan Oligosaccharides (COS) and EDTA against Fusarium fujikuroi Causing Rice Bakanae Disease*. *Curr Microbiol* 72, 496–502. obtido de <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0973-9>.
- Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Lofke, C., Teichmann, T., Tanaka, H., & Friml, J. (2011). Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Rockville,. v. 23, p. 1920-1931.
- Kobayashi, T., Eun, C., Hanai, H., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., & Kamada, H. (1999). Phytosulphokine-a, a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. *Journal of Experimental Botany*, Oxford,. v. 50, p. 1123–1128.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., . . . Hedrich, R. (2010). Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore. v. 285, p. 13471-13479.

- Kubo, L., Lee, S., & Ha, T. (2005). *Efecto de EDTA solo y en combinación con poligodial sobre el crecimiento de Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1818-1822.
- Kunkel, B. (1996). A useful weed put to work: genetic analysis of disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Genetic*, 12, 62–69.
- Leslie, J., Zeller, K., & Summerell, B. (2001). Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.59, p.107-117.
- Liu J., W. X.-J. (2006). An integrative analysis of the effects of auxin on jasmonic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. . *Journal of Integrative Plant Biology*, 48, 99–103.
- López , D., & López , M. (2004). Influencia del ph y de los medios de cultivo en la expresión de los caracteres de valor diagnóstico de las especies del género *Fusarium* en cuba. *Fitosanidad*, 7 - 11.
- Lozano-Durán R., Z. C. (2015). Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends in Plant Science*, 20, 12–19.
- M.E., A. (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology*, 44, 429–442.
- Masachis, S., Segorbe, D., Turrà, D., Leon-Ruiz, M., Fürst, U., El Ghalid, M., & Di Pietro, A. (2016). *Un patógeno fúngico secreta péptidos alcalinizantes de plantas para aumentar la infección*. *Nature Microbiology*, 1(6), 1-9.
- Matos, J., Fiori, C., Silva-Filho, M., & Moura, D. (2008.). A conserved dibasic site is essential for correct processing of the peptide hormone AtRALF1 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, Amsterdam,. v. 582, p. 3343-3347.
- Matsubayashi, Y. (2014). Posttranslationally modified small-peptide signals in plants. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v. 65, p. 385-413.
- Matsubayashi, Y., & Sakagami, Y. (1996). Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington,. v. 93, p. 7623-7627.
- Matsubayashi, Y., Ogawa, M., Morita, A., & Sakagami, Y. (2002). An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science*, Washington,. v. 296, p. 1470–1472.



- Matsubayashi, Y., Takagi, L., Omura, N., Morita, A., & Sakagami, Y. (1999). The endogenous sulfated pentapeptide phytosulfokine- $\alpha$  stimulates tracheary element differentiation of isolated mesophyll cells of zinnia. *The Plant Physiology*, Lancaster,. v. 120, p. 1043 - 1048.
- Mauch-Mani B., M. F. (2005). The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Current Opinion in Plant-Biology*, 8, 409–414.
- Mingossi, F., Matos, J., Rizzato, A., Madeiros, A., Falco, M., Silva-Filho, M., & Moura, D. (2010). SacRALF1, a peptide signal from the grass sugarcane (*Saccharum* spp.), is potentially involved in the regulation of tissue expansion. *Plant Molecular Biology*, Boston, v.73, p. 271 - 281.
- Morato do Canto, A., H.O Ceciliato, P., Ribeiro, B., Ortiz Morea, F. A., Franco García, A. A., & Silva-Filho, M. C. (2013). Biological activity of nine recombinant AtRALF peptides: Implications for their perception and function in *Arabidopsis*.
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. 4(11), a011254. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(11), a011254. Disponible en <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>.
- Moura, D., & Silva-Filho, M. (2006). Plant peptide hormones, from defense to pollen self-incompatibility, cell fate and development: small peptides as signaling molecules in plants. In: SILVA, J.A.T. Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. London. *Global Science Books*, p. 203 - 209.
- Murphy, E., & De Smet, I. (2014). Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends Plant Sci.* 19, 664–671.
- Narita, N., Moore, S., Horiguchi, G., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., . . . Tsukaya, H. (2014). Overexpression of a novel small peptide rotundifolia4 decreases cell proliferation and alters leaf shape in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, Oxford,. v.30, p. 699 - 713.
- Ohyama, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M., & Matsubayashi, Y. (2009). A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Chemical Biology*, London,. v. 5, p. 578–580.

- Oliveira, V., & Costa, J. (2002). Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.631 - 634.
- Olsen, A., Mundy, J., & Skriver, K. (2002). Peptomics, identification of novel cationic *Arabidopsis* peptides with conserved sequence motifs. *In Silico Biology*, Göttingen, v. 2, p. 441-451.
- Olsen, A., Mundy, J., & Skriver, K. (2002). Peptomics, identification of novel cationic *Arabidopsis* peptides with conserved sequence motifs. *In Silico Biology*, Göttingen, v. 2, p. 441-451.
- Pearce, G. M. (2001). Jr. RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 12843–12847.
- Pearce, G. Y. (2010). Structure–activity studies of RALF, rapid alkalization factor, reveal an essential—YISY—motif. *Peptides* 31, 1973–1977.
- Pearce, G., Moura, D., Stratmann, J., & Ryan, C. (2001a). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature*, London, v. 411, p. 817-820.
- Pearce, G., Moura, D., Stratmann, J., & Ryan, C. (2001b). RALF, a 5 kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 98, p. 12843-12847.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., & Ryan, C. (1991). A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science*, vol. 253, p. 895 - 898.
- Pearce, G., Yamaguchi, Y., Munske, G., & Ryan, C. (2010). Structure–activity studies of RALF, rapid alkalization factor, reveal an essential—YISY—motif. *Peptides*, v. 31, 1973–1977.
- Pérez Arbelaez , E. (1953). Todo sobre los Quelatos, Instituto Geográfico Agustín Codazzi Recursos Naturales-Colombia. 12.
- Petrini, O. (1991). Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S.S. (Ed.) *Microbial Ecology of Leaves*New York: Spring Verlag, p.179-197.
- Prusky, D., & Yakoby, N. (2003). Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Plant Pathol.* 4, 509 – 516.

- Prusky, D., McEvoy, J., Leverentz, B., & Conway, W. (2001). Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 1105–1113.
- Puhalla, J. (1981). Genetic considerations of the genus *Fusarium*. In: Nelson, P.E.; Toussoun, A.T.; Cook, R.J. (Ed) *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Pennsylvania: , , *Pennsylvania State University* v.27, p.291-305.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., & Scheel, D. (2011). Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *The Plant Journal*, Oxford, . v. 68, p. 100-113.
- Rathore. S. & Saxena, S. &. (2015). *Effect of pH and salt levels on growth of Fusarium oxysporum f. sp.* . *International Journal of Seed Spices*. 5. 100-101. .
- Rodríguez, F., Mayavales, C., & Álvarez, P. (2001). *Desarrollo y puesta a punto*. *Alimentaría*; 32319-24.
- Ross, A., Yamada, K., Hiruma, K., Yamashita-Yamada, M., Lu, X., Takano, Y., . . . Saijo, Y. (2014.). The Arabidopsis pepr pathway couples local and systemic plant immunity. *The EMBO Journal*, London, . v. 33, p. 62-75.
- Ryan, C. (1990). Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, . v. 28, p. 425–449.
- Ryan, C., & Moura, D. (2002). Systemic wound signaling in plants: a new perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, . v. 99, p. 6519-6520.
- Ryan, C., & Pearce, G. (1998). Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Palo Alto, . v. 14, p. 1-17.
- Sablowski, R. (2007). Flowering and determinacy in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, . v. 58, p. 899–907.
- Sanabria, N., Guadarrama, A., & Romero, H. (2002). Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v.28, p. 161- 173.

- Sandoval , L., Bonilla Bernal, T., Porras, A., & Lopéz, O. (2002). Determinación del medio de cultivo para el crecimiento y esporulación de *sarocladium oryzae* (sawada) Gams & Hawks. *Fitosanidad*. 6., 15-18.
- Santiago, J., Brandt, B., Wildhagen, M., Hohmann, U., Hothorn, L. A., Butenko, M. A., & Hothorn, M. (2016). Mechanistic insight into a peptide hormone signaling complex mediating floral organ abscission. *Elife*, Cambridge,. v. 5, p. 15075.
- Sauval, M. (2010). Enigmas de la inhibición.
- Schopfer, C., Nasrallah, M., & Nasrallah, J. (1999). The male determinant of self-incompatibility in Brassica. *Science, Washington*, v. 286, p. 1697-1700.
- Seung, K., Kweon, J., Lee, C., & Hahn, B. (2015). Comparison of the Antimicrobial Properties of Chitosan Oligosaccharides (COS) and EDTA against *Fusarium fujikuroi* Causing Rice Bakanae Disease. *Springer*.
- Shaul , Y., & Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*.
- Shopien, K., & Cyril, Z. (2016). Host modulation every which way. *Fungal Pathogenesis*.
- Simon, R., & Dresselhaus, T. (2015). Peptides take centre stage in plant signalling. *Journal of Experimental Botany, Oxford*. v. 66, p 5135-5138.
- Siqueira, J., & Sen, B. (2004). *Hongos en infecciones endodóncicas*. *Cirugía Oral Oral Med. O.*, 97: 632-641.
- Snyder, W., & Hansen, H. (1953). Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. *Phytopathology*, v.44, p. 338 - 342.
- Somerville , C., & Koornneef, M. (2002). A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nature*, 3, 883–889.
- Soria Melguizo, F. (octubre de 2009). *Francisco Soria Melguizo, S.A*. Fonte: [www.f-soria.es](http://www.f-soria.es)
- Srivastava, R. L. (2009). Regulation and processing of a plant peptide hormone, AtRALF23, in Arabidopsis. *Plant J*. 59, 930–939.
- Stenvik, G., Butenko, M., Urbanowicz, B., Rose, J., & Aalen, R. (2006). Overexpression of inflorescence deficient in abscission activates cell

- separation in vestigial abscission zones in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Rockville,. v. 18, p. 1467-1476.
- Stenvik, G., Tandstad, N., Guo, Y., Shi, C., Kristiansen, W., Holmgren, A., . . . Butenko, M. (2008). The epip peptide of Inflorescence Deficient In Abscission is sufficient to induce abscission in arabidopsis through the receptor-like kinases haesa and haesa-like2. *The Plant Cell*, Rockville, v. 20, p. 1805-1817.
- Sturz, A., Christie, B., & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes: Potencial role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.19, p.1-30.
- Sugano, S., Shimada, T., Imai, Y., Okawa, K., Tamai, A., Mori, M., & Hara-Nishimura, I. (2010). Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature, London*, v. 463, p. 241-244.
- Summerell, B., & Leslie, J. (2003). A utilitarian approach to Fusarium identification. *Plant Disease*, v.87, p.117-128.
- Suzuki, G., Kai., Hirose, T., Fukui, K., & Nishio, T. (1999). Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of S(9) haplotype of Brassica campestris (syn. rapa). *Genetics*, Austin,. v. 153, p. 391–400.
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Asano, K., Hara, M., Che, F., . . . Isogai, A. (2000). Isolation and characterization of pollen coat proteins of Brassica campestris that interact with S locus-related glycoprotein 1 involved in pollen-stigma adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington. v. 97, p. 3765-3770.
- Takayama, S., Shiba, H., Iwano, M., Shimosato, H., & Che, F. (2000). The pollen determinant of self-incompatibility in Brassica campestris. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington,. v. 97, p. 1920–1925.
- Tang, J., Han, Z., Sun, Y., Zhang, H., Gong, X., & Chai, J. (2015). Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. *Cell Research*, Basingstoke,. v. 25, p. 110-120.
- Taylor, E., Bates, J., Kenyon, D., Maccaferri, M., & Thomas, J. (2001). Modern molecular methods for characterization and diagnosis of seed-borne fungal pathogens. *Journal of Plant Pathology* v.83, p.75-81.

- Thynne, E., L. Saur, I. M., Thynne, E., Simbaqueba, J., A. Ogilvie, H., Gonzales Cendales, Y., . . . S. Solomon, P. (2016). Fungal phytopathogens encode functional homologues of plant rapid alkalization factor (RALF) peptides. *Molecular plant pathology*.
- Turra, D. S. (2014). A. Protein kinases in plant pathogenic fungi: conserved regulators of infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 267–288.
- Van Poecke, R., & Dicke, M. (2004). Indirect defence of plants against herbivores: using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biology*, 6, 387-401.
- Vanoosthuysse, V., Miege, C., Dumas, C., & Cock, J. (2001). Two large *Arabidopsis thaliana* gene families are homologous to the Brassica gene superfamily that encodes pollen coat proteins and the male component of the self-incompatibility response. *Plant Molecular Biology*, Boston,. v. 46, p. 17–34.
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütchorn, B., & Franken, P. (1999). *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.2741-2744.
- Wagner, B. & (2000). Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.3468–3473.
- Walters D.R., M. N. (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins. . *Trends in Plant Science*, 11, 581–586.
- Wen, J., Lease, K., & Walker, J. (2004). DVL: a novel class of small polypeptides: overexpression alters *Arabidopsis* development. *The Plant Journal*, Oxford,. v. 37, p. 668–677.
- Wheeler, K., Beverly, F., & Pitt, J. (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* ( 12 ), 141-150.
- Whitford, R., Fernandez, A., Tejos, R., Pérez, A., Kleine-Vehn, J., Vanneste, S., . . . Devreese, B. (2012). secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Developmental Cell*, Cambridge, v.22, p. 678 - 685.
- Won Kim, S., Kweon Park, J., Cho Heun, L., Bum-Soo, H., & Choon Koo, J. (2015). Comparison of the Antimicrobial Properties of Chitosan Oligosaccharides (COS) and EDTA against *Fusarium fujikuroi* Causing Rice Bakanae Disease.

- Wu, J., Kurten, E., Monshausen, G., Hummel, G., Gilroy, S., & Baldwin, I. (2007). NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hair tip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils. *The Plant Journal, Oxford*,. v. 52, p. 877-890.
- Xu, J. R. (1996). MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev. 10*, 2696–2706.
- Yamaguchi, Y., Huffaker, A., Bryan, A., Tax, F., & Ryan, C. (2010). PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell, Rockville*,. v. 22, p. 508-522.
- Yamakawa, S., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H., & Satoh, S. (1999). Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine-alpha, on the growth and chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, Tokyo*,. v. 63, p. 2240–2243.
- Yamakawa, S., Sakurai, C., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H., & Satoh, S. (1998). The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine, on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. *Journal of Plant Research, Tokyo*,. v. 111, 453–458.
- Yang, H., Matsubayashi, Y., Nakamura, K., & Sakagami, Y. (1999). *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine-alpha, a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Wa.* v.96, p. 13560 - 13565.
- Yasuda M., I. A.-N. (2008). Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in *Arabidopsis*. *The plant Cell, 20*, 1678-1692.
- Zemankova, M. L. (2001). *Fusarium* species, their taxonomy, variability and significance in plant pathology. *Plant Protection Science Uv.37*, p.25-42.
- Zhao, Y., Yan, A., Feijó, J., Furutani, M., Takenawa, T., Hwang, I., . . . Yang, Z. (2010). Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in *Arabidopsis* and tobacco. *The Plant Cell, Rockville*,. v. 22, p. 4031-4044.

Zielińska, M., & Michniewicz, M. (2001). El efecto del calcio en la producción de etileno y ácido abscísico por el hongo *Fusarium culmorum* y por las plántulas de trigo infectadas con ese patógeno. *Acta Physiol Plant* 23 obtenido de <https://doi.org/10.1007/s11738-001-0026-9>, 79–85.



# **ANEXOS**

**Anexo 1: Pruebas de Normalidad, intervalo de confianza (ICC95%) para Crecimiento micelial en función al pH.**

**Prueba de Kolmogorov para bondad de ajuste Normalidad**

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Sig.
RDUO Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium Fujikuroi</i>	Normal (0,98.05)	0	98.05	60	0.7252
RDUO Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium graminearum</i>	Normal (0,120.23)	0	120.23	60	0.9719
RDUO Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium oxysporum</i>	Normal (0,120.23)	0	120.23	60	0.9719

**Intervalo de confianza (ICC 95%)**

Variable	Parámetro	E.E.	n	LI (95%)	LS (95%)
RDUO Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium Fujikuroi</i>	Media	2.04	60	110.18	118.35
RDUO Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium graminearum</i>	Media	3.34	60	143.96	157.33
RDUO Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium oxysporum</i>	Media	2.96	60	145.54	157.4

**Cálculo de la varianza**

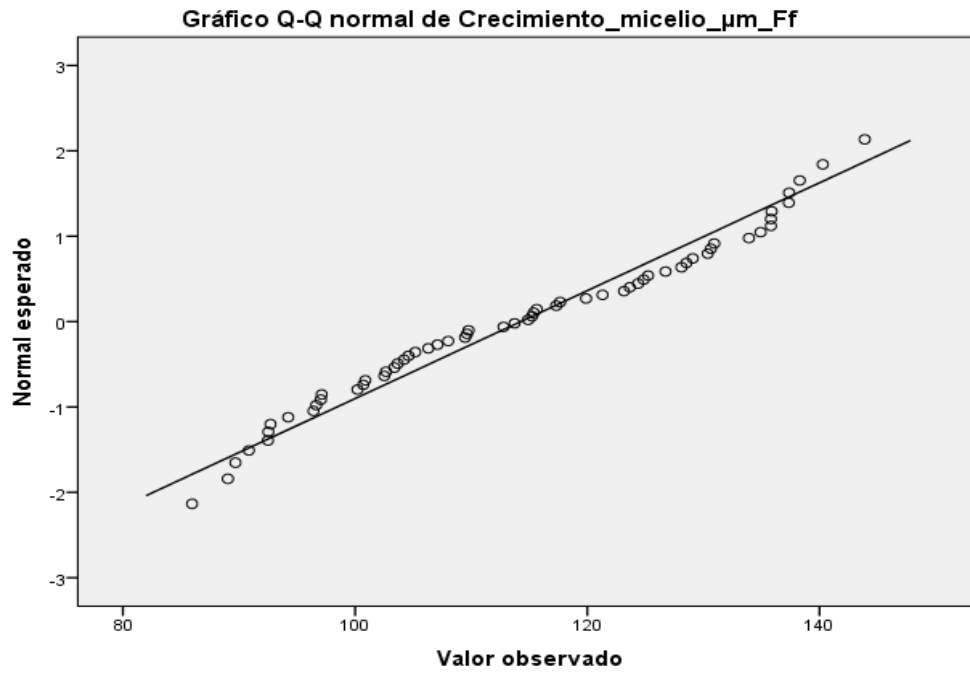
Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)
RDUO Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium Fujikuroi</i>	60	0	9.9	98.05
RDUO Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium graminearum</i>	60	0	10.96	120.23
RDUO Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium oxysporum</i>	60	0	12.68	160.81

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

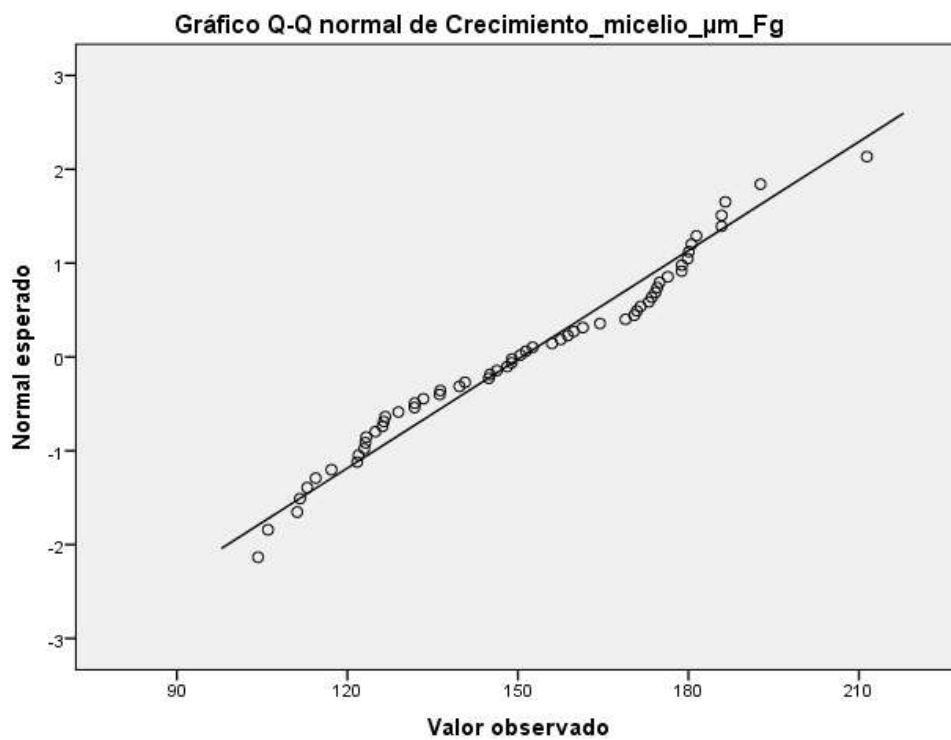
Indicadores	Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium Fujikuroi</i>	3.279	2	57	.065
Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium graminearum</i>	.265	2	57	.768
Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium oxysporum</i>	2,479	2	57	0.93

Las varianzas son mayores de 0.05 por a tanto se asume que son iguales y podemos realizar la prueba de Tukey.

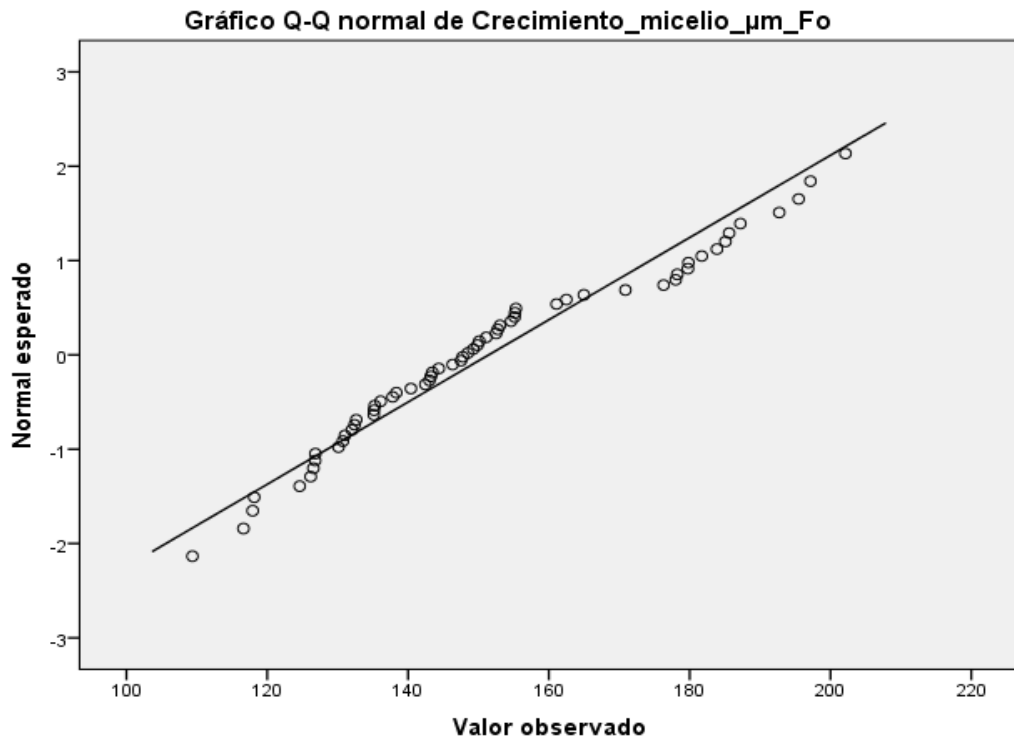
Grafica 1.1. Distribuciones de Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) *Fusarium Fujikuroi*



Grafica 1.2. Distribución de Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) *Fusarium graminearum*



Grafica 1.3. Distribución de Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) *Fusarium oxysporum*



**Anexo 2: Pruebas de Normalidad, intervalo de confianza (ICC95%), gráficos de distribuciones para crecimiento micelial (sensibilidad de calcio)**

**Prueba de normalidad**

**Prueba de Kolmogórov-Smirnov para una muestra**

Estadístico de prueba	Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium Fujikuroi</i>	Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium graminearum</i>	Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium oxysporum</i>
N	100	100	100
Media	31.68	72.99	64.30
Desviación estándar	32.81	76.85	56.27
Sig. asintótica (bilateral)	,000	,000	,000

Se puede observar que a nivel de datos para cada indicador muestra una tendencia de no mostrar una distribución normal por lo tanto realizamos pruebas no paramétricas. entonces usamos la prueba de Kruscal Wallis.

**Intervalo de confianza (ICC 95%)**

Indicador	Valor de prueba = 0	
	95% de intervalo de confianza de la diferencia Inferior	Superior
Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium Fujikuroi</i>	25.1656	38.1859
Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium graminearum</i>	57.74426	88.24002
Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium oxysporum</i>	53.1398	75.4686

**Cálculo de la varianza**

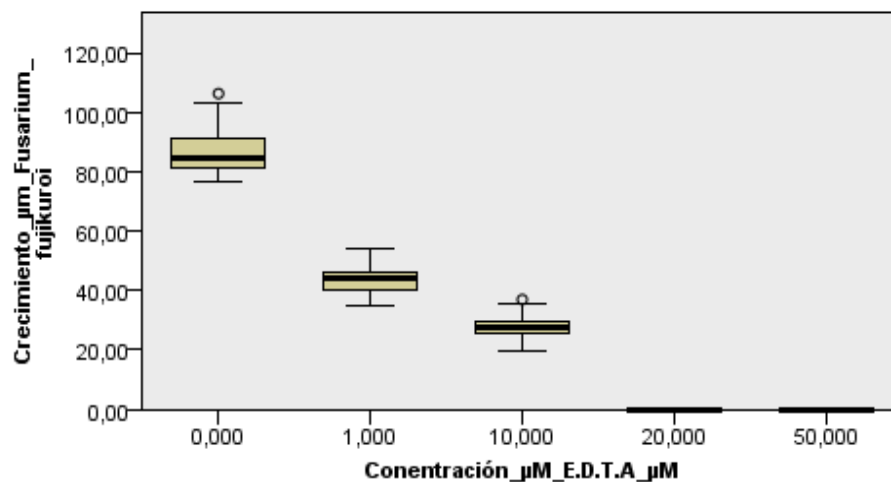
Indicadores	Estadísticas de muestra única				
	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	Varianza
Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium Fujikuroi</i>	100	31.6757	32.80961	3.28096	1076.4
Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium graminearum</i>	100	72.9921	76.84584	7.68458	5905.28
Crecimiento ( $\mu\text{m}$ ) <i>Fusarium oxysporum</i>	100	64.3042	56.26618	5.62662	3165.88

### Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Crecimiento_μm_Fusarium_fujikuroi es la misma entre las categorías de Concentración_μM_E.D.T.A_μM.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.
2	La distribución de Crecimiento_μm_Fusarium_graminiarium es la misma entre las categorías de Concentración_μM_E.D.T.A_μM.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.
3	La distribución de Crecimiento_μm_Fusarium_oxysporum es la misma entre las categorías de Concentración_μM_E.D.T.A_μM.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.

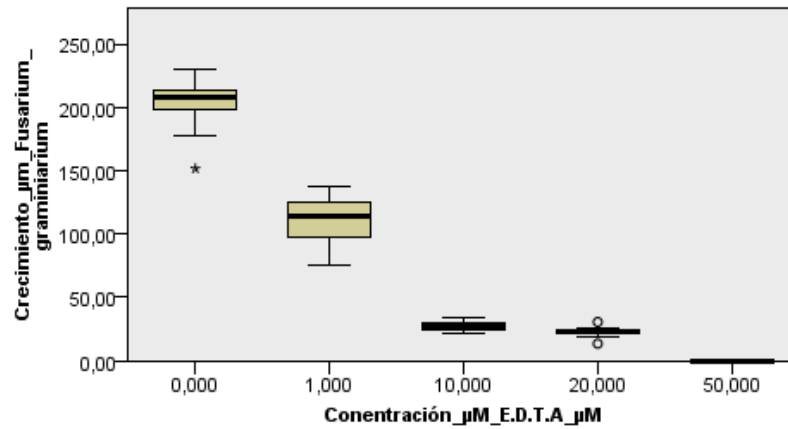
Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

### Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



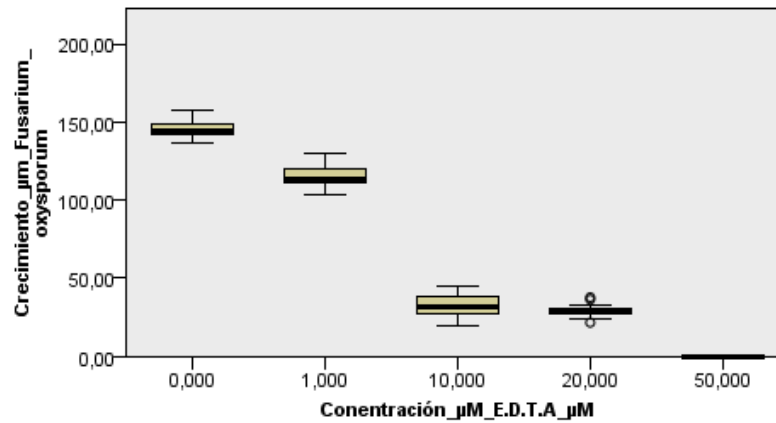
<b>N total</b>	100
<b>Estadístico de contraste</b>	96,217
<b>Grados de libertad</b>	4
<b>Significación asintótica (prueba bilateral)</b>	,000

**Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes**



<b>N total</b>	100
<b>Estadístico de contraste</b>	93,239
<b>Grados de libertad</b>	4
<b>Significación asintótica (prueba bilateral)</b>	,000

**Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes**



<b>N total</b>	100
<b>Estadístico de contraste</b>	91,335
<b>Grados de libertad</b>	4
<b>Significación asintótica (prueba bilateral)</b>	,000

**Anexo 3: Pruebas de Normalidad, intervalo de confianza (ICC95%), gráficos de distribuciones para Inhibición de crecimiento de raíces de *Arabidopsis thaliana***

**Prueba de normalidad**

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

Estadístico de prueba	Crecimiento (cm) de raíz de <i>A. thaliana</i> en contacto con <i>Fusarium Fujikuroi</i>	Crecimiento (cm) de raíz de <i>A. thaliana</i> en contacto con <i>Fusarium graminearum</i>	Crecimiento (cm) de raíz de <i>A. thaliana</i> en contacto con <i>Fusarium oxysporum</i>
N	80	80	80
Media	0.07	0.13	0.19
Desviación estándar	0.02	0.05	0.07
Sig. asintótica (bilateral)	0,002	0,003	0,184

**Intervalo de confianza (ICC 95%)**

Indicadores	Valor de prueba = 0 95% de intervalo de confianza de la diferencia	
	Inferior	Superior
Crecimiento (cm) de raíz de <i>A. thaliana</i> en contacto con <i>Fusarium Fujikuroi</i>	0.0615	0.0698
Crecimiento (cm) de raíz de <i>A. thaliana</i> en contacto con <i>Fusarium graminearum</i>	0.11607	0.13933
Crecimiento (cm) de raíz de <i>A. thaliana</i> en contacto con <i>Fusarium oxysporum</i>	0.1781	0.2073

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

Crecimiento (cm) de raíz de *A. thaliana* en contacto con *Fusarium oxysporum*

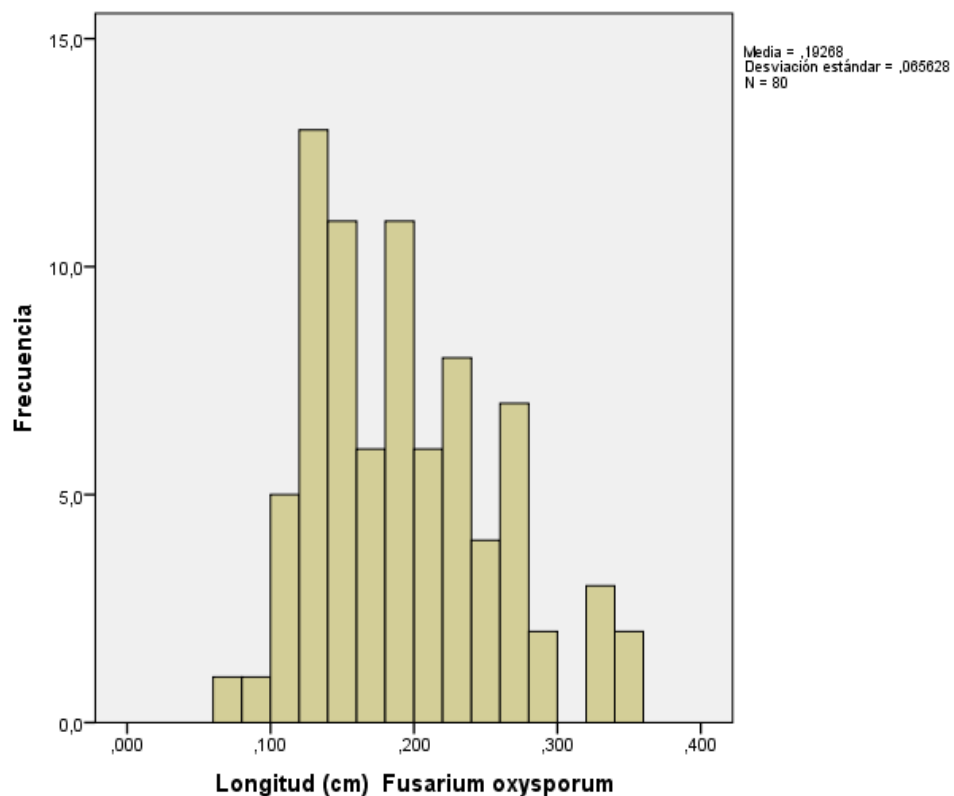
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
3.621	3	76	.017



T3 Dunnett						
(I) Concentración (µm) de péptido		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
T0	1,00	,055500*	.014483	.003	.01520	.09580
	2,00	,113250*	.013275	.000	.07587	.15063
	5,00	,140150*	.013184	.000	.10297	.17733
T1	,00	-,055500*	.014483	.003	-.09580	-.01520
	2,00	,057750*	.010303	.000	.02909	.08641
	5,00	,084650*	.010187	.000	.05629	.11301
T2	,00	-,113250*	.013275	.000	-.15063	-.07587
	1,00	-,057750*	.010303	.000	-.08641	-.02909
	5,00	,026900*	.008380	.016	.00371	.05009
T3	,00	-,140150*	.013184	.000	-.17733	-.10297
	1,00	-,084650*	.010187	.000	-.11301	-.05629
	2,00	-,026900*	.008380	.016	-.05009	-.00371

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Graficas 3.1. Normalidad de Crecimiento (cm) de raíz de *A. thaliana* en contacto con *Fusarium oxysporum*



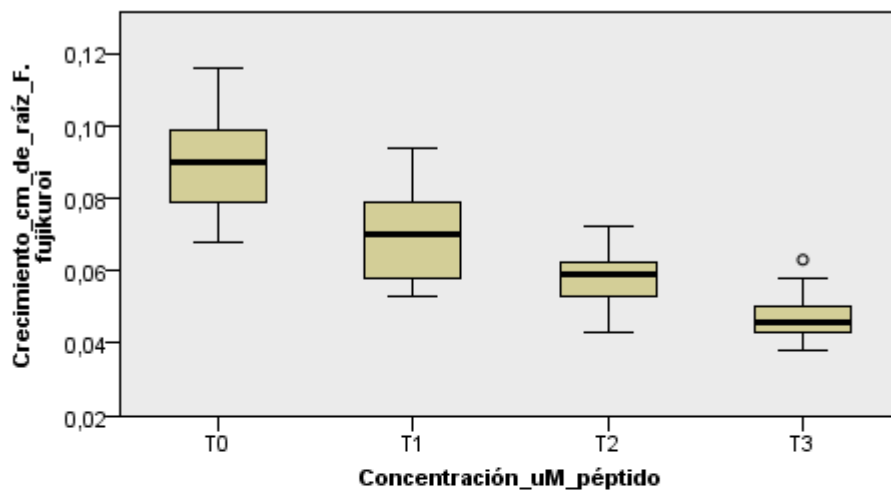
## Prueba de Kruskal Wallis

### Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Longitud_cm_Ff es la misma entre las categorías de Concentración_péptido_um.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.
2	La distribución de Longitud_cm_Fg es la misma entre las categorías de Concentración_péptido_um.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

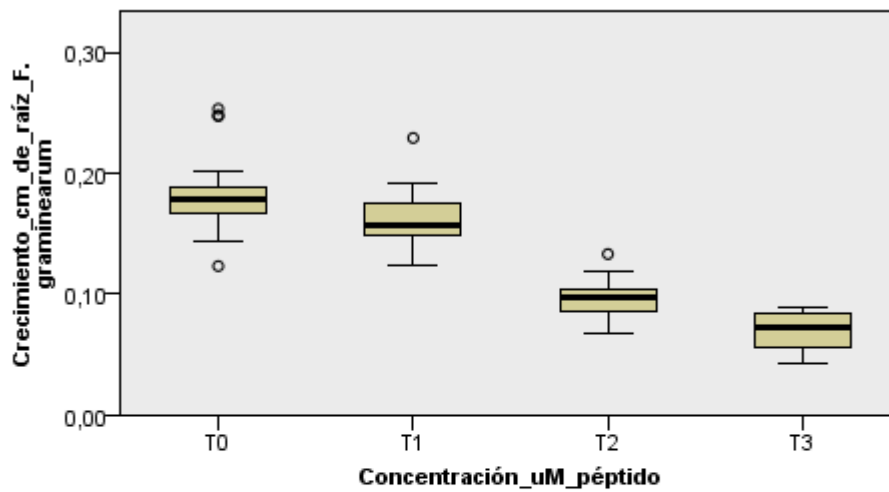
### Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



<b>N total</b>	80
<b>Estadístico de contraste</b>	57,341
<b>Grados de libertad</b>	3
<b>Significación asintótica (prueba bilateral)</b>	,000

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

### Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



<b>N total</b>	80
<b>Estadístico de contraste</b>	64,785
<b>Grados de libertad</b>	3
<b>Significación asintótica (prueba bilateral)</b>	,000

**Anexo 4: Pruebas de Normalidad, intervalo de confianza (ICC95%), gráficos de distribuciones para Inhibición del crecimiento de hipocótilo de *Arabidopsis thaliana***

**Prueba de normalidad**

**Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra**

Estadístico de prueba	Crecimiento (cm) de		
	Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con <i>Fusarium Fujikuroi</i>	hipocótilo en contacto con <i>Fusarium graminearum</i>	Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con <i>Fusarium oxysporum</i>
N	80	80	80
Media	0.75	0.73	0.84
Desviación estándar	0.23	0.26	0.26
Sig. asintótica (bilateral)	0,200	0,200	0,019

**Intervalo de confianza (ICC 95%)**

Variable	Valor de prueba = 0	
	95% de intervalo de confianza de la diferencia Inferior	Superior
Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con <i>Fusarium Fujikuroi</i>	0.6972	0.8014
Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con <i>Fusarium graminearum</i>	0.67066	0.78791
Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con <i>Fusarium oxysporum</i>	0.7795	0.8934

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

Variables	Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con <i>Fusarium Fujikuroi</i>	1.807	3	76	.153
Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con <i>Fusarium graminearum</i>	1.206	3	76	.313

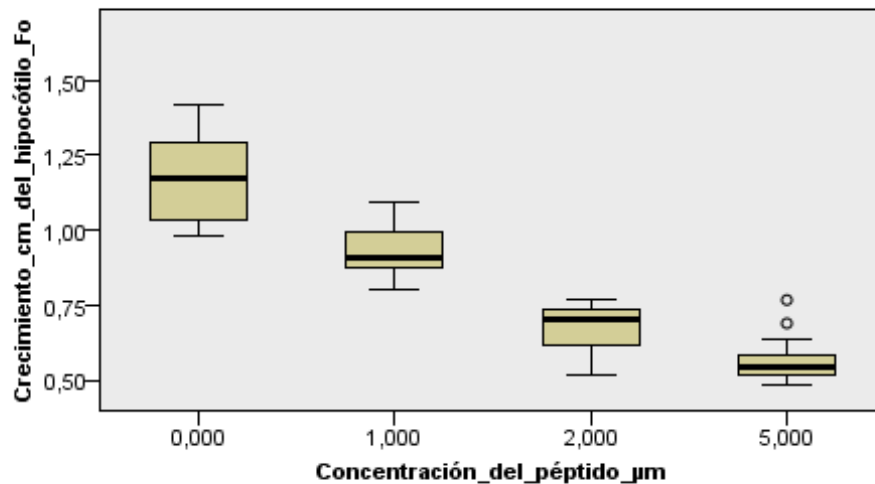
**Prueba de Kruskal Wallis para Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con *Fusarium oxysporum***

**Resumen de contrastes de hipótesis**

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Crecimiento_cm_del_hipocótilo_Fo es la misma entre las categorías de Concentración_del_péptido_μm.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

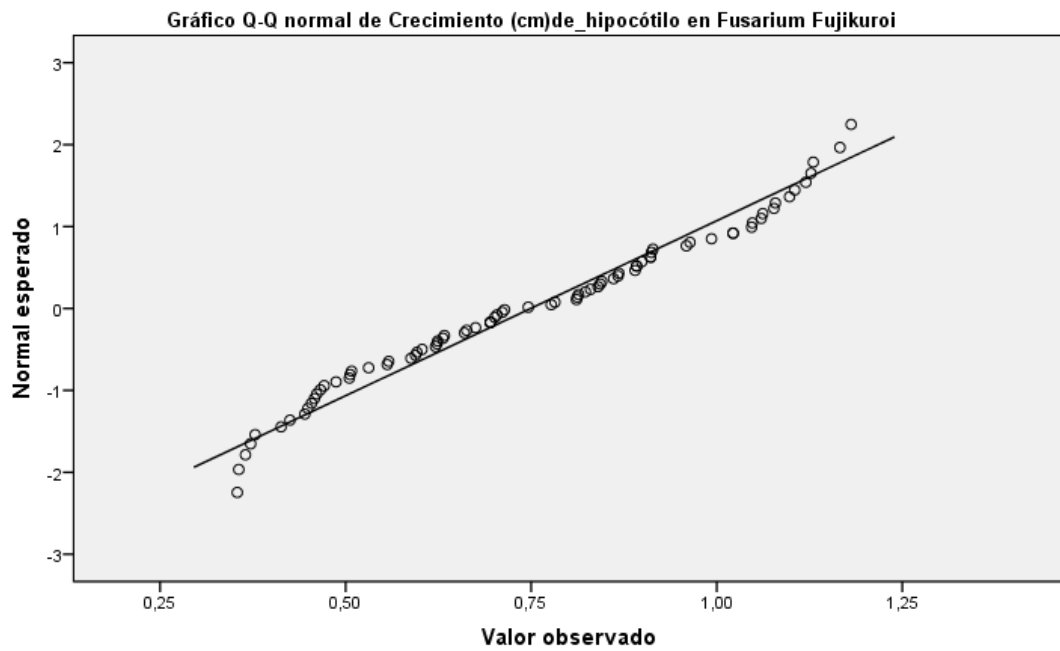
**Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes**



<b>N total</b>	80
<b>Estadístico de contraste</b>	69,082
<b>Grados de libertad</b>	3
<b>Significación asintótica (prueba bilateral)</b>	,000

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

Graficas 4.1. Distribución normal Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con *Fusarium Fujikuroi*



Graficas 4.2. distribución normal Crecimiento (cm) de hipocótilo en contacto con *Fusarium graminearum*

