



TESIS

CON EL TEMA:

“Evaluación de respuesta defensiva en *Salix bonplandiana* a elicitores ante *Fusarium solani* proveniente de complejo ambrosial”

QUE PRESENTA:

OMAR ISRAEL CAMACHO MORENO

ASESOR:

DRA. MAYRA ITZCALOTZIN MONTERO CORTES

REVISORES:

**DRA. NORMA ALEJANDRA MANCILLA MARGALLI
LIC. ANTONIA GUTIERREZ MORA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO EN AGRONOMIA**

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. OCTUBRE, 2022.



Instituto Tecnológico de Tlajomulco
Dirección
Subdirección Académica

Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **19/agosto/2022**

No. DE OFICIO: D.SA/732/2022
ASUNTO: Autorización de impresión
definitiva y digitalización.

**C. OMAR ISRAEL CAMACHO MORENO
PASANTES DE LAS CARRERAS DE INGENIERIA EN AGRONOMIA
PRESENTES**

Dado que el Comité dictaminó como **APROBADA** su TITULACIÓN INTEGRAL: OPCIÓN I (TESIS), con el tema **"Evaluación de respuesta defensiva en *Salix bonplandiana* a elicitores ante *Fusarium solani* proveniente de complejo ambrosial"** y determinó que da cumplimiento con los requisitos establecidos, se le notifica que tiene la autorización para su impresión definitiva y digitalización.

Sin otro particular quedo de usted.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica® |
Educar para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro

**C. MARÍA ISABEL BECERRA RODRÍGUEZ
DIRECTORA DEL PLANTEL**



C.c.p.- Coordinación de Apoyo a la Titulación. - Edificio
C.c.p.- Minutaño. -

MIBR/AIBR/ALGC/mjhc



Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, **08/AGOSTO/2022**

No. DE OFICIO: D.SA/DCA/204/2022
ASUNTO: Liberación de proyecto para la titulación integral.

ICE. ANA LUISA GARCIA CORRALEJO
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
P R E S E N T E

Por este medio informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación integral:

NOMBRE DEL ESTUDIANTE Y/O EGRESADO:	OMAR ISRAEL CAMACHO MORENO
NO. DE CONTROL:	17940003
PRODUCTO:	OPCIÓN I (TESIS)
CARRERA:	INGENIERÍA EN AGRONOMIA
NOMBRE DEL PROYECTO:	"Evaluación de respuesta defensiva en <i>Salix bonplandiana</i> a elicitores ante <i>Fusarium solani</i> proveniente de complejo ambrosial"

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros egresados.


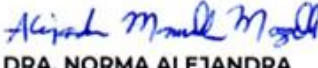
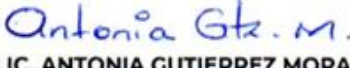
ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Educando para la Sociedad Actual y los Retos del Futuro



ING. MIGUEL HERNANDEZ FLORES
RESPONSABLE DEL DEPARTAMENTO
DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

S.E.P.
TECNM
14DIT0003B
IT TLAJOMULCO
DEPARTAMENTO
CIENCIAS
AGROPECUARIAS

 DRA. MAYRA ITZCALOTZIN MONTERO CORTES Nombre y firma del asesor	 DRA. NORMA ALEJANDRA MANCILLA MARGALLI Nombre y firma del revisor	 LIC. ANTONIA GUTIERREZ MORA Nombre y firma del revisor
--	---	---

C.c.p.- Expediente.
PYC/mjhc*



732

AGRADECIMIENTOS

Por el apoyo Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo económico otorgado en el proyecto “Mantenimiento de la infraestructura del Laboratorio Nacional PlanTECC”.

Un agradecimiento Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado en el proyecto; 2017-08 292399 Generación de estrategias científico-tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambrosiales en los sectores agrícola y forestal de México; del Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación (FORDECYT).

También de manera especial a la Dra. Mayra Itzcalotzin Montero Cortés. Sin usted y sus virtudes, este trabajo de tesis no lo hubiera logrado, gracias a sus consejos cuando de mí no salían las ideas, usted forma parte importante de esta historia y este trabajo, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo desde inicios de mi carrera hasta el fin de la misma, todo su apoyo, paciencia y confianza todos estos años de enseñanza.

Orientación del Dr. Joaquin Alejandro Qui y la Dra. Antonia Gutiérrez Mora y por permitirme ser parte de este trabajo, su asesoría y apoyo que me permitieron desarrollar mi trabajo de tesis.

A la Dra. Norma Alejandra Mancilla Margalli por su asesoría en mi trabajo de tesis, por todos sus comentarios y sugerencias, sin ellas no sería lo que es hoy este trabajo.

A los miembros de este proyecto, por todas sus sugerencias, observaciones, apoyo y enseñanzas durante mi estancia en este centro de investigación e Instituto; Dr. José Juvencio Castañeda Nava, M.C. Julio Cesar López Velázquez, Lic. Rubí Espinoza Fierro, Ing. Laura Campos.

A todos los maestros y compañeros que tuve en el instituto y en el centro de investigación por todas sus enseñanzas y apoyos.

A mis padres y hermanos que fueron pacientes en muchas ocasiones, a mis padres Ricardo J. Camacho y Patricia Moreno por su cariño, consejos y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mi pareja que siempre me dio aliento para continuar, paciencia inigualable y apoyo en los momentos más críticos para concluir de esta tesis.

En general agradezco a todos mis amigos, familiares y todos aquellos que aportaron su granito de arena para la realización de esta tesis.

RESUMEN

El sauce es una especie con alto potencial de aprovechamiento medicinal, artesanal, ecológico, entre otros; sin embargo, en los últimos años, su población ha disminuido considerablemente debido a enfermedades como la marchitez por *Fusarium*, deforestación e incendios. A cuestión del avance de la enfermedad en México y su interés en el género *Salix*, su desconocimiento de ella en los sauces y otros géneros, es por esta razón que actualmente existe una gran necesidad de contar con material seleccionado de *Salix* para entender mejor el funcionamiento dentro de las plantas, sin embargo la cantidad de material que se requiere excede la cantidad que puede obtenerse mediante propagación por semilla, por lo que las alternativas fueron propagación *in vitro* y *ex vitro* con estacas. Aunque la semilla del *Salix* es muy pequeña y delicada en trabajos previos se ha mostrado que es posible desinfectarla sin dar la eclosión de la misma. El objetivo del presente trabajo fue realizar estudios orientados a conocer la respuesta defensiva del *Salix bonplandiana* ante *Fusarium solani* proveniente de complejo ambrosial mediante cuatro capítulos: el primero es la metodología e investigación de las partes a tratar, el segundo fue para establecer un protocolo de propagación *in vitro* del *Salix bonplandiana*, en el tercero se estableció una propagación de *S. bonplandiana* por esquejes *ex vitro*, y el cuarto se pusieron a prueba las respuestas defensivas de la planta.

En el último capítulo se evaluaron las respuestas defensivas mediante dos enfoques: uno que consistía en hacer pruebas y evaluar la reproducción y colonización de las esporas en el tallo de las plantas y otro mediante pruebas *in vitro* se observó si había cambios en las plantas con pruebas fotográficas, sin datos cuantificables.

Se fueron recopilando datos y fueron evolucionando los experimentos conforme se obtenía información de los anteriores, primero se evaluó con qué tipo de herida se podría simular el complejo ambrosial, por consiguiente, se calcularon las áreas colonizadas por diferentes profundidades y concentraciones de esporas. Se demostró que entre mayor concentración y profundidad habría mayor colonización. Con forme a los datos, se realizaron las inoculaciones

agresivas con aplicaciones de elicitores, no hubo éxito al tratar de observar algún cambio de con elicitores y sin elicitores. Al combinar los experimentos anteriores se puede determinar, que para lograr observar resultados con estos daños y uso de elicitores se deben hacer 2 cosas: 1. Dejar mayor tiempo la inoculación, para así poder obtener una colonización favorecida del hongo y una respuesta sistémica del organismo hacia la inoculación y colonización del hongo. 2. A estas pruebas que se obtengan de los experimentos se les deberá hacer estudios de tinción para poder saber correctamente si existe o no una colonización, posteriormente verificar que en dicha colonización se encuentre el hongo que se inoculó y finalmente hacer los estudios bioquímicos correspondientes para entender que actividad existe dentro de la planta ante estos sucesos.

Para caracterizar el uso del filtrado de este hongo y poder entenderlo mejor se trabajó a nivel histológico. A nivel morfo-histológico se fue descartando los niveles que llegaban a ser mortales para la planta, empezando con concentraciones de 0:10, 1:10, 2.5:10, 5:10, 10:10, estas concentraciones se compararon con el filtrado esterilizado y no esterilizado, se observó que la necrosis y el daño en la planta era muy avanzado en los tratamientos cuyo FC se había esterilizado, se logró diferenciar que el FC a dosis del 1:10 no lograba hacer un daño histológico avanzado, por lo que se realizó el siguiente a concentraciones similares las cuales fueron 1:10, 2:10, 3:10, tomando como referencia la 1:10. Por otra parte a estos resultados se adicionaron elicitores para observar en plantas *in vitro* con concentraciones de FC 1:10 y distintas en elicitores con 2 elicitores a evaluar, se observaron a los 15 días, fecha en la que no se obtuvieron resultados visibles. En conjunto los resultados obtenidos representan un progreso importante tanto en la eficiencia de la reproducción y multiplicación de plantas de este género, un mejor entendimiento del *cultivo in vitro* y un avance en el estudio de los complejos ambrosiales, entendimientos que podrían servir como base para futuros protocolos de micropropagación, barrenado de plantas y entendimiento de las vías y rutas defensivas de las plantas.

ABSTRACT

Willow is a species with high potential for medicinal, handicraft, ecological and other uses; however, in recent years, its population has decreased considerably due to diseases such as Fusarium wilt, deforestation and fires. As a matter of the advance of the disease in Mexico and its interest in the genus *Salix*, its unknown in willows and other genera, it is for this reason that currently there is a great need to have selected material of *Salix* to better understand the functioning within the plants, however the amount of material required exceeds the amount that can be obtained by seed propagation, so the alternatives were *in vitro* and *ex vitro* propagation with cuttings. Although the *Salix* seed is very small and delicate, previous work has shown that it is possible to disinfect it without hatching. The objective of the present work was to carry out studies oriented to know the defensive response of *Salix bonplandiana* against *Fusarium solani* from ambrosial complex through four chapters: the first is the methodology and investigation of the parts to be treated, the second was to establish a protocol for *in vitro* propagation of *Salix bonplandiana*, in the third was established a propagation of *S. bonplandiana* by *ex vitro* cuttings, and the fourth was to test the defensive responses of the plant.

In the last chapter, the defensive responses were evaluated using two approaches: one consisted of testing and evaluating the reproduction and colonization of the spores in the stem of the plants, and the other, using *in vitro* tests, observed if there were changes in the plants with photographic evidence, without quantifiable data.

Data were collected and the experiments evolved as information was obtained from the previous ones, first it was evaluated with what type of wound could simulate the ambrosial complex, therefore, the areas colonized by different depths and concentrations of spores were calculated. It was shown that the higher the concentration and depth, the greater the colonization. According to the data, aggressive inoculations were carried out with elicitor applications, but there was no success in trying to observe any change between with elicitors and without elicitors. When combining the previous experiments, it can be determined

that in order to observe results with these damages and the use of elicitors, two things should be done: 1. Leave the inoculation for a longer time, in order to obtain a favored colonization of the fungus and a systemic response of the organism towards the inoculation and colonization of the fungus. 2. These tests obtained from the experiments should be subjected to staining studies in order to know correctly whether or not there is colonization, then verify that the inoculated fungus is present in the colonization, and finally perform the corresponding biochemical studies to understand what activity exists within the plant in the face of these events.

To characterize the use of the filtrate of this fungus and to understand it better, we worked at the histological level. At the morphological-histological level, the levels that were lethal for the plant were discarded, starting with concentrations of 0:10, 1:10, 2. 5:10, 5:10, 10:10, these concentrations were compared with the sterilized and non-sterilized filtrate, it was observed that necrosis and damage to the plant was very advanced in the treatments whose FC had been sterilized, it was possible to differentiate that the FC at a dose of 1:10 did not achieve advanced histological damage, so the following was done at similar concentrations which were 1:10, 2:10, 3:10, taking 1:10 as a reference. On the other hand, elicitors were added to these results to observe in plants in vitro with concentrations of FC 1:10 and different in elicitors with 2 elicitors to evaluate, they were observed after 15 days, date in which no visible results were obtained. Overall, the results obtained represent an important progress both in the efficiency of reproduction and multiplication of plants of this genus, a better understanding of in vitro culture and an advance in the study of ambrosial complexes, understandings that could serve as a basis for future protocols for micropropagation, drilling of plants and understanding of the defensive pathways and routes of plants.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
ÍNDICE	9
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE CUADROS	12
1. CAPÍTULO 1.	16
1.1 Introducción.....	16
1.2 Antecedentes	18
1.2.1 Complejo ambrosial	19
1.2.2 <i>Fusarium</i>	30
1.2.3 Importancia de los sauces	35
1.2.4 Mecanismos de defensa.....	38
1.3 Planteamiento del problema.....	39
1.4 Justificación.....	40
1.5 Hipótesis	43
1.6 Objetivos	44
1.6.1 Objetivo general.....	44
1.6.2 Objetivos particulares	44
1.7 Bibliografía	45
2. CAPÍTULO	51
2.1 Establecimiento de un protocolo de propagación <i>in vitro</i> de plantas de <i>Salix sp.</i> a partir de semillas.	51
2.1.1 Resumen	51

2.1.2	Introducción	52
2.1.3	Materiales y métodos.....	60
2.1.4	Resultados y discusión	63
2.1.5	Conclusiones	73
2.1.6	Bibliografía.....	74
3.	CAPÍTULO	80
3.1	Propagación de plantas de <i>S. bonplandiana</i> a partir de esquejes en condiciones <i>ex vitro</i>	80
3.1.1	Resumen	80
3.1.2	Introducción	80
3.1.3	Materiales y métodos.....	87
3.2	Resultados y discusión.....	89
3.2.1	Conclusiones	92
3.2.2	Bibliografía.....	93
4.	CAPÍTULO	96
4.1	Evaluación de protección por inducción de resistencia por elicitores (Ácido salicílico y Metil jasmonato) en plantas de salix.....	96
4.1.1	Resumen	96
4.1.2	Introducción	97
4.1.3	Materiales y métodos.....	99
4.1.4	Resultados y discusión	109
4.1.5	Conclusiones	121
4.1.6	Trabajo a futuro	123
4.1.7	Bibliografía.....	124
5.	Bibliografía general	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.- Establecimiento de semillas cigóticas de plantas de <i>S. bonplandiana</i> en cultivo <i>in vitro</i>	63
Figura 2.2.- Desarrollo de plántulas de <i>Salix</i> a los 30 días de cultivo <i>in vitro</i>	67
Figura 2.3.- Desarrollo de plantas de <i>Salix</i> a los 30 días de micropropagación <i>in vitro</i>	70
Figura 2.4.- Desarrollo de plantas de <i>Salix</i> a los 60 días de micropropagación <i>in vitro</i>	72
Figura 3.1.- Esquejes de <i>Salix</i> en condiciones de invernadero los días 15 y 60 de establecimiento.	91
Figura 4.1.- Filtrado estéril (izquierda) y filtrado no estéril (derecha).	106
Figura 4.3.- Infección de <i>F. solani</i> en plantas de salix después de 30 días de inoculación en heridas de tallo por barrenado a diferentes profundidades (50 y 80% de daño).....	112
Figura 4.4.- Inducción de elicitores en plantas de <i>Salix</i> infectadas con <i>F solani</i> (después de 15 días) en heridas de 80% de daño por barrenado en tallo bajo condiciones de invernadero.....	114
Figura 4.5.- Evaluación de fitotoxicidad de FC (0 al 100%) en hojas de <i>Salix</i> en condiciones <i>in vitro</i> 0 a 100% de FC (día 3).....	116
Figura 4.6.- Las imágenes A, B y C Muestran las repeticiones de los siguientes tratamientos en orden desde la herida inferior a la superior: CHF1, THF1, THF2, THF3.	117
Figura 4.7.- Evaluación de fitotoxicidad de FC (0 al 30%) en hojas de <i>Salix</i> en condiciones <i>in vitro</i> (día 3).....	118
Figura 4.8 Efecto del FC estéril y de elicitores (MeJa y SA) en plantas de <i>Salix</i> en condiciones <i>in vitro</i>	119

Figura 4.9 Inducción de protección con elicitors (SA y Meja) a plantas de salix en condiciones <i>in vitro</i> ante los compuestos fitotóxicos del FC de <i>F. solani</i> a los 15 días después de realizar la inoculación del FC.	120
---	-----

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 0.1.- CLAVE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	14
CUADRO 1.1.- MEDICIONES Y DESARROLLO DE <i>EUWALLACEAE FORNICATUS</i>	27
CUADRO 2.1.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE <i>S. BONPLANDIANA</i> EN EL DÍA 10 DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	64
CUADRO 2.2.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE <i>SALIX</i> A LOS 20 DÍAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	65
CUADRO 2.3.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESARROLLO DE PLÁNTULAS EN EL DÍA 30 DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	66
CUADRO 2.4.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESARROLLO EN PLÁNTULAS DE <i>SALIX</i> A PARTIR DE ESQUEJES EN CONDICIONES <i>IN VITRO</i>	69
CUADRO 2.5.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE <i>SALIX</i> EN EL DÍA 60 DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	71
CUADRO 3.1.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESARROLLO DE ESQUEJES DE <i>SALIX</i> EN CONDICIONES DE INVERNADERO.	89
CUADRO 3.2.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DESARROLLO DE ESTACAS DE <i>SALIX</i> A LOS 15 Y 30 DÍAS.	89
CUADRO 3.3.- EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESARROLLO DE ESTACAS DE <i>SALIX</i> EN LOS DÍAS 45 Y 60 DÍAS.	90
CUADRO 4.1.- TRATAMIENTOS PARA EL PROTOCOLO DE INFECCIÓN DE <i>F. SOLANI</i> EN HERIDAS DE TALLO CON RASPADO Y BARRENADO EN PLANTAS DE <i>S. BONPLANDIANA</i>	100
CUADRO 4.2.- TRATAMIENTO PARA EL PROTOCOLO DE INFECCIÓN POR BARRENADO DE TALLO A DIFERENTES PROFUNDIDADES EN PLANTAS DE <i>S. BONPLANDIANA</i>	101
CUADRO 4.3.- DESCRIPCIÓN DE TRATAMIENTOS PARA LA INDUCCIÓN DE ELICITORES EN TALLOS DE PLANTAS DE <i>SALIX</i> INFECTADAS CON <i>F. SOLANI</i> EN CONDICIONES DE INVERNADERO.	103

CUADRO 4.4.- TRATAMIENTOS Y CONTROLES ESTABLECIDOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DEL FC EN HOJAS DE <i>S. BONPLANDIANA</i> EN CONDICIONES <i>IN VITRO</i>	106
CUADRO 4.5.- TRATAMIENTOS QUE SE USARON EN EL PUNTO (4.1.4.4) CON LOS FILTRADOS DE LA (FIGURA 4.1).....	107
CUADRO 4.6.- TRATAMIENTOS DE EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ELICITORES EN HOJAS DE <i>SALIX</i>	107
CUADRO 4.7.- TRATAMIENTOS DEL EXPERIMENTO DE LA INDUCCIÓN ELICITORES ANTE EL FC.	108
CUADRO 4.8.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE DAÑO DE TALLO E INFECCIÓN DE <i>F. SOLANI</i>	111
CUADRO 4.9.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS EN LA PROFUNDIDAD DEL BARRENADO EN PLANTAS DE <i>SALIX</i>	113
CUADRO 4.10.- EVALUACIÓN DEL DAÑO DE TALLO EN EL EXPERIMENTO DE LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA POR ELICITORES EN PLANTAS DE <i>S.BONPLANDIANA</i>	115
CUADRO 4.11.- EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FITOTOXICIDAD DE LOS FC EN HOJAS DE <i>SALIX</i>	116

Cuadro 0.1.- Clave de Símbolos y Abreviaturas

ABREVIATURA	TÉRMINO
±	Mas menos
µL	Microlitros
µmol m ⁻² s ⁻¹	Unidad radiación fotosintética activa
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
ANOVA	Análisis de varianza
BAP	6-Bencilaminopurina
°C	Grados Celsius
CA	Carbón Activado
CNRF	Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad
DAMP	Patrones Moleculares Asociados al Daño
DGSV	Dirección General de Sanidad Vegetal
DMS	Grados, Minutos y Segundos
dS/m	DeciSiemens
EBP	Escarabajo Barrenador Polífago
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FC	Filtrado de Cultivo (<i>F. solani</i>)
FD	Fusarium dieback
FORDECYT	Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación
FSSC	Food Safety System Certification
gL ⁻¹ o g/L	gramo por litro
Ha	Hectárea
HR	Respuesta Hipersensible
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias.
Kin	Cinetina
Kin	Cinetina
km, m, cm, mm	Kilómetro, metro, centímetro, milímetro
KSHB	Kuroshio Shot Hole Borer
LE, NH, NR, NRA, NN, NB, LR	Longitud del Explante, Número de Hojas, Número de Raíces, Número de Raíces Adventicias, Número de Nudos, Número de Brotes, Longitud de Raíz
LSD	Diferencia mínima significativa
MAPK	Vía de las Proteinas Cinasas Activadas por Mitógenos
mgL ⁻¹ o mg/L.	Miligramo por litro
MJ	Metil-Jasmonato
mM, M	Milimolar, Molar
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
N, O	Norte, Oeste
NaOH	Hidróxido de Sodio

NIMF	Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias
NLR	Nod like Receptor
p/v	Peso por volumen de solución
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PDA	Papa Dextrosa Agar
PDB	Caldo Papa Dextrosa
PF, PS	Peso Fresco, Peso Seco
pH	Potencial hidrogeno
PR	Relación con patogénesis
PRR	Receptores que Reconocen Patrones
PVE	Programa de Vigilancia Epidemiológica
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
s, min, h.	Segundo, minuto, horas.
SA	Ácido salicílico
SD	Desviación Estándar
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad
sp. spp.	Especie - especies
TF	Factores de Transcripción
Ton	Tonelada
v/v	Volumen por Volumen de solución

1. CAPÍTULO 1.

1.1 Introducción

México cuenta con aproximadamente 64 millones de hectáreas de bosques de clima templado y selvas que abarcan el 32% del territorio nacional. Adicionalmente el país cuenta con 56 millones de ha de matorrales y cerca de 2 millones de ha de vegetación hidrófila. Tales recursos son de gran importancia para el país desde el punto de vista social, económico y ambiental (Torres Rojo, 2020).

Los escarabajos barrenadores son escarabajos que perforan las ramas o troncos en este grupo de barrenadores se encuentran los llamados ambrosiales, caracterizados por mantener una asociación con hongos a los cuales les ayudan a colonizar los árboles rompiendo la defensa de éstos, y proporcionando alimento para los escarabajos y su descendencia (González, Loranca, Canela, Lamelas, & Ibarra, 2018).

Este es el caso del complejo ambrosial *Euwallacea sp.-Fusarium euwallaceae*, el cual está compuesto por un insecto vector y un hongo fitopatógeno (de aquí en adelante referidos como plagas invasoras), que en su lugar de origen no son plagas de importancia fitosanitaria. Sin embargo, desde su introducción a los Estados Unidos -presumiblemente, a través del embalaje de mercancías provenientes de Oriente-, estas plagas invasoras han afectado negativamente al sector agrícola y forestal. En lo que respecta al sector agrícola, la industria aguacatera en Estados Unidos ha sufrido cuantiosas pérdidas, debido a que este cultivo es atacado por ambas plagas. En el sector forestal, las afectaciones están relacionadas con la muerte de miles de árboles presentes en los bosques, valles ribereños y zonas conurbadas en el sureste y suroeste de los Estados Unidos. Cabe resaltar que además de la mayoría de las especies de la familia Lauraceae, muchas otras especies de amplia distribución (aproximadamente 200 especies arbóreas) son también afectadas (FORDECYT, 2017).

Algunos coleópteros de la subfamilia Scolytinidae son plagas forestales de gran importancia en México. Publicaciones recientes han identificado 867 especies de Scolytinae, pero solo el 5 % son de importancia económica. Estos insectos han sido reportados en 265 especies de hospederos de los cuales 199 tienen un valor económico (árboles frutales y forestales), especies las cuales diseminarían al hongo simbiote causando daños en áreas forestales y agrícolas, afectando ecosistemas susceptibles (Ángel Restrepo, y otros, 2019).

Las especies vegetales del género *Salix* modifican los sustratos y ayudan al establecimiento de otras especies arbóreas. En Europa, Estados Unidos, Canadá y Argentina se han establecido plantaciones con fines de reforestación utilizando diversas especies del género *Salix*. Además, con fines agroforestales, cuando se manejan en línea, sirven como cortinas rompevientos y para definir linderos (Rodríguez García, 2002).

En México, el *Salix bonplandiana* tiene importancia en la reforestación / restauración, especie con potencial para la restauración de zonas ribereñas erosionadas. Se ha plantado con fines de restauración en las delegaciones de Xochimilco y Tláhuac (Mixquic) de la Ciudad de México y en Durango (Kunth, 1817).

S. bonplandiana también es utilizado en el Sistema agroforestal. Ampliamente usado en el agrosistema conocido como "chinampa". Se planta como cortina rompevientos, para proteger los cultivos hortícolas y florícolas del viento, granizo y tormentas y para retener el suelo y la humedad.

Las plantas son organismos que han logrado evolucionar para crecer y desarrollarse en ambientes donde existen diferentes factores de estrés incluyendo el estrés biótico, esto debido al desarrollo de mecanismos específicos de defensa que les permiten detectar cambios en el ambiente y responder a ellos, minimizando los daños posibles. Este tipo de defensa incluye barreras físicas y químicas características de la planta, también llamadas constitutivas que son estructuras o sustancias químicas presentes en la planta antes de la infección del patógeno. Los mecanismos de defensa inducidos se activan

solamente como respuesta al ataque de patógenos durante el proceso de infección. Las plantas secretan una alta variedad de sustancias con propiedades tóxicas o inhibitorias como fenoles, lignina, taninos, saponinas, antocianinas, flavonoides, glucocinatos, lectinas, glucanasas y quitinasas, entre otros (García Enciso, Robledo Olivo, Benavides Mendoza, Solís Gaona, & González Morales, 2018) (AGROACTIVO, 2018).

La interacción planta-patógeno inducirá una respuesta defensiva en las plantas de *Salix bonplandiana*, se realizaron tres experimentos, en el primer experimento, fueron estacas obtenidas de una planta madre, que se adaptaron a invernadero, se evaluaron las respuestas de las plantas a las diferentes perforaciones ante la inducción del patógeno (*F. solani*), los dos siguientes experimentos fueron obtenidos por semilla, germinadas *in vitro*, el segundo experimento se realizó con plantas en condiciones *in vitro* evaluando los elicitores y su respuesta ante las proteínas del patógeno, en el tercer experimento se tomó en cuenta la mejor respuesta de perforación del primer experimento, y la mejor respuesta defensiva del segundo experimento. Estas plantas se adaptaron a invernadero para su evaluación y respuesta de la planta.

1.2 Antecedentes

Los problemas fitosanitarios que ponen en riesgo al sector agrícola, aumentan cada día y causan grandes pérdidas económicas. Este tipo de riesgos son más peligrosos si se considera, entre otros muchos aspectos la globalización, la cual implica mayores intercambios comerciales de productos y nuevas conexiones territoriales entre los países, dando lugar a escenarios no vislumbrados tales como la dispersión acelerada de algunas plagas. Esta dispersión es a su vez acrecentada por el efecto del cambio climático, que puede favorecer el establecimiento de plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas y/o en los diferentes ecosistemas naturales. Un escenario más preocupante es cuando algunos de los insectos, introducidos de forma accidental, se constituyen como vectores de microorganismos que, al interactuar en un ambiente nuevo y libre de los factores que los controlan como ocurre en su lugar de origen, se

vuelven patógenos de los hospederos, a los que estos vectores atacan (FORDECYT, 2017).

1.2.1 Complejo ambrosial

Los complejos ambrosiales o los escarabajos ambrosiales son insectos globalizados que están distribuidos en bosques de zonas tropicales y subtropicales los cuales comprenden más de 6,000 especies en dos subfamilias, Scolytinidae y Platypodidae. La mayoría de los escarabajos ambrosiales colonizan árboles muertos, moribundos o estresados y ayudan en el proceso de descomposición de madera. Existen factores de estrés que se asocian al ataque de los escarabajos ambrosiales, como el clima, enfermedades, deficiencias nutricionales, plagas. Estos factores de estrés disminuyen la resistencia de los hospederos y facilitan el ataque masivo de los escarabajos. Además, varias especies de escarabajos ambrosiales pueden colonizar un mismo hospedero, sin embargo, una especie puede ser la que predomina (Ángel Restrepo, y otros, 2019).

Muchos de los daños que ocasionan estos escarabajos aún no se han estudiado de manera detallada. El conocimiento sobre la biología (ciclos biológicos) y ecología, permitirá entender la función de éstos en la dinámica y las modificaciones del hábitat en el que se desarrollan, que ha representado muchos millones de años de evolución. Estos insectos se establecen sobre sus hospedantes con dos propósitos fundamentales, el de alimentarse y reproducirse, asimismo juegan un papel importante en el equilibrio de las comunidades vegetales, ya que contribuyen eliminando aquellas plantas moribundas y enfermizas, además se incluyen dentro de los grupos principales que participan en el procesamiento de materia orgánica, particularmente de la madera (Burgos Solorio & Equihua Martínez, 2007).

El 99 % de la subfamilia de escarabajos Platypodinae y más de la mitad de la subfamilia Scolytinae tienen hábitos ambrosiales, es decir, se alimentan y dependen exclusivamente de sus hongos simbioses que son transportados en micangios (bolsas especializadas), los cuales están ubicados en diferentes

partes del cuerpo del insecto. Dependiendo de la especie de escarabajo, los micangios pueden estar presentes en ambos sexos o solo en uno de ellos (Ángel Restrepo, y otros, 2019).

Como el claro ejemplo está el caso de los complejos ambrosiales *Xyleborus glabratus-Raffaelea lauricola*, y *Euwallacea* sp.-*Fusarium euwallaceae*, los cuales están compuestos por un insecto vector y un hongo fitopatógeno (de aquí en adelante referidos como plagas invasoras), que en su lugar de origen no son plagas de importancia fitosanitaria. Sin embargo, en otros lugares han afectado de manera significativa, económica y forestalmente siendo referidos como plagas invasoras integrantes de la familia Salicaceae y muchas otras con una amplia distribución (FORDECYT, 2017).

Algunos miembros de las subfamilias Scolytinidae y Platyponidae son plagas forestales de gran importancia en México. Publicaciones recientes han identificado 867 especies de Scolytinae y 40 especies de Platyponidae, pero solo el 5 % son de importancia económica. Estos insectos han sido reportados en 265 especies de hospederos de los cuales 199 tienen un valor económico (árboles frutales y forestales).

Los escarabajos ambrosiales y sus hongos simbioses comienzan a considerarse como amenazas actuales para ecosistemas naturales, cultivos agrícolas y la industria maderera, generando un impacto ecológico y económico. Garcia Avila, y otros, (2016) reportaron por primera vez a *Euwallacea* nr. *fornicatus* y su hongo simbiote *Fusarium* sp. en Baja California, México. Posteriormente, (Castrejón Antonio, y otros, 2017) reportaron tres especies de *Xyleborus* (*X. affinis*, *X. volvulus* y *X. spinulosus*) asociadas a aguacate en el estado de Colima (en ese estudio no se especifican las condiciones de los árboles).

En 2014 varias especies de escarabajos ambrosiales fueron asociadas a árboles de aguacate con síntomas de marchitez y muerte en diferentes municipios del estado de Michoacán. Recientemente, se identificaron diferentes

especies de escarabajos ambrosiales, diez escolitinos. asociados a árboles de aguacate en Michoacán (Ángel Restrepo, y otros, 2019).

En el sector forestal, las afectaciones están relacionadas con la muerte de miles de árboles presentes en los bosques, valles ribereños y zonas conurbadas en el sureste y suroeste de los Estados Unidos. Cabe resaltar que además de la mayoría de las especies de la familia Salicaceae, muchas otras especies de amplia distribución (aproximadamente 200 especies arbóreas) son también afectadas (FORDECYT, 2017).

Entre los *Xyleborus*, los machos no vuelan, carecen de micangios y nunca se alejan mucho del árbol anfitrión de la galería natal. En contraste las hembras adultas son diploide y simbiontes de hongos vectores en sus micangios proveniente de la galería después de que se aparean con un macho. Además, en contraste con los escarabajos de la corteza que se reproducen en el floema, los escarabajos ambrosiales construyen galerías en el xilema. La propagación de su simbiote fúngico puede obstruir el transporte de agua y minerales, lo que resulta en muerte, marchitamiento y mortalidad del árbol anfitrión (Freeman, y otros, 2013).

Los escolítidos son relativamente bien conocidos en México, Veracruz, Oaxaca, Puebla, Morelos entre otros, pero sobre todo en algunas regiones o entidades como el estado de Jalisco. La falta de inventarios faunísticos de las especies mexicanas de escarabajos descortezadores y ambrosiales, adquiere relevancia debido a la importancia y el impacto ecológico y económico que tienen algunos géneros; ante estas evidencias resulta importante el ir plasmando toda la información con el propósito de realizar estudios más detallados abordando aspectos biológicos y ecológicos, sobre estos insectos, para así poder establecer (en su caso) estrategias de manejo y control, en particular sobre aquellas especies de importancia económica (Burgos Solorio & Equihua Martínez, 2007).

1.2.1.1 *Euwallacea*

El origen exacto del Escarabajo Barrenador Polífago (EBP) es desconocido, pero el análisis genético indica que puede proceder de la zona comprendida entre el norte de Tailandia y el sur de Japón. Actualmente, el EBP sólo se ha registrado en el sur de California y sur de Florida (EUA), Israel, Tijuana (México), así como en Pietermaritzburg y Johannesburgo en Sudáfrica. Se cree que Taiwán es el presunto origen de la infestación en el Condado de San Diego (SENASICA, 2019).

Clasificación taxonómica (SENASICA, 2019)

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Sub-phylum: Hexapoda

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Curculionidae

Subfamilia: Scolytinae

Género: *Euwallacea*

Con las acciones del programa “Mantenimiento de la infraestructura del Laboratorio Nacional PlanTECC” se tiene el propósito de contener la dispersión del complejo del escarabajo barrenador polífago, para proteger árboles de paisajes urbanos y áreas naturales de Baja California, evitar la dispersión y establecimiento de la plaga en otros estados del país, asimismo, proteger la superficie establecida con aguacate, producción y mercado nacional e internacional al ser un hospedante susceptible y reproductivo para la plaga, además de otras especies susceptibles (no reproductivos) de importancia agrícola como limón, granado, cacao, naranja dulce, olivo, durazno, níspero, nuez pecanera o encarcelada y vid (Castillo Cerón, 2018).

Varias otras especies de *Euwallacea* con hábitos similares a los de *E. fornicatus* han sido importadas a zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Es interesante que *E. fornicatus* no esté registrada entre las muchas

especies interceptadas en la madera importada a Japón. Esto se debe probablemente a que ataca principalmente a tallos de menor diámetro. Sin embargo, el riesgo de introducción fuera de su actual área de distribución geográfica debe considerarse alto. Al haber sido introducida accidentalmente muy recientemente tanto en el lado oriental (Florida) como en el occidental (California) de los Estados Unidos, parece probable que se extienda aún más a través de los estados meridionales. Existe un claro peligro de que se produzcan daños en las plantaciones en África y América del Sur si la especie se establece en esas regiones. Uno de los hongos con los que puede asociarse, el *F. euwallaceae*, es un importante patógeno de las plantas con una amplia gama de huéspedes. Algunos estudios observan que algunos escarabajos ambrosiales que normalmente son secundarios, y no atacan árboles sanos, han comenzado a hacerlo, y analizan las posibles razones de ello (CABI, 2019).

En Israel, los ataques del escarabajo en aguacate han sido en los principales cultivares: 'Haas', 'Pinkerton' y 'Ettinger', pareciendo ser 'Haas' el más susceptible, además los patógenos simbióticos han sido aislados en cultivares de aguacate en varias áreas de producción (SENASICA, 2019).

Los escarabajos: adultos y larvas se alimentan del micelio del hongo el cual es inoculado en el xilema que se desarrolla en la pared de las galerías o túneles (Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, 2019).

De acuerdo con sus hábitos alimenticios, los escolitinos pueden ser xilomicetófagos, fleófagos, espermatófagos y mielófagos.

Los xilomicetófagos también son conocidos como coleópteros ambrosiales, debido a que llevan consigo hongos que se cultivan en el interior de las galerías y les sirven de alimento a ellos mismos.

Los fleófagos son insectos que consumen madera del floema en donde crean galerías.

Los espermatófagos son aquellos que consumen semillas.

Los mielófagos estos se alimentan de varias partes de los árboles, realizan galerías y perforaciones, cerca del tallo (Pérez Silva , y otros, 2015).

1.2.1.1.1 *Euwallacea fornicatus*

En Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Sub-phylum: Hexapoda

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Curculionidae

Subfamilia: Scolytinae

Género: *Euwallacea*

Especie: *fornicatus*.

Expertos suponen que la introducción del Escarabajo barrenador polífago (EBP), *Euwallacea sp.*, fue a través de productos y/o material procedente del sudeste de Asia, debido a que ha sido detectado en Taiwán, Vietnam y China. Este insecto forma interacciones simbióticas con múltiples especies de hongos, hasta el momento se sabe que es vector de tres hongos: *Fusarium euwallaceae*, *Graphium sp.*, y *Acremonium sp.*, en aguacate y otras plantas hospedantes en California, EUA e Israel (SENASICA, 2019).

Recientemente se detectó otra invasión por un escarabajo barrenador cercano a *Euwallacea sp.*, el cual ya ha sido encontrado en Tijuana. La marchitez por *Fusarium* ha causado daños ecológicos y económicos severos en California, y su dispersión en México, si no se llevan a cabo medidas de control, podría afectar las zonas forestales y la salud de una amplia variedad de árboles silvestres (Reverchon & Eskalen , 2015).

El EBP es morfológicamente indistinguible del Tea Shot Hole Borer (*Euwallacea fornicatus*), el cual originalmente fue identificado como esta especie en Israel y California. Sin embargo, las diferencias tanto de ADN nuclear como mitocondrial entre muestras de EBP colectados en Israel, California y Florida, así

como muestras de *E. fornicatus* de las plantaciones de té de Sri Lanka y otros países del sudeste asiático indican que EBP es una especie distinta genéticamente, por lo que actualmente se refiere generalmente como *Euwallacea sp.* Sin embargo, algunos autores lo han clasificado como *Euwallacea nr. fornicatus #1 - #5*. La especie detectada en los Ángeles fue clasificada como *Euwallacea nr. fornicatus #1*, la de Florida como *Euwallacea nr. fornicatus #2* y la establecida en Sri Lanka como *Euwallacea nr. fornicatus #4* y la de San Diego y México como *Euwallacea nr. fornