

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PARA OPTAR A LA LICENCIATURA DE
BIOLOGIA



Efecto de hongos aislados de yuca y sus metabolitos sobre el crecimiento *in vitro* de esta planta

Tutor:

Dra. Nelly Díaz.

Autor:

Br. Daniela Chame Ferreira

Caracas, Octubre de 2010

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mis padres

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que siempre me dieron su ejemplo de lucha, honestidad, cariño, apoyo y las herramientas para seguir adelante.

A mi tutora la Dra. Nelly Díaz por la original combinación que logra realizar entre ser profesional y humana. Gracias a su apoyo y orientación me ofreció la oportunidad de un aprendizaje valioso que me dieron las bases para una visión holística de la biología.

A la Fundación de Estudios Avanzados IDEA por permitir el desarrollo científico de calidad en el país y principalmente a los laboratorios y al personal de Agricultura y Soberanía Alimentaria que siempre fueron muy colaboradores durante la realización de este trabajo.

Al ingeniero Juan Matehus que apoyó la realización de este proyecto y además brindó su valioso conocimiento que fue fundamental para el desarrollo del trabajo práctico y escrito.

A personas importantes cuyos aportes y críticas fueron fundamentales como: Roberto Fernández, Arsenio Rodríguez, Alan Miyadi, Mingrelia España, la Señora María, la profesora Ana Gómez y a mi asesora académica la profesora Enza.

A mis amigos Denis Molina, Daymile Perez, Vanessa Vallar y Carolina Fiol que siempre me ayudaron durante todo el curso de biología.

A Héctor Azpúrua por el apoyo, la comprensión, el aliento, el amor y sobre todo por los momentos de alegría que hacían ver cualquier obstáculo como una meta fácil de alcanzar.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es conocer el efecto que tienen hongos aislados de la yuca (*Manihot esculenta*) y sus metabolitos sobre el crecimiento *in vitro* de estas plantas. Para esto se tomaron muestras de plantas de yuca con síntomas de súper-alargamiento en Masparro, Municipio Cruz Buredes, Edo. Barinas, Venezuela. Las hojas, tallos y peciolo de estas plantas fueron esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% y etanol al 70%. Los microorganismos que crecieron del material vegetal fueron transferidos a agar zanahoria suplementado con ampicilina y carbenicilina a una concentración final de 0,1 mg/mL. Posteriormente se realizó un cultivo monospórico por diluciones seriadas, para lo cual se adicionaron 100 µL de una suspensión de conidios a una concentración de 100 conidios/mL en *tween 20* al 0,005%, a agar agua. Los cultivos axénicos de los 18 hongos aislados se conservaron de dos formas, utilizando el método de Castellani y sumergidos en glicerol al 30%.

Los experimentos se realizaron con las variedades 35 y 98 de plántulas de yuca, proporcionadas por la Agricultura y Soberanía Alimentaria de la Fundación IDEA. Para conocer el efecto de los hongos aislados sobre las plantas de yuca, se utilizaron dos estrategias. Primero, para conocer el efecto de los metabolitos producidos por los hongos, sobre el crecimiento *in vitro* de plantas de yuca, se incubó cada hongo, durante una semana, en un medio de crecimiento rico en carbono y limitado en nitrógeno con una proporción 1:19 C:N. Por cuantificación del consumo de nitrógeno y carbono se determinó la fase del metabolismo alcanzada por los hongos. Posteriormente, el sobrenadante de los hongos incubados se infiltró

en hojas de yuca. Comparando los efectos producidos con un control de ácido acético salicílico, se observó que algunos hongos mimetizaban la respuesta de hipersensibilidad en las hojas. Segundo, se infectaron plántulas de yuca, crecidas *in vitro*, con micelio en crecimiento de los hongos aislados. Los cambios inducidos por los hongos y sus metabolitos fueron analizados realizando un ANOVA donde la variable en estudio fue la longitud de los entrenudos de las plántulas infectadas y de los controles, los cuales fueron plántulas de yuca sin infectar. Los resultados del ANOVA no fueron significativos con respecto a las plántulas control. En el experimento de infección no se observó los síntomas característicos de la enfermedad de súper-alargamiento, sin embargo, cuatro hongos fueron patógenos, causando la muerte de la planta, donde la variedad 35 mostró ser más susceptible que la 98.

1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta*) es una planta perenne y leñosa, perteneciente a la familia *Euforbiaceas*, género *Manihot*. Este género se compone principalmente de arbustos que están distribuidos a lo largo del mundo. La característica principal de la yuca es su capacidad de almacenamiento de almidones en las raíces por lo que éstas constituyen el órgano con mayor valor al ser fuente de carbohidratos en la dieta de millones de personas (Cartay, 2004); sus hojas son consideradas como una fuente suplementaria de proteínas (Nassar & col., 2006). Además de ser una fuente de alimento, es utilizada como materia prima para elaborar fibra para los fabricantes de papel y textiles, almidón para la industria de farmacéuticos y alimentos (Ceballos, 2002).

En Venezuela, la producción de yuca está concentrada en los estados Anzoátegui, Miranda, Monagas, Barinas, Bolívar y Zulia. En el territorio nacional, las demandas de yuca han sido cada vez más crecientes a lo largo de los años; sin embargo, numerosas enfermedades causadas por hongos y bacterias en hojas, tallos y raíces de la planta, pueden ocasionar la pérdida total de la cosecha de la raíz (Cartay, 2004). El conocer las interacciones que la planta de yuca tiene con los microorganismos de su hábitat, puede contribuir a un manejo integrado y sostenible de estas enfermedades.

Las distintas enfermedades de la yuca pueden reducir la capacidad fotosintética de la planta, causar pudriciones radicales, inducir la muerte de los

tejidos invadiendo el sistema vascular, producir manchas, defoliación y marchitez en las hojas, entre otros (Lozano & col., 1981). Entre las enfermedades que ocasionan mayores pérdidas económicas a nivel nacional se encuentran: bacteriosis causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, mancha blanca y mancha parda del follaje, causadas por los hongos *Cercospora caribae* y *Cercospora henningsii*, respectivamente, y la pudrición seca de las estacas causadas por el hongo *Diplodia manihotis* (Montaldo, 1985)

Además de las enfermedades nombradas anteriormente, en Venezuela, Colombia y Brasil se encuentra la enfermedad conocida por súper-alargamiento de tallos y es atribuida al hongo *Sphaceloma manihotica*. Esta enfermedad fue identificada inicialmente por Bitancourt y Jenkins en Brasil en 1950 (citado por Zeigler & col., 1980; Álvarez & col., 2000). La enfermedad se caracteriza por elongación de los entrenudos del tallo, puntos necróticos y deformaciones asociadas a la formación de chancros en las hojas y pecíolo (Alvarez & col., 2002). La súper-elongación es causada por un metabolito secundario, identificado como Giberelina A₄, producido por el hongo *S. manihotica* (Radmacher & col., 1979; Zeigler & col., 1980).

En este trabajo se plantea por primera vez en Venezuela el aislamiento del hongo *S. manihotica* con el interés de obtener giberelinas a partir de él. Las hormonas vegetales como las giberelinas son de gran importancia en los trabajos de propagación de plantas ya sea *in vitro* o en campo. En Venezuela estas hormonas son importadas, encareciendo los costos de propagación de las plantas. En el

campo de la biotecnología, aprovechar al hongo *S. manihotica* sería de gran valor al desarrollo agrícola de país.

Adicionalmente, el aislamiento del hongo *S. manihotica* implica aislar hongos endófitos u otros patógenos que se encuentran en interacción con las partes aéreas de plantas de yuca. Razón por la que se hicieron análisis de los microorganismos con potencialidad biotecnológica a todos los hongos aislados de las hojas, tallos y pecíolos de plantas de yuca con síntomas de súper-alargamiento.

Los análisis realizados buscaron: (i) encontrar metabolitos extracelulares de los hongos filamentosos que fuesen capaces de inducir muerte celular y (ii) encontrar hongos endófitos. En los dos casos, además de la búsqueda de fitohormonas, los resultados serán las bases para empezar las investigaciones en la producción de inductores de las defensas de la planta para contribuir a un manejo de enfermedades más amigable al ambiente y al humano que los usados actualmente, los cuales tienen riesgos para la salud humana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar hongos filamentosos de plantas de yuca con síntomas de súper-alargamiento y determinar el efecto de estos hongos, y los metabolitos extracelulares producidos por ellos, sobre el crecimiento de plantas de la misma especie.

2.2 Objetivos específicos

- Aislar y conservar hongos filamentosos de las partes aéreas de plantas de yuca con síntomas de súper-alargamiento.
- Determinar el efecto de los metabolitos extracelulares de los hongos filamentosos aislados sobre plántulas de yuca obtenidas *in vitro*.
- Determinar el efecto de infectar plántulas de yuca obtenidas *in vitro* con las cepas axénicas de hongos filamentosos aislados.

3. ANTECEDENTES

3.1 Interacciones entre plantas y microorganismos

Las interacciones entre las plantas y microorganismos pueden ser benéficas o perjudiciales. Las interacciones perjudiciales a la planta son conocidas como huésped y no huésped. En las interacciones de huésped la planta provee nutrientes al patógeno. Mientras que en las interacciones de no-huésped la planta no puede mantener el crecimiento del patógeno. Las interacciones de huésped se basan en la habilidad de la planta de reconocer al patógeno y son divididas en interacciones compatibles o no compatibles. En las interacciones compatibles el patógeno invade a la planta, mientras que, en las interacciones incompatibles la planta bloquea el crecimiento del patógeno inmediatamente después de la penetración.

Durante la penetración, las plantas detectan a los patógenos de dos formas paralelas. Primero, mediante el reconocimiento por medio de proteínas extracelulares de Patrones Moleculares Generales Asociados a los Patógenos (PMGAP, siglas en inglés PAMP), como la quitina presente en la pared de los hongos, o la flagelina presente en el flagelo de algunas bacterias. De forma paralela las plantas reconocen elicitores específicos de los patógenos. Este reconocimiento específico es conocido como interacción gen a gen. En esta interacción un determinante específico de resistencia reconoce a un determinante específico de avirulencia en el patógeno. Este reconocimiento es específico entre razas de patógenos y sus huéspedes y la falta de un determinante de resistencia o de avirulencia conlleva a la enfermedad de la planta. El reconocimiento del patógeno

por cualquiera de las dos vías (PMGAP o receptor específico) induce respuestas de defensa de la planta, las cuales en la mayoría de los casos logran bloquear el avance del patógeno. Como parte de las respuestas de las plantas ante el patógeno hay producción y acumulación de fitoalexinas, aumento en la producción de lignina para fortalecer la pared celular, producción localizada de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO, siglas en inglés ROS) y expresión de genes relacionados a la patogenicidad (Díaz, 2009).

La efectividad de la infección del patógeno se debe a que en algunos casos el patógeno evade o suprime las defensas de la planta. Algunas estrategias que poseen los hongos para evadir las respuestas de defensa son por ejemplo, la presencia de enzimas que inactiven el oxígeno reactivo o las moléculas antimicrobianas (saponinas y fitoalexinas) producidas por la planta; también por la producción de compuestos que bloquean el reconocimiento de los receptores PMGAP (Díaz, 2009).

3.2 Metabolitos secundarios

Las plantas, microorganismos y algunos insectos producen una amplia gama de compuestos orgánicos, referidos como metabolitos secundarios, tales como terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides, ligninas, lignanos, flavonoides, cumarinas y estilbenos, que no participan directamente en el crecimiento y desarrollo sino que influyen en las interacciones entre las plantas y su entorno; mientras que los compuestos tales como los lípidos, carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos; conocidos como metabolitos primarios, se encuentran en todas las plantas y desempeñan un papel indispensable en la nutrición y en los procesos metabólicos

esenciales (Croteau & col., 2000). El metabolismo secundario en microorganismos empieza usualmente luego de entrar en la etapa de crecimiento estacionaria y suelen conferir ventajas en la competencia con otras formas de vida presentes en el ambiente. Algunos metabolitos secundarios microbianos son los antibióticos, micotoxinas, los pigmentos y algunas fitohormonas (Calvo, 2000; Aleel, 2006).

3.2.1 Metabolitos secundarios microbianos en interacción con las plantas

Los primeros estudios sobre el efecto de metabolitos microbianos en plantas se llevaron a cabo en el siglo XVIII para entender y controlar una enfermedad del arroz que estaba disminuyendo la producción en China. Las plantas enfermas se caracterizaban por ser de color amarillo claro, con tallos alargados, raíces atrofiadas y poca, o nula, producción de semillas (Aleel K. Grennan, 2006).

No fue hasta 1898 cuando Shotaro Hori (Hori, 1898) descubrió que el agente causante de la enfermedad era un hongo; posteriormente, en 1926 Eiichi Kurosawa determinó que un químico liberado por el hongo *Gibberella fujikuroi*, también conocido como *Fusarium moniliforme*, era el que estimulaba la elongación de los tallos y los demás síntomas (Kurosawa, 1926). Kurosawa también observó que el compuesto podía ocasionar que otras plantas desarrollaran tallos alargados, y en la década de 1930 dicho compuesto fue cristalizado y nombrado *Giberelina* por Teijiro Yabuta y Yusuke Sumiki, llamadas así debido a que fueron aisladas del hongo *Gibberella* (Yabuta & col., 1938).

Los estudios sobre los metabolitos secundarios fueron retomados luego de la Segunda Guerra Mundial. En 1957 Ulrich Weiss, Helen Flon y Willian Burger

obtuvieron pigmentos de los cultivos líquidos de varias especies de *Sphaceloma*. La mayoría de los pigmentos extraídos presentaron el mismo espectro de absorción, indicando que poseen el mismo grupo cromogénico (Weiss & col., 1957). Posteriormente, en 1979 Wilhelm Radmacher y Jan E. Graebe identificaron la Giberelina A₄, cuyo número se basa en el orden de descubrimiento, en el medio de cultivo de *Spaceloma manihotica*, el segundo hongo identificado en la producción de giberelinas luego de *Fusarium moniliforme* (Radmacher & col., 1979). En 1992 continuando sus estudios anteriores, Radmacher investigó veintiocho especies del género *Sphaceloma* por su habilidad de producir giberelinas en sus medios de cultivo (Radmacher & col., 1992).

Sassa y colaboradores en 1989 reportaron la producción de metabolitos secundarios (giberelinas) en los sobrenadantes del medio de cultivo de *Phaeosphaeria* (Sassa & Col, 1989); y en 1991 Matheussen y sus colaboradores identificaron giberelinas producidas por *Sphorisorium reilianum* (Matheussen & col., 1991).

Los metabolitos como las giberelinas, no sólo son producidos por hongos y plantas superiores sino también por bacterias. Los primeros estudios que evidenciaron la producción de metabolitos por bacterias, que estimulaban el crecimiento vegetal, fueron en 1979 donde Tien y colaboradores descubrieron que *Azospirillum brasiliense* tenía un efecto sobre el crecimiento de plantas superiores (Tien & col., 1979). En 1988 Atzorn y colaboradores detectaron giberelinas (GA₁ y GA₄) en diez cultivos de cepas silvestres y mutantes de *Rhizobium phaseoli* (Atzorn & col., 1988). Simultáneamente, Bottini y colaboradores identificaron giberelinas A₁ y

A₃ en cultivos, de *Azospirillum lipoferum*, aislados de plantas superiores con síntomas de elongación (Bottini & col., 1989).

En 1992, Janzen y colaboradores, descubrieron que *Azospirillum brasilense* producía giberelinas en medios de cultivos químicamente definidos y además con otros microorganismos presentes (Janzen & col., 1989). Posteriormente, en 1999 Bastián y colaboradores descubrieron que brotes de *Sorghum bicolor* inoculados con *Acetobacter diazotrophicus*, presentaban una mayor contenido de glucosa y fructosa (Bastián & col., 1999). Para el año 2001, Gutiérrez y colaboradores evidenciaron que la elongación de tallos, de plantas superiores, es promovida por giberelinas sintetizadas por *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* (Gutierrez & col., 2001).

Los efectos de las giberelinas en las plantas superiores han sido ampliamente identificados y conocidos, como la estimulación del crecimiento en tallo y hojas, inducción floral, crecimiento del fruto, etc. Sin embargo, no se conoce el papel que desempeñan en hongos y bacterias, sino que más bien son metabolitos secundarios que juegan un papel como factores de señalización en la planta huésped (Bottini & col., 2004).

3.3 Yuca

La yuca es un arbusto perenne, con ramificación simpódica y con una altura máxima de 3 m. El tallo está formado por alternación de nudos y entrenudos, es cilíndrico con un diámetro de 2 a 6 cm y es de suma importancia en la multiplicación vegetativa de la planta. Las hojas son caducas, constituidas por una lámina foliar, palmeada y lobulada, con peciolo; el color de las hojas varía con la edad de la

planta pudiendo ser púrpura, verde oscuro y verde claro. Las flores se producen en inflorescencias, donde las femeninas ocupan las posiciones basales y las masculinas las distales; no presentan ni cáliz ni corola sino más bien un perianto compuesto de cinco tépalos. El sistema radical es el órgano de la planta que tiene mayor impacto económico por su capacidad de almacenamiento de almidones. Si la planta proviene de la semilla sexual, se forma una raíz primaria que se desarrolla en una raíz tuberosa mientras que si la planta proviene de estacas, las raíces son adventicias, las cuales inician su engrosamiento y son ricas en carbohidratos (Ceballos & col., 2002b).

3.3.1 Enfermedades de la yuca

La yuca es afectada por enfermedades fungosas y bacterianas. Entre las enfermedades fungosas más comunes se encuentran las que causan las manchas foliares, de las cuales, las más relevante son conocidas como mancha parda de la hoja y mancha blanca de la hoja, cuasada por *C. henningsii* y *P. manihotis*, respectivamente. El tallo también es susceptible a la infección por microorganismos, siendo el súper-alargamiento, causado por *S. manihotica*, la enfermedad más común en épocas de lluvia. También, existen enfermedades del tallo cuyo síntoma característico es la pudrición del tejido, entre las más importantes está el necrosamiento del tallo debido a *Glomerella sp.* En el caso de enfermedades que afectan las raíces, el síntoma más común es la pudrición radical, de las cuales las más grave son inducida por el oomiceto *Pythophthora spp* y el hongo *Roselinias spp* (Alvarez & col., 2002).

Entre las enfermedades bacterianas el añublo bacteriano, causado por *Xanthomonas axonopodis* es una de las más limitantes de la producción, su síntoma principal es marchitez de la hoja y necrosamiento de los haces vasculares del tallo y peciolo. Además, existen enfermedades bacterianas que afectan el tallo como la pudrición bacteriana del tallo causada por *Erwinia carotovora*, la cual ocasiona pudrición acuosa y olorosa del tallo o necrosis de la porción leñosa de la planta (Alvarez & col., 2002).

3.3.2 Súper-alargamiento de la yuca por *Sphaceloma manihoticola*

La enfermedad de súper alargamiento es causada por el hongo *S. manihoticola*, el cual crece inicialmente sobre la epidermis de la planta de yuca y posteriormente, luego de su penetración, en los espacios intercelulares de los tejidos de la epidermis y la corteza. Entre los síntomas de la enfermedad se encuentra distorsión o enroscamiento de las hojas, lesiones localizadas en las nervaduras primarias o secundarias, además de manchas blancas irregulares. El tallo es alargado y débil, pudiendo notarse a simple vista que las plantas enfermas son más altas y raquíticas. Se cree que la causa de estos síntomas se debe a la producción de ácido giberélico (AG) o giberelinas producidas por el hongo. Se ha observado que el tipo de enzimas involucradas en la formación de GA son comparables a las mismas de las plantas superiores (Radmacher & col., 1992; Alvarez, E., & Llano, G, 2002).

El género *Sphaceloma*, es clasificado en la clase Ascomycetidae, orden Myriangiales, familia Elsinoeaceae. En 1982 Zeigler y Lozano (Zeigler & col., 1983), aislaron al hongo de plantas infectadas, entre ellas la yuca, y estudiaron su

crecimiento en agar papa (siglas en inglés, PDA). Ellos concluyeron que el color de la colonia era extremadamente variable, dependiente de las condiciones ambientales, en un rango que va desde amarillo, anaranjado, rojo brillante y marrón; los conidios observados eran pequeños, unicelulares y hialinos, empacados en conidióforos (Zeigler & col., 1983).

4. MATERIALES Y METODOS

El capítulo describe los métodos de los componentes de trabajo: (i) Aislamiento y conservación de los hongos de las plantas de yuca; (ii) infección de las plántulas por los hongos aislados y (iv) efecto de los metabolitos extracelulares de los hongos aislados.

4.1 Esterilidad

Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad en cámaras de flujo laminar vertical, marca Nuaire, clase II y de flujo horizontal, marca ESCO clase I.

4.1.1 Desinfección de superficies

En la esterilización de la campana de flujo laminar vertical se utilizó luz ultravioleta debido a que induce la formación de dímeros de timina, entre las bases nitrogenadas adyacentes, inhibiendo el crecimiento de los microorganismos (Bachmann, 1978). Tanto en la campana de flujo laminar vertical y horizontal se utilizó etanol al 70%, como desinfectante bactericida y esporicida. Se utilizó hipoclorito de sodio al 3.5%, para desinfectar el mesón de trabajo. Se utilizó mecheros de etanol para mantener las condiciones de asepsia y para flamear las asas, pinzas, bisturís y las bocas de los tubos de ensayo.

4.1.2 Esterilización de los medios de crecimiento

Los medios de crecimiento se esterilizaron por calor húmedo, combinando con altas presiones. El objetivo principal de este procedimiento fue suministrar suficiente calor que inactive a los microorganismos contaminantes que estén presentes en el medio. Utilizando el autoclave se obtuvo un efecto letal a una temperatura de 121°C, a una presión de 15 psi por 20 minutos, donde la probabilidad de sobrevivencia es nula (Russel & col, 2004).

4.1.3 Esterilización de compuestos sensibles al calor

La esterilización por filtración es un método que permite remover microorganismos, haciendo pasar las soluciones por un filtro cuyo poro impide el paso de las partículas mayores a su diámetro (Russel & col, 2004). En el caso de los compuestos sensibles al calor, como los antibióticos, los extractos de plántulas de yuca y los sobrenadantes de los hongos, se esterilizaron utilizando filtros con poros de 0,2 µm de diámetro.

4.2. Antibióticos

Se utilizaron los antibióticos carbenicilina y ampicilina. Tanto la ampicilina como la carbenicilina son antibióticos beta-lactámicos (Holten & col, 2000) que inhiben la síntesis de la pared celular de las bacterias, inactivando las enzimas transpeptidasas de la superficie interna de la membrana celular; tienen efecto en las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sigma-Aldrich co. 2010)

Se prepararon soluciones madres de la sal disódica de carbenicilina y la sal sódica de ampicilina, marca sigma, en agua destilada estéril, a una concentración de 10 mg/mL y 5 mg/mL, respectivamente. Los antibióticos se almacenaron a -20°C. En el medio de cultivo se utilizaron a una concentración final de 0,1 mg/mL y fueron adicionados después de que los medios fueran esterilizados en autoclave y a una temperatura aproximada de 70-80°C.

4.3 Medios de crecimiento

Un medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos es muy similar a los formulados para plantas, ya que debe contener una fuente de carbono, de nitrógeno, de fósforo y azufre necesarios para la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos. Los micronutrientes como potasio, magnesio, calcio, hierro, y otros, también son necesarios. (Stanier, 1996).

Los medios de cultivo utilizados para la propagación *in vitro* contienen, adicionalmente, microelementos como boro, zinc, magnesio, cobre, molibdeno, hierro y cloro (Roca & col., 1984)

Los medios de cultivo pueden dividirse en dos grupos: definidos e indefinidos o complejos. Los medios químicamente definidos se preparan conociendo las cantidades de los macro y microelementos. Estos medios son útiles para que un experimento sea reproducible. Los medios indefinidos son ideales para el aislamiento y mantenimiento de los microorganismos. En estos medios, las cantidades y proporciones de sus componentes no son críticas, entre ellos se encuentra el agar zanahoria, agar papa y otros (Madigan, 2004).

En este trabajo se utilizaron tanto medios definidos como indefinidos. Entre los medios indefinidos o complejos se utilizaron agar zanahoria para el aislamiento de los hongos, conservación y mantenimiento. Entre los medios definidos se utilizaron agar agua solidificado con *phytagel* para los cultivos monospóricos, el medio definido "A" para la cinética de crecimiento, medio MS (Murashige & Skoog, 1962), para la multiplicación *in vitro* de las plántulas de yuca y el medio para cultivo hidropónico para mantener las plantas de yuca durante la infección.

4.3.1 Agar zanahoria

Se pesaron 200 g de zanahoria, cortadas en trozos y se licuaron con 200 mL de agua destilada y 15 g de agar, hasta que la zanahoria quedó bien licuada. La solución se trasvasó a un frasco de 1 L, se lavó la licuadora con agua destilada y se completó el volumen hasta alcanzar 1 L. Una vez completado el volumen se distribuyó la solución en dos frascos del mismo tamaño, se forraron las tapas con papel aluminio, y se esterilizaron como se describe en la sección 4.1.2. Una vez enfriado el medio se agregaron los antibióticos ampicilina y carbenicilina como se describe en la sección 4.2.

4.3.2 Agar agua para monospórico

Se disolvió en 1 L de agua destilada 10 g de sacarosa y 9.3 g de sulfato de amonio. Se solidificó utilizando 2 g de *phytagel*; posteriormente se esterilizó siguiendo el protocolo de la sección 4.1.2. Una vez enfriado el medio se agregaron los antibióticos ampicilina y carbenicilina como se describe en la sección 4.2.

4.3.3 Agar agua

Se agregó en 1 L de agua destilada 2 g de *phytagel*; posteriormente se esterilizó siguiendo el protocolo de la sección 4.1.2. Una vez enfriado el medio se agregaron los antibióticos ampicilina y carbenicilina como se describe en la sección 4.2.

4.3.4 Medio definido “A” para cinética de crecimiento

En este trabajo para realizar la cinética de crecimiento se utilizó un medio definido llamado “A” (Fraga & Col, 2000) rico en carbono, en el que el nutriente limitante es el nitrógeno a una proporción C:N 19:1. Así, el consumo total del nitrógeno marcará la transición entre el metabolismo primario y el secundario (Tudzynski, 1999). La composición del medio A utilizado es la siguiente:

Tabla I: Composición del Medio “A”

Macroelementos		Microelementos 0.2%:	
$C_6H_{12}O_6$	8%	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1%
Urea	0.36%	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.015%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1%	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.16%
KH_2PO_4	0,0002%	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01%
MES Sigma	100 mM	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.1%
pH 6			

El medio se esterilizó por 15 minutos en un autoclave Market Forge y posteriormente fue suplementado con los antibióticos ampicilina y carbenicilina (sección 4.2), y con un extracto de plántulas jóvenes de yuca, a una concentración

de 3 mg/mL (sección 4.3.4.1), para inducir la producción de metabolitos que se produzcan durante el proceso de infección.

4.3.4.1 Extracto de plántulas de yuca

Cinco plántulas de yuca, cultivadas *in vitro*, se liofilizaron en un liofilizador marca Telstar modelo Cryodos 80; posteriormente se maceraron utilizando un mortero, se pesó la cantidad pulverizada (0,15 g) y se disolvió en 500 µL de agua destilada des-ionizada. El extracto fue esterilizado por filtración, como se describe en la sección 4.1.3. Una vez esterilizado se agregó al medio de cultivo descrito anteriormente (sección 4.3.4).

4.3.5 Medio MS

Utilizado para la propagación *in vitro* de plantas de yuca. La composición se muestra en la siguiente tabla:

Tabla II: Composición del Medio MS propuesto por Murashige y Skoog

Composición del MS para yuca		
P.M.	STOCK 1 (1 litro) 50X	Concentración
80.04	NH ₄ NO ₃	82,5 g/L
101.1	KNO ₃	95,0 g/L
246.48	MgSO ₄ 7H ₂ O	18,5 g/L
136.09	KH ₂ PO ₄	8,5 g/L
STOCK 2 (100 ml) 1000X		
61.83	H ₃ BO ₃	6,2 g/L
169	MnSO ₄ H ₂ O	17,9 g/L
287.54	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6 g/L
241.95	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25 g/L
249.68	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025 g/L
237.93	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025 g/L

P.M	STOCK 3 (100 ml) 1000X	Concentración
166.01	KI	0,83 g/L
	STOCK 4 (100 ml) 345X	
147.02	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,15 g/L
	STOCK 5 (400 ml) 100X	
372.24	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	3,73 g/L
278.05	FeSO ₄ 7H ₂ O	2,785 g/L
	STOCK 6 (200 ml) 100X	
337.3	Tiamina-HCl	0,10 g/L
	STOCK 7 (200 ml) 80X	
180.2	m-Inositol	8 g/L
186.2	ANA (200 ml) 100 ppm	0,1 g/L
346.4	AG₃ (200 ml) 100 ppm	0,1 g/L

4.3.6 Medio Hidropónico

Utilizado para mantener las plántulas de yuca durante el proceso de infección. La composición se muestra en la siguiente tabla:

Tabla III: Composición del medio hidropónico

Composición	Concentración
KNO ₃	50 mg/L
Ca(NO ₃) ₂ •2H ₂ O	25 mg/L
KH ₂ PO ₄	200 mg/L
NaH ₂ PO ₄	50 mg/L
MnSO ₄	10 mg/L
Fertilum®	50 mg/L

4.4 Crecimiento de los hongos

De acuerdo a la finalidad de cada experimento los hongos se crecieron en diferentes medios. Inicialmente se crecieron en agar zanahoria (sección 4.3.1) a 27°C, en oscuridad por 3 días, para aislar hongos del material vegetal. Una vez aislados se crecieron en agar zanahoria (sección 4.3.1) por 15 días a 27°C en

oscuridad, como medio de mantenimiento y para obtener conidios. Se sembraron las diluciones de los conidios en agar agua (sección 4.3.2) a 27°C por 3 días en oscuridad, a fin de obtener cultivos monospóricos.

Para la cinética de crecimiento se crecieron en medio "A" (4.3.4) solidificado con agar a 27°C por 3 días en oscuridad para minimizar el tiempo de adaptación de los hongos durante la cinética. Para el experimento de infección se crecieron en agar agua (sección 4.3.3) a 27°C por 3 días para garantizar que la única fuente de nutrientes provenía de las plántulas de yuca.

4.5 Crecimiento de plántulas de yuca

Para la propagación *in vitro* de plántulas de yuca se sembraron en frascos, con medio MS (sección 4.3.5) solidificado con *phytagel*. Los frascos se colocaron en un cuarto de crecimiento a 28°C y un fotoperiodo de 12 horas.

Para la infección (sección 4.12) y efecto de los metabolitos en las plántulas (sección 4.13), se realizó el siguiente procedimiento: Plántulas de 4 semanas, con raíces desarrolladas, fueron lavadas con agua destilada y transferidas a un sustrato inerte (turba estéril) en cajas de plástico. Posteriormente se adicionó a las raíces de cada plántula 1 µL de la solución hidropónica (sección 4.3.6) cada cuatro días y se llevaron a incubación a 28 °C y un fotoperiodo de 12 horas (figura 1).

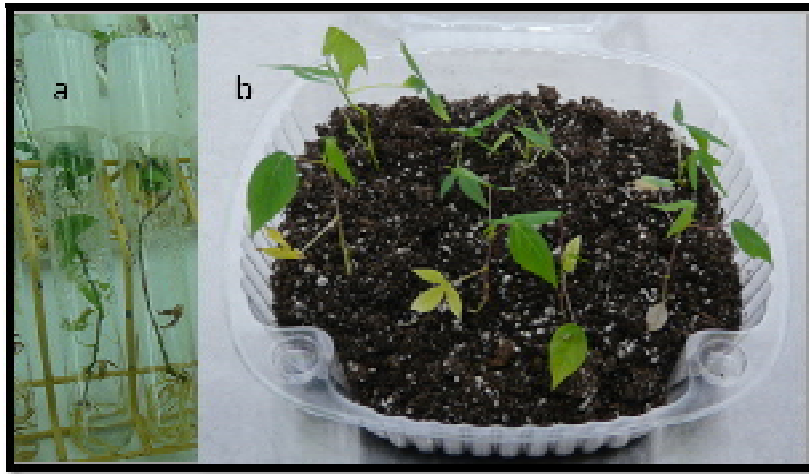


Figura 1: a) Plántulas de 4 semanas con raíces desarrolladas en medio líquido MS. b) Plántulas trasplantadas a turba.

4.6 Aislamiento de hongos

El aislamiento de los hongos se realiza cortando los trozos del tejido de interés y sembrándolo en medios de cultivo. Otro método es soltar las esporas del material infectado directamente sobre una placa de *Petri* con medio de crecimiento, o en una solución con *Tween 20*, para luego recuperarlos por centrifugación y ser sembrados en un medio de crecimiento. (Agrios, 2005, Rondón, 1997).

Dependiendo del interés del investigador, el material vegetal puede ser desinfectado o no, antes de colocarlo en la placa con medio de crecimiento. Para la desinfección se utilizan lavados del material en una solución con hipoclorito de sodio y etanol. Los tejidos desinfectados se colocan en medios con antibióticos si se desean recuperar hongos (Agrios, 2005).

En el presente trabajo se analizaron muestras de yuca con síntomas de superalargamiento recolectadas el 12 de agosto de 2009 en Masparro, Municipio

Cruz Buredes, Edo. Barinas y enviadas por correo a los laboratorios de Agricultura y Soberanía Alimentaria de la Fundación IDEA. Se tomaron muestras de hojas, tallos y peciolo que presentaran cicatrices de color café, según lo reportado para síntomas por infección de *S. manihotica* (Álvarez & col. 2000). De las hojas se cortaron fragmentos de aproximadamente 1 cm² evitando tomar el borde. En total se utilizaron 6 fragmentos de hoja, tallo y peciolo.

Las muestras se desinfectaron bajo condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar horizontal. Para esto, un grupo de fragmentos (hoja, tallo y peciolo) fue sumergido en etanol al 96% por 30 segundos, posteriormente, cada grupo se esterilizó aumentando en 30 segundos la exposición en hipoclorito de sodio al 3%, hasta alcanzar 3 minutos en total. Finalmente cada grupo se lavó tres veces con agua estéril por 30 segundos cada lavado. El exceso de agua se retiró con una toalla de papel estéril y el fragmento se adicionó a placas de *Petri* con agar zanahoria (sección 4.3.3) suplementado con antibióticos (sección 4.2). Las placas se llevaron a incubar (sección 4.4) y se revisaron diariamente para evaluar el crecimiento de los microorganismos a partir del tejido vegetal.

Una vez que la aparición del micelio fue visible, se cortaron trozos del micelio, de hongos con diferencias macroscópicas de crecimiento, y se sembró cada uno en placas de agar zanahoria suplementadas con antibiótico (sección 4.2).

4.6.1 Cultivo axénico o monospórico

Los cultivos monospóricos o axénicos son obtenidos a partir de un conidio o de una célula hifal. Para esto, se prepara una suspensión de conidios a una concentración de 50 a 100 conidios/mL, posteriormente se siembra en agar agua u

otro medio traslúcido y se incubó entre 24 y 36 horas en oscuridad. Trascorrido el tiempo los conidios germinados se observan a simple vista o con ayuda de un estereoscopio y se recolectan con un bisturí o una aguja de disección (Álvarez & col., 2000).

En el presente trabajo los conidios se soltaron de placas con hongos maduros de 15 días de crecimiento. Para soltar los conidios se adicionó 3 mL de una solución de *Tween 20* al 0,005% y con la ayuda de una cucharilla se raspó suavemente el micelio del hongo. La suspensión de conidios se transfirió a un microtubo de 1,5 mL. Se centrifugó a 3000 g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 500 μ L de *Tween 20* al 0,005% y se agitó utilizando un *Vortex*.

Para el conteo de los conidios se utilizó una cámara de *Neubauer*. Para esto, se agregó 10 μ L de la suspensión a la cámara y se contó el número de conidios con la ayuda de un microscopio. Una vez conocido el número de conidios por mililitro, se calculó el título y se hicieron diluciones seriadas hasta alcanzar una concentración de 100 conidios/mL. De esta suspensión se sembraron 50 μ L, 100 μ L y 200 μ L en diferentes placas de agar agua (sección 4.3.4).

Las placas se llevaron a incubar (sección 4.4) y se observaron cada 24 horas, hasta que se vio crecimiento. Una pequeña colonia de micelio (figura 2) fue transferida a una placa agar zanahoria (sección 4.3.1) suplementada con antibióticos (sección 4.2).



Figura 2: Foto tomada al estereoscopio, aumento 2X, en fondo negro, de las colonias formadas a partir de un solo conidio.

Los cultivos obtenidos de esta forma son llamados axénicos o monospóricos, porque las colonias observadas en agar *phytagel* provienen de un solo conidio o célula hifal, esto porque el *Tween 20* disminuye la tensión superficial, es decir, la cantidad de energía necesaria para aumentar la superficie del líquido por unidad de área, permitiendo que los conidios estén más dispersos unos de otros.

4.7 Conservación de los hongos

Existen diferentes métodos para conservar hongos. A largo plazo se utilizan métodos como (i) liofilización, la cual se basa en remover el agua por sublimación al vacío. (ii) Criocongelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, la cual requiere, al igual que la liofilización de protectores de membrana como el glicerol. A corto plazo se utilizan métodos como (i) la suspensión de los hongos en agua destilada, descrito inicialmente por Castellani; (ii) el embebimiento del hongo en glicerol o aceite mineral y (iii) además

de cultivar los hongos cada cierto tiempo en medios adecuados, como agar zanahoria, agar papa, etc. (Alarcón, 2006).

En este trabajo los hongos fueron conservados en agua y en glicerina. Para la conservación con el método Castellani: Luego de realizar los cultivos axénicos y una vez que el micelio del hongo alcanzó el borde de la placa de *Petri*, el micelio se cortó en trozos de aproximadamente 3 mm². Los trozos se transfirieron a un tubo de ensayo previamente estéril y se adicionó agua destilada estéril hasta cubrir los trozos de micelio. Los tubos se guardaron a temperatura ambiente (20-25°C) en oscuridad. Para la conservación en glicerina: Se crecieron los hongos por 15 días en tubos inclinados con agar zanahoria (sección 4.3.1) una vez que el micelio alcanzó todo el tubo, se adicionó una solución estéril de glicerol al 30% (figura 3).

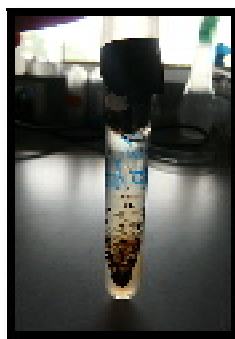


Figura 3: Hongo filamentoso conservado en glicerol al 30%.

4.8 Cinética de crecimiento de los hongos aislados

La cinética de crecimiento puede determinarse de dos formas, primero, realizando cultivos no renovados con un volumen fijo, en donde el medio es continuamente modificado por los microorganismos. Y segundo, cultivos continuos o constantes, en el que el medio fresco es añadido y los metabolitos producidos son

retirados constantemente. Estos cultivos generalmente se realizan en un birreactor o quimiostato (Madigan, 2004).

La metodología utilizada en este trabajo se basó en determinar indirectamente la producción de metabolitos primarios y secundarios en un cultivo cerrado. Para esto se cuantificó glucosa y nitrógeno no consumidos por el hongo. Se conoce que el consumo de glucosa es inversamente proporcional al crecimiento en biomasa (Madigan, 2004) y que además el metabolismo secundario es inhibido por cantidades altas de nitrógeno (Tudzynski, 1999), sólo se producen metabolitos secundarios una vez entrada la fase estacionaria (Demain, 1986), razón por la cual se utilizan el consumo de glucosa y nitrógeno como parámetros indirectos que indiquen la fase del metabolismo en la cual se encuentren los hongos analizados en la cinética.

Los hongos crecidos en agar zanahoria fueron transferidos a agar definido A solidificado (sección 4.3.1), para minimizar el tiempo de adaptación del hongo durante la cinética. Transcurrido tres días, se adicionó un trozo de micelio en crecimiento de 5 mm de diámetro a 2 mL de caldo definido A (sección 4.3.1) en tubos de ensayo de 20 mm de diámetro. Usando 14 tubos por hongo, cada tubo se identificó con una letra, empezando por la letra "A" hasta la letra "N".

Los controles fueron: (i) caldo definido A con antibióticos y extracto vegetal (sección 4.3.2), y (ii) caldo definido A sin extracto de plantas y sin antibióticos. Los controles no fueron inoculados con hongos y fueron tratados en las mismas condiciones que las muestras. Los tubos se colocaron en agitación a 170 rpm entre 26°C y 31°C por cinco días. Debido a limitaciones con el espacio en la incubadora

las muestras se incubaron en dos tandas. En la primera tanda se incubaron las muestras Yu – 1, Yu – 4, Yu – 6, Yu – 10, Yu – 11, Yu – 13 y Yu – 14. Para la segunda tanda se incubaron las muestras Yu – 2, Yu – 3, Yu – 7, Yu – 8, Yu – 12, Yu – 15, Yu – 16 y Yu – 18. Controles independientes se montaron para las dos tandas. Las muestras fueron tomadas así:

Tabla IV. Cronograma de toma de muestra de la primera y segunda tanda para la cinética de crecimiento de los hongos filamentosos aislados.

Primera Tanda	Hora	Día	Segunda Tanda	Hora	Día
Incubación	12:45 pm	Lunes	Incubación	13:20	Lunes
A	5:15 pm	Lunes	A	8:35 am	Miércoles
B	9:15 pm	Lunes	B	12:35 pm	Miércoles
C	12:01 pm	Martes	C	4:35 pm	Miércoles
D	4:07 pm	Martes	D	8:10 pm	Miércoles
E	8:00 pm	Martes	E	9:10 am	Jueves
F	8:35 am	Miércoles	F	1:10 pm	Jueves
G	12:38 pm	Miércoles	G	4:10 pm	Jueves
H	4:38 pm	Miércoles	H	9:05 pm	Jueves
I	8:30 pm	Miércoles	I	8:45 am	Viernes
J	8:35 am	Jueves	J	12:55 pm	Viernes
K	2:35 pm	Jueves	K	16:20 pm	Viernes
L	8:30 pm	Jueves	L	10:00 pm	Viernes
M	9:20 am	Viernes	M	10:55 am	Sábado
N	4:30 pm	Viernes	N	8:50 am	Lunes

Una vez parado el proceso de incubación de cada muestra, el medio sin micelio se transfirió a un microtubo de 2 mL se centrifugó a 13.000 g por 3 minutos. 900 µL del sobrenadante se almacenaron para el bioensayos con la plántula de yuca (sección 4.14) y aproximadamente 700 µL del sobrenadante se almacenaron a – 20°C para la cuantificación de glucosa (Sección 4.10) y nitrógeno (Sección 4.11). La biomasa de los hongos se almacenó a -80 °C.

4.9 Cuantificación de glucosa

Existen dos técnicas principales para la cuantificación de glucosa. La primera es un método colorimétrico como el de Fehling y Benedict, basado en la propiedad reductora de la glucosa (Fehling, 1849; Benedict, 1908). La otra técnica es enzimática en la que se detecta glucosa por la glucosa oxidasa, la cual es una enzima que cataliza la oxidación de la glucosa a b-D-gluconolactona consumiendo oxígeno y formando peróxido de hidrógeno. La reacción se puede medir espectrofotométricamente mediante una segunda reacción indicadora para la cual se añade al medio peroxidasa de rábano silvestre (HRP), que elimina el peróxido de hidrógeno generando un color que se puede medir en el espectrofotómetro (Keston, 1956; Trinder, 1969).

En este trabajo para la cuantificación de la glucosa no consumida por los hongos filamentosos se utilizó el método enzimático siguiendo las instrucciones del inserto proporcionado por el kit comercial marca Qualitest.

El kit contiene las siguientes soluciones: (i) solución patrón de glucosa 1 mg/mL. (ii) viales de enzimas (iii) viales de sustrato y (iv) solución tampón. Las instrucciones de uso del inserto son: para hacer el reactivo de reconstitución se agregan 0,1 mL de enzima y 0,1 mL de sustrato por cada 10 mL de solución tampón. Para la reacción se mezclan 10 μ L de la muestra o patrón con 1 mL del reactivo de reconstitución. Se incuban por 10 minutos a 37°C o por 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se lee a 510 nm. El color es estable por una hora.

4.9.1 Determinación de la longitud de onda de máxima absorción del producto de la peroxidasa de rábano

Siguiendo las instrucciones de Qualitest para la cuantificación de la glucosa, y utilizando el patrón de glucosa del kit, se midió la absorbancia a las longitudes de onda: 400, 450, 460, 470, 480, 490, 495, 500, 505, 510, 520, 530, 540, 550, 600, 650 y 700 nm.

4.9.2 Sensibilidad del método enzimático para la cuantificación de glucosa

Para conocer el intervalo óptimo de concentraciones a las cuales el kit enzimático marca Qualitest es sensible, se realizó una curva *Ringbom* (Ringbom, 1939) haciendo diluciones de la solución patrón de glucosa proporcionada por el kit. Las concentraciones utilizadas para hacer la curva *Ringbom* fueron: 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 2500 y 5000 µg de glucosa/mL

4.9.3 Cuantificación de la glucosa no consumida por los hongos

Se realizaron diluciones seriadas 1/100 de cada muestra. La cuantificación se realizó siguiendo las proporciones de reacción del fabricante, con los siguientes cambios de volumen: La reacción se hizo con 100 µL del reactivo de reconstitución y 10 µL de las muestras diluidas. Cada reacción se colocó en pozos de placas 96 pozos. La absorbancia a la máxima longitud de onda se determinó en un espectrofotómetro Synergy HT. Se realizó una curva de calibración, utilizada como control, todas las veces que se analizaron las muestras. La concentración de los

controles fueron: 1, 5, 10, 50, 100, 200, 400, 800 μg de glucosa/mL. Las muestras cuyos valores de absorbancia fueron mayores al límite máximo de la curva de calibración se volvieron a diluir con un factor de dilución de 2.

Una vez analizadas las muestras en el espectrofotómetro, se calculó la concentración de glucosa, despejando la variable X de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración.

4.10 Cuantificación de nitrógeno

El nitrógeno total puede ser cuantificado colorimétricamente por métodos como el de Kjeldahl (Fleck, 1969). Existen métodos enzimáticos para cuantificar nitrógeno en forma de urea. La enzima ureasa cataliza la hidrólisis de la urea en amoníaco y anhídrido carbónico. La urea se cuantifica a partir del amonio liberado, que puede ser medido con varios reactivos. La reacción de *Berthelot* es la más utilizada, en la cual el amonio reacciona con hipoclorito dando cloramina que en presencia de fenol produce un derivado indofenólico de color azul en medio alcalino (Fawcett & Scott, 1960). Se puede cuantificar urea enzimáticamente por una reacción en presencia de ureasa que produce amonio. El amonio a su vez reacciona en presencia de hipoclorito, fenol y nitroprusiato de sodio produciendo un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de urea (Borsook, 1935).

En este trabajo para la cuantificación de urea no consumida por los hongos se utilizó el método enzimático siguiendo las instrucciones del inserto proporcionado por el kit comercial marca Qualitest.

El kit contiene las siguientes soluciones: (i) solución patrón de urea 0,3 mg/mL. (ii) solución alcalina (iii) solución de enzimas y (iv) solución fenólica. Las instrucciones de uso del inserto son: Mezclar la solución enzimática y la solución fenólica a una proporción de 0,25 a 1 (reactivo 1). Mezclar 1,25 mL del reactivo 1 con 10 μ L de la muestra o patrón. Incubar por 5 minutos a 37°C. Mezclar 1 mL de la solución alcalina e incubar por 10 minutos a 37°C. Leer en el espectrofotómetro a 580 nanómetros. El color es estable por una hora.

4.10.1 Determinación de la longitud de onda de máxima absorción del derivado indofenólico

Siguiendo las instrucciones de Qualitest para la cuantificación de urea, y utilizando el patrón de urea del kit, se midió la absorbancia a las longitudes de onda: 400, 450, 500, 505, 550, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 635, 640, 645, 650, 655, 700, 750, 800, 850 y 900 nm.

4.10.2 Sensibilidad del método enzimático para la cuantificación de urea

Para conocer el intervalo óptimo de concentraciones a las cuales el kit enzimático marca Qualitest es sensible, se realizó una curva *Ringbom* (Ringbom, 1939) haciendo diluciones de la solución patrón de urea proporcionada por el kit. Las concentraciones utilizadas para hacer la curva *Ringbom* fueron: 1.2, 4.8, 10.2, 49.8, 102, 450, 900 y 1500 μ g de urea/mL

4.10.3 Cuantificación de la urea no consumida por los hongos

Para la cuantificación de urea no consumida, se utilizaron las diluciones 1/100 de las muestras. Para la determinación de urea se realizan dos reacciones. En la primera reacción se agregó 10 μL de la muestra diluida, 125 μL del reactivo 1; se incubó por 5 minutos a 37°C. En la segunda reacción se agregó en la mezcla anterior 100 μL de solución alcalina y se incubó por 10 minutos a 37°C. Ambas reacciones se hicieron en pozos de placas de 96 pozos. La absorbancia a la máxima longitud de onda se determinó en un espectrofotómetro Synergy HT. Se realizó una curva de calibración, utilizada como control, todas las veces que se analizaron las muestras en una placa de 96 pozos, la concentración de los controles fueron: 1.2, 4.8, 10.2, 49.8, 102 μg de urea/mL.

Una vez analizadas las muestras en el espectrofotómetro, se calculó la concentración de urea, despejando la variable X de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración.

4.11 Propagación *in vitro* de plántulas de yuca

El cultivo de tejidos *in vitro* consiste en aislar una porción de la planta y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas que permitan que las células se desarrollen sin contaminantes (Roca & col., 1984).

Los sistemas de propagación *in vitro* utilizados en yuca se dan a partir de meristemos apicales o entre nudos y de embriones somáticos obtenidos a partir de hojas inmaduras o meristemos apicales. Debido a la totipotencialidad de las células en los meristemos es rápido obtener y propagar plántulas a partir de meristemos,

por lo cual esta es la técnica más usada para la propagación *in vitro* de yuca (Roca & col., 1984, Szabados & col., 1987).

Las plántulas de yuca utilizadas en este trabajo fueron obtenidas del laboratorio de propagación masiva de yuca de la Fundación IDEA. Estas plántulas fueron obtenidas a partir de meristemos de plantas tratadas térmicamente. Los clones de yuca usados en este ensayo fueron el 35 y el 98.

La propagación se realizó en condiciones de esterilidad de la siguiente forma: en la campana de flujo laminar horizontal se destaparon los frascos con las plántulas madres; utilizando una pinza larga se extrajo la plántula y se colocó sobre una cápsula de *Petri*. Se eliminaron las hojas y raíces con un bisturí. El tallo se seccionó en varios segmentos que contengan al menos una yema axilar. Los segmentos se cultivaron en un frasco con agar nutritivo MS (sección 4.3.5) y se llevaron a incubar (sección 4.5). Después de 6 semanas de cultivo se obtienen plántulas desarrolladas (con vástagos y raíces), las cuales se vuelven a multiplicar siguiendo el procedimiento descrito (figura 4).

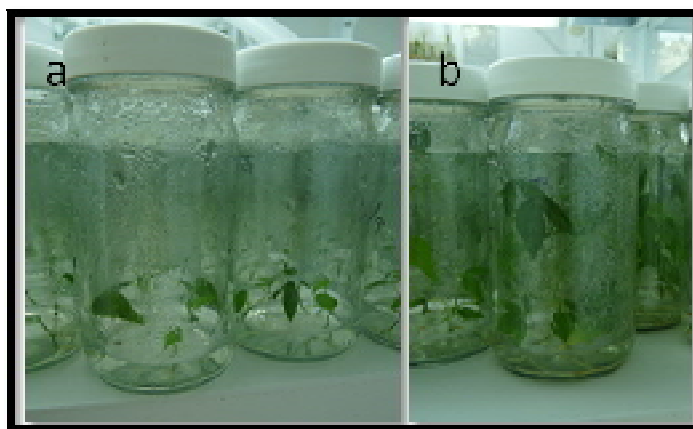


Figura 4: a) foto de plántulas de 2 semanas de crecimiento. b) foto de plántula de 4 semanas de crecimiento.

4.12 Infección de plántulas de yuca con los hongos aislados

La metodología propuesta por Zeigler y colaboradores y Álvarez y colaboradores (Zeigler & col., 1980 y Álvarez & col., 2000) se basa en crecer al hongo por varios días ya sea en un medio líquido Czapek o en un medio sólido, hasta producir esporas. Una vez producidas las esporas se calcula el título y se ajusta la concentración en un rango de 10^5 a 10^6 conidios/mL. Las plántulas pueden o no tener un tratamiento previo para facilitar la entrada del hongo. La infección se realiza rociando las esporas, con un atomizador manual, en el tallo, hojas y peciolo. Se incuban a una temperatura entre 18 – 28 °C y se evalúan los efectos luego de 15 días de infección.

En este trabajo las plantas, en sustrato inerte (sección 4.5), de seis semanas fueron infectadas con los hongos aislados. Hojas basales de las plantas fueron tratadas con carborundo N° 2 para facilitar la entrada de los hongos y posteriormente se colocó un fragmento de 5 mm de diámetro del micelio en crecimiento en agar agua (sección 4.3.3 y 4.4). Se infectaron 4 plántulas de cada clon por hongo. Los controles fueron plántulas tratadas con carborundo y agar agua y plántulas sin ningún tratamiento (figura 5). Las plántulas infectadas se llevaron a incubar (sección 4.5).



Figura 5: Foto de plántulas infectadas con los hongos filamentosos aislados. Se observa en las hojas los fragmentos de agar.

El efecto de los hongos sobre las plántulas se evidenció por comparación con los controles centrándose en la presencia de necrosis y elongación de los entrenudos.

4.12.1 Análisis de los datos obtenidos de la longitud de los entrenudos

Para cada una de las plántulas infectadas se midieron la longitud de los entrenudos luego de 38 días de infección. Los datos recolectados por hongo se compararon entre sí, y con los controles, mediante un ANOVA de un solo factor. Para el análisis estadístico se utilizó el Software Minitab 15, el cual es un programa

de computadora diseñado para ejecutar funciones estadísticas básicas y avanzadas.

El ANOVA de un solo factor permite comparar varios grupos en una variable cuantitativa, en este caso la longitud de los entrenudos. A la variable categórica o nominal que define a los grupos se denomina factor y en este caso es el tratamiento con cada hongo y los controles.

La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA de un factor es que las medias poblacionales son iguales (hipótesis nula). En este experimento se considera como una población las plántulas infectadas por un hongo y los controles.

Inicialmente para hacer un ANOVA es necesario realizar una prueba que compruebe que la distribución de la población es normal, es decir, en forma de campana de Gauss. Utilizando el software Minitab 15 se realizó un histograma para comprobar la distribución de los datos. En el histograma, el eje de las X está dividido en secciones y representa los valores de la variable observados. El eje de las Y representa la frecuencia con la que los valores observados se ubican en cada sección.

En el análisis de varianza la hipótesis nula se acepta o se rechaza de acuerdo al valor de un estadístico, en este caso, el estadístico F, el cual es una estimación de la varianza poblacional basada en la variabilidad existente entre las medias de cada grupo. A partir del estadístico F se determina el nivel crítico o nivel de significación observado P, es decir, la probabilidad de obtener valores como los obtenidos o mayores. Para saber si se rechaza la hipótesis nula o no, se compara el valor P con α , definido como la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando es

falsa. Si la probabilidad P es menor a α se rechaza la igualdad de medias, en caso contrario, se acepta.

4.13 Efecto de los metabolitos extracelulares de los hongos aislados sobre plántulas de yuca obtenidas *in vitro*

Para determinar el efecto que tienen los metabolitos extracelulares de los hongos aislados se realizaron cinéticas de crecimiento (sección 4.8) en las que se determinaron el consumo de carbono y nitrógeno por el hongo (sección 4.9 y 4.10).

En este trabajo los análisis de la cuantificación de glucosa y de la urea determinaron la muestra con los metabolitos del hongo a ser usada. Se seleccionó la última muestra de la cinética en la cual hay más producción de metabolitos por los hongos.

Hojas de plántulas en sustrato inerte de 6 semanas fueron infiltradas con la ayuda de una jeringa de 1 mL con sobrenadante estéril de los hongos obtenidos en la cinética de crecimiento (sección 4.1.3 y 4.9). Las plántulas control se infiltraron con (i) los sobrenadantes obtenidos de los controles en la cinética de crecimiento; (ii) ácido salicílico 1.8 mg/mL en etanol y (iii) etanol al 100%. Se llevaron a incubar a 28°C por seis días. El efecto de los sobrenadante sobre las plántulas se evidenció por comparación con los controles centrándose en la presencia de necrosis.

5. RESULTADOS

El capítulo describe los resultados obtenidos al haber aplicado los métodos descritos en la sección 4 para lograr los objetivos del trabajo.

5.1 Aislamiento y conservación de hongos filamentosos de las partes aéreas de plantas de yuca.

De las plantas de yuca con síntomas de súper-alargamiento se aislaron 18 hongos filamentosos con morfología macroscópica diferente. Cada hongo fue identificado con las iniciales Yu, seguido de un número (ej. Yu – 1, Yu – 2, etc.) (figura 6). Posterior a tener los cultivos axénicos, estos fueron conservados utilizando el método de Castellani (Castellani, 1963). Utilizando este método de conservación los hongos identificados como Yu – 5 y Yu – 9 no pudieron ser activados nuevamente en agar, por lo que el resto de los experimentos se realizaron sin éstos hongos. Los hongos restantes fueron conservados en glicerol al 30% mostrando crecimiento normal después de su activación. Todos los experimentos fueron realizados con cultivos provenientes de los cultivos axénicos conservados, con un máximo de tres repiques en cada activación.

Con respecto a las características macroscópicas resaltantes se observó para Yu – 1, Yu – 3, Yu – 7 y Yu – 13 (tabla V) un crecimiento de la colonia joven de forma gelatinosa y la aparición de micelio aéreo luego de una semana de haber sembrado la colonia. Entre las características observadas al microscopio destacan los hongos identificados como Yu – 8, Yu – 13 y Yu – 19 por la presencia de macroconidias curvadas, pluriseptadas en forma de media luna.

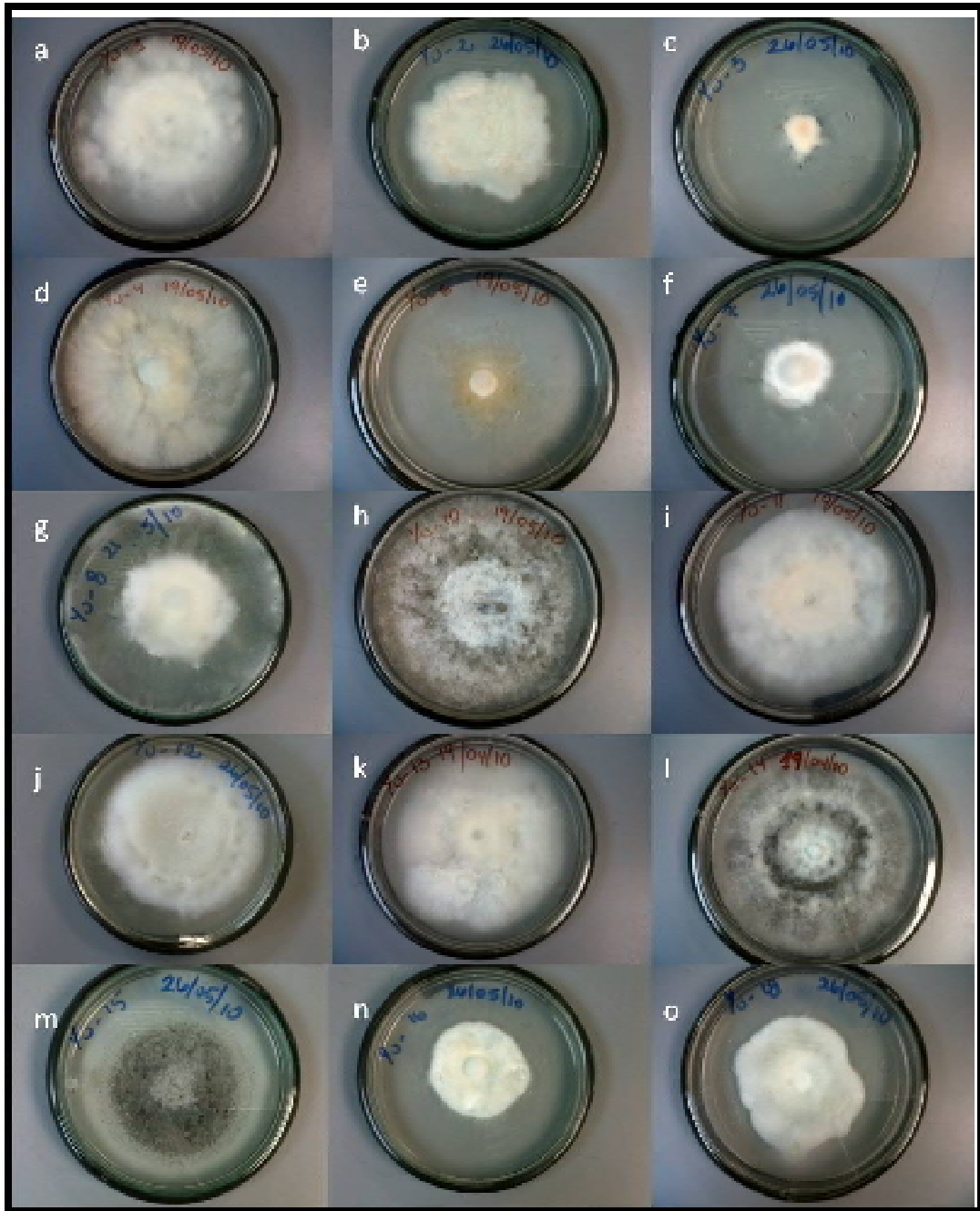


Figura 6: Hongos filamentosos en medio A, con 10 días crecimiento. a) yu-1, b) yu-2, c) yu-3, d) yu-4, e) yu-5, f) yu-7, g) yu-8, h) yu-10, i) yu-11, j) yu-12, k) yu-13, l) yu-14, m) yu-15, n) yu-16, o) yu-18.

Tabla V: Características morfológicas de los hongos en agar definido A de 10 días de crecimiento

Hongo	Color ^a	Crecimiento ^b	Micelio aéreo ^c
Yu -1	Blanco	Irregular	+*
Yu -2	Blanco	Irregular	+
Yu -3	Rosado +	Irregular	+*
Yu -4	Rosado -	Regular	+
Yu -6	Anaranjado	Regular	+
Yu -7	Amarillo -	Regular	+*
Yu -8	Blanco	Regular	+
Yu -10	Blanco *	Regular	+
Yu -11	Rosado -	Regular	+
Yu -12	Blanco	Regular	+
Yu -13	Blanco	Regular	+*
Yu -14	Gris	Regular	+
Yu -15	Gris	Regular	-
Yu -16	Blanco	Regular	+
Yu -18	Blanco	Irregular	+

a Colores de las diferentes colonias: (+) = intenso, (-) = claro. (*) = manchas de color gris.

b El crecimiento regular: agrandamiento concéntrico del micelio, crecimiento irregular: los bordes del micelio son asimétricos.

c Presencia (+) o ausencia (-) del micelio aéreo. (*) = hongos que inicialmente no presentaron micelio aéreo sino después de una semana.

5.2 Efecto de los metabolitos extracelulares de los hongos aislados sobre plántulas de yuca.

Para probar el efecto de los metabolitos extracelulares se incubaron los hongos axénicos en el medio determinado A, tomando muestras como se indica la sección 4.8. Se evaluó el consumo de glucosa y urea, en función del tiempo, por cada hongo y, posteriormente, de acuerdo a los resultados de las curvas de crecimiento, los sobrenadantes que permanecieron más tiempo en incubación con los hongos, se infiltraron en hojas de yuca de las variedades 35 y 98.

5.2.1 Cinética de crecimiento

El crecimiento de los hongos en el medio determinado A se evaluó de acuerdo al consumo de glucosa y urea. Todos los hongos, excepto Yu – 19, desarrollaron micelio suficiente para incubar 14 tubos por hongo.

Antes de cuantificar el consumo de glucosa y urea se comprobó la calidad y el buen funcionamiento de los kit comerciales, marca Qualitest®, utilizados. Para cada kit se realizó una curva de absorbancia en función de la longitud de onda y una curva *Ringbom*.

La curva absorbancia en función de la longitud de onda determinó que la máxima absorbancia, para la cuantificación de glucosa es de 505 nm (figura 6) y de 655 nm para la cuantificación de urea (figura 7).

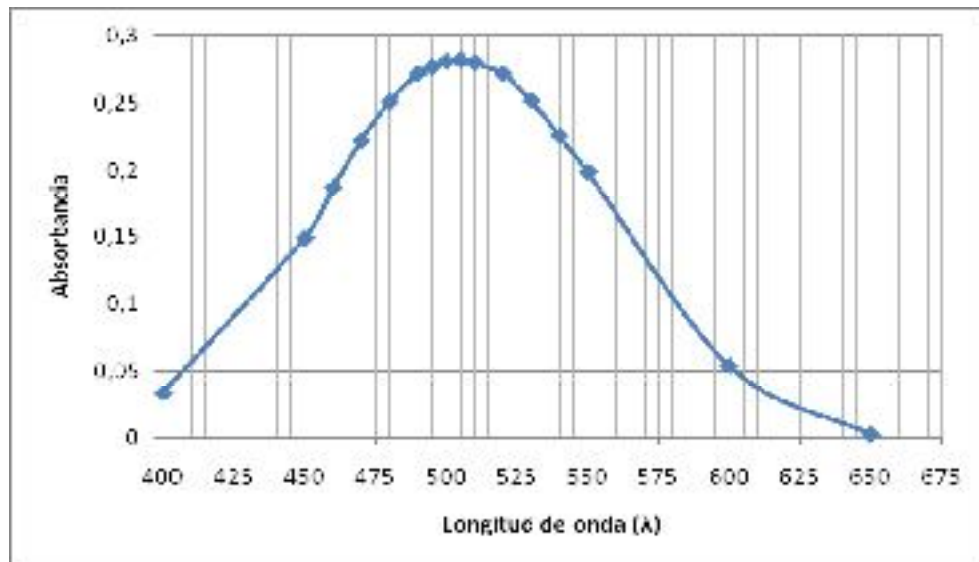


Figura 6: Curva de absorbancia para determinar la absorción máxima para cuantificación enzimática de glucosa usando el kit marca Qualitest.

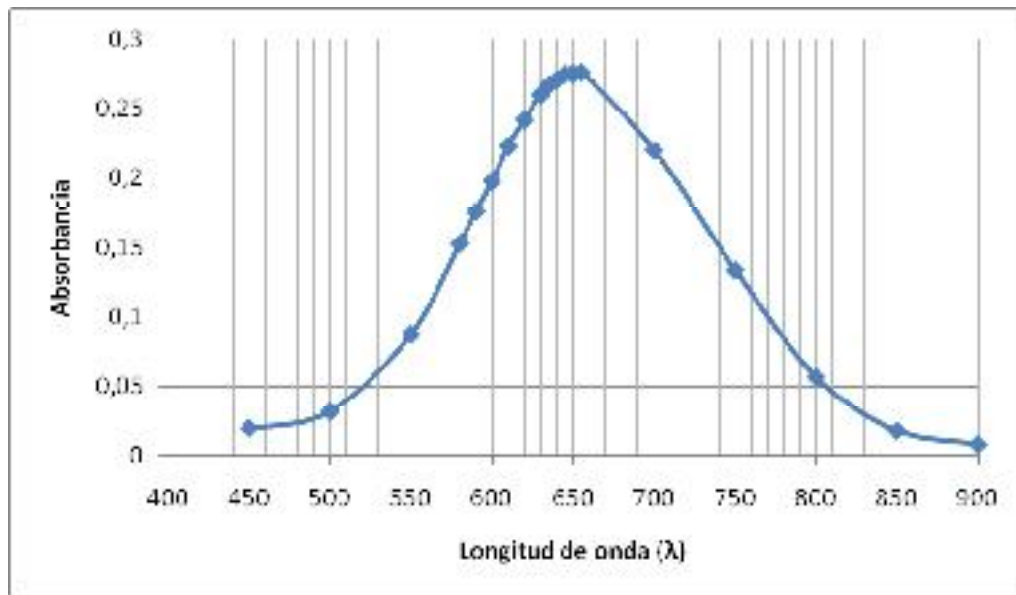


Figura 7: Curva de absorción para determinar la absorción máxima para cuantificación enzimática de urea usando el kit marca Qualitest.

Una vez conocida la longitud de onda de máxima absorción para la cuantificación enzimática de glucosa y urea, bajo las condiciones del fabricante, se realizaron las curvas de *Ringbom* para determinar los rangos de detección de las pruebas. Para el kit de cuantificación de glucosa los resultados de la curva de *Ringbom* (figura 8) muestran que tiene una sensibilidad de 0 a 800 μg de glucosa/mL (línea roja de la figura 8). A mayores concentraciones (línea azul de la figura 8) se observa una pérdida de linealidad.

Se realizaron diluciones 1/100 de las muestras (sobrenadante) porque inicialmente la concentración de glucosa es de 80000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, superior a la concentración máxima de la curva de calibración. Al realizar una dilución 1/100 la concentración de glucosa se encuentra dentro del rango de sensibilidad del kit.

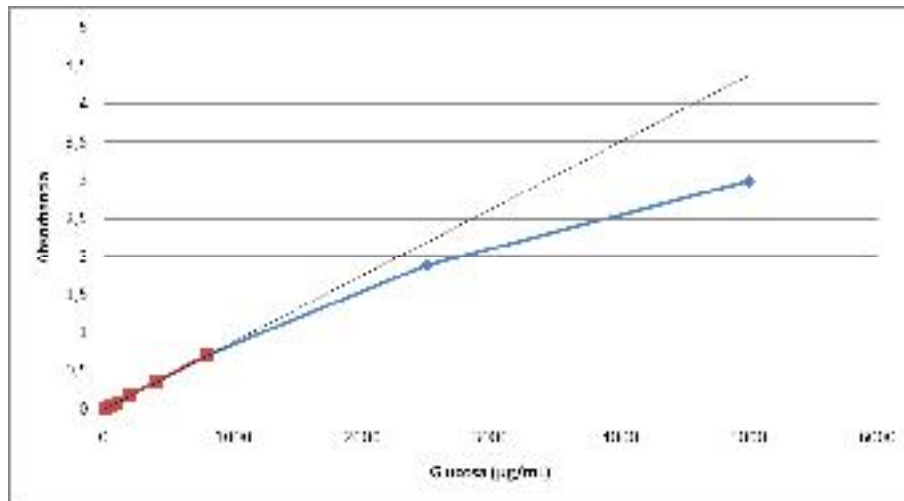


Figura 8: Curva Ringbom para determinar los rangos de detección de glucosa del kit marca Qualitest. En rojo la parte lineal de la curva con su respectiva línea de tendencia. En azul la curva obtenida a diferentes concentraciones de glucosa.

El kit de cuantificación de urea marca Qualitest presenta un rango de sensibilidad de 0 a 102 µg de urea/mL de urea (figura 9, línea roja). A mayores concentraciones se pierde la linealidad (figura 9, línea azul).

Para cuantificar urea en los sobrenadantes de las muestras se utilizaron las diluciones 1/100 porque inicialmente la concentración de urea es de 3600 µg/mL. Al realizar una dilución 1/100 la concentración de urea se encuentra dentro del rango de sensibilidad del kit.

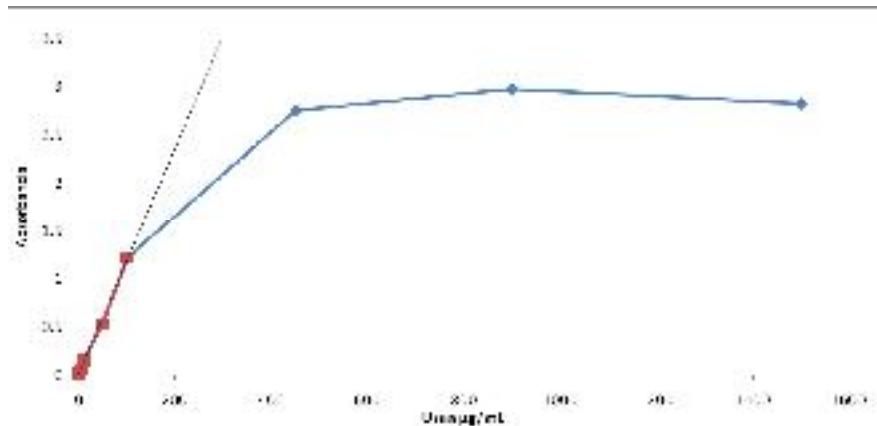


Figura 9: Curva Ringbom para determinar los rangos de detección urea del kit marca Qualitest. En rojo la parte lineal de la curva con su respectiva línea de tendencia. En azul la curva obtenida a diferentes concentraciones de urea.

La concentración de la glucosa y urea en el sobrenadante de cada hongo se determinó con base en la ecuación de la recta de la curva de calibración (figuras 10 y 11).

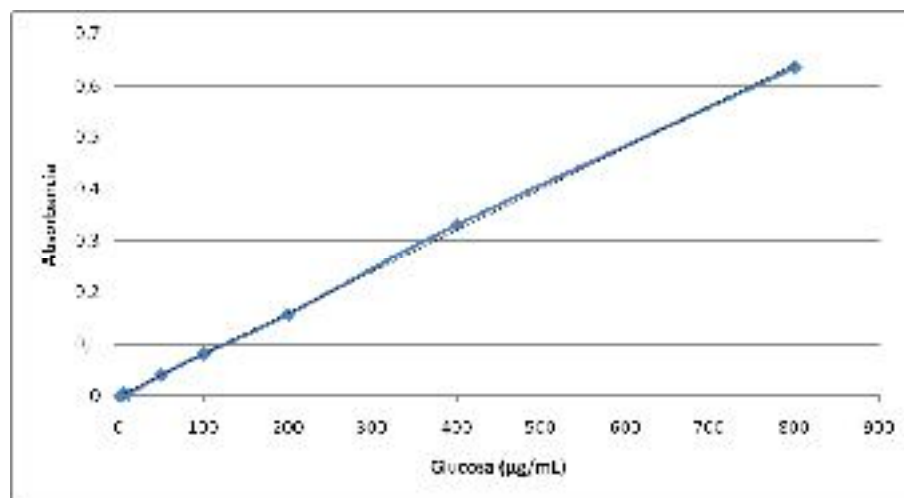


Figura 10: Curva de calibración de glucosa. Ecuación de la recta: $y = 0,0008x + 0,001$. $R^2 = 0,9995$.

Las ecuaciones y el error de las diferentes curvas de calibración realizadas fueron:

Tabla VI. Ecuaciones y error de las curvas de calibración realizadas para la cuantificación de glucosa

Ecuación	Coficiente de determinación
$y = 0,0009x + 0,0026$	$R^2 = 0,9997$
$y = 0,0008x + 0,0017$	$R^2 = 0,9999$
$y = 0,0009x - 0,0014$	$R^2 = 0,9999$
$y = 0,0009x - 0,0025$	$R^2 = 0,9998$
$y = 0,0011x - 0,0166$	$R^2 = 0,9972$

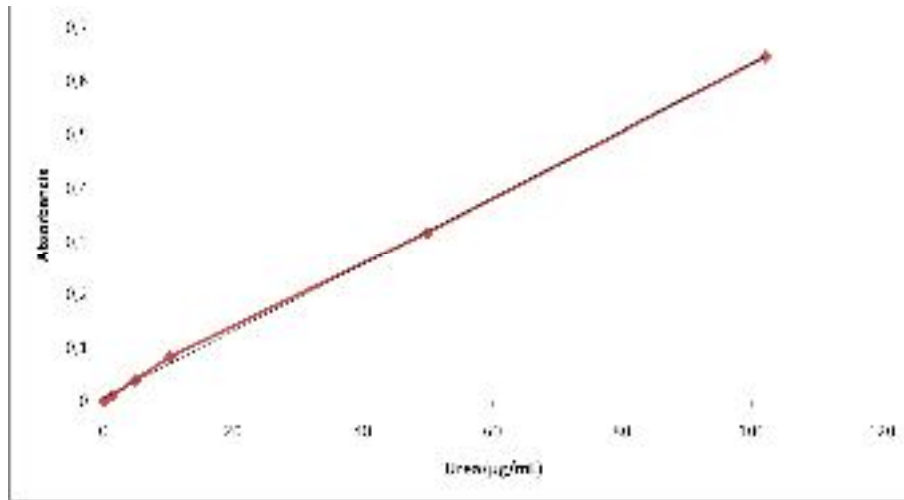


Figura 11: Curva de calibración de urea. Ecuación de la recta: $y = 0,0063x + 0,0076$. $R^2 = 0,9992$.

Tabla VII. Ecuaciones y error de las curvas de calibración realizadas para la cuantificación de urea

Ecuación	Coficiente de determinación
$y = 0,0091x - 0,0028$	$R^2 = 0,9998$
$y = 0,009x + 0,0266$	$R^2 = 0,9973$
$y = 0,0107x + 0,0062$	$R^2 = 0,9995$

La disminución de glucosa y urea se observó en gráficos de dispersión donde el eje de las “X” corresponde al tiempo medido en horas, y el eje de las “Y” corresponde a la cantidad de glucosa (azul) o urea (rojo) expresadas en mg/mL. Los gráficos se muestran a continuación:

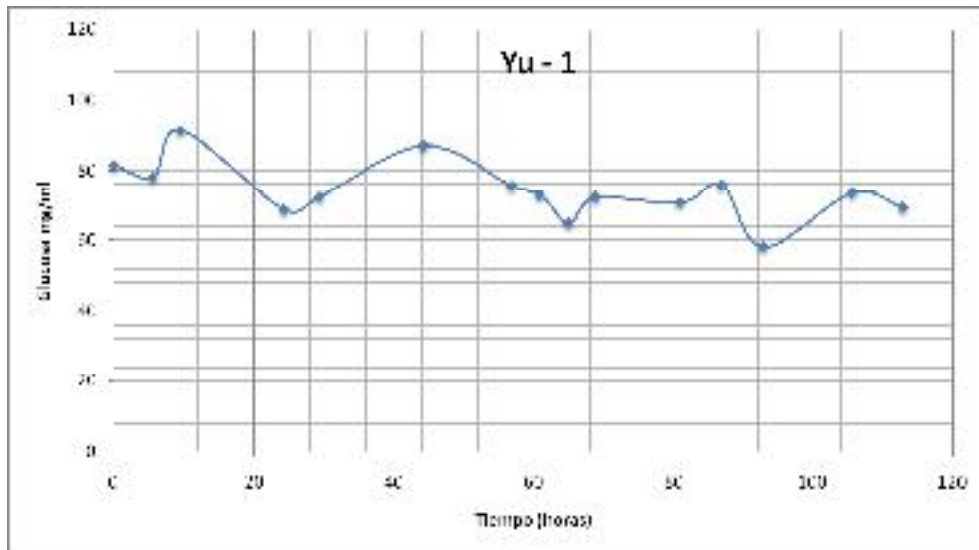


Figura 12a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-1 en el medio determinado A.

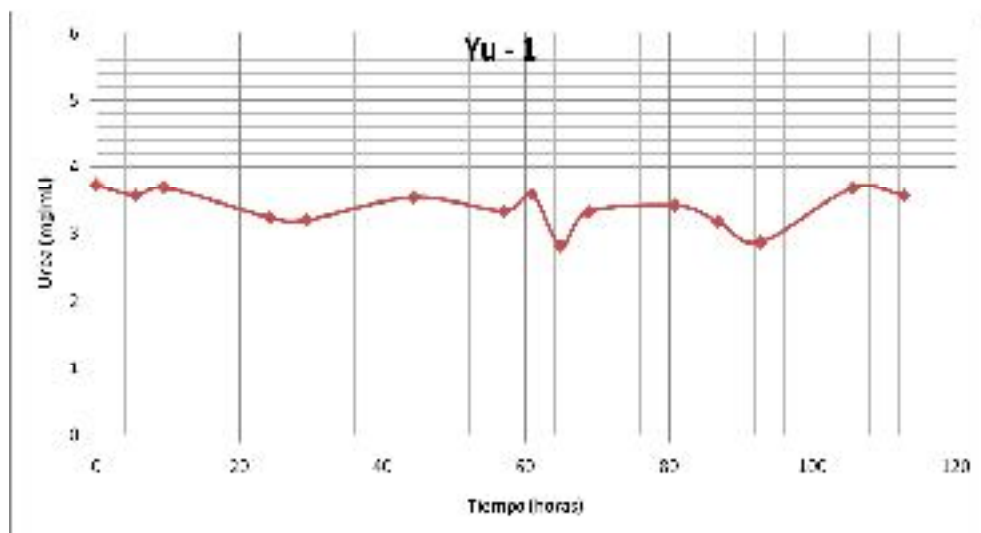


Figura 12b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-1 en el medio determinado A.

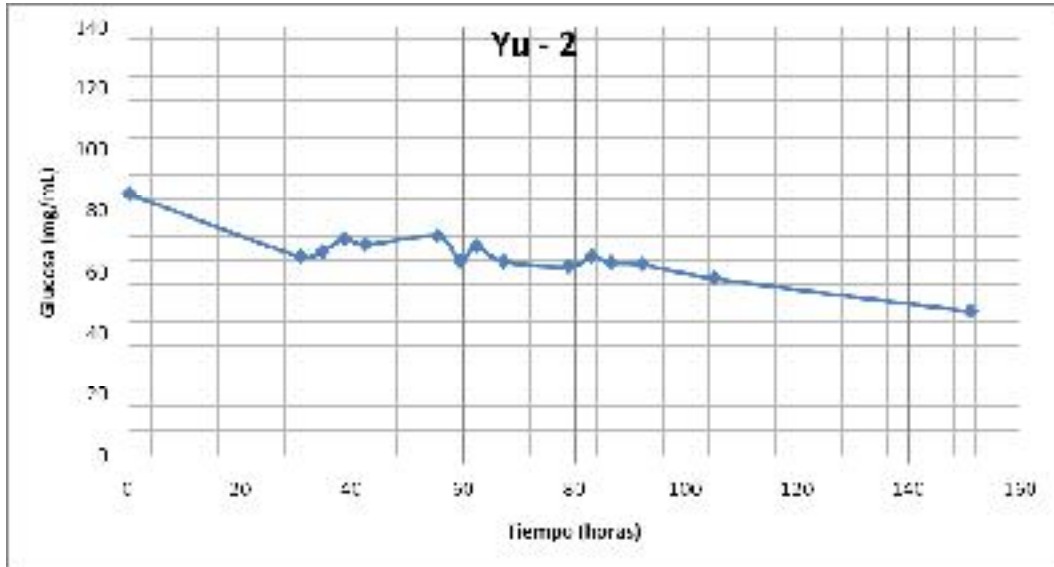


Figura 13a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-2 en el medio determinado A.

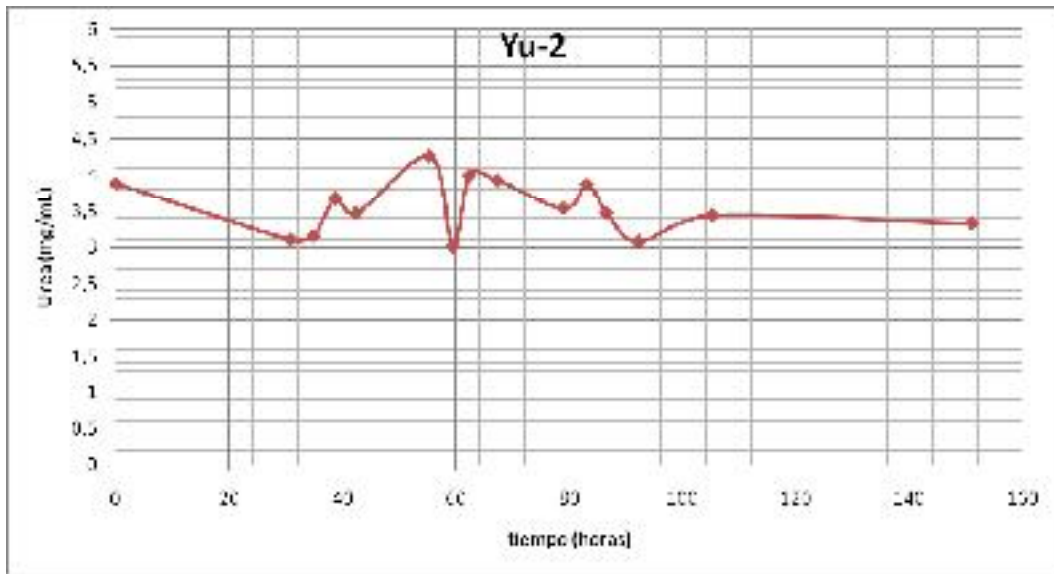


Figura 13b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-2 en el medio determinado A.

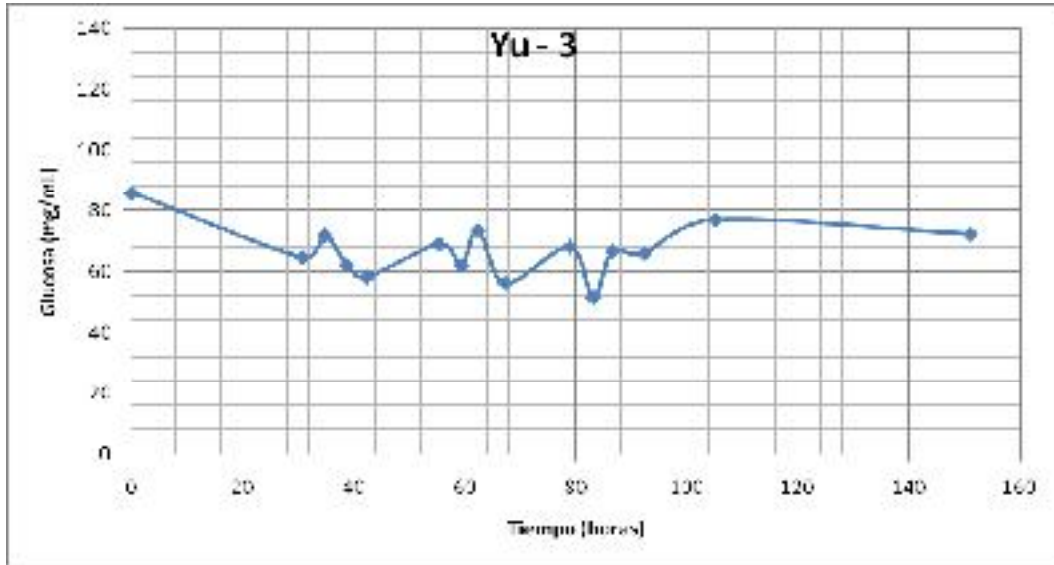


Figura14a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-3 en el medio determinado A.

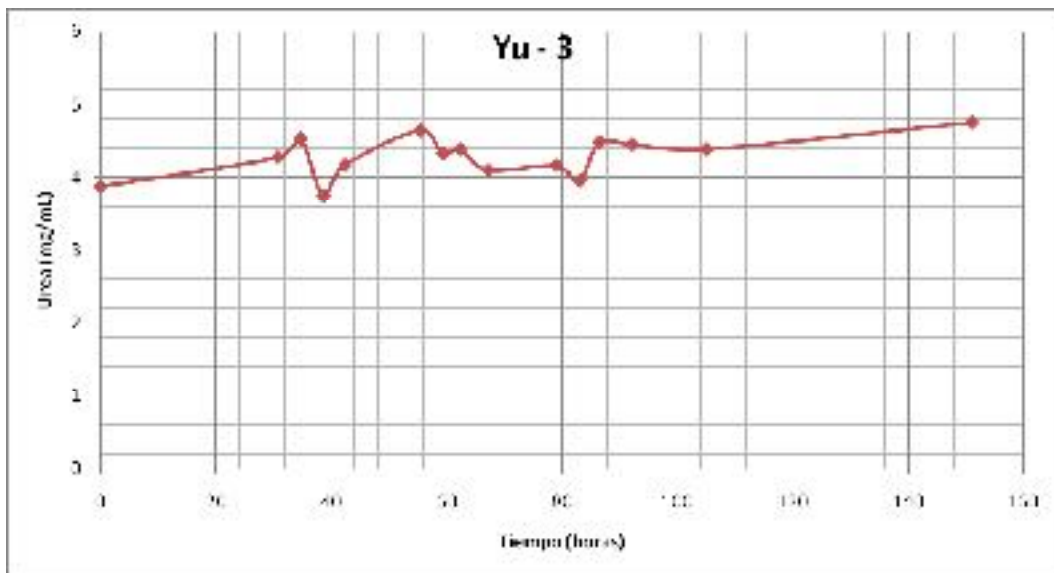


Figura14b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-3 en el medio determinado A.

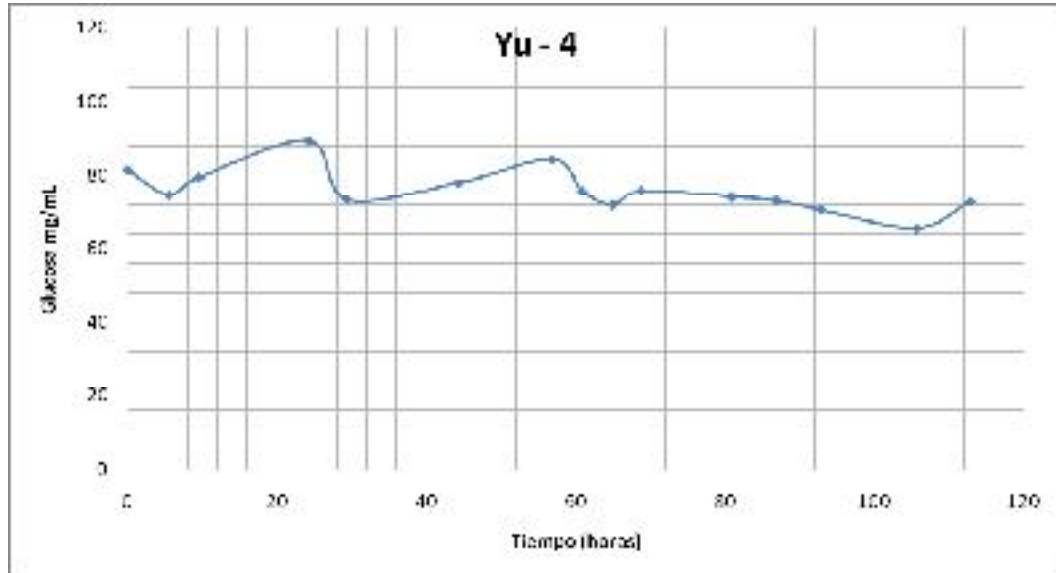


Figura 15a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-4 en el medio determinado A.

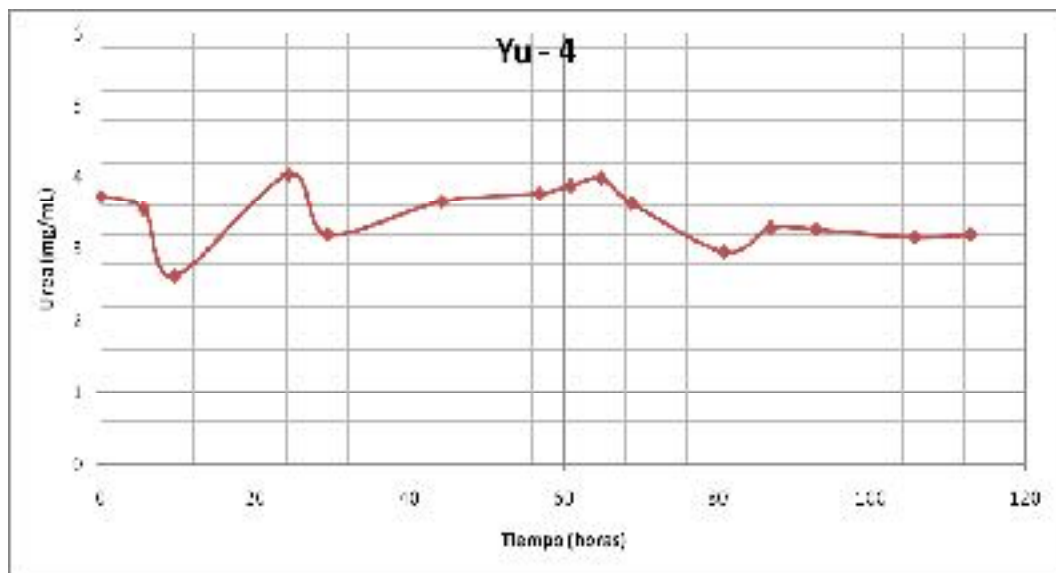


Figura 15b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-4 en el medio determinado A.

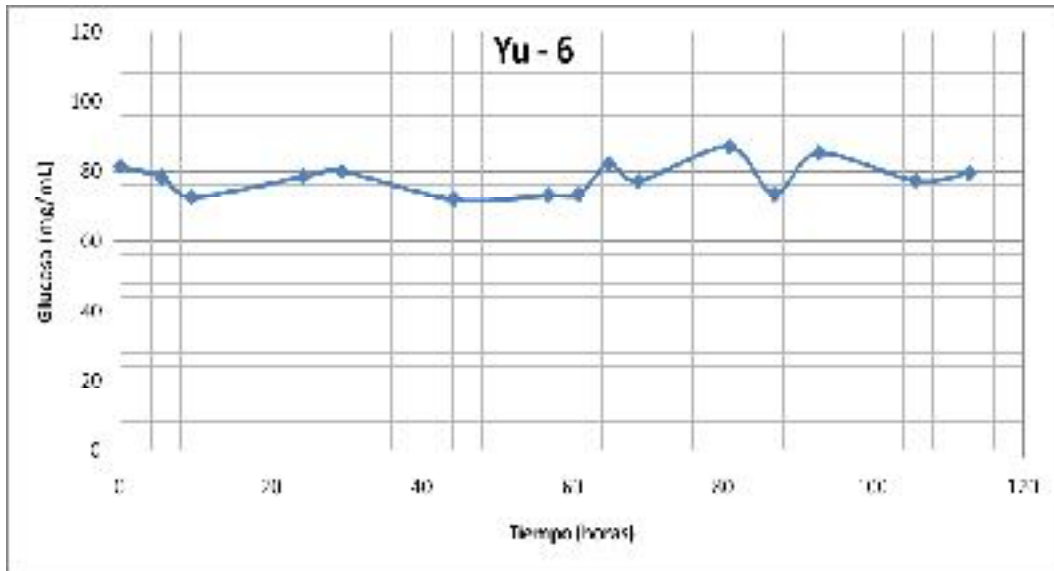


Figura 16a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-6 en el medio determinado A.

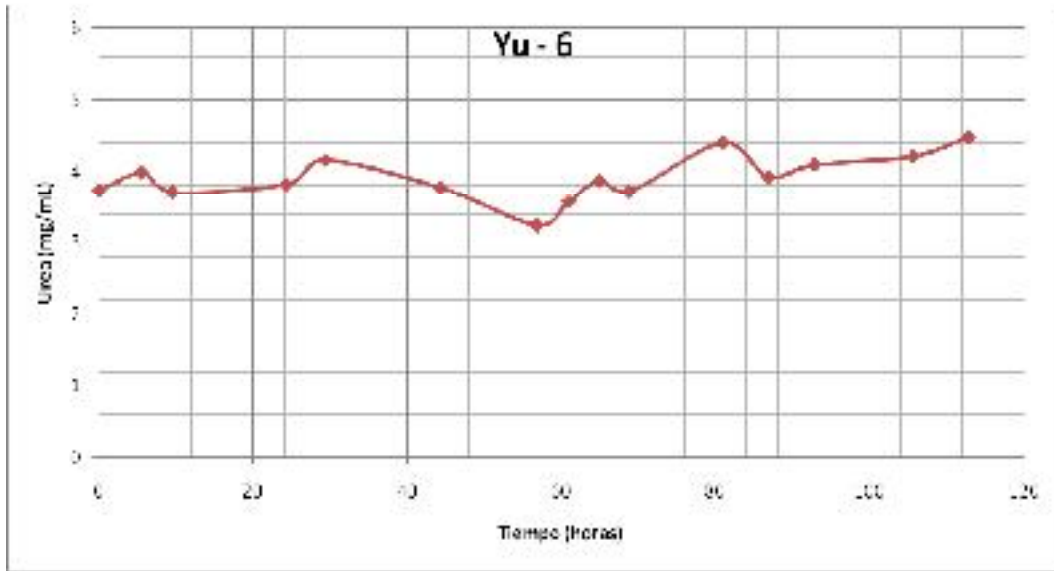


Figura 16b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-6 en el medio determinado A.

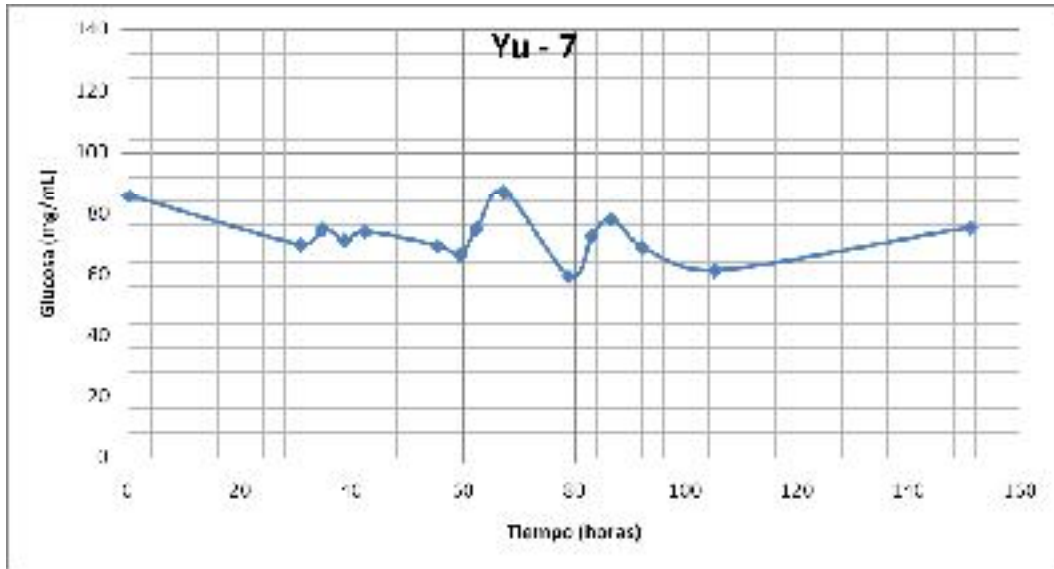


Figura 17a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-7 en el medio determinado A.

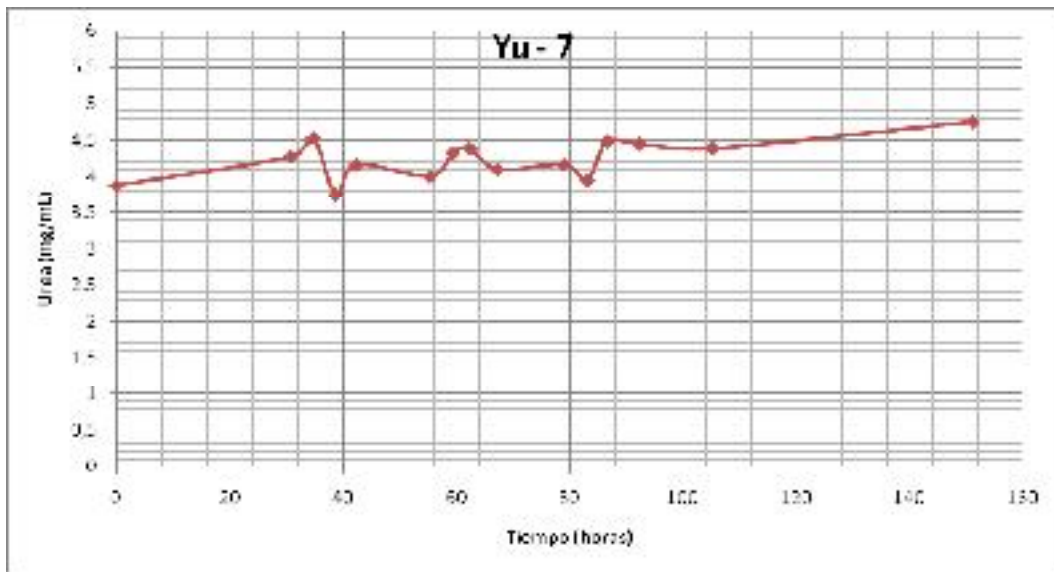


Figura 17b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-7 en el medio determinado A.

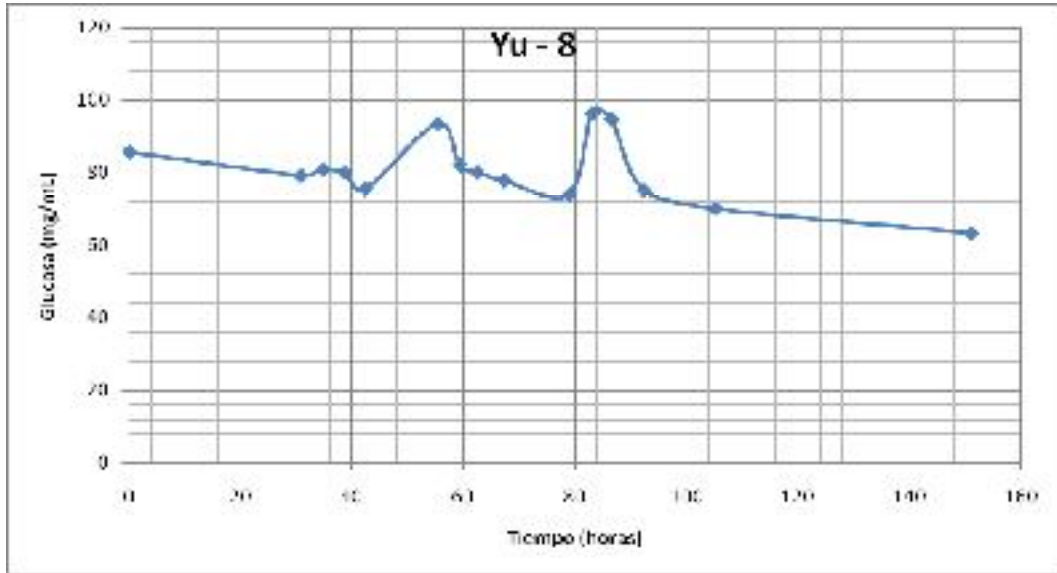


Figura 18a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-8 en el medio determinado A.

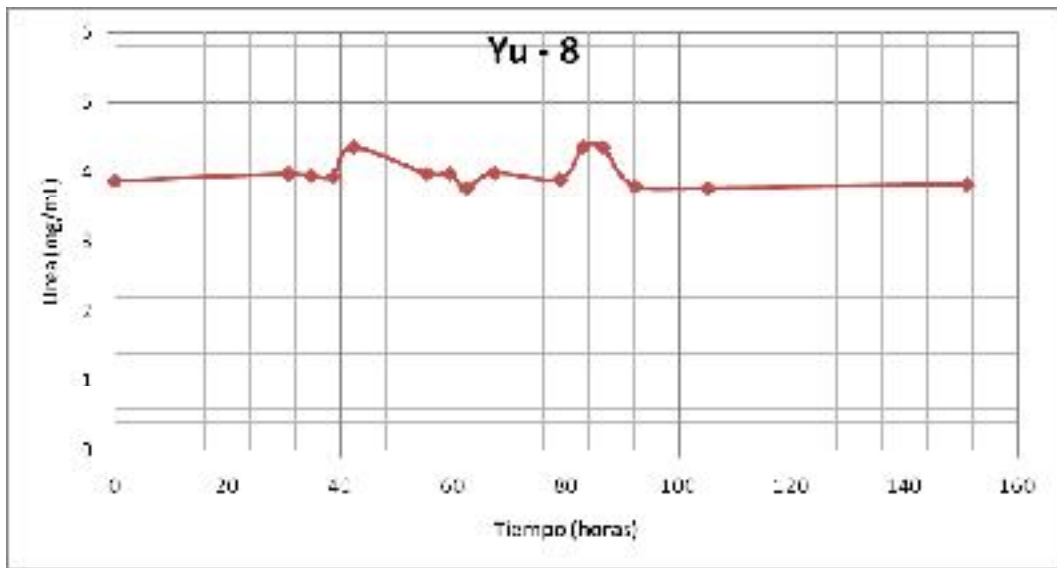


Figura 18b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-8 en el medio determinado A.

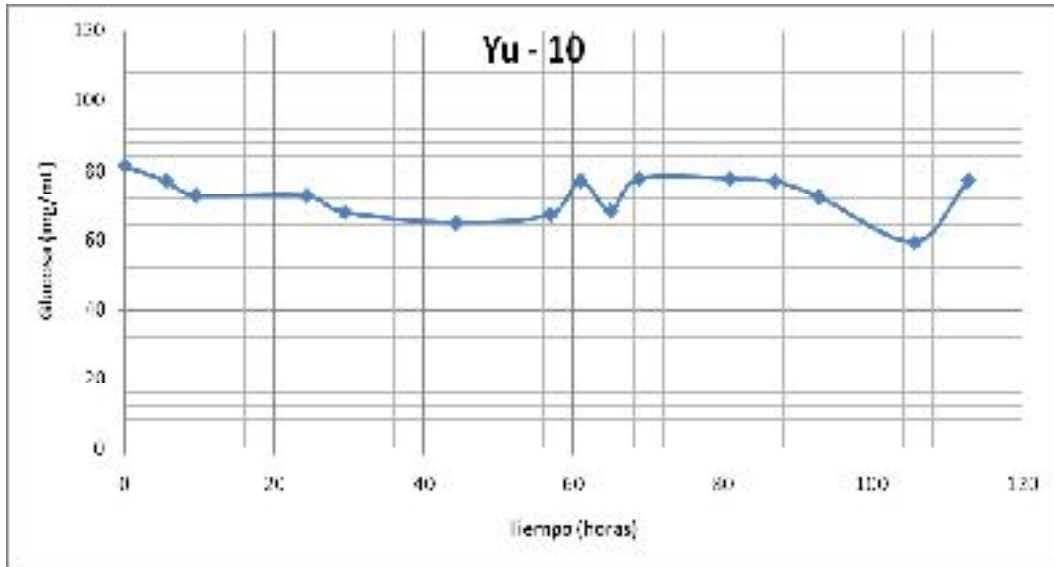


Figura 10a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-10 en el medio determinado A.

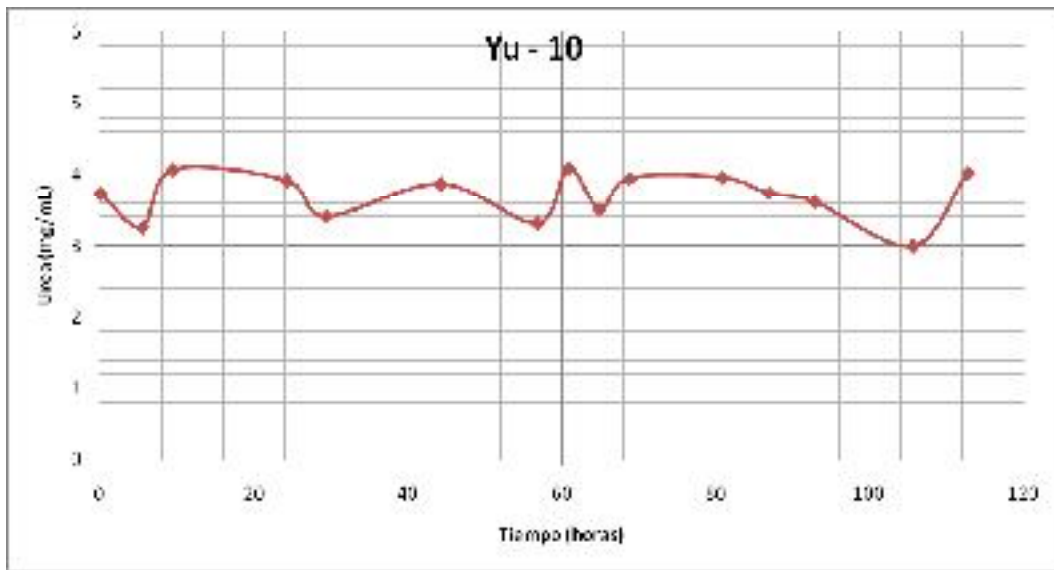


Figura 19b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-10 en el medio determinado A.

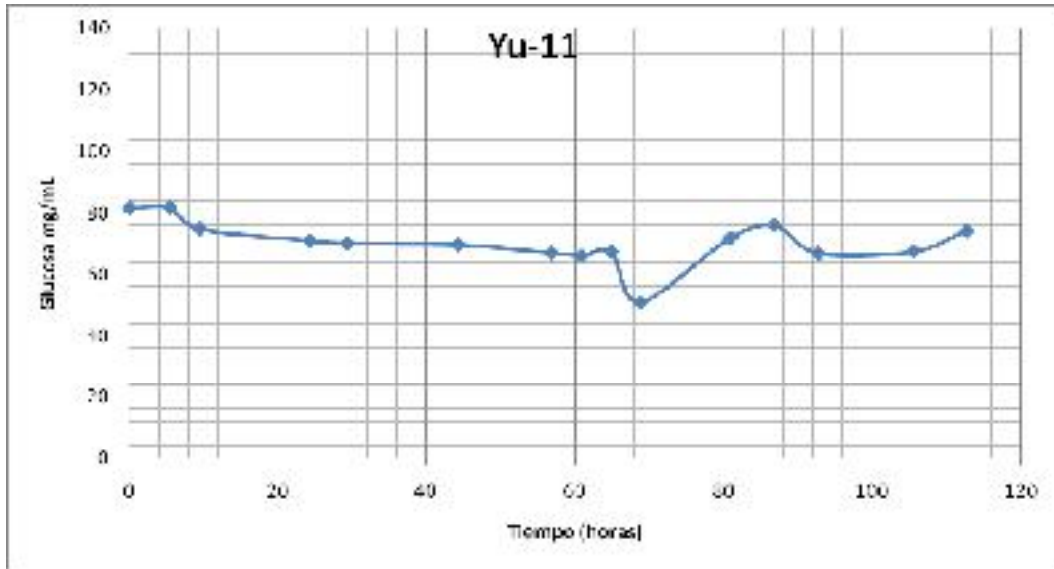


Figura 20a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-11 en el medio determinado A.

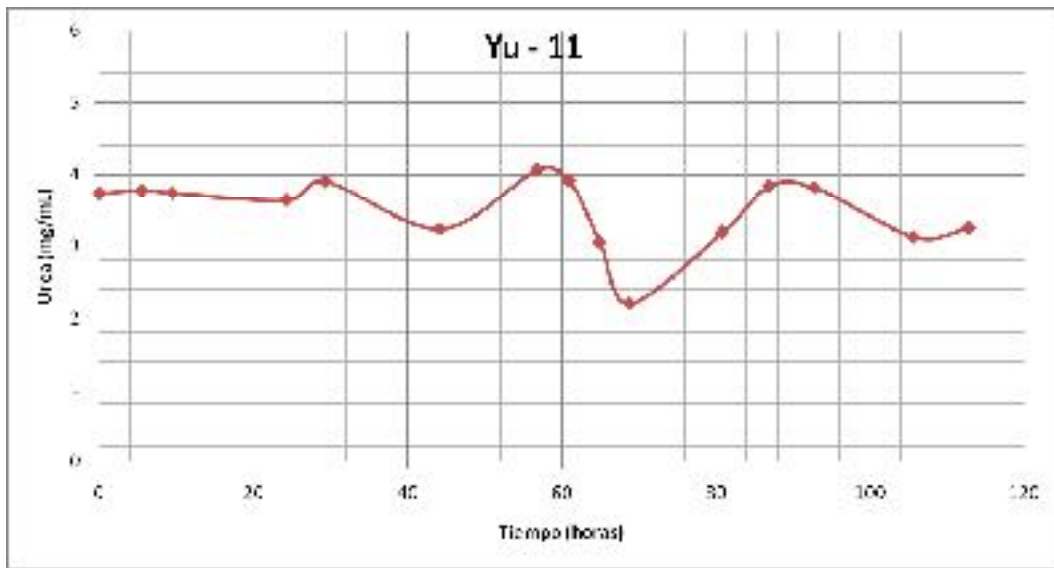


Figura 20b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-11 en el medio determinado A.

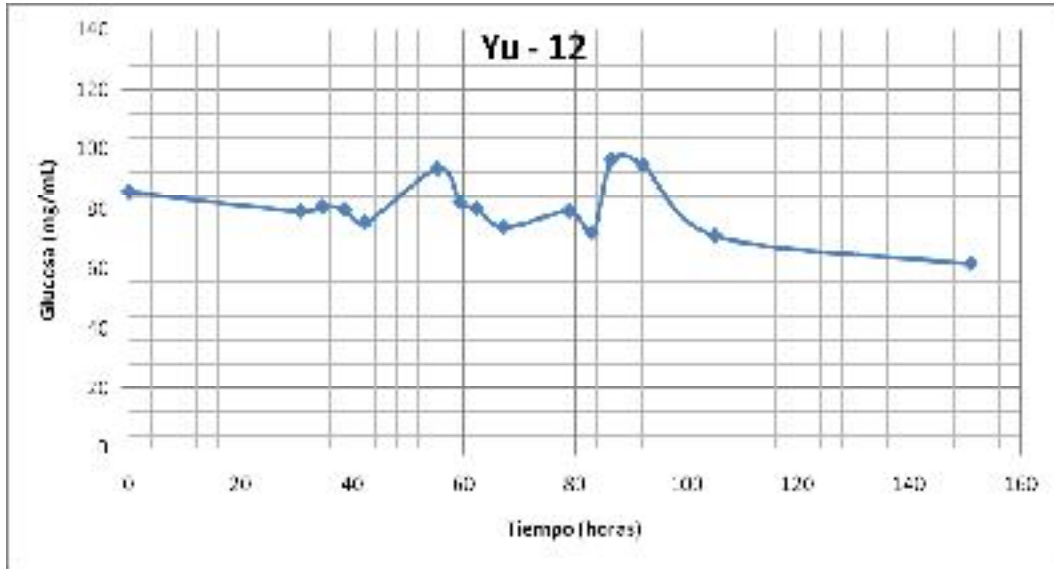


Figura 21a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-12 en el medio determinado A.

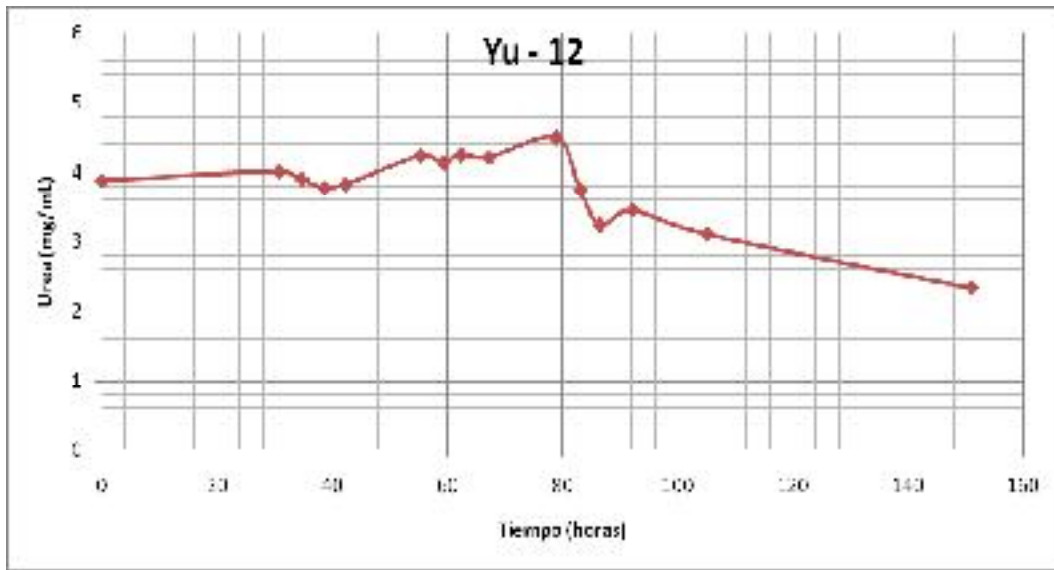


Figura 21b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-12 en el medio determinado A.

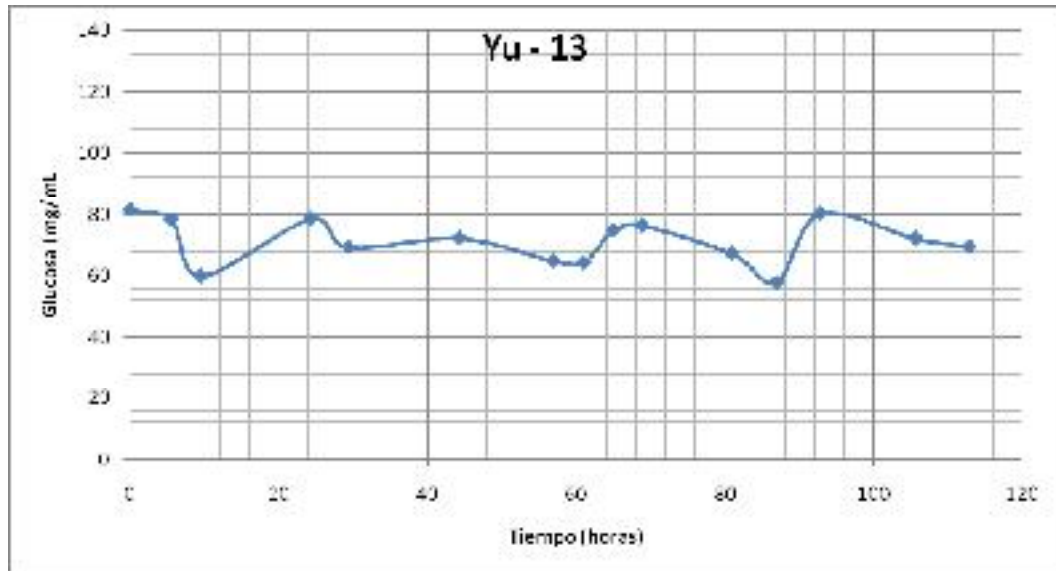


Figura 22a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-13 en el medio determinado A.

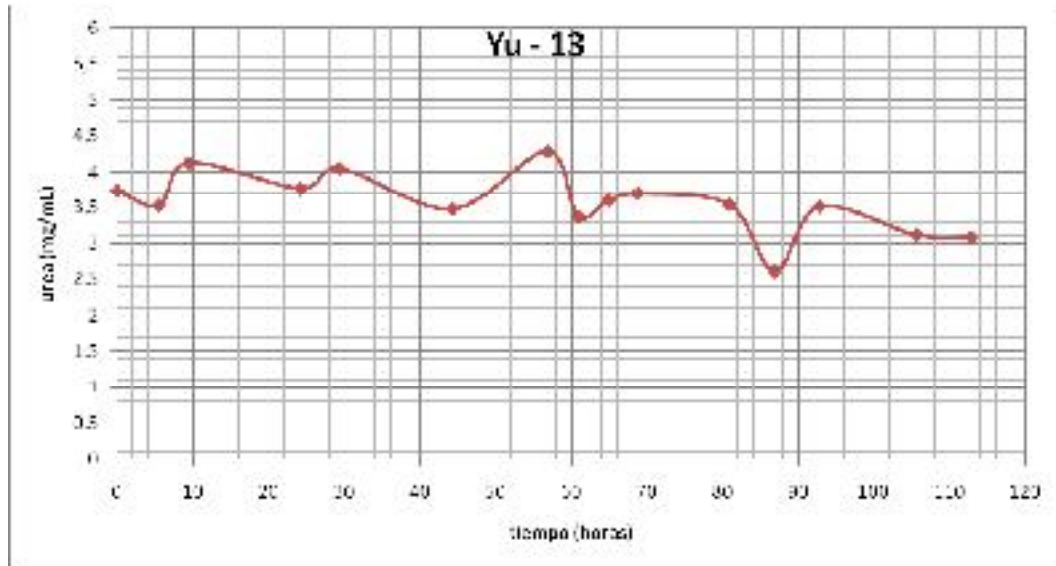


Figura 22b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-13 en el medio determinado A.

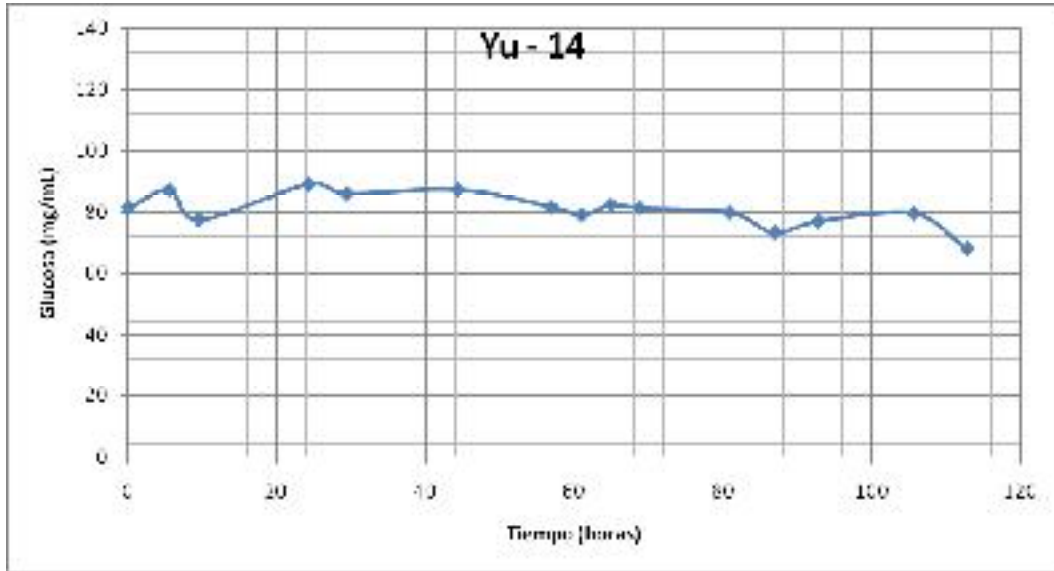


Figura 23a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-14 en el medio determinado A.

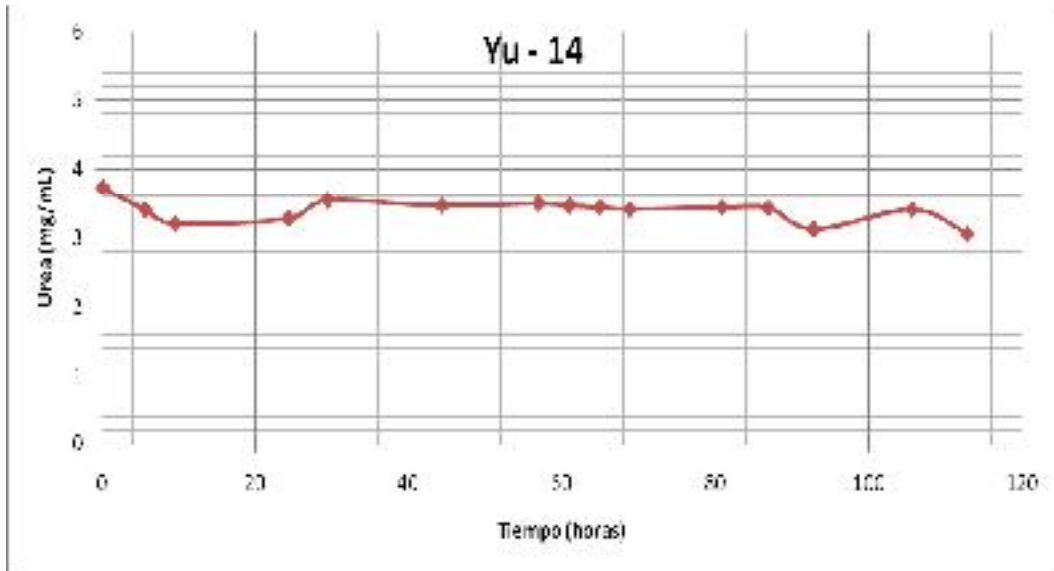


Figura 23b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-14 en el medio determinado A.

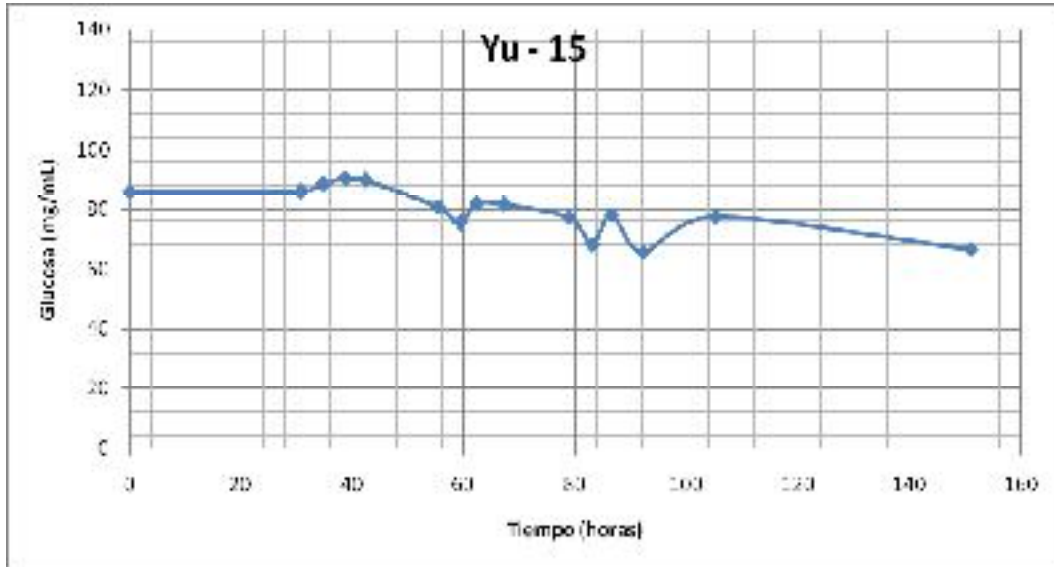


Figura 24a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-15 en el medio determinado A.



Figura 24b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-15 en el medio determinado A.

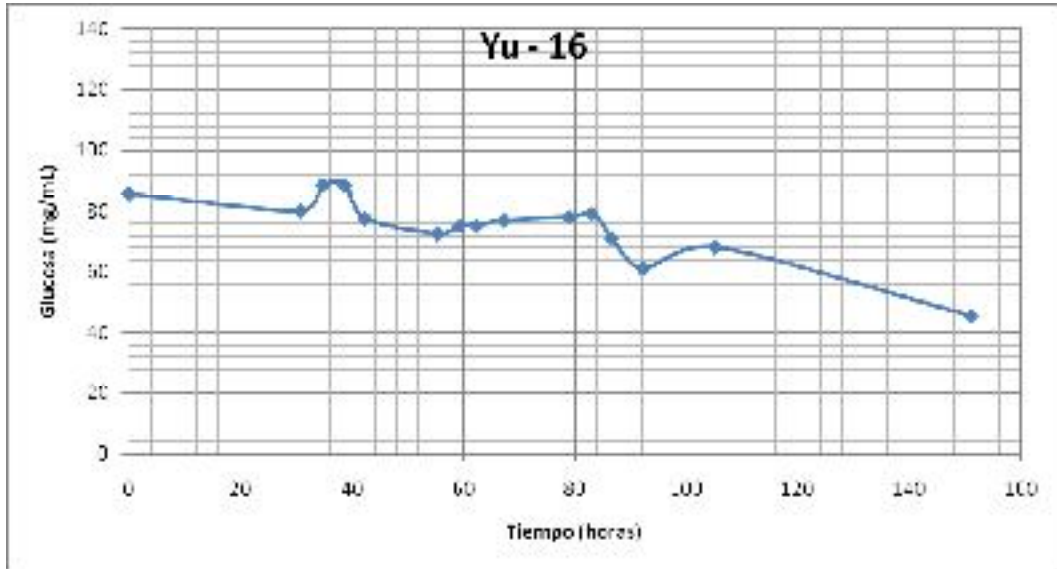


Figura 25a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-16 en el medio determinado A.

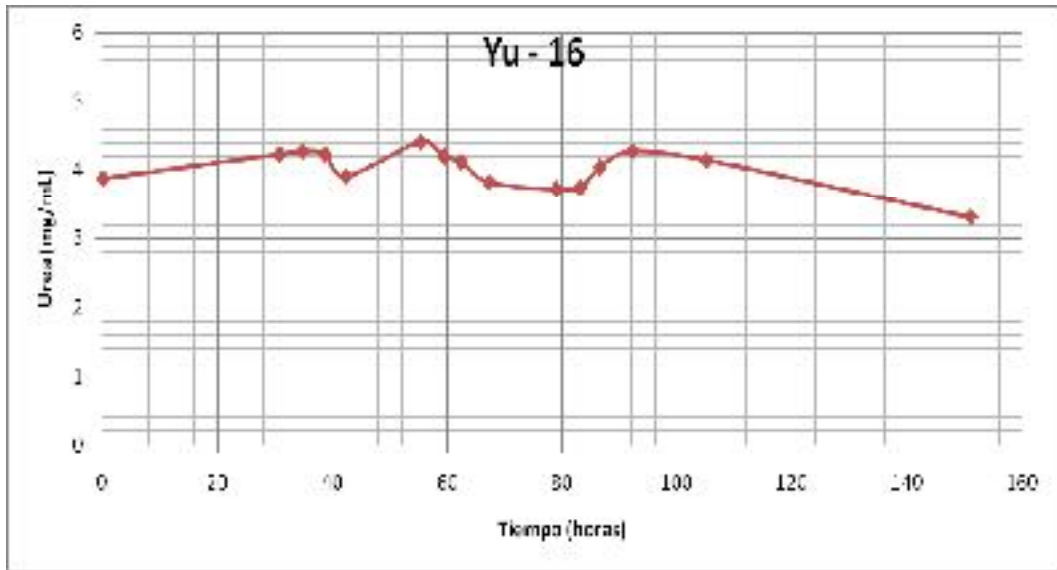


Figura 25b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-16 en el medio determinado A.

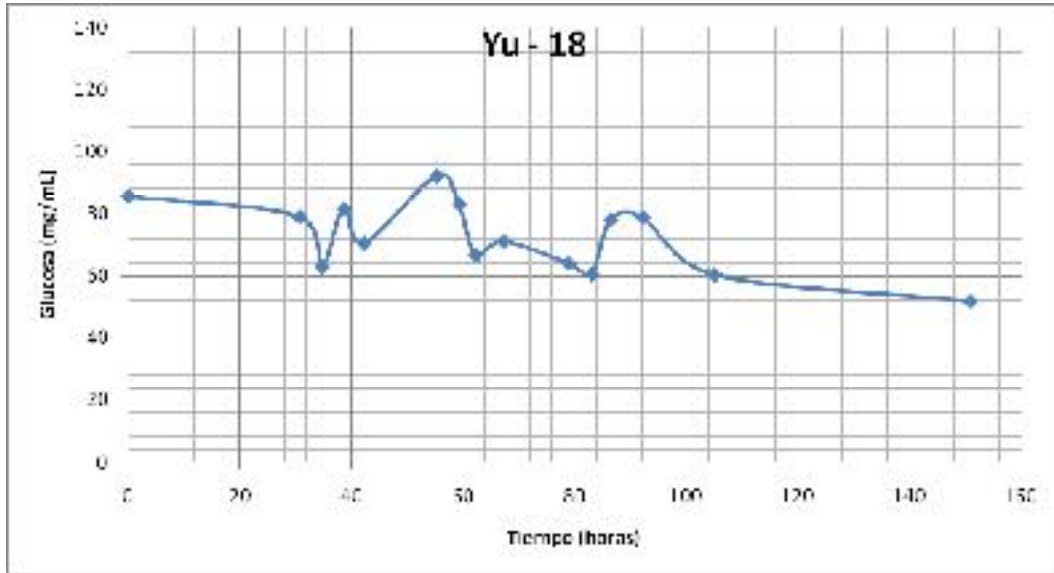


Figura 26a: Cuantificación de glucosa en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-18 en el medio determinado A.

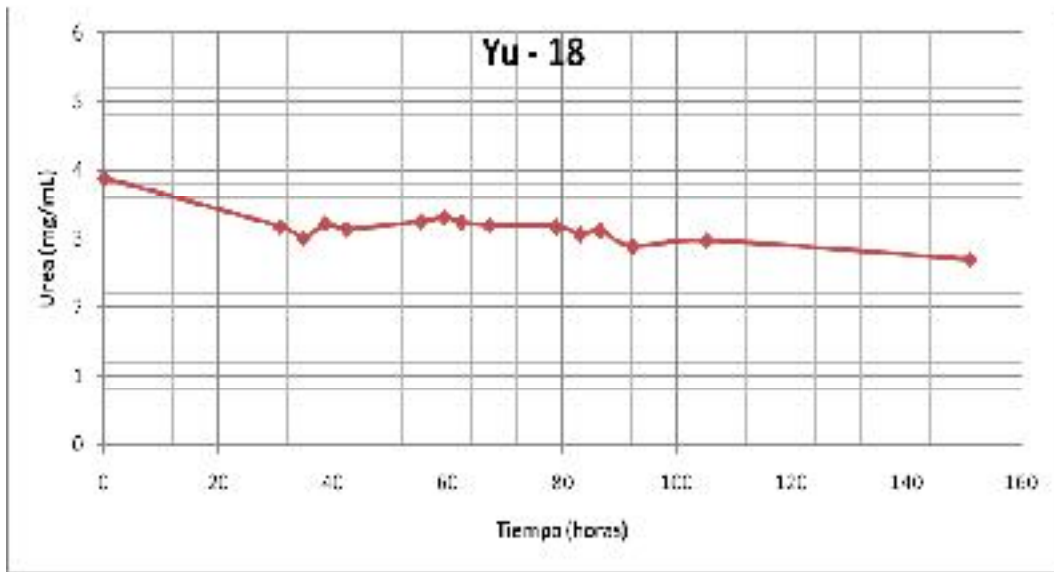


Figura 26b: Cuantificación de urea en el sobrenadante del crecimiento del hongo Yu-18 en el medio determinado A.

5.2.2 Infiltración de los metabolitos extracelulares en plántulas de yuca

De acuerdo a los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento (Figuras 12 a 26) se eligieron los sobrenadantes a ser utilizados para infiltrar las hojas. Se seleccionaron los sobrenadantes con mayor producción de metabolitos extracelulares, lo cual se determinó indirectamente por los hongos que consumieron más nitrógeno. Las hojas se infiltraron con el último sobrenadante de la cinética de los hongos: Yu – 2, Yu – 4, Yu – 11, Yu – 13, Yu – 14 y Yu – 16. Los demás sobrenadantes de los hongos no se utilizaron en el experimento porque no se observó un cambio en la concentración de urea con respecto a la primera muestra; o porque mostraron un comportamiento irregular indicando que pudieron ser por un error de manipulación ya sea en la precisión de la cantidad de medio “A” agregado; o pudo presentarse en los trozos de agar, de algunas muestras de un mismo hongo, una mayor cantidad de micelio que otras.

El efecto de los metabolitos extracelulares se evidenció 6 días después de que las hojas fueron infiltradas con las muestras seleccionadas. Los sobrenadantes Yu-2, Yu-13, Yu-14 y Yu-16 ocasionaron muerte celular del tejido. También se observó muerte celular en los controles de estas muestras. Las hojas infiltradas con Yu -11 y Yu – 4 no provocaron muerte celular. Tampoco se observó muerte celular con los controles de estas muestras. Las hojas infiltradas con el ácido acético salicílico también muestran necrosis celular dado que el dicho ácido induce la producción de especies Reactivas de Oxígeno.

A continuación se muestran las fotos del efecto producido en las diferentes hojas; las zonas donde se infiltró el control, el cual fue el sobrenadante del medio sin inocular, y los sobrenadantes de los hongos, fueron señaladas haciendo un círculo con un marcador verde indeleble.

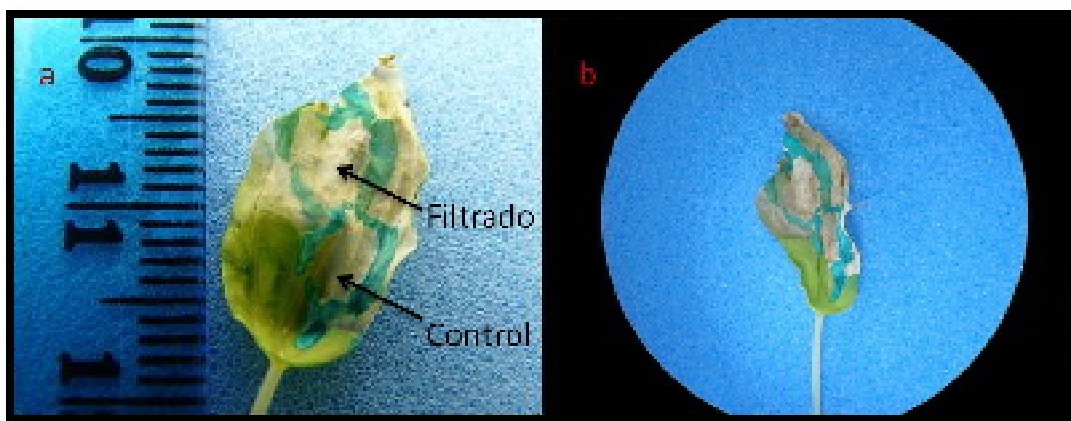


Figura 27: Infiltración de hoja de la variedad 35 con el sobrenadante del hongo Yu-2. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1X.

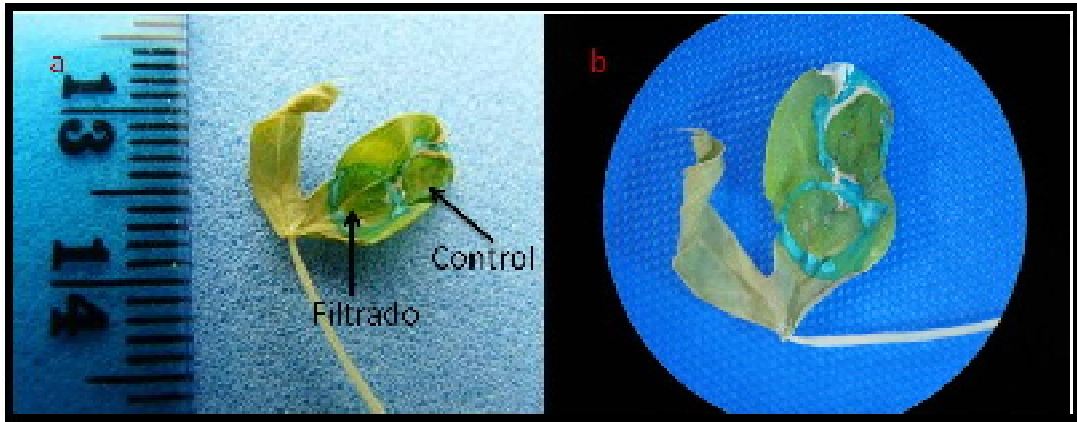


Figura 28: Infiltración de hoja de lav ariedad 35 con el sobrenadante del hongo Yu-4. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

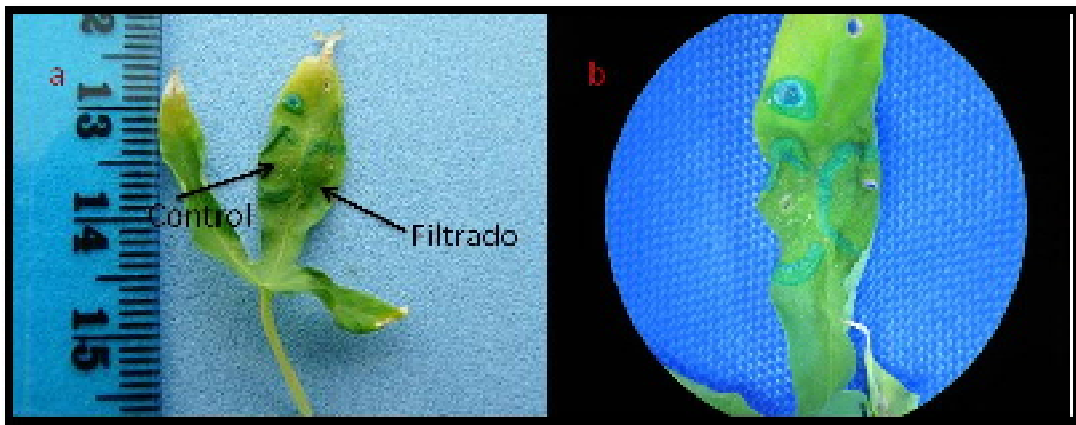


Figura 29: Infiltración de hoja de lav ariedad 98 con el sobrenadante del hongo Yu-4. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

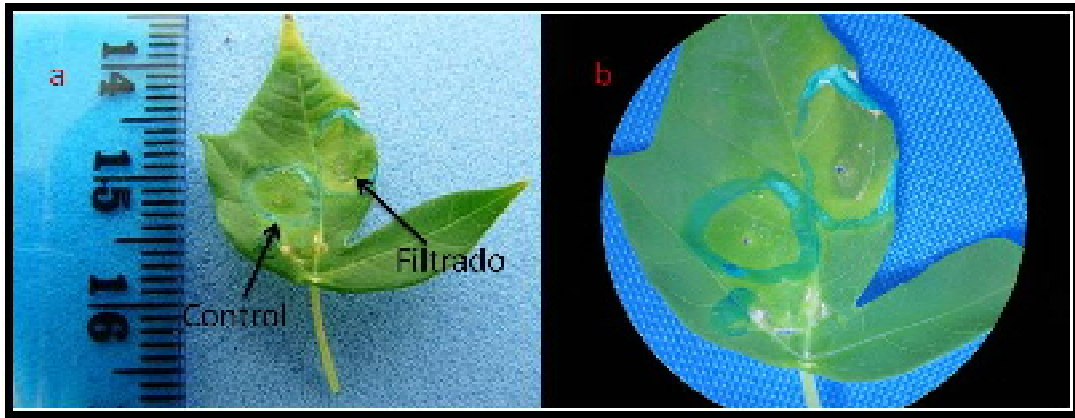


Figura 30: Inf infiltración de hoja de la variedad 35 con el sobrenadante del hongo Yu-11. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

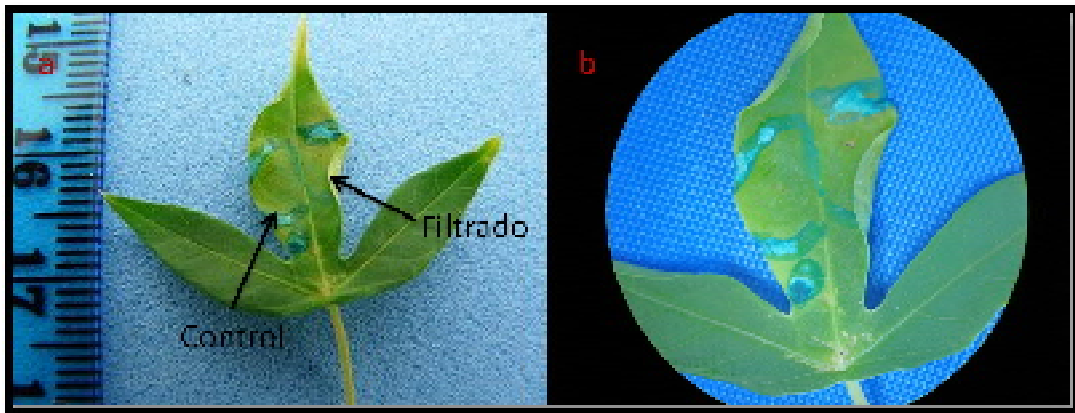


Figura 31: Inf infiltración de hoja de la variedad 98 con el sobrenadante del hongo Yu-11. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

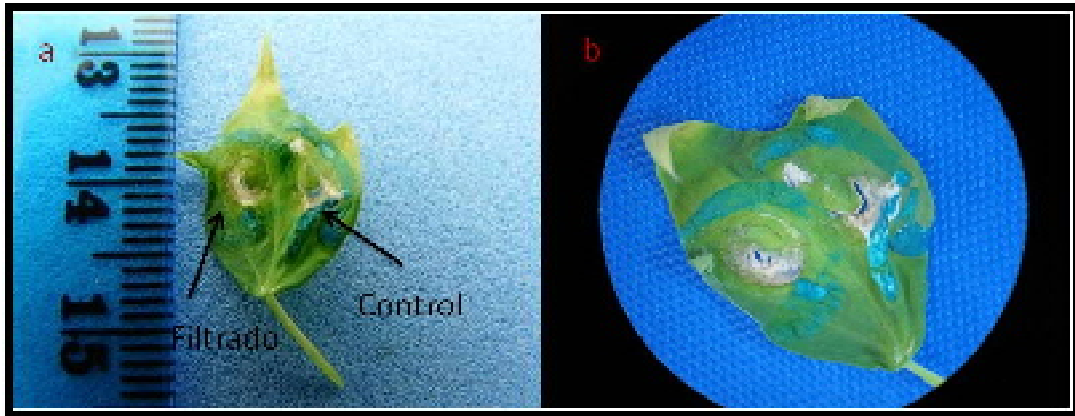


Figura 32: Inf infiltración de hoja de la variedad 35 con el sobrenadante del hongo Yu-13. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

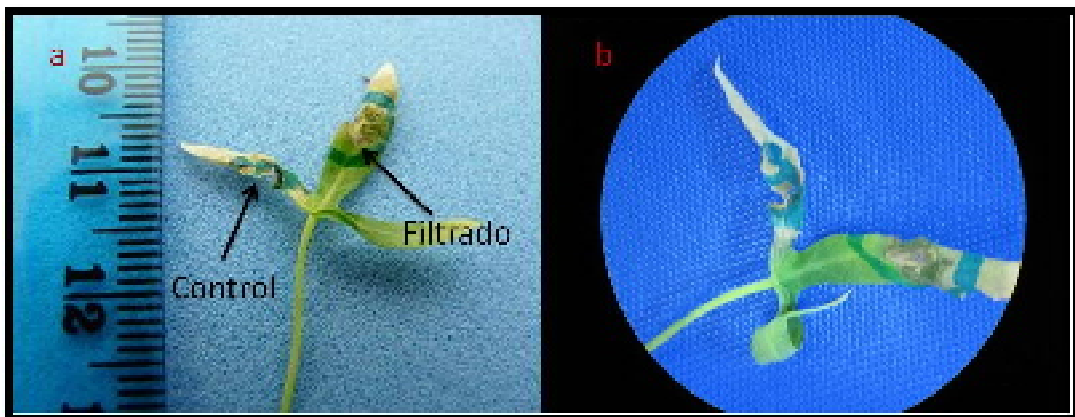


Figura 33: Inf infiltración de hoja de la variedad 98 con el sobrenadante del hongo Yu-13. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

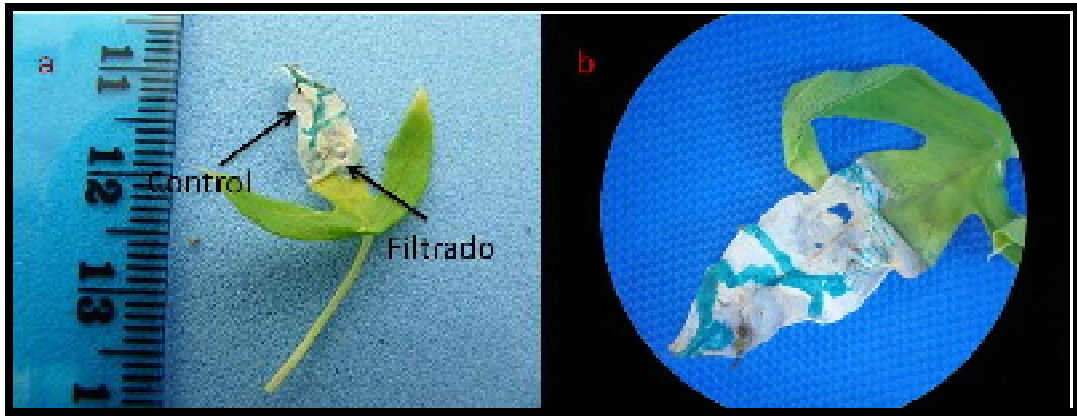


Figura 34: Inf infiltración de hoja de lav ariedad 35 con el sobrenadante del hongo Yu-14. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

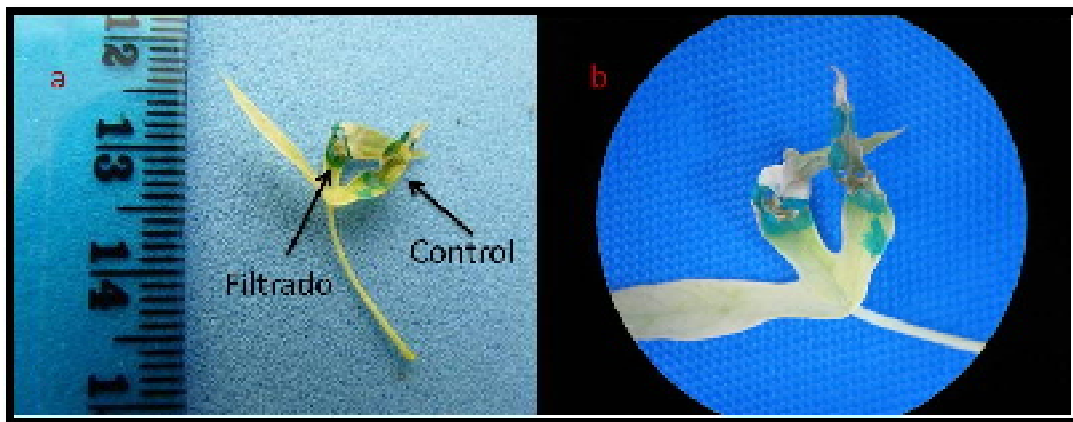


Figura 35: Inf infiltración de hoja de lav ariedad 98 con el sobrenadante del hongo Yu-14. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

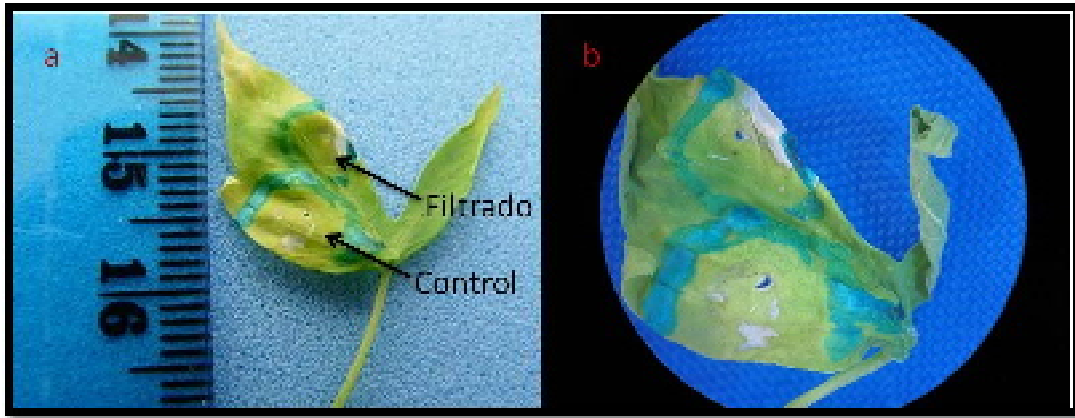


Figura 36: Inf infiltración de hoja de lav ariedad 35 con el sobrenadante del hongo Yu-16. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

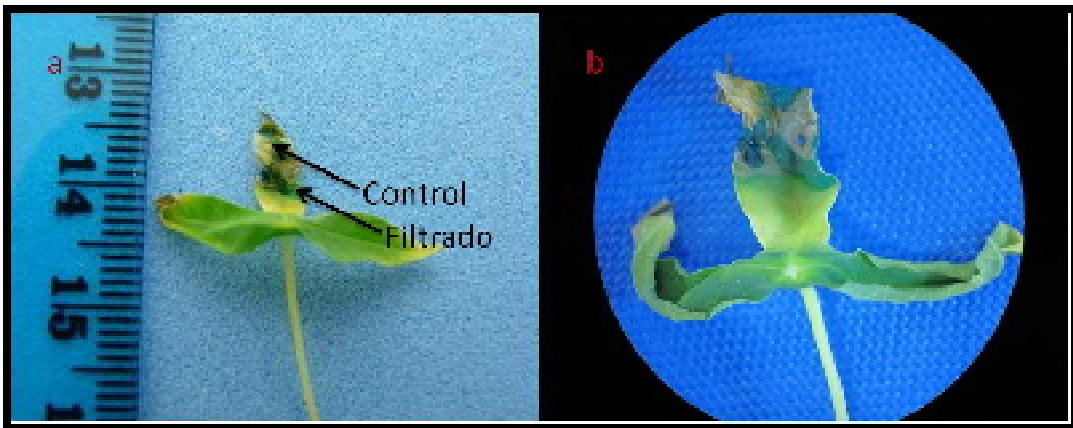


Figura 37: Inf infiltración de hoja de lav ariedad 98 con el sobrenadante del hongo Yu. 16. a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

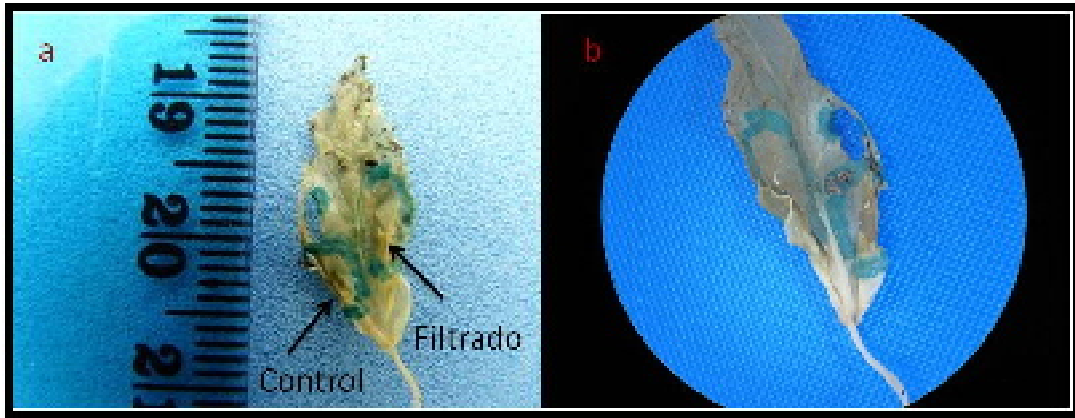


Figura 38: Infiltración de hoja de lav ariedad 35 con ácido acetilsalicílico y etanol como control a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

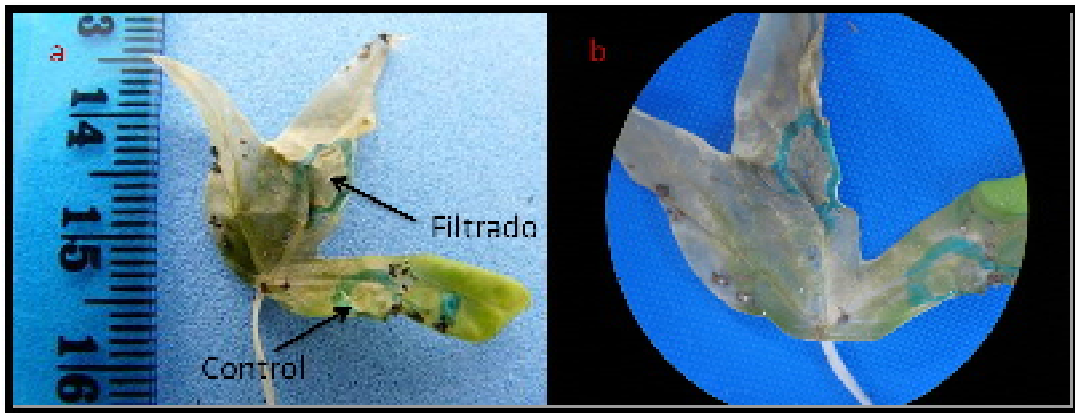


Figura 39: Infiltración de hoja de lav ariedad 98 con ácido acetilsalicílico y etanol como control a) Foto tomada con cámara Canon EOS 500. b) Foto tomada al estereoscopio, aumento 1,5X.

5.3 Infección de plántulas de yuca con los hongos filamentosos aislados

El efecto de la infección de los hongos filamentosos en las plántulas de yuca (sección 4.12) se determinó comparando la longitud de los entrenudos de las plántulas infectadas y los controles, y además observando si hubo necrosis en las plántulas infectadas con respecto a los controles. A continuación se muestran las fotos al inicio y al final de la infección:

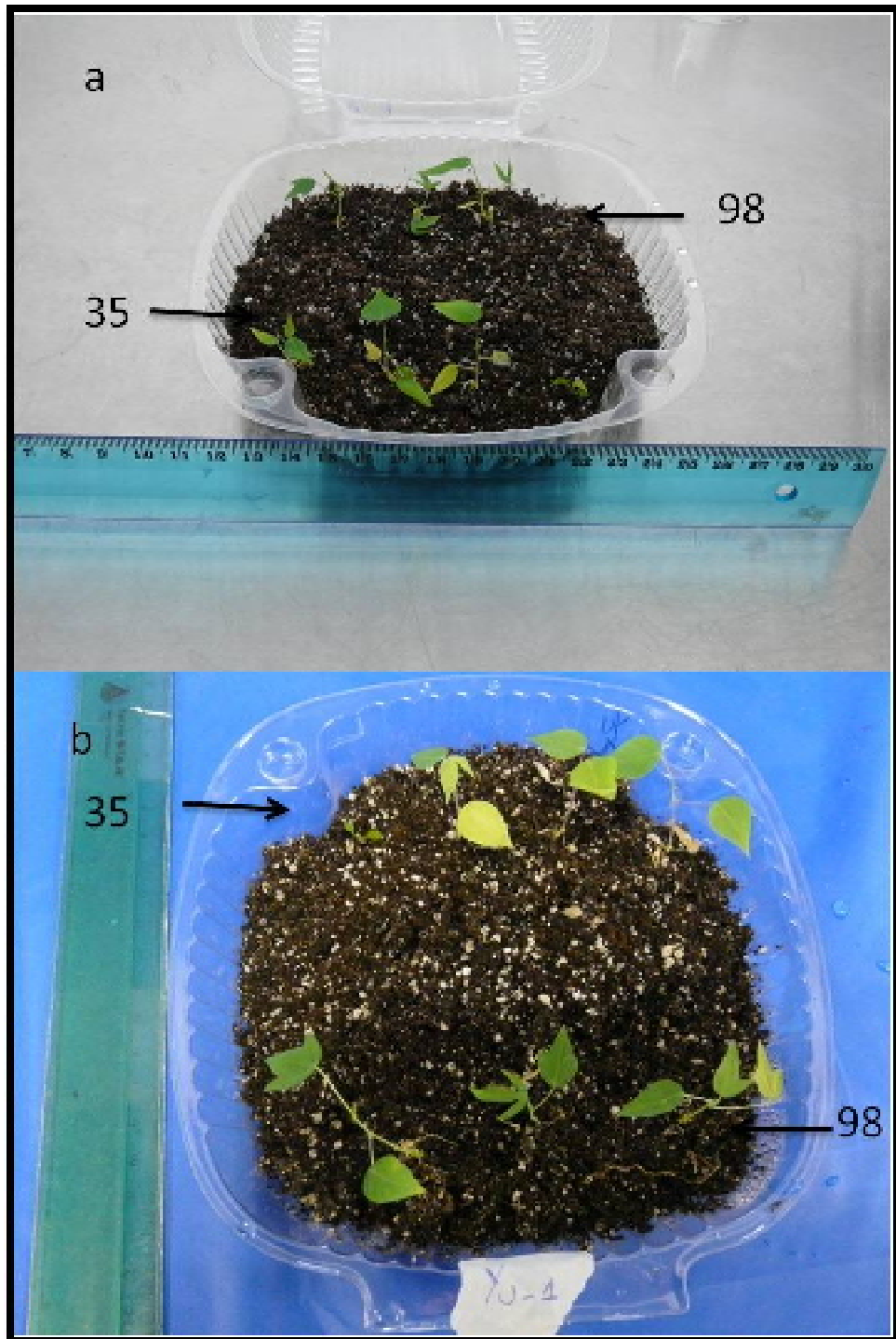


Figura 40: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-1.
a) primer día de infección. b) último día de infección.

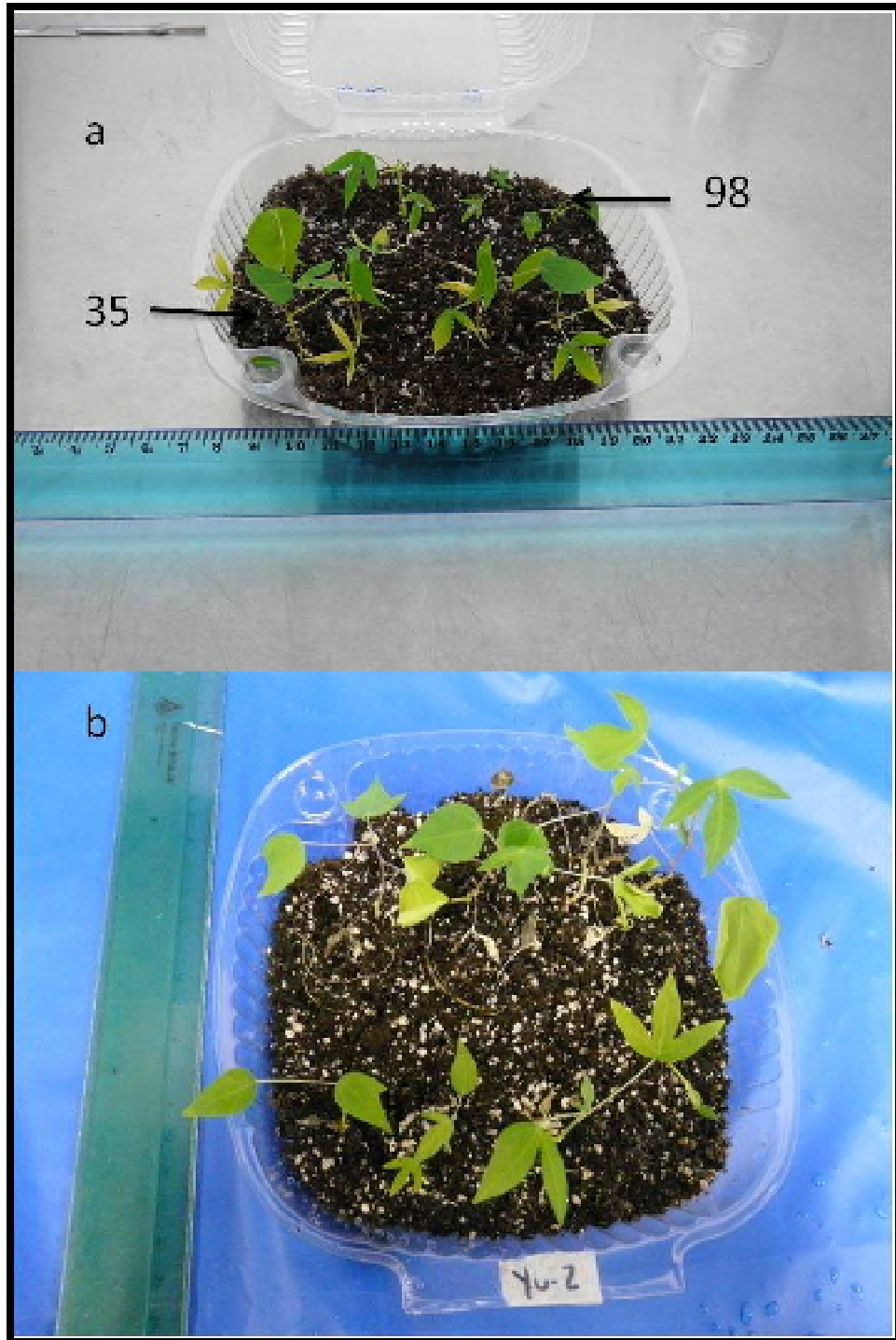


Figura 41: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-2. a) primer día de infección. b) último día de infección.

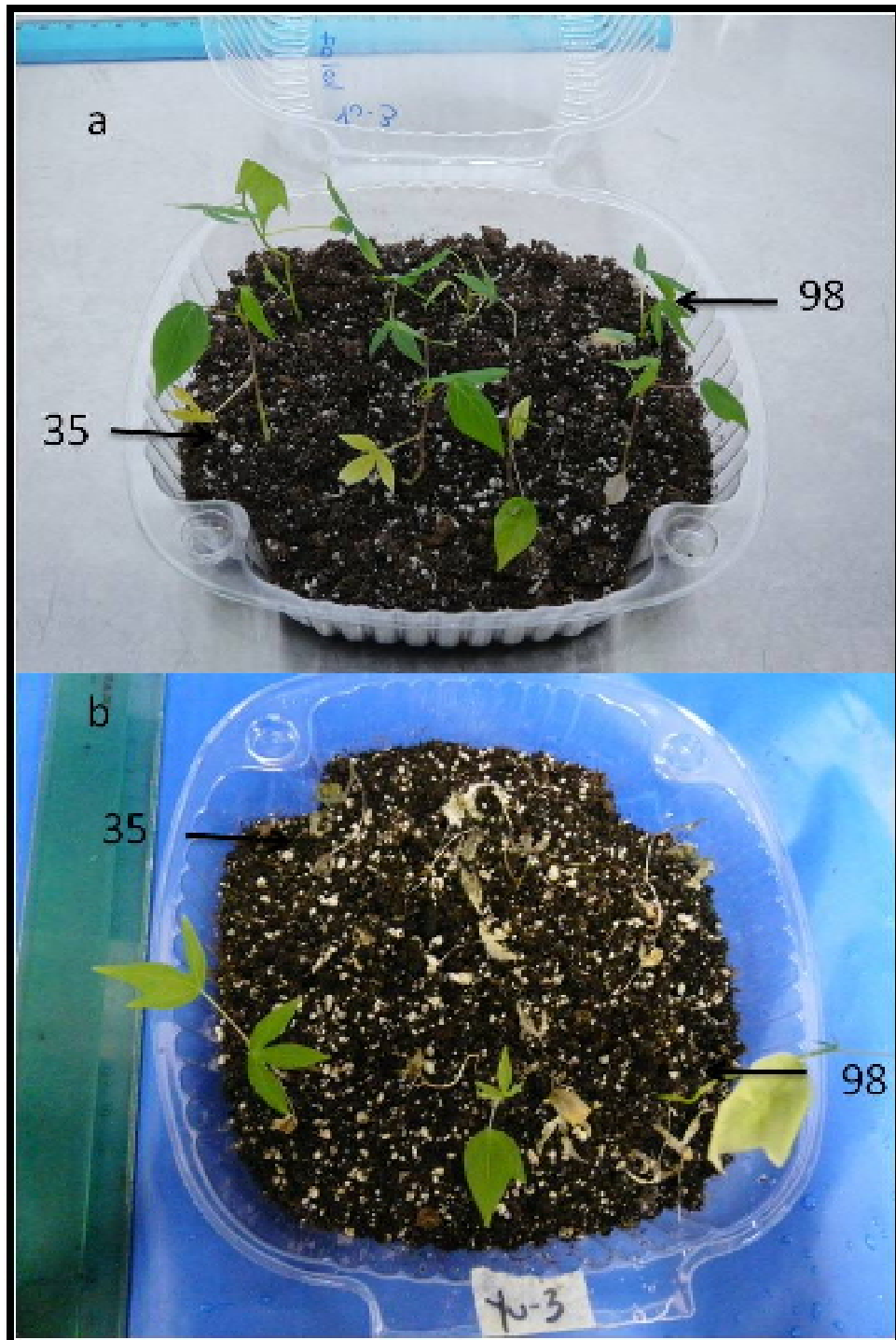


Figura 42: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-3. a) primer día de infección. b) último día de infección.

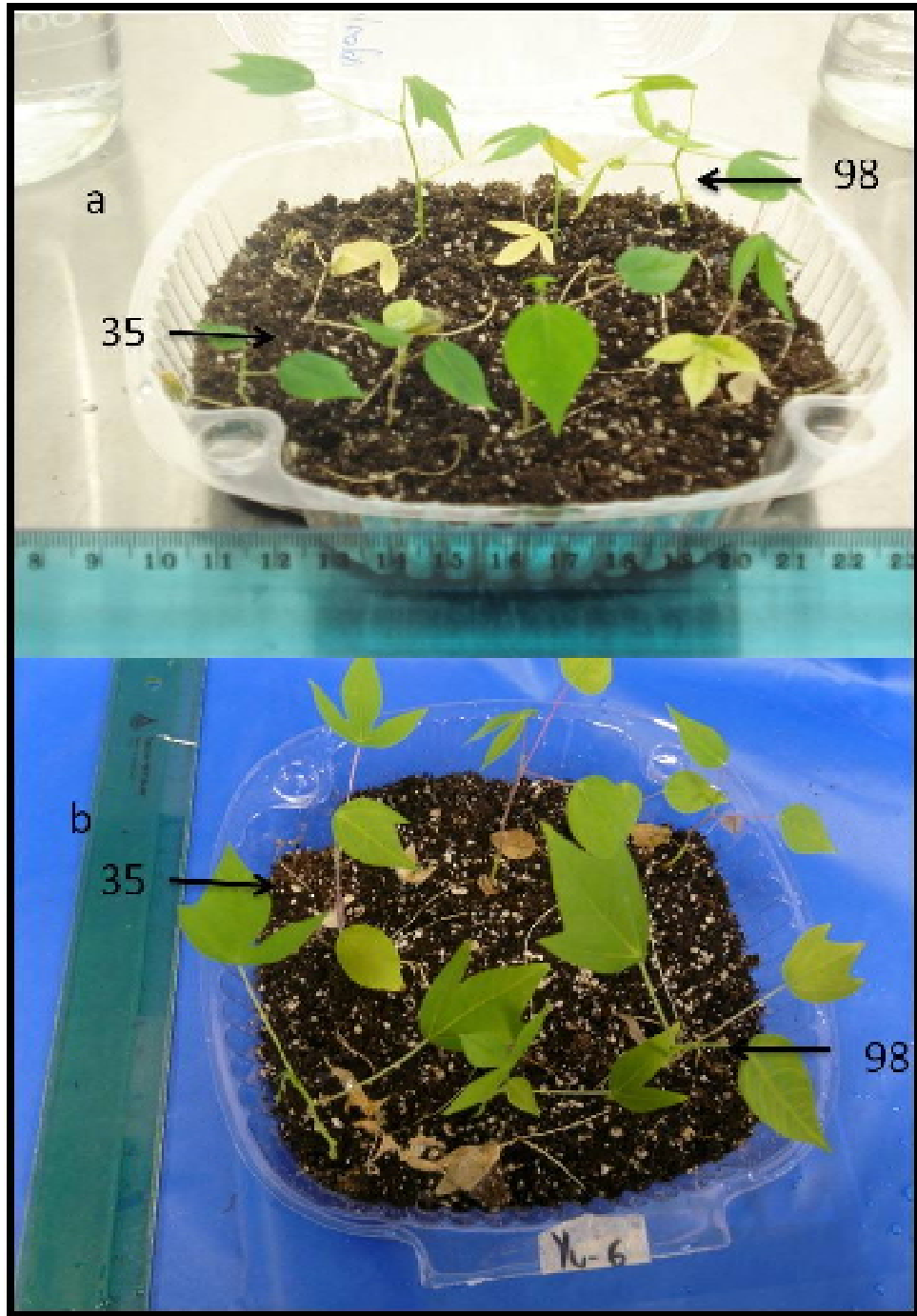


Figura 43: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-6. a) primer día de infección. b) último día de infección.

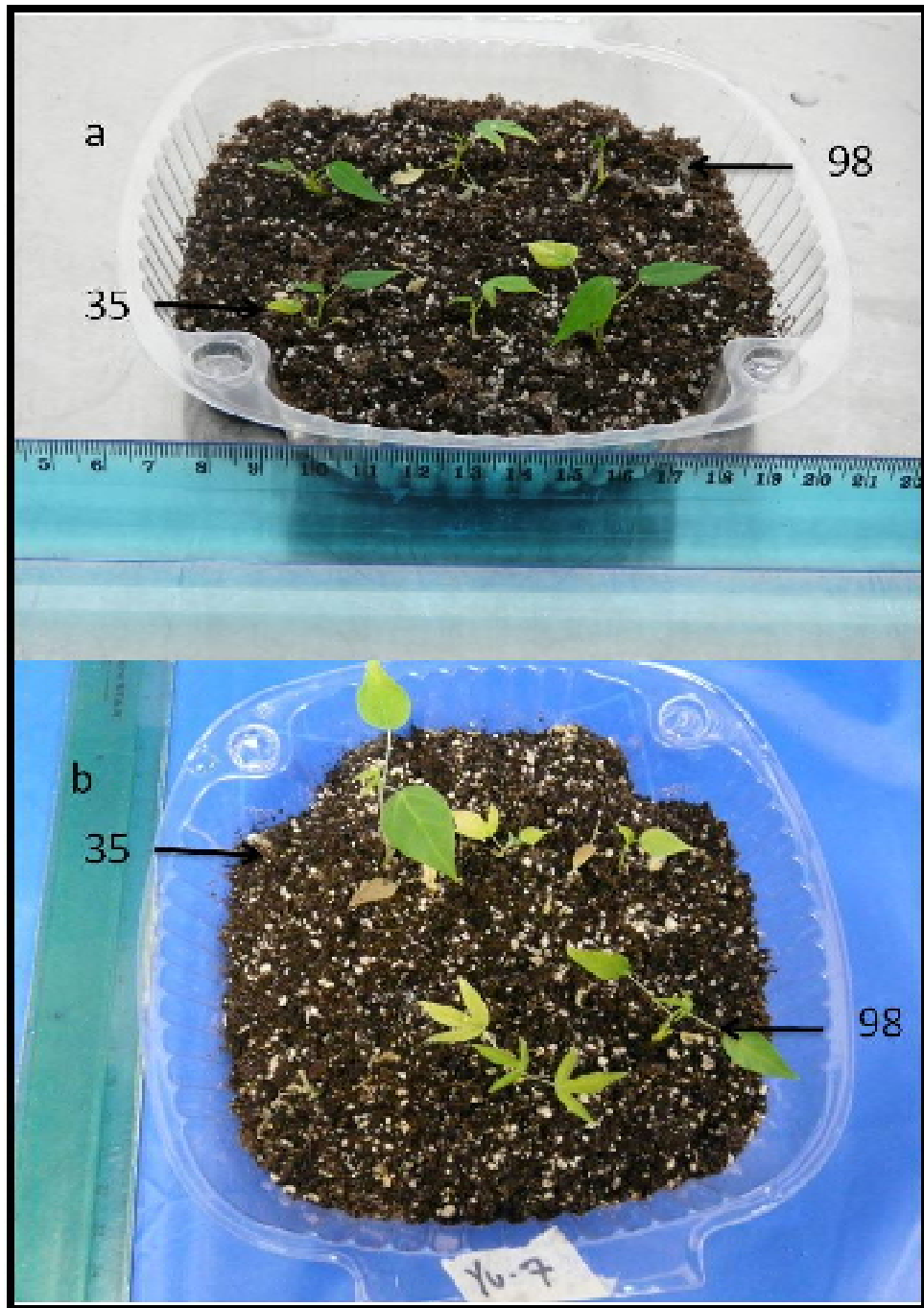


Figura 44: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-7. a) primer día de infección. b) último día de infección.

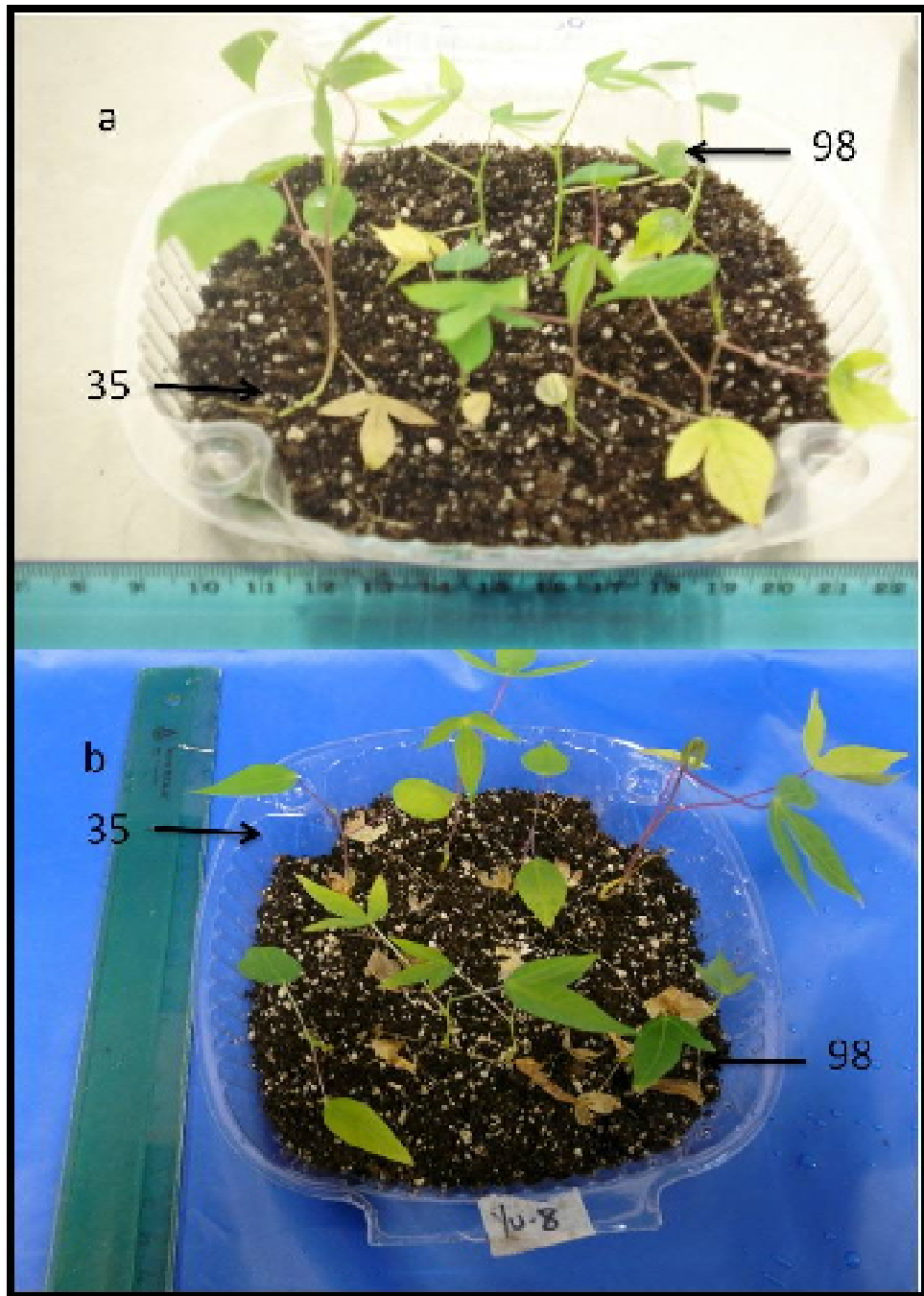


Figura 45: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-8. a) primer día de infección. b) último día de infección.

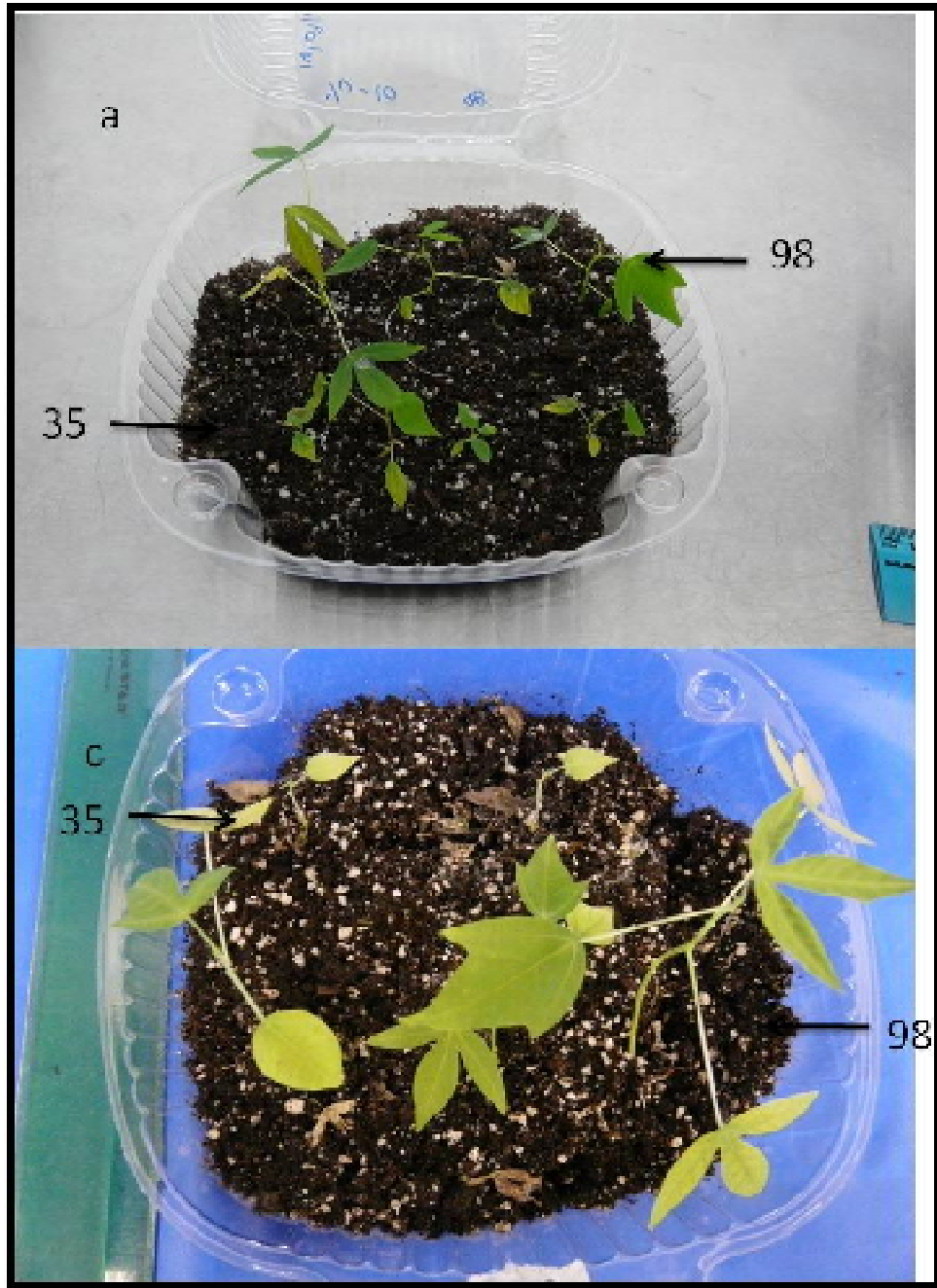


Figura 46: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-10. a) primer día de infección. b) último día de infección.



Figura 47: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-11. a) primer día de infección. b) último día de infección.

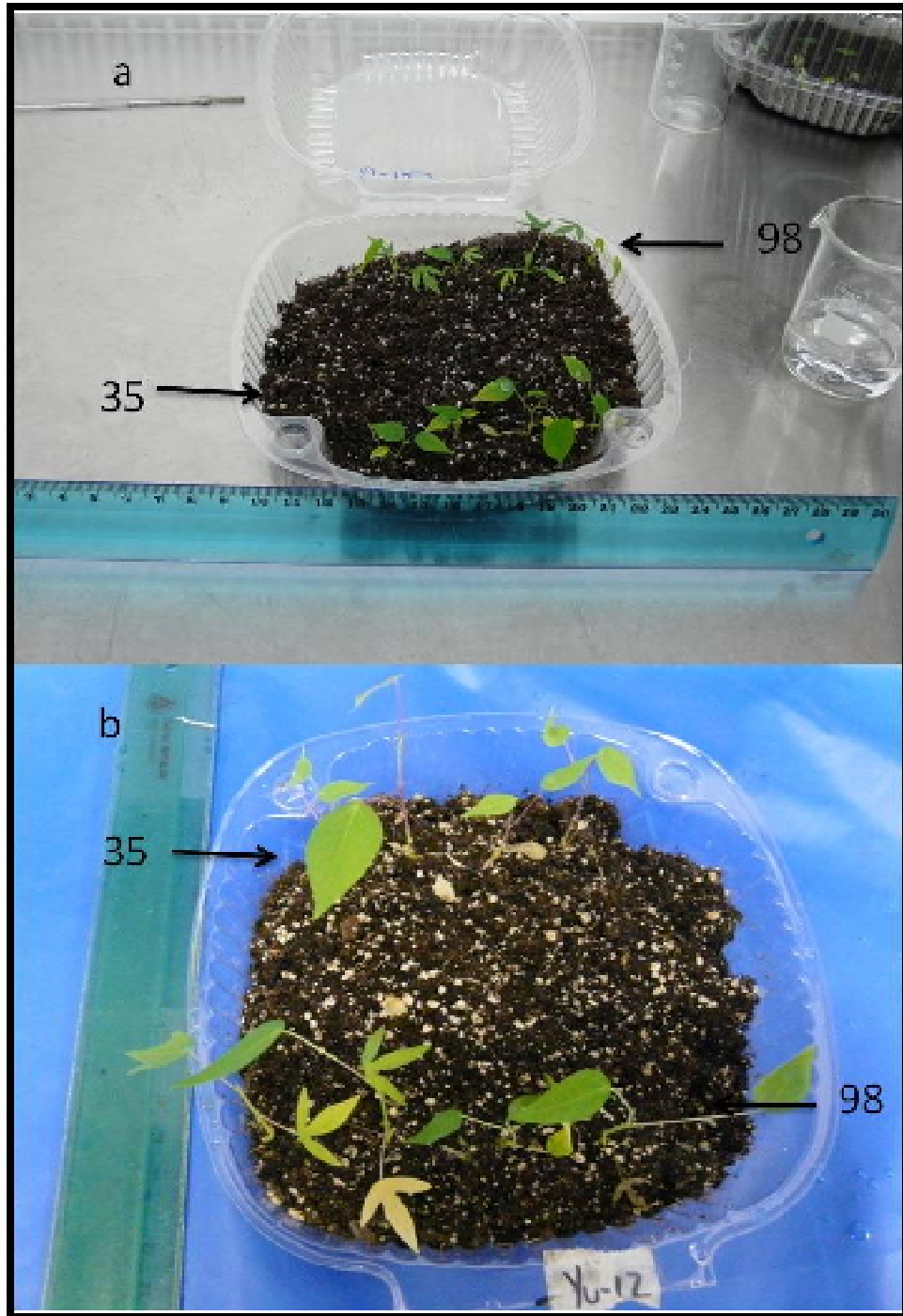


Figura 48: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-12. a) primer día de infección. b) último día de infección

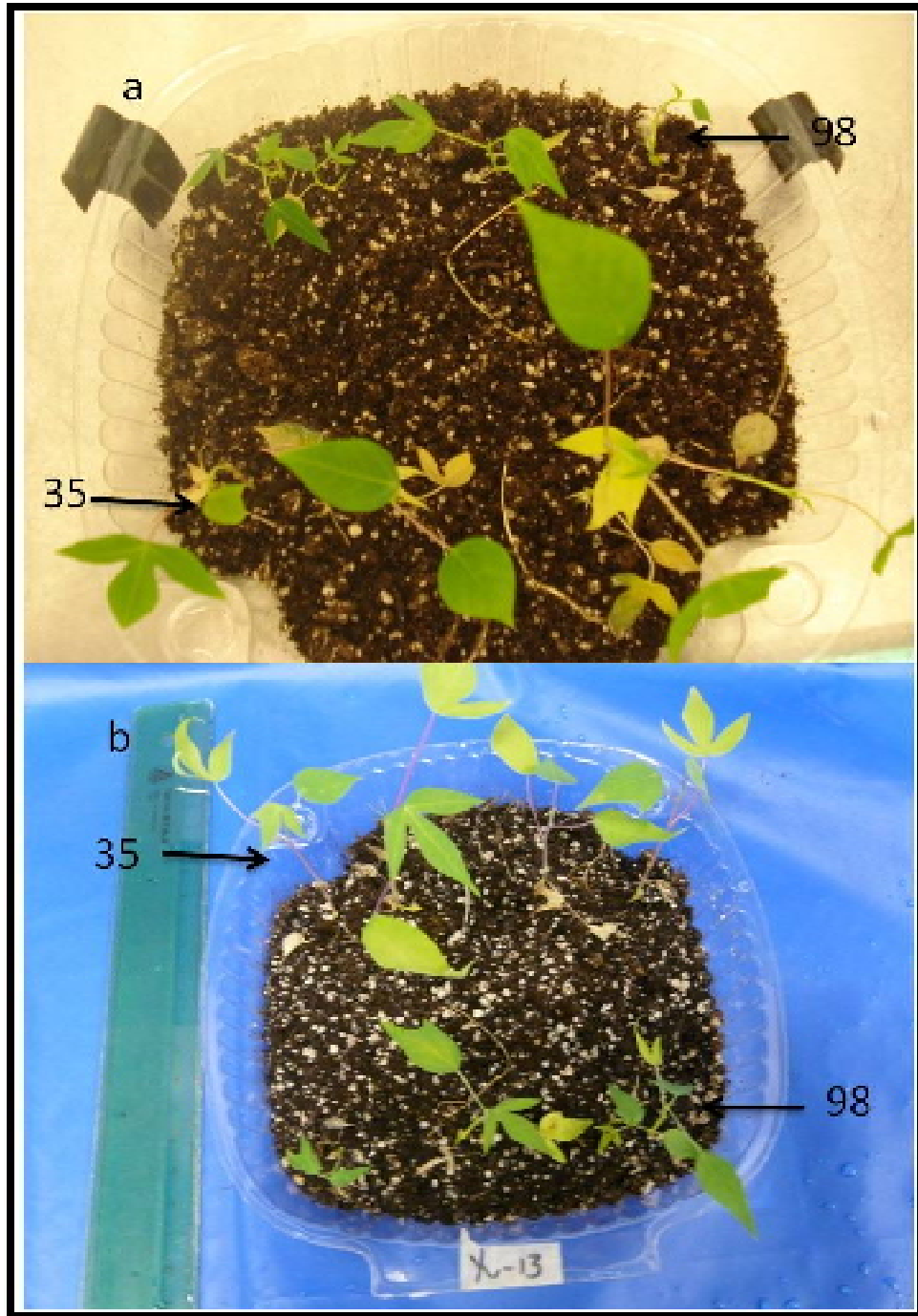


Figura 49: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-13. a) primer día de infección. b) último día de infección.

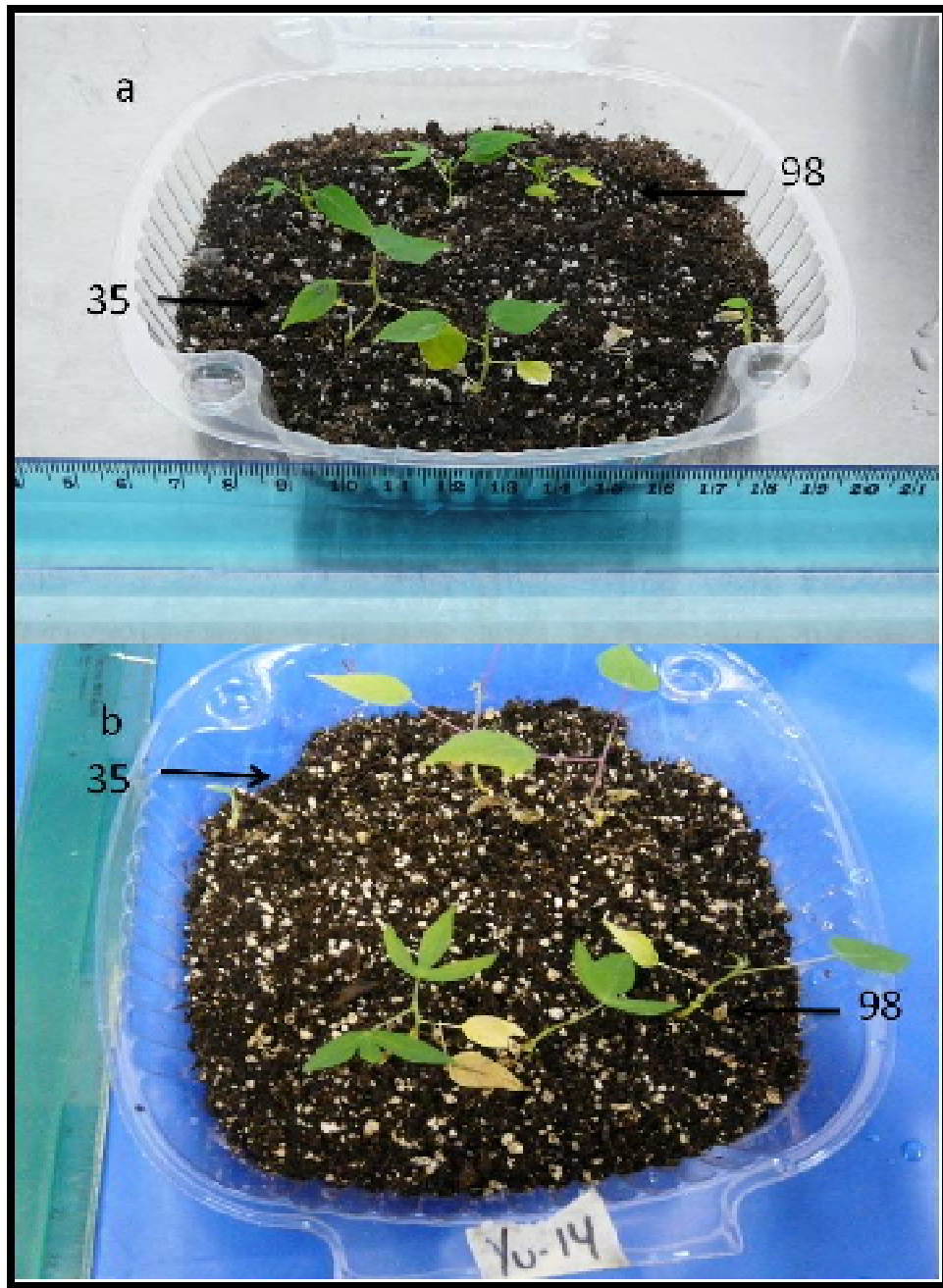


Figura 50: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-14. a) primer día de infección. b) último día de infección.

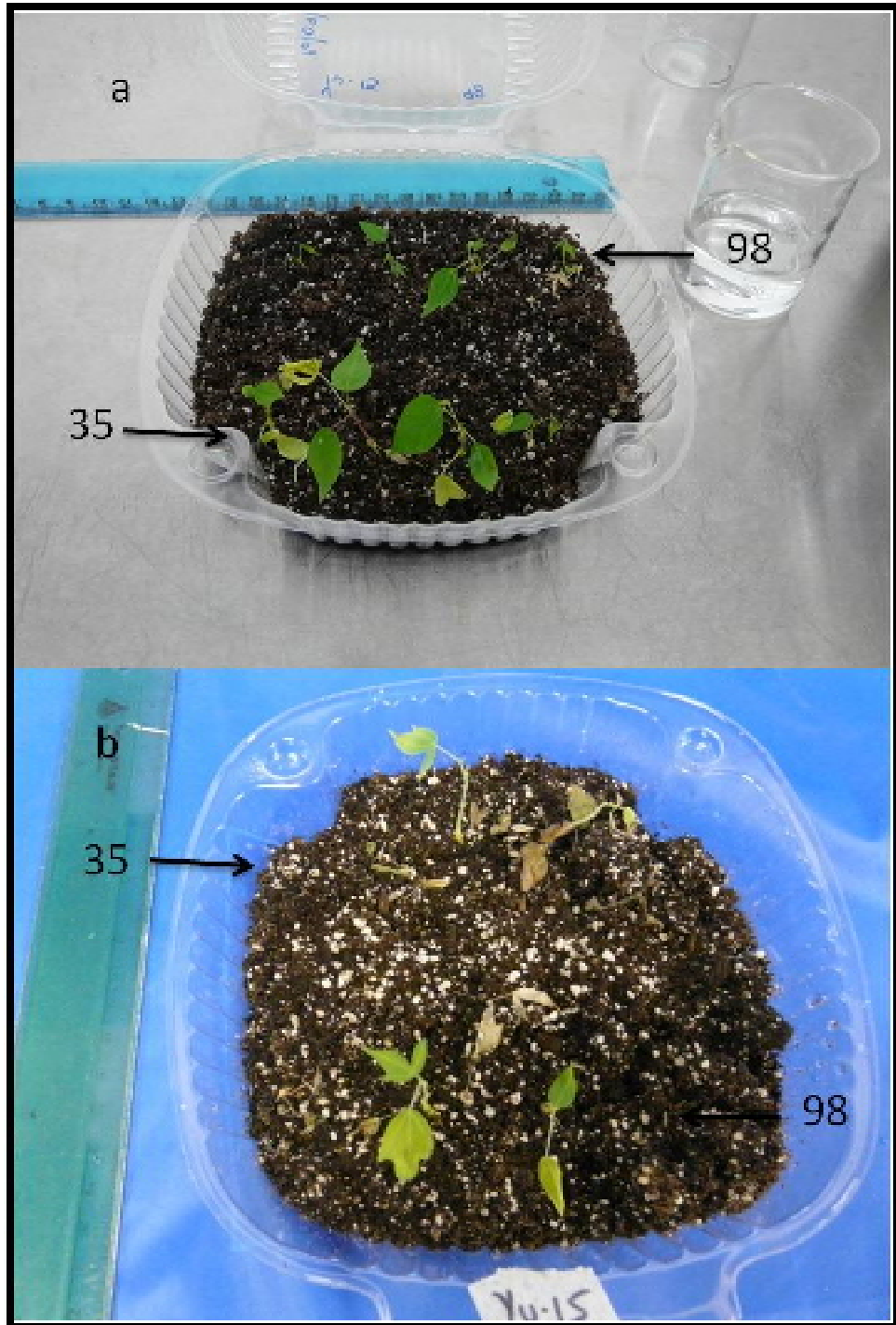


Figura 51: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-15. a) primer día de la infección. b) último día de la infección.

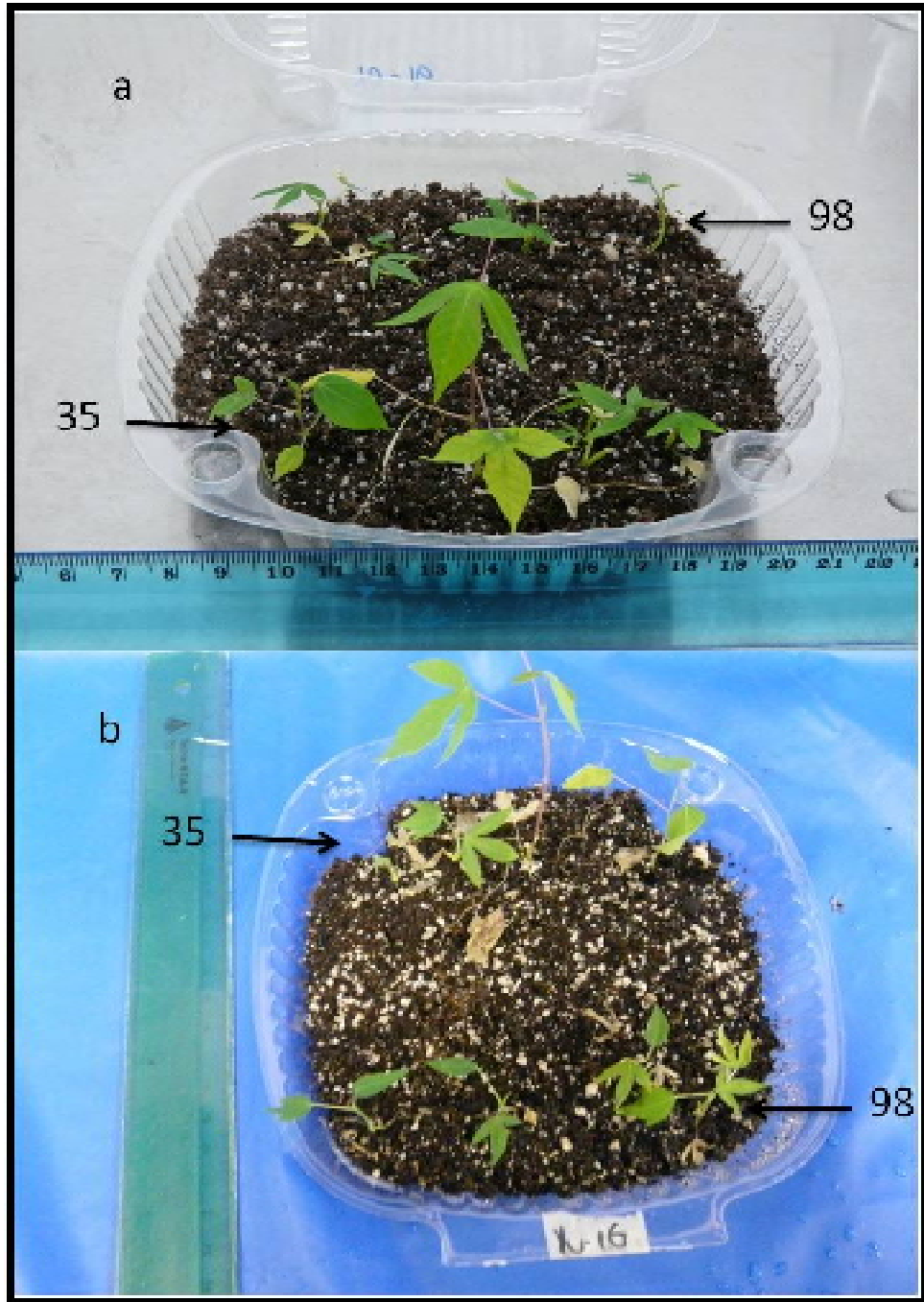


Figura 52: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-16. a) primer día de la infección. b) último día de la infección.

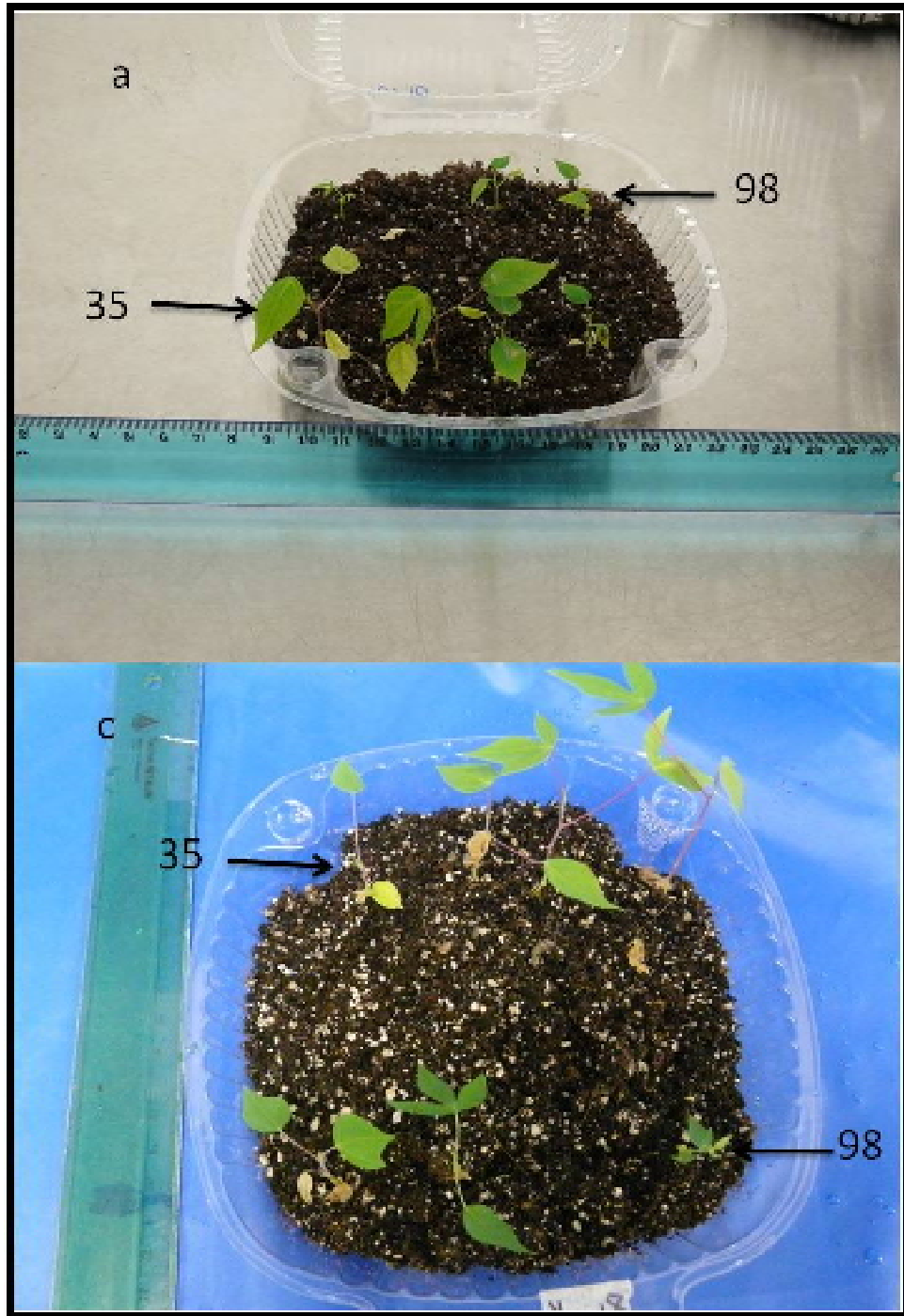


Figura 53: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-18. a) primer día de la infección. b) último día de la infección.

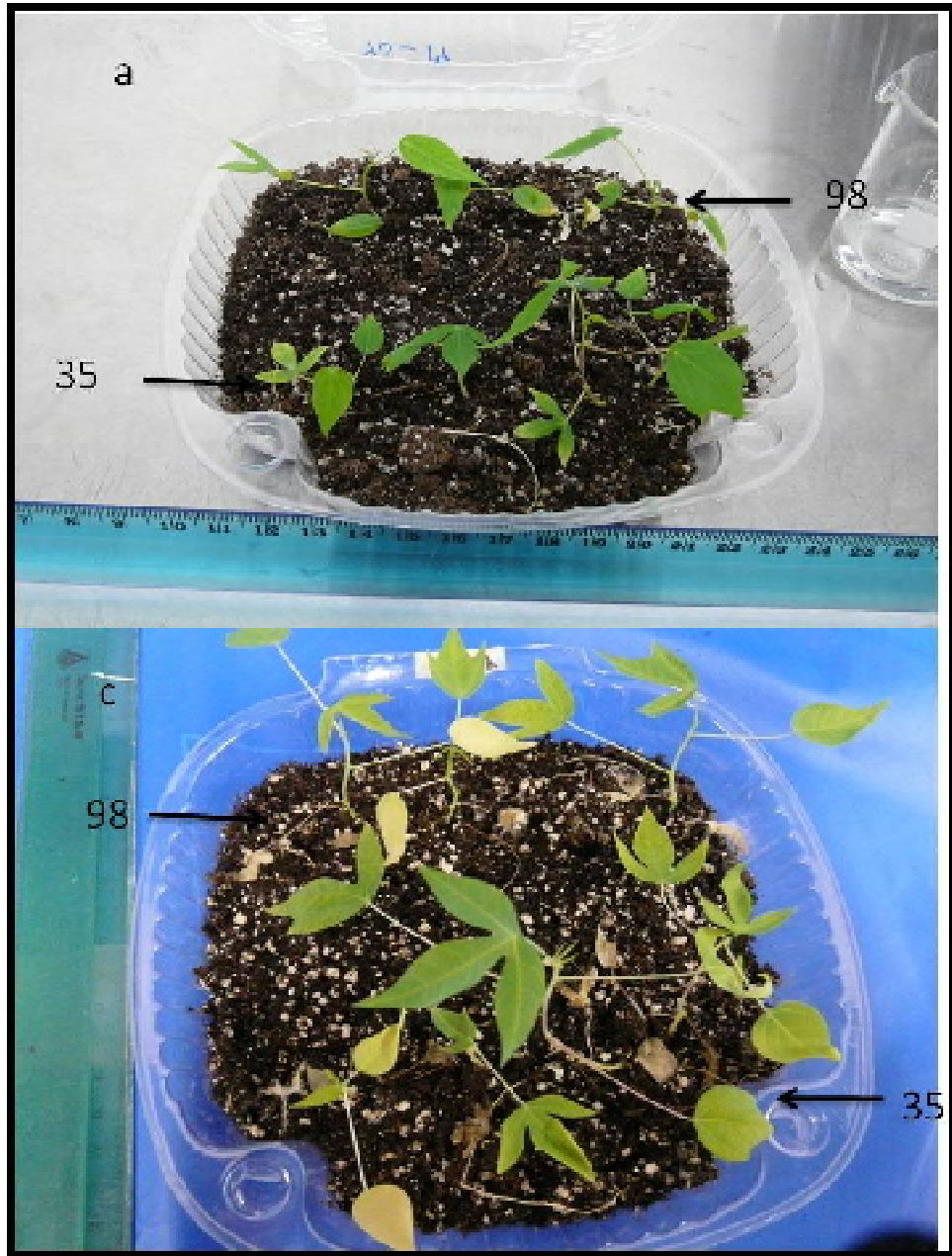


Figura 54: Infección de plántulas de yuca de la variedad 35 y 98 con el hongo Yu-19. a) primer día de la infección. b) último día de la infección.

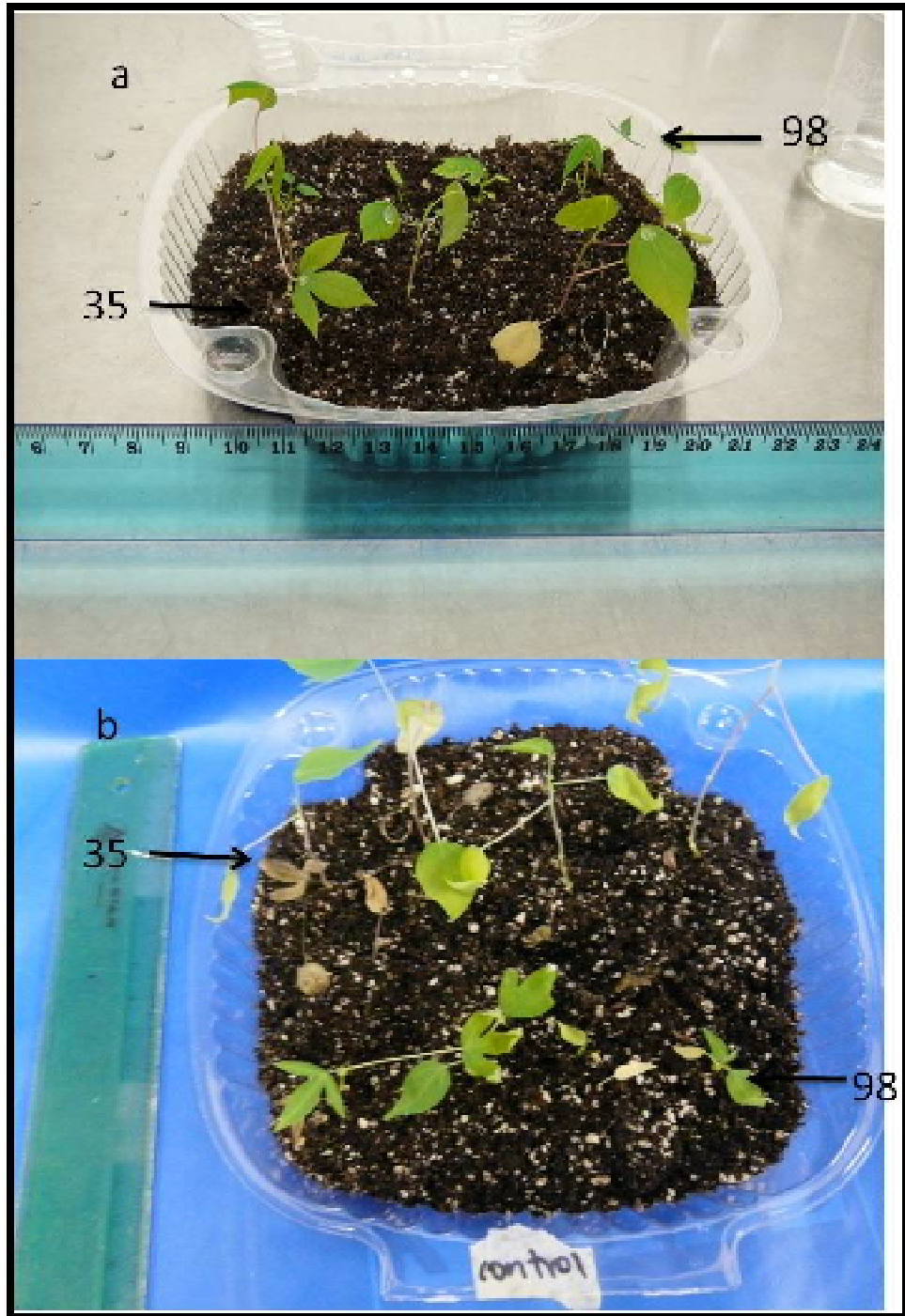


Figura 55: Control de la variedad 35 y 98 tratado con Carborundo N° 2. a) primer día de la infección. b) último día de la infección.



Figura 56: Control de la variedad 35 y 98 tratado con Carborundo N° 2. a) primer día de la infección. b) último día de la infección.

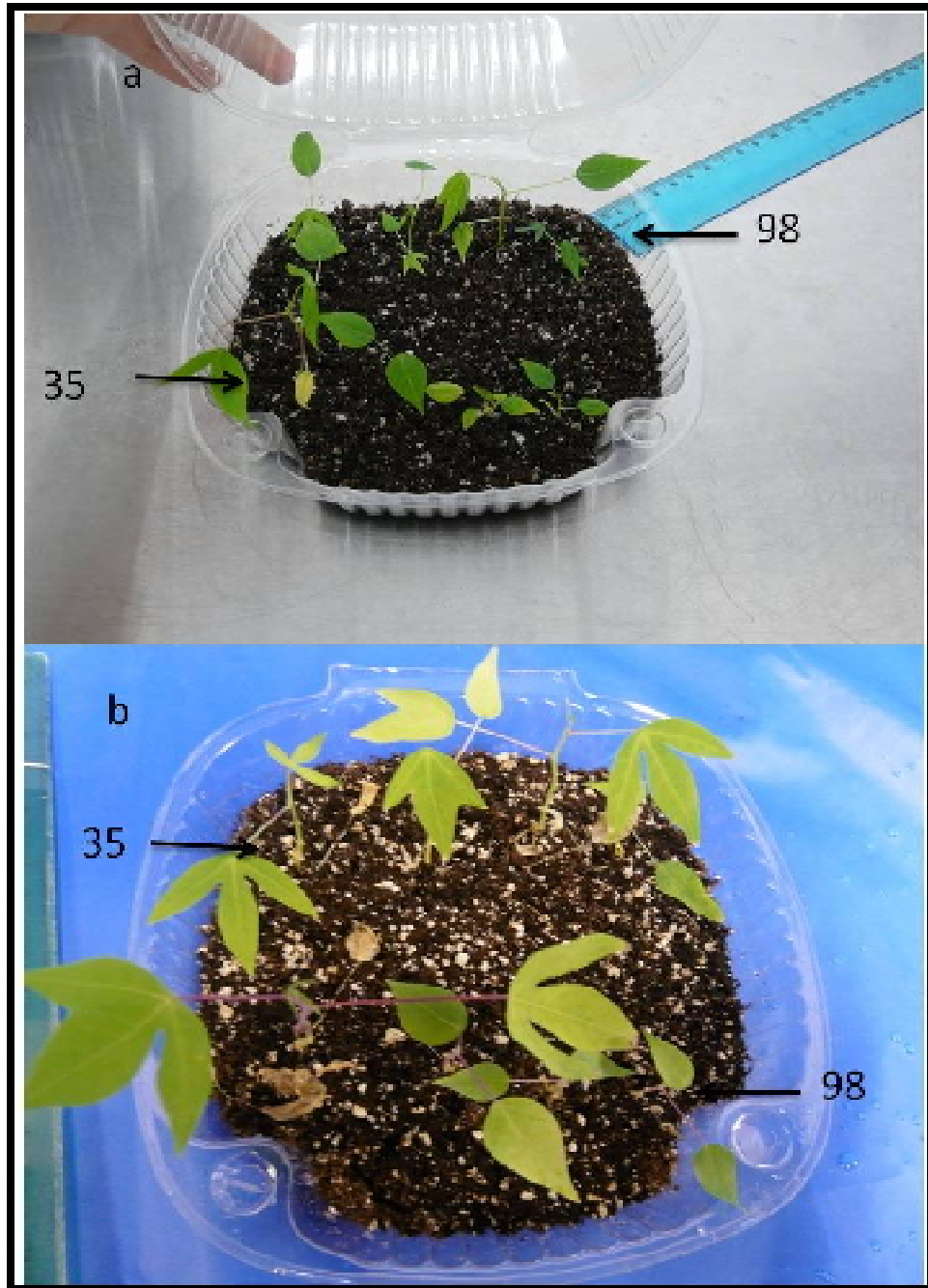


Figura 57: Control de la variedad 35 y 98 sin tratar con carborundo. a), primer día de la infección. b) último día de la infección.

Para determinar el efecto de los diferentes hongos sobre las plántulas infectadas se midió la longitud de los entrenudos de cada planta y se realizó, utilizando el Software Minitab 15, un análisis de varianza o ANOVA de un solo factor (sección 4.12.1).

En el histograma realizado la longitud media de los entrenudos de todas las plántulas es de 0,9147 cm y además, la comparación del histograma con la distribución normal sugiere que los datos satisfacen el supuesto de normalidad dado que la curva normal teórica (figura 58 curva azul) es simétrica alrededor de la media estimada (figura 58, línea roja).

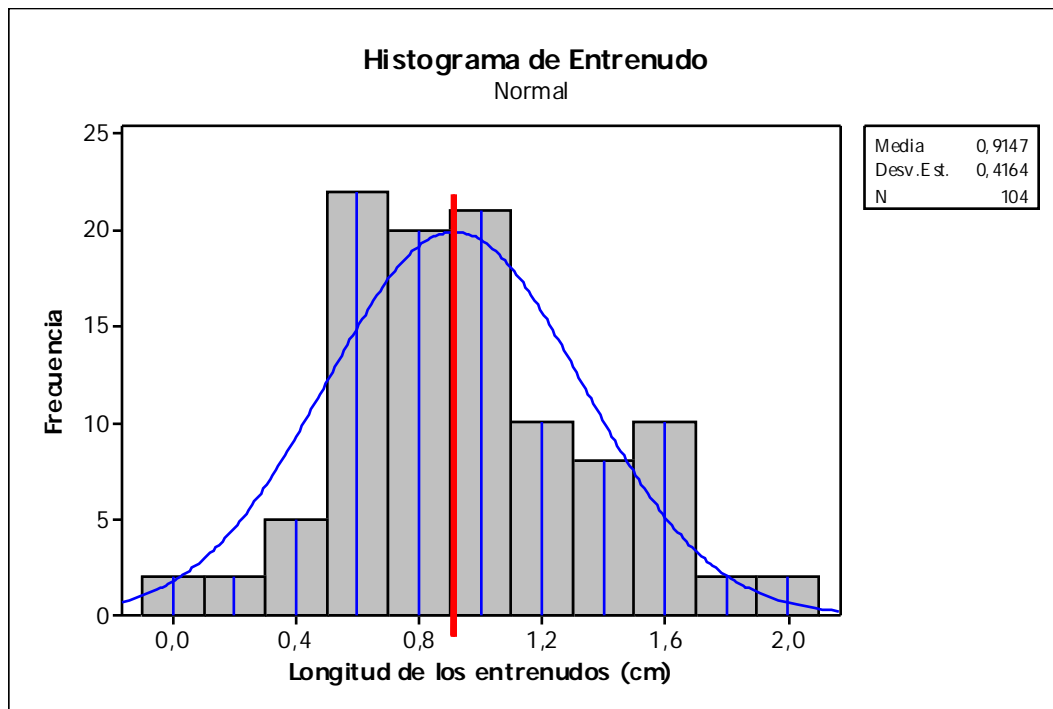


Figura 58: Histograma con ajuste de distribución Normal de las plántulas infectadas con hongos filamentosos.

Una vez comprobada la normalidad de los datos, la estrategia para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias consiste en obtener un estadístico (F)

que refleja el grado de parecido entre las medias que se comparen. Si las medias poblacionales son iguales, las medias muestrales serán parecidas, existiendo entre ellas tan sólo diferencias atribuibles al azar.

Comparando la longitud media de las plántulas infectadas por los diferentes hongos y los controles tratados con carborundo N°2, se realizó el análisis de varianza donde los estadísticos se muestran en la tabla VI.

Tabla VIII: Estadísticos de ANOVA realizado con los controles con tratamiento.

$\alpha = 0.05$	GL	SC	MC	F	P
Inter-grupos	15	3,011	0,201	1,19	0,295
Intra-grupos	88	14,847	0,169		
Total	103	17,859			

GL: grados de libertad SC: suma de cuadrados MC: medias cuadráticas F: estadístico de Fisher. P: valor P

En la tabla VI el estimador intergrupo se obtiene a partir de la variación existente entre las medias de los grupos, en este caso, el conjunto de plántulas tratadas con cada hongo y los controles. El estimador intragrupo se obtiene a partir de la variación existente entre las medias dentro de cada grupo. La tabla VI recoge la suma de cuadrados del estimador inter e intragrupo (SC).

Los grados de libertad (GL), corresponden al número de variables aleatoriamente independientes n , menos el número de variables dependientes $r(n - r)$. En el caso del estimador intergrupo, GL es el número de grupos totales de la muestra, menos el número de grupos estadísticamente dependientes ($16 - 1 = 15$). Para el caso del estimador intragrupo, GL es el número de sujetos totales, menos el número de sujetos estadísticamente dependientes ($104 - 16 = 88$). Las medias cuadráticas (MC) se obtienen dividiendo la suma de cuadrados (SC) entre los

grados de libertad GL. El estadístico F se obtuvo como un cociente entre la MC intergrupos e intragrupos ($0,201/0,169 = 1,19$).

En el experimento realizado $P = 0,295$ es mayor a $\alpha = 0,05$ por lo que se acepta la hipótesis de igualdad de medias entre los controles tratados con carborundo N° 2 y las plántulas infectadas con los hongos aisladas. No hay diferencias entre la longitud de los entrenudos de las plántulas control con tratamiento y las plántulas infectadas. Gráficamente (figura 59) el resultado del ANOVA se observa como un solapamiento de las medias de las plántulas infectadas con cada uno de los hongos y las plántulas control tratadas con carborundo N°2.

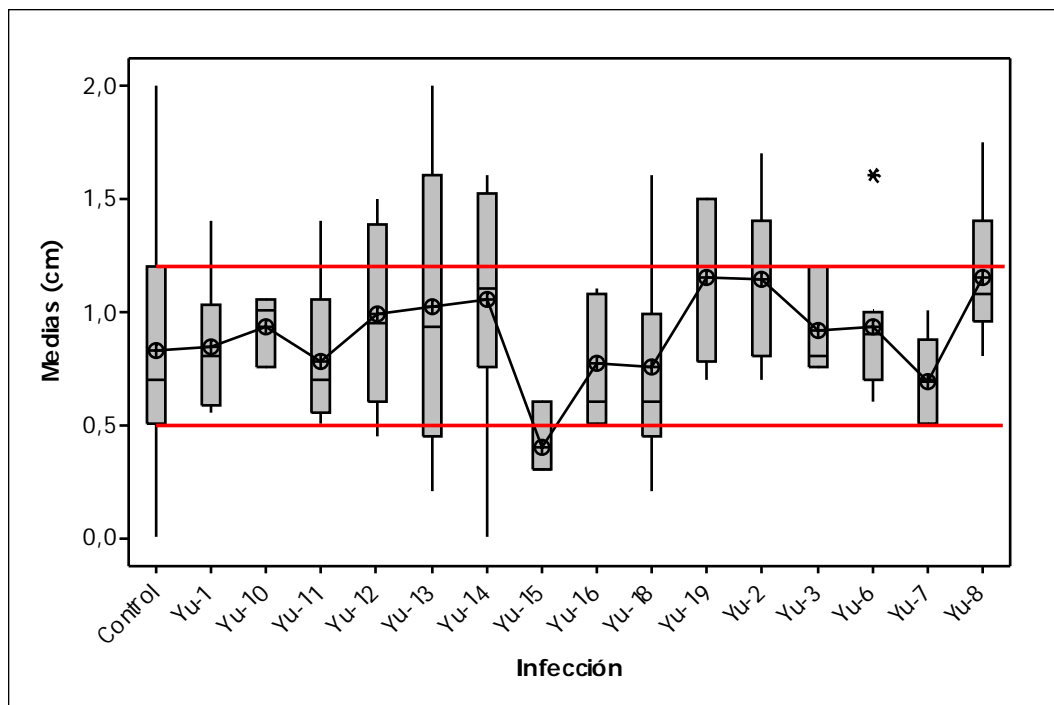


Figura 59: Gráfico de cajas de las medias obtenidas para las plántulas control, tratadas con carborundo N° 2, y las plántulas infectadas con los hongos aislados.

Además de comparar las medias de las plántulas infectadas con los hongos y las plántulas control tratadas con carborundo N° 2, es importante comparar si

existen diferencias significativas entre el control sin tratamiento con carbورundo y las plántulas infectadas con los hongos. Como en el caso anterior, se realiza un histograma para comprobar la distribución normal de los datos (figura 60). Los estadísticos del ANOVA se muestran en la tabla VII.

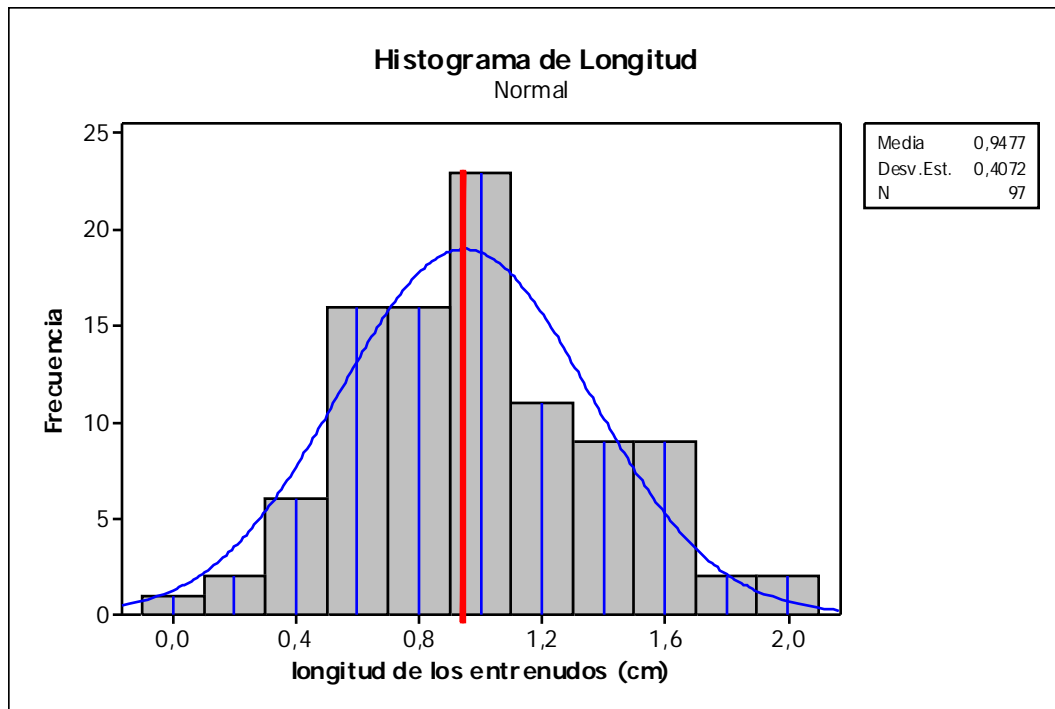


Figura 60: Histograma con ajuste de distribución Normal de las plántulas infectadas y los controles sin carbورundo.

Tabla IX: Estadísticos de ANOVA realizado con los controles sin tratamiento.

$\alpha = 0.05$	GL	SC	MC	F	P
Inter-grupos	15	3,2	0,213	1,36	0,188
Intra-grupos	81	12,715	0,157		
Total	96	15,915			

GL: grados de libertad SC: suma de cuadrados MC: medias cuadráticas F: estadístico de Fisher. P: valor P

En la tabla VII se observa que el estadístico P es mayor al nivel de significación α , por lo que no se rechaza la hipótesis de la igualdad de medias. No

hay diferencias entre las plántulas tratadas con carborundo y las plántulas que no han sido tratadas con carborundo.

Los resultados obtenidos en el experimento junto con el análisis estadístico comprueba que los hongos aislados no producen alargamiento de los entrenudos de las plántulas infectadas.

En cuando a la necrosis producida por los diferentes hongos, se comparó tomando en cuenta las fotos al inicio del experimento y al final del experimento, la presencia de manchas foliares (M.F), chancros en la hoja tallo o peciolo (Chan.), la cantidad de plantas que murieron por la infección (X) y el número de hojas caídas (N.C) (tabla VIII).

Tabla X. Observaciones sobre la mortalidad y necrosis del tejido de las plantas infectadas.

Infección	M. F.	Chan.	X		N.C	
			35	98	35	98
Yu - 1	-	-	0	0	4	2
Yu - 2	-	-	0	0	4	2
Yu - 3	-	-	4	1	9	4
Yu - 6	-	-	0	0	3	4
Yu - 7	-	-	0	1	4	2
Yu - 8	-	-	-	-	5	7
Yu - 10	-	-	3	0	5	2
Yu - 11	-	-	3	0	4	1
Yu - 12	-	-	1	0	4	4
Yu - 13	-	-	0	0	5	2
Yu - 14	-	-	2	0	5	2
Yu - 15	-	-	2	1	4	3
Yu - 16	-	-	1	0	7	5
Yu - 18	-	-	1	0	2	2
Yu - 19	-	-	0	0	6	5
Control1	-	-	1	0	5	3
Control2	-	-	0	0	5	2
Control*	-	-	0	0	3	6

Los hongos que ocasionaron la muerte de 3 o más plántulas fueron Yu-3, Yu - 10, Yu – 11 y Yu – 15. Dichos hongos afectaron principalmente a la variedad 35, observándose que las plántulas de la variedad 98 están saludables sin síntomas de necrosis. La cantidad de hojas caídas varía en un rango de 5 a 13 hojas caídas, siendo en los controles un promedio de 8 hojas caídas. Es importante resaltar que la mayoría de las hojas donde se inoculó el hongo se cayeron a inicios del experimento. Para ninguno de los hongos se observó deformación de la hoja, manchas foliares o chancros en las hojas, tallo y peciolo.

6. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue aislar al hongo *Sphaceloma manihoticola*, así como otros hongos patógenos y endófitos asociados con plantas de la yuca con síntomas de súper-alargamiento. Se aisló una población de hongos de las hojas, tallo y peciolo con síntomas de súper-alargamiento y se realizó un análisis de patogenicidad en plantas de yuca. Adicionalmente, se determinó el efecto de metabolitos extracelulares de los hongos aislados en plantas de yuca.

6.1 Aislamiento de los hongos

Inicialmente en la enfermedad de súper-alargamiento, el hongo *Sphaceloma manihoticola* crece en la epidermis de la planta; luego de su penetración, crece en los espacios intercelulares de los tejidos de la epidermis y la corteza (Álvarez & col, 2002). Se realizó una desinfección superficial, de los tejidos infectados, a fin de remover los contaminantes de la superficie para poder aislar a *S. manihoticola* y otros hongos endófitos, los cuales se definen como aquellos que viven en los espacios intercelulares o dentro de las células de las plantas hospedantes sin ocasionar un síntomas de enfermedad (Bill, 1996).

De acuerdo a lo reportado por Álvarez y colaboradores (Álvarez & col, 2000) las colonias de *S. manihoticola* crecen lentamente, observándose las colonias jóvenes como una masa gelatinosa y mucosa que luego se estabiliza en el medio con un ancho irregular y variable dentro de varias réplicas de un mismo aislado; el micelio aéreo aparece en una colonia entre los 21 y 28 días de haber sembrado el

hongo en el medio de cultivo; puede ser completamente amarillo o presentar diferentes colores como negro, marrón, rojo, verde, beige, rosa o blanco.

Entre los resultados descritos en la sección 5.1 se observó crecimiento de colonias jóvenes con apariencia gelatinosa para algunos hongos, semejantes a lo reportado por Álvarez y colaboradores (Álvarez & col., 2000); sin embargo, se observaron diferencias con respecto a la aparición de micelio aéreo en un tiempo menor al estimado por dichos investigadores. A pesar de las similitudes y diferencias encontradas, es importante tomar en cuenta que las características morfológicas reportadas para *S. manihoticola* no son suficientemente distintivas por ser altamente variables e inestables a lo largo del tiempo (Álvarez & col., 2000). Algunos autores consideran que dichos cambios morfológicos son inducidos por factores del entorno en el que se encuentra el hongo (Zeigler & col. 1983).

Con respecto a las investigaciones de los hongos endófitos, hasta el momento no han sido reportados para plantas de yuca; sólo han sido estudiados hongos endófitos en otras plantas de la familia de las *Euforbiaceas* (Dai & col, 2006; Dai & col, 2008). Algunas variedades del género *Fusarium* han sido descritas como hongos endófitos de *Ephorbia pekinensis*, una planta medicinal china de la familia *Euforbiaceas* (Dai & col., 2008). La mayoría de las especies de *Fusarium*, se han definido principalmente como saprófitas, algunas parasíticas y muy pocas patógenas (Alabouvette & col, 1993). Existen estudios de algunas especies de *Fusarium* utilizadas como controlador biológico en plantas de banana y tomate (Amin, 1994; Hallman & col., 1995).

La característica principal para el reconocimiento del género *Fusarium* es la forma y tamaño de las esporas. La presencia de macroconidios curvados y pluriseptados es típica del género (Booth, 1971); similar a lo observado en la presente investigación para algunos hongos como se describe en la sección 5.1. Las características macroscópicas de la colonia pueden variar entre colores blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo, especialmente en el reverso de la colonia (Seifert, 2001).

Debido a la variabilidad de las características macroscópicas y microscópicas, los datos obtenidos sobre la morfología de las colonias aisladas no son suficientes para identificar hongos; es necesario realizar estudios de secuencias de ADN que permitan identificar el género y especie de los hongos aislados, tales como las secuencias de regiones ITS y los factores de elongación (Nilsson & col., 2008).

6.2 Cinética de crecimiento

El término cinética de crecimiento puede definirse de dos maneras: (i) incremento en número de células por unidad de tiempo (Madigan & col. 2004); (ii) como la relación entre una tasa de crecimiento específica y la concentración del sustrato (Kovárová-Kovar, & col., 1998).

Los conceptos sobre la cinética de crecimiento microbiano se rigen por un modelo empírico propuesto por Monod (Monod, 1942). El modelo de Monod introduce el concepto del sustrato como un controlador del crecimiento donde el término de un sustrato limitante es utilizado para describir dos fenómenos: (i) En un sentido estequiométrico la disponibilidad de un nutriente determina la densidad de

células que puede alcanzarse; (ii) La tasa de crecimiento de un microorganismo está dictada por el consumo de un sustrato particular (Kovárová-Kovar, & col., 1998).

De acuerdo a las definiciones anteriores, en un cultivo discontinuo se pueden obtener datos de forma directa midiendo el incremento en biomasa y de forma indirecta, estimando el consumo del sustrato en función del tiempo. La relación entre el crecimiento y el consumo del sustrato fue hecha por Monod (Monod, 1942). La variación de biomasa (N) en función del sustrato consumido (s) (dN/ds) son inversamente proporcionales, es decir, se va consumiendo un sustrato cuya concentración decrece en forma proporcional al crecimiento de la biomasa. Siguiendo el modelo de Monod, los datos de la cinética de crecimiento se obtuvieron estimando el consumo de glucosa y nitrógeno en función del tiempo (gráficos 5 al 18, sección 5.3).

En un sistema cerrado o cultivo en medio no renovado se obtiene para todos los microorganismos una curva de crecimiento típica que puede dividirse en fases: (i) una fase inicial de latencia donde no se observa crecimiento, dicha fase puede ser larga o breve dependiendo de las condiciones de crecimiento. (ii) Una fase exponencial donde el aumento en biomasa es una progresión geométrica de base 2; es decir, cuando las células se duplican en función del tiempo. (iii) una fase estacionaria cuando un nutriente esencial es un factor limitante del crecimiento o cuando ocurre la acumulación de productos de desecho que cesen el crecimiento. (iv) Finalmente la fase de muerte donde los microorganismos pierden de forma irreversible la capacidad de multiplicación, puede ocurrir lisis celular (Madigan & col. 2004).

Así mismo, la actividad metabólica en cada una de las fases de una curva de crecimiento es de gran interés. Durante la fase de latencia las células se adaptan metabólicamente a las condiciones de crecimiento. Una vez que las células se adaptan a sus condiciones de crecimiento, se multiplican y comienza la fase de crecimiento exponencial. Cuando un nutriente es limitante del crecimiento se produce la fase estacionaria y aunque no hay aumento de células muchas funciones celulares continúan, como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos (Madigan & col., 2004).

Algunos hongos y bacterias producen metabolitos secundarios luego de que cese el crecimiento exponencial, en medios de cultivos nutricionalmente ricos (Demain, 1986). Los genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios no se expresan de forma constitutiva; existen factores de transcripción críticos para la expresión o supresión de estos genes (Hoffmeister & col. 2007).

El reconocimiento de las condiciones del medio influye en la formación de metabolitos secundarios; se han encontrado algunos factores de transcripción que responden a la concentración de carbono, nitrógeno y pH en el medio (Dowzer & col, 1989; Hynes, 1975; Tilburn & col., 1993).

Siguiendo el modelo de Monod (Monod, 1942), las fases de una curva de biomasa en función del tiempo pueden extrapolarse a las curvas de consumo de sustrato en función del tiempo. En los resultados descritos en la sección 5.2 (figuras 12 a 26) no se agotó la fuente de nitrógeno, un elemento importante que interviene en la regulación de la síntesis de giberelinas dado que los genes que inducen la producción de giberelinas son reprimidos por altas concentraciones de nitrógeno

(Tudzynski, 1999). Sin embargo, como se describió anteriormente la fase de latencia y crecimiento es metabólicamente activa, por lo que hay producción de metabolitos intracelulares y extracelulares (Madigan, 2004).

Entre los estudios acerca de la producción de giberelinas por *S. manihotica* y *F. Moniliforme* se encuentran los realizados por Zeigler y colaboradores (Zeigler & col, 1980) los cuales obtuvieron giberelinas cultivando *S. manihotica* en medio líquido Czapek entre 11 y 24 días de incubación con agitación continua. Rademacher y colaboradores (Rademacher & col., 1992) cultivaron por 12 días, a *F. moniliforme* y *S. Manihotica* en un medio limitado en nitrógeno, obteniendo altas concentraciones de GA₃ y GA₄, respectivamente. Dai y colaboradores (Dai & col., 2008) obtuvieron giberelinas cultivando especies de *Fusarium* por 20 días en medio líquido MS.

Los resultados del experimento de cinética de crecimiento (sección 5.3) muestran que en 5 días es poco el nitrógeno consumido. Los hongos pudieron producir metabolitos extracelulares pero no en grandes cantidades como sería la producción de metabolitos primarios cercano al agotamiento de la fuente de nitrógeno. Para obtener los metabolitos secundarios, como la giberelinas, es necesario realizar la cinética de crecimiento por más tiempo; posiblemente 1 mes, tomando muestras cada 24 horas.

6.3 Respuesta hipersensible de la planta por la infiltración de compuestos

La coexistencia de las plantas y los patógenos en la naturaleza indica que han evolucionado juntos, generándose una especificidad entre patógeno y

hospedante. El equilibrio dinámico entre la resistencia y la virulencia puede ser explicado por el concepto gen-por-gen el cual asume que el producto de un gen en el patógeno es reconocido específicamente por el producto de un gen del huésped. Cuando la planta no es capaz de reconocer el producto del gen del patógeno ocurre la infección (Agrios, 2005).

Cuando un gen específico de resistencia (gen *R*) aparece en el hospedante, le permite reconocer el producto de un gen de avirulencia del patógeno (genes *Avr*) (Agrios, 2005). Los genes *Avr* fueron identificados inicialmente por Flor (Flor, 1971), se denominan genes de avirulencia dado que hacen que un patógeno sea avirulento, es decir, incapaz de inducir una enfermedad en la planta hospedante. Mientras que el gen que codifica para una proteína que no es reconocida por el hospedante, se denomina virulento porque produce infección.

El gen *Avr* codifica un ligando (molécula elicitora) que es reconocido por el producto del gen *R* de la planta, dicha interacción de reconocimiento por el hospedante dispara una serie de reacciones denominada respuesta hipersensible que confieren resistencia a la planta contra la infección del patógeno (Bent, 1996).

El término respuesta hipersensible (RH), inicialmente fue acuñado para describir la muerte rápida de una planta hospedante cuando es infectada por un patógeno (Stakman, 1915).

Durante la respuesta hipersensible ocurren los siguientes cambios en las células que rodean la infección: (i) producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). (ii) Flujo rápido de iones a través de la membrana que se caracteriza por la toma de iones calcio y la salida de iones de cloro y potasio, resultando en la

alcalinización del citoplasma (Morel & col., 1997). (iii) Expresión de genes relacionados a la defensa que incluyen enzimas involucradas en la síntesis de compuestos antimicrobianos, llamados fitoalexinas; proteínas estructurales incorporadas en la pared celular (Bradley & col., 1992), y proteínas, relacionadas a la patogenicidad, con actividad antimicrobiana (Schlumbaum & col., 1986, Diaz, 2009).

Algunos componentes que se producen en la respuesta hipersensible son tóxicos para las células de la planta, como las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden participar directamente en la muerte celular porque oxidan la membrana lipídica, las proteínas y los ácidos nucleicos, causando pérdida de la integridad celular (Baker & col., 1995).

El papel del ácido salicílico (AS) debe ser considerado en la producción de los compuestos tóxicos durante la Respuesta hipersensible. El ácido salicílico es una molécula de señalización producida en la planta cuando ocurre un ataque por un patógeno (Agrios, 2005).

El ácido salicílico induce la muerte celular dado que se une y bloquea la catalasa, una enzima que degrada el peróxido de hidrógeno en oxígeno e hidrógeno (Mur & col., 2008). En las plantas, la producción de peróxido de hidrógeno es un proceso continuo que se sintetiza como un subproducto de la fotorrespiración, la fotosíntesis, la oxidación de los ácidos grasos y la fosforilación oxidativa. Al bloquear la actividad de la catalasa, los niveles de peróxido de hidrógeno en la célula aumentan y activan genes relacionados a la defensa que desencadenan la respuesta de hipersensibilidad (Chen & col, 1995).

La acumulación de los niveles intracelulares de oxígeno reactivo también induce, además de la respuesta hipersensible, otro proceso muy importante, relacionado a la expresión de genes de defensa con le confiere protección a la planta contra una infección secundaria de patógenos, lo que se denomina resistencia sistémica adquirida (SAR) (Diaz, 2010).

Morfológicamente la respuesta hipersensible está caracterizada por la muerte rápida del tejido en el sitio de infección, limitando la multiplicación y propagación del patógeno (Gilchrist, 1998). La planta sacrifica alguna de sus células para rodear al patógeno con una capa o anillo de células muertas que inhiban su crecimiento produciendo una barrera física (Iakimova, 2005).

Bajo condiciones artificiales, la infiltración, en las hojas, de bacterias y hongos patógenos (Agrios, 2005; Mur & col., 2008), así como otros compuestos como el ácido salicílico (Chen & col, 1995), resultan en el desarrollo de la respuesta hipersensible.

En los experimentos realizados, la infiltración con aspirina (figuras 38 y 39), cuyo componente principal es el ácido salicílico, mostró las lesiones características que se describen para la respuesta hipersensible (Agrios, 2005, Bailleul & col., 1995; Billard & col., 1988). Las lesiones producidas por los sobrenadantes de Yu – 2, Yu -13, Yu – 14 y Yu – 16, fueron similares a las observadas por el control con ácido salicílico, indicando que los sobrenadantes de dichos hongos mimetizan la respuesta hipersensible (figuras 27, 32, 33, 34, 35, 36 y 37). Sin embargo, los controles en estas muestras también mostraron necrosis celular. Esto puede

explicarse con que el sobrenadante de la muestra llegó hasta la zona de los controles induciendo en ellos la muerte celular.

Los resultados de las muestras Yu-4 y Yu-11 no mostraron muerte celular en los controles, los cuales fueron los mismos usados en las hojas que mostraron muerte celular. Es necesario repetir el experimento infiltrando en hojas diferentes las muestras y los controles.

Los sobrenadantes de los hongos, pueden tener metabolitos extracelulares de crecimiento, o metabolismo primario, que activen los genes de defensa de la planta y ocasionen las lesiones características de la respuesta hipersensible.

Hasta ahora han sido identificadas diferentes compuestos que inducen la respuesta de hipersensibilidad. Entre ellos, una proteína de 60 kDa aislada de la bacteria *Pseudomonas solanacearum* fue descrita por su capacidad de inducir la respuesta hipersensible en la papa (Huang & col., 1989). En experimentos con tabaco, las proteínas harpinas, aisladas de *Pseudomonas sp.*, inducen zonas necróticas, similares a la respuesta hipersensible, cuando son infiltradas en las hojas (Arlat & col., 1994).

Los elicitores provenientes de los hongos son oligosacáridos, polisacáridos y lípidos. (Koga & col., 1998). Algunos de los elicitores más estudiados son del Oomicete *Phytophthora*. Entre las moléculas identificadas se encuentra el hepta- β -glucopiranosido, un oligosacárido (Sharp & col., 1984). Algunos ácidos grasos insaturados tales como los ácidos icosapentaenoico y araquidónico, producido por *Phytophthora infestans*, han sido identificados como elicitores en la papa (Bostok & col, 1981).

En el caso de proteínas elicitoras, han sido identificadas las elicinas, que son pequeñas proteínas extracelulares, producidas por varias especies de *Phytophthora*, producen necrosis cuando son infiltradas en los tejidos de tabacco (Billard & col., 1988). En estudios con *Phytophthora megasperma*, la infiltración con una glicoproteína de 32 kDa, producida por el oomicete, en hojas de tabaco, causa los efectos típicos de la respuesta hipersensible (Baillieul & col., 1995).

Adicionalmente, existen sustancias químicas, además del ácido salicílico que pueden inducir la respuesta hipersensible, entre dichas sustancias se encuentra el ácido cólico, un ácido biliar producido en el hígado, identificado por inducir la producción de fitoalexinas y proteínas relacionadas a la patogenicidad en las plantas, además de muerte celular (Koga & col., 2006)

En el experimento algunos sobrenadantes mimetizaron la respuesta fisiológica observada en la respuesta de hipersensibilidad. Es probable que dichos sobrenadantes contengan moléculas elicitoras, ya sean oligosacáridos, lípidos, proteínas u otras sustancias que induzcan la respuesta de hipersensibilidad en las hojas infectadas, lo cual puede ser una potencialidad para inducir las defensas sistémicas de la planta.

Las moléculas que inducen la respuesta hipersensible pueden inducir las defensas sistémicas de la planta, manteniéndolas activas por un tiempo. Actualmente estudios en la inducción de las defensas de la planta brillan como una alternativa al control de patógenos de menor impacto al ambiente que los controladores sintéticos que son tóxicos al hombre y al ambiente.

Es necesario continuar los estudios con los metabolitos extracelulares de los hongos que produjeron necrosis celular como experimentos de infiltración de productos extracelulares de mayor tiempo de incubación. Es importante confirmar estos resultados para posteriormente caracterizar las moléculas que pueden inducir la muerte celular en las plántulas de yuca.

6.4 Infección de las plántulas de yuca con los hongos aislados

La enfermedad producida por el hongo *Sphaceloma manihoticola* causa grandes pérdidas económicas y tiene mayor incidencia en la época lluviosa, disminuyendo en los períodos secos. Los síntomas de la enfermedad son: (i) distorsión y enroscamiento de las hojas jóvenes. (ii) chancros en las nervaduras, tallo y peciolo. (iii) alargamiento exagerado de los entrenudos del tallo (Álvarez & col., 2002).

Los ensayos de patogenicidad del hongo *S. manihoticola* en plantas de yuca fueron realizados por Zeigler (Zeigler & col., 1980) y por Álvarez (Álvarez & col., 2003 y Álvarez & col., 2000).

Zeigler y colaboradores desarrollaron el experimento de infección a partir de plantas incubadas en un invernadero (Zeigler & col., 1980). Hojas, tallo y peciolo fueron inoculados por aspersión con las esporas del hongo *S. manihoticola*.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Zeigler y colaboradores (Zeigler & col., 1980) la infección de la planta por el hongo sólo ocurrió en una o dos hojas jóvenes, a pesar de que se roció toda la planta con esporas. Encontraron los síntomas característicos de la infección y adicionalmente, un halo amarillo de 1-2 mm de diámetro alrededor de los chancros en las hojas.

En los estudios de Álvarez y colaboradores (Álvarez & col., 2000), evaluaron la patogenicidad de 31 aislados del hongo en dos variedades diferentes de yuca, una resistente y otra susceptible. Los efectos de la patogenicidad fueron evaluados de acuerdo a una escala del 1 al 5 donde (1) plantas sin síntomas. (2) algunos puntos o chancros en las hojas y peciolo. (3) chancros en los peciolo y tallos, con deformación severa de la hoja. (4) alargamiento, chancros en las hojas, peciolo y tallo con deformación severa de la hoja. (5) Muerte tras alargamiento severo.

Luego de 15 días de inoculación, Álvarez y colaboradores (Álvarez & col., 2000) los diferentes aislados del hongo causaron síntomas que incluyen puntos necróticos en las hojas, chancros en las hojas, tallo y peciolo, distorsión severa de la hoja y alargamiento de los internudos del tallo. Sin embargo, no todas las plantas infectadas presentaron los síntomas anteriores. De acuerdo a la escala del 1 al 5 descrita anteriormente, la variedad de yuca susceptible presentó síntomas del 1 al 3 y la variedad resistente de 2 a 4.

Los resultados de Álvarez y colaboradores (Álvarez & col., 2000) indican que existen diferentes interacciones entre el hongo y el hospedante, tanto la variabilidad genética de las plantas de yuca como la del hongo determina el rango de interacción entre el hospedante y el patógeno, pudiendo manifestarse algunos o todos los síntomas característicos de la enfermedad.

Posteriormente, Álvarez & Colaboradores (Álvarez & col., 2003) realizaron de nuevo una prueba de patogenicidad, utilizando los mismos criterios descritos anteriormente. Haciendo un análisis molecular de los hongos aislados, encontraron

cinco grupos genéticamente diferentes, donde cuatro de los cuales son patógenos y uno no es patógeno.

En el experimento de infección realizado con los hongos aislados (sección 5.5, figuras 40 a 55), no se observaron diferencias significativas en la longitud de los entrenudos, como lo indica el ANOVA entre las plántulas controles y las plántulas infectadas con los hongos (tabla VI y VII). Siguiendo el criterio de evaluación de los síntomas descritos por Álvarez y colaboradores (Álvarez & col., 2003) no se observó ninguno de los síntomas característicos de la infección por *S. manihotica*.

Sin embargo, los resultados obtenidos no son suficientes para descartar que algunos de los hongos aislados pudiera ser *S. manihotica* dado que, como se describe en los trabajo de Álvarez y colaboradores (Álvarez & col., 2000 y Álvarez y col., 2003), los ensayos de patogenicidad muestran diferencias por la variabilidad genética existente en las plántulas de yuca y el hongo.

Adicionalmente, los síntomas entre las plantas tratadas con carborundo y las plantas no tratadas con carborundo no mostraron diferencias significativas (figuras 55, 56 y 57), pudiendo sugerir que el tratamiento con carborundo no fue efectivo para facilitar la entrada de los hongos a la planta o que muchos de los hongos aislados son endófitos de la yuca. Habría que tomar trozos de la planta infectada y colocarlos sobre agar zanahoria. Si el hongo crece confirmaría que es un endófito que no produce síntomas de infección.

Es importante determinar, si es tal caso, que éstos endófitos ayudan a proteger la planta de infecciones posteriores por hongos patógenos. Se ha observado que algunos hongos endófitos como *Fusarium* ayudan a la planta a

controlar hongos patógenos (Amin, 1994; Hallman & col., 1995). Confirmar la hipótesis de que los hongos, que no producen síntomas de infección, son endófitos tiene gran potencialidad para ayudar al control de patógenos igualmente de una forma más amigable al ambiente y al humano.

El síntoma más observado para los hongos que causaron daño a la planta fue muerte del tejido y caída de las hojas (tabla VIII, sección 5.5). Es necesario en experimentos futuros identificar y caracterizar los hongos que produjeron muerte a las plántulas de yuca.

El estudio del efecto de los metabolitos en las plántulas de yuca parece ser una técnica más eficiente para monitorear el efecto que tienen los hongos en la planta. La infección de las plantas podría estar influenciada por factores ambientales que pudieran enmascarar el efecto de los hongos. En particular para la caracterización por infección del hongo *S. manihotica* (Agrios, 2005).

7. CONCLUSIONES

- 1) Se aislaron y conservaron 18 cultivos axénicos de hongos filamentosos, con morfología macroscópica diferente, de las hojas, tallos y peciolo de plantas de yuca con síntomas de súper-alargamiento.
- 2) Entre los 18 hongos algunas características macroscópicas pudieran sugerir que entre ellos se ha podido aislar al hongo *Sphaceloma manihoticola*, como el caso del crecimiento inicial de un micelio gelatinoso y la aparición posterior del micelio aéreo. Adicionalmente, algunos hongos, pudieran ser identificados dentro del género *Fusarium* de acuerdo a la forma de los macroconidios característica del género. Sin embargo, las características morfológicas no son suficientes para identificar los hongos aislados.
- 3) Durante el proceso de infección los hongos Yu - 3, Yu - 10, Yu- 11 y Yu- 15 produjeron muerte de las plantas del clon de yuca 35 pero no del 98.
- 4) Los estudios de patogenicidad sobre las plántulas de yuca, son dependientes de la variabilidad genética de la planta, ya sea esta resistente o susceptible a los hongos aislados y adicionalmente, de la variabilidad genética del hongo.
- 5) Durante las pruebas de patogenicidad, no se observaron síntomas similares a los reportados para *S. manihoticola*.
- 6) La variedad 35 de yuca es más susceptible a la muerte por infección de los hongos que la variedad 98.
- 7) Metabolitos extracelulares producidos en la fase de crecimiento de los hongos Yu - 2, Yu - 13, Yu - 14, y Yu - 16 desencadenan respuestas de

defensa en las plantas del clon 35 y 98 de yuca. La respuesta de hipersensibilidad obtenida en las dos variedades de yuca para estos hongos demuestra que existe una interacción entre la planta y los hongos.

- 8) Los metabolitos extracelulares producidos en la fase de crecimiento de los hongos Yu – 11 y Yu – 4 no indujeron muerte celular de ninguno de los clones de yuca.

8. BIBLIOGRAFIA

- **Alabouvette, C., P. Lemanceau and C. Steinberg** (1993). Recent advances in the biological control of fusarium wilts. *Pestic. Sci.*, 37: 365-373.
- **Alarcón D.I.** (2006). Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- **Aleel K. Grennan.** (2006). Gibberellin Metabolism Enzymes in Rice. *Plant Physiol.* 141, 524-526.
- **Agrios G.N.** (2005). *Plant Pathology*. 4° edición. Academic Press,. Inc. San Diego, California.
- **Alvarez E, Molina M.L.,** (2000). Characterizing the *Sphaceloma* fungus, causal agent of superelongation disease in cassava. *Plant Disease* 84, 423-428.
- **Alvarez E, Llano G.** (2002) Enfermedades del cultivo de la yuca y métodos de control. Pág 130-146 en: CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). La Yuca en el Tercer Milenio, Cali, Colombia.
- **Amin, N.** (1994). Untersuchungen über die Bedeutung endophytischer Pilze für die biologische Bekämpfung des wandernden Endoparasiten *Radopholus similis* (Cobb) Thorne an Bananen. Ph.D. Thesis, University of Bonn, 112 pp.
- **Arlat, M., Gijsegem, F.V., Huet, J.-C., Pernellet, J.-C. and Doucher, C.A.** (1994) PopA1, a protein which induces a hypersensitivelike response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J.* 13: 543-553.

- **Atzorn R., Crozier A., Wheeler C., Sandberg G.** (1988). Production of gibberellins and Indole 3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta* **175**, 532–538
- **Bachmann, K.** (1978). *Biología para médicos: conceptos básicos para las facultades de medicina, farmacia y biología.* Editorial Reverte. Pp 133-149.
- **Baillieul F., Genetet I., Kopp M., Saindrenan P., Fritig B. and Kauffmann S.** (1995) A new elicitor of the hypersensitive response in tobacco: A fungal glycoprotein elicits cell death, expression of defence genes, production of salicylic acid, and induction of systemic acquired resistance. *Plant J.* **8**: 551–560.
- **Baker C.J. and Orlandi E.W.** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 299 – 321.
- **Bastián F., Rapparini F., Baraldi R., Piccoli P., Bottini R.** (1999) Inoculation with *Acetobacter diazotrophicus* increases glucose and fructose content in shoots of *Sorghum bicolor* (L.) *Moench.* *Symbiosis* **27**, 147–156.
- **Benedict, S. R.** (1908). “A Reagent For the Detection of Reducing Sugars”. *J. Biol. Chem.* **5** (6): 485–487.
- **Bent A.F.** (1996) Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell.* **8**: 1757- 1771.
- **Billard, V., Bruneteau, M., Bonnet, R, Ricci, P., Pemollet, J.-C., Huet, J.-C., Vergne, J.-C., Richard, G. and Michel, G.** (1988) Chromatographic purification and characterization of elicitors of necrosis on tobacco produced by incompatible *Phytophthora* species. *J. Chromatogr.* **44**: 87-94.

- **Bills G.F.** (1996) Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants In: Redlin SC, Carris LM, eds. Endophytic fungi in grasses and woody plants. St Paul, Minnesota: APS Press. p 31–65.
- **Booth, C.** (1971). The Genus *Fusarium*. CMI. Kew, Surrey. pp. 19-31.
- **Bostock R. M., Kuc J. A., Laine R. A.** (1981). Eicopentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungotoxic sesquiterpenes in the potato. *Science* **212**:67–69.
- **Bottini R., Fulchieri M., Pearce D., Pharis R.P** (1989) Identification of Gibberellins A1, A3, and isoA3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol* **90**: 45–47.
- **Borsook, H.** (1935) Micromethods for determination of ammonia, urea, total nitrogen, uric acid, creatinine (and creatine), and allantoin. *J. Biol Chem.* **110**: 481.
- **Bottini, R.; Cassán, F.; Piccoli, P.** (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *App. Microbiol. Biotech.* **65**: 497-503.
- **Bradley D.J., Kjellbom, Lamb C.J.** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21 – 30.
- **Calvo, A. M., Wilson, R.A., Woo Bok, J., Keller, N. P.** (2000). Relationship between secondary metabolism and fungal development *Micro. Mol. Biol. Rev.* **66**: 447-459.

- **Cartay, R.** (2004). Difusión y comercio de la yuca (*Manihot esculenta*) en Venezuela y el mundo. *Agroalimentaria*. 18, 13-22.
- **Castellani, A.** (1963). Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathol et Mycol Appl*; **20**: 1-6
- **Ceballos, H.** (2002^a) La yuca en Colombia y el mundo: nuevas perspectivas para un cultivo milenario. Pág 1-13 en: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). La Yuca en el Tercer Milenio, Cali, Colombia.
- **Ceballos, H, De la Cruz, G. A.** (2002^b) La yuca en Colombia y el mundo: Taxonomía y morfología de la yuca. Pág 16-32 en: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). La Yuca en el Tercer Milenio, Cali, Colombia.
- **Chen Z, Malamy J, Hennig J, Conrath U, Sanchez-Casas P, Ricigliano J, Silva H, Klessig DF** (1995) Induction, modification and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4134-4137.
- **Croteau, R., Kutchan, T., Lewis, N.** (2000). Natural products (Secondary Metabolites) en American Society of Plant Pathology. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 1250-1315p.
- **Dai C.C., Yu B.Y., Zhao Y.T., Jian J.H., Yang Q.Y.** (2006). The screening and identification of endophytic fungi from four species medicinal plant of family Euphorbiaceae and the strains antibacterial activity. *J. Nanjing Fore. Univ. (natural science edition)*, 30(1): 83-87.

- **Dai C.C., Yu B.Y., Li X.** (2008). Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 3505-3509.
- **Demain, A.** (1986). Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure & Appl. Chem.*, **58(2)**, 219-226.
- **Diaz, N.** (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como respuestas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET.* **1**: 31 – 54.
- **Diaz, N.** (2010). Resistencia Sistémica Adquirida en plantas. Una revisión. Fundación Instituto de Estudios Avanzados, IDEA.
- **Dowzer C.E., Kelly J.M.** (1989). Cloning of the creA gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr Genet.* **15(6)**:457–459.
- **Fawcett, J.K., and Scott, J.E.** (1960), *J. Clin. Pathol.* 13.
- **Fehling, H.** (1849). "Die quantitative Bestimmung von Zucker und Stärkmehl mittelst Kupfervitriol". *Annalen der Chemie und Pharmacie* **72** (1): 106–113.
- **Fleck, A.** (1969). Automated Analysis of nitrogen compounds. Biochemistry Department. Glasgow Royal Infirmary. Glasgow, Scotland.
- **Flor, H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**:275-296.
- **Fraga, B.M., Hernández, M., González, P., Chamy, M. C., Garbarino J. A.,** (2000). The Biotransformation of 18-Hidroxy-9-epi-ent-pimara-7,15diene by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochem* 53: 395-399.

- **Gilchrist D.G.** (1998). Programmed cell death in plant defence: the purpose and promise of cellular suicide. *Ann. Rev.phytl.* 39: 393-414.
- **Gutiérrez-Mañero F., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J., Tadeo F.R., Talon M.** (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* **111**:206–211
- **Hallman, J., Sikora, R.,** (1995). Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. *Journal of Plant Disease and Protection* **101**, 475–481.
- **Huang, Y., Helgeson, J.P and Sequeira, L.** (1989) Isolation and purification of a factor from *Pseudomonas solanacearum* that induces a hypersensitive-like response in potato cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**: 132-138.
- **Hoffmeister D., Keller N.P.** (2007) Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep* **24**:393-416.
- **Holten KB, Onusko EM** (2000). Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American family physician* **62** (3): 611–20.
- **Hori S.** (1898). Some observations on “Bakanae” disease of the rice plant. *Mem. Agric. Res. Sta. (Tokyo)* 12 (1), 110-119.
- **Hynes M.J.** (1975) Studies on the role of the *areA* gene in the regulation of nitrogen catabolism in *Aspergillus nidulans*. *Aust J Biol Sci.* **28**(3):301–313.
- **Iakimova, E.T., Michalczuck L., Woltering, E. J.** (2005). Hypersensitive cell death in plants – its mechanisms and role in plant defense against pathogens. *A Review . J. Fruit. Ornam. P. Res.* **13**: 135-158.

- **Janzen R., Rood S., Dormar J., McGill W.** (1992) *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically-medium and in co-culture on straw . *Soil Biol Biochem* **24**:1061–1064.
- **Kovárová-Kovar, K. Egli, T.,** (1998). Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (3), 646–666.
- **Keston, A.S.** (1956). Colorimetric, “Enzymatic Reagents for glucose.” Abstracts of Papers. 129th Meeting ACS, 131 C.
- **Koga J., Yamauchi T., Shimura M., Ogawa N., Oshima K., Umemura K., Kikuchi M., and Ogasawara N.** (1998). Cerebrosides A and C, Sphingolipid Elicitors of Hypersensitive Cell Death and Phytoalexin Accumulation in Rice Plants. *J. Biol. Chem.* **273**, 31985-31991
- **Koga J., Kubota H., Gomi S, Umemura K., Ohnishi M, and Kono, T.** (2006).Cholic acid, a bile acid elicitor of hypersensitive cell death, pathogenesis-related protein synthesis, and phytoalexin accumulation in rice. *P. Physiol*, **140**: 1475–1483,
- **Kurosawa E.** (1926). Experimental studies on the nature of the substance secreted by the “bakanae” fungus. *Nat HistSoc Formosa.* 16, 213-227.
- **Lozano, J.C., Bellotti, A., Reyes, J.A., Howeler, R., Leihner, D., Doll, J.** (1981). Problemas en el cultivo de la yuca. Centro internacional de agricultura tropical (CIAT). Cali, Colombia. 208p.

- **Madigan, M.T., Martinko, J., J. Parker** (2004). *Brock Biología de los Microorganismos*. Octava edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid, España. pp. 109-176.
- **Matheussen, A.-M., Morgan, P.W., and Frederiksen, R.A.** (1991). *Plant Physiol.* 96, 537-544.
- **Monod, J.** (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*. Hermann et Cie, Paris, France.
- **Montaldo, A.** (1985). *La yuca o mandioca: cultivo, industrialización, aspectos económicos, empleo en la alimentación animal, mejoramiento*. 1° Edición. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 386 p.
- **Morel, J.-B. Dangl, J.** (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ.* 4: 671-683.
- **Mur L.A.J., Kenton P., Lloyd A.J, Ougham H., Prats E** (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* 59:501–520.
- **Murashige T., Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- **Nagib, M., Marques, N., Marques, A.** (2006). *Cassava Leaves as a Source of protein*. Departamento de genética e morfologia and Departamento de Nutricao respectively. Universidade de Brasília, Brazil.
- **Nassar, N.; Marques, A.** (2006). Cassava leaves as a source of protein. *J. Food Agric. Environ.* 4:187-188

- **Nilsson, R.H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E, Kristiansson, E** (2008). The ITS región as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol lett* **296**: 97-101.
- **Rademacher, W. and Graebe, J.E** (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**: 35-40.
- **Rademacher, W., (1992)** *Phytochemistry*, 31, 4155-4157
- **Ringbom, A.** (1939). Accuracy of colorimetric determinations. *Zeitschrift fuer Analytische Chemie.* **115**: 332-43.
- **Roca, W.M.** (1984). Cassava. En: Sharp WR; Evans DA; Ammirato PV; Yamada Y. Handbook of plant cell culture. 2: Crop species. MacMillan Pub., Nueva York. 269-301.
- **Russell, A.D., Hugo, W.B., Ayliffe, G.A.J.** (2004) *Principles and practice of disinfection, preservation and esterilization*. Edited by Adam P. Fraise, Peter A. Lambert, Jean-Yves Maillard. Editorial Blackw ell Sience 4th ed.
- **Sassa, T., Suzuki, K, and Hakuri, E** (1989) *Agric. Biol. Chem.* (1989) 53, 303-304.
- **Schlumbaum, A. Mauch, F. Vogeli, Boller, T.** (1986). Plant chitinase are potent inhibitors of fungal grow th. *Nature* **324**: 365-367.
- **Seifert, K.** (2001). *Fusarium* and anamorph generic concepts. pp. 15 - 28 en: *Fusarium*. Summerell BA et al., eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- **Sharp J. K, Valent B., Albersheim P.** (1984). Purification and partial characterization of beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* **259**:11312–11320

- **Sigma-Aldrich Co** (2010). Carbenicillin Disodium salt. Consultado en: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=C3416|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC. Ultimo acceso 9 de septiembre 2010.
- **Stakman E.C.** (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agric. Res.* **4**: 193-299.
- **Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., Painter, P.** (1996). *Microbiología*. 2° edición. Editorial Reverté (pp 17-27). Barcelona, España.
- **Szabados L; Hoyos R; Roca W.** (1987). In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Reports* **6**: 248-251.
- **Tien T.M., Gaskins M.H., Hubell D.H.** (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* **37**, 1016–1024.
- **Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Peñalva MA, Arst HN, Jr.** (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**(4):779–790.
- **Trinder, P.** (1969) Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase *Ann Clin Biochem* **6:24**.
- **Tudzynski, B., and K. Höltter.** 1998. The gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence of a gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* **25**:157-170.

- **Tudzynski, B.** (1999) Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:298–310.
- **Weiss, U., Flon, H., Burger, W.C.** (1957). The photodynamic Pigment of some species of *Elsinoë* and *Sphaceloma*. *Arch. Biochem. Biophys.* 69, 311-319.
- **Yabuta T., Sumiki Y.** (1938). On the crystal of gibberellin, a substance to promote plant growth. *Agric. Chem. Soc. Japan.* **14**: 1526.
- **Zeigler, R. S., L. E. Powell, and H. D. Thurston.** (1980). Gibberellin A₄ production by *Sphaceloma manihoticola*, causal agent of cassava superelongation disease. *Phytopathology* **70**:589-593.
- **Zeigler, R. S., and Lozano, J. C.** (1983). Relaciones patogénicas entre algunas especies de *Elsinoë* y *Sphaceloma* afectando la yuca (*Manihot esculenta*) y a otras euphorbiáceas en Centro y Sur América. *Fitopatol. Bras.* **8**:153-171.



GLUCOSA

Método Enzimático para la determinación de Glucosa en sangre

CONTENIDO:

1. Patrón 100 mg/dl de Glucosa: 1 vial con 2.5 ml.
2. Enzimas: 2 viales con 2.5 ml. c/u.
3. Sustrato: 2 viales con 2.5 ml. c/u.
4. Solución Tampón (Buffer): 2 botellas con 250 ml. c/u.

INDUSTRIAS QUALITEST C.A.
 APARTADO 46/04 - CABAÇAS 1060
 REGISTRO SANITARIO No. P.M.P. 3152

PRINCIPIO (Método de Trinder)

La glucosa es oxidada enzimáticamente por la Glucosa Oxidasa produciendo Ácido Glucónico y Agua Oxigenada (H₂O₂). Esta última oxida al cromógeno en presencia de Peroxidasa produciendo un compuesto de color rosado cuya intensidad es proporcional a la concentración de Glucosa en la muestra analizada.

INSTRUCCIONES DE RECONSTITUCION

Para reconstituir 250 ml. de reactivo, vierta el contenido total de un vial de Enzimas y un vial de Sustrato en una de las botellas de Solución Tampón. Para reconstituir cantidades parciales el reactivo se prepara agregando 0.1 ml. de Enzimas y 0.1 ml. de Sustrato por cada 10 ml. de Solución Tampón.

INSTRUCCIONES DE USO

Mezcle 10 microlitros de suero, Plasma ó Patrón con 1 mililitro de Reactivo Reconstituido, incube por 10 minutos a 35-37 grados centígrados ó 30 minutos a temperatura ambiente. Leer la Absorbancia a 510 nm. ó con filtro verde. El color es estable por una hora.

NOTA: Los volúmenes de Muestra y Reactivo Reconstituido pueden aumentarse ó disminuirse proporcionalmente.

INSTRUCCIONES PARA CALCULO DE LOS RESULTADOS

ABSORBANCIA DE MUESTRA
 x Conc. de Patrón = Glucosa (mg/dl)
 ABSORBANCIA DE PATRÓN

VALORES DE REFERENCIA

Suero o Plasma: 70 - 100 mg/dl.

RANGO ANALITICO

La reacción colorimétrica es lineal hasta una concentración de 400 mg/dl. de Glucosa.

INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Reactivo reconstituido: 30 días a 2-8 grados centígrados
 Reactivo sin reconstituir: hasta la fecha de expiración de 2-8 grados centígrados.

AUTOANALIZADORES

Este producto puede ser utilizado en la mayoría de los autoanalizadores existentes. Solicite a su proveedor local el programa correspondiente a su autoanalizador.

BIBLIOGRAFIA

Trinder P. Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase Ann Clin Biochem 8:24 1969.
 Lott V. Clin Chem 21:22 1754-1760 - 1975.
 Kabackallian P. Clin Chem 20:5 606-607 - 1974.
 Trinder P. J. Clin Path 22 158-161 1969.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1: Inserto Qualitest Glucosa



UREA DIRECTA

Método Enzimático para la determinación de Urea en sangre y orina

CONTENIDO:

1. Patrón 30 mg/dl de Urea: 1 vial con 2.5 ml.
2. Solución Alcalina: 1 botella con 100 ml.
3. Solución de Enzimas: 1 botella con 25 ml.
4. Solución Fenólica: 1 botella con 100 ml.

INDUSTRIAS QUALITEST S.A.

APARTADO 49704 - CARR/CAS 1040
REGISTRO SANITARIO N° RMP 4160

PRINCIPIO (Reacción de Berthelot)

La Urea es desdoblada por la Ureasa, produciendo Amonio. Este a su vez reacciona en presencia de hipoclorito, fenol y nitroprusiato de sodio produciendo un compuesto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de Urea en la muestra analizada.

INSTRUCCIONES DE USO PARA SUERO O PLASMA

Mezclar 10 microlitros de suero, plasma o patrón con 0.25 ml. de Solución de Enzimas, incluye por 5 minutos a 37 grados centígrados. Añadir 1 ml. de Solución Fenólica, luego añadir 1 ml. de Solución Alcalina. Agitar e incubar por 15 minutos a 35-37 grados centígrados, leer en espectrofotómetro a 580 nm. ó con filtro verde contra un blanco del reactivo. El color es estable por una hora. Las adiciones deben realizarse en el mismo orden que se señala en el procedimiento anterior, pues de lo contrario se verán afectados los resultados de las pruebas.

INSTRUCCIONES PARA USO EN ORINA

Diluya la muestra de orina (1:50), seguir las instrucciones para uso en suero plasma ó patrón y multiplique el resultado por el factor de dilución utilizado (50).

INSTRUCCIONES PARA EL CALCULO DE LOS RESULTADOS

$\frac{\text{Absorbencia de Muestra}}{\text{Absorbencia de Patrón}} \times \text{Conc. de Patrón} = \text{Urea (mg/dl)}$
 $\frac{\text{Concentración de Urea}}{2.14} = \text{BUN (mg/dl)}$

VALORES DE REFERENCIA

Suero o Plasma: 10 a 35 mg/dl. Urea.
 4.7 a 16.4 mg/dl. BUN.
 Orina: 15 a 34 g/24 h Urea.
 7 a 15.3 g/24 h BUN.

INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El Reactivo es estable hasta la fecha de expiración manteniéndose entre 2-8 grados centígrados.

RANGO ANALITICO DEL REACTIVO

El reactivo se mantiene lineal de 10 a 100 mg/dl de Urea (4.8 a 46.7 mg/dl BUN).

UTILIZACION EN AUTOANALIZADORES

Mezclar previamente la solución enzimática con la solución fenólica en las proporciones de 0.25 a 1.0 (Reactivo 1).

NOTA: La solución es estable por 60 min.

PARAMETROS:

Vol. Muestra→ 5 ul.
 Vol. Reactivo 1.....→ 625 ul.
 Tiempo de incubación 1→ 5 min. (37 °C).
 Vol. Reactivo 2.....→ 500 ul. Sol. Alcalina)
 Tiempo de incubación 2→ 10 min. (37 °C).

BIBLIOGRAFIA

SEARCY R., Clin Chem Act. 12 : 170-175 1965.
 BORSOOK H., J. Biol Chem 110 : 481 1935.
 FAWCETT J., Clin Path 13 : 156 1960.
 CHANEY A., Clin Chem 8 (2) : 130 1962.

9.2. Anexo 2: Inserto Qualitest Urea

INDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo general.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. ANTECEDENTES	11
3.1 Interacciones entre plantas y microorganismos.....	11
3.2 Metabolitos secundarios.....	12
3.2.1 Metabolitos secundarios microbianos en interacción con las plantas	13
3.3 Yuca.....	15
3.3.1 Enfermedades de la yuca	16
3.3.2 Súper-alargamiento de la yuca por <i>Sphaceloma manihoticola</i>	17
4. MATERIALES Y METODOS	19
4.1 Esterilidad	19
4.1.1 Desinfección de superficies	19
4.1.2 Esterilización de los medios de crecimiento	20

4.1.3	Esterilización de compuestos sensibles al calor	20
4.2.	Antibióticos	20
4.3	Medios de crecimiento.....	21
4.3.1	Agar zanahoria.....	22
4.3.2	Agar agua para monospórico.....	22
4.3.3	Agar agua.....	23
4.3.4	Medio definido "A" para cinética de crecimiento.....	23
4.3.4.1	Extracto de plántulas de yuca	24
4.3.5	Medio MS	24
4.3.6	Medio Hidropónico	25
4.4	Crecimiento de los hongos	25
4.5	Crecimiento de plántulas de yuca.....	26
4.6	Aislamiento de hongos	27
4.6.1	Cultivo axénico o monospórico	28
4.7	Conservación de los hongos	30
4.8	Cinética de crecimiento de los hongos aislados	31
4.9	Cuantificación de glucosa.....	34
4.9.1	Determinación de la longitud de onda de máxima absorción del producto de la peroxidasa de rábano	35

4.9.2	Sensibilidad del método enzimático para la cuantificación de glucosa	35
4.9.3	Cuantificación de la glucosa no consumida por los hongos	35
4.10	Cuantificación de nitrógeno	36
4.10.1	Determinación de la longitud de onda de máxima absorción del derivado indofenólico	37
4.10.2	Sensibilidad del método enzimático para la cuantificación de urea	37
4.10.3	Cuantificación de la urea no consumida por los hongos	38
4.11	Propagación <i>in vitro</i> de plántulas de yuca	38
4.12	Infección de plántulas de yuca con los hongos aislados	40
4.12.1	Análisis de los datos obtenidos de la longitud de los entrenudos	41
4.13	Efecto de los metabolitos extracelulares de los hongos aislados sobre plántulas de yuca obtenidas <i>in vitro</i>	43
5.	RESULTADOS	44
5.1	Aislamiento y conservación de hongos filamentosos de las partes aéreas de plantas de yuca	44
5.2	Efecto de los metabolitos extracelulares de los hongos aislados sobre plántulas de yuca	46
5.2.1	Cinética de crecimiento	47
5.2.2	Infiltración de los metabolitos extracelulares en plántulas de yuca	67

5.3	Infección de plántulas de yuca con los hongos filamentosos aislados	74
6.	DISCUSION	99
6.1	Aislamiento de los hongos	99
6.2	Cinética de crecimiento	101
6.3	Respuesta hipersensible de la planta por la infiltración de compuestos	104
6.4	Infección de las plántulas de yuca con los hongos aislados	110
7.	CONCLUSIONES	114
8.	BIBLIOGRAFIA	116
9.	Anexos	127
9.1.	Anexo 1: Inserto Qualitest Glucosa.....	127
9.2.	Anexo 2: Inserto Qualitest Urea	128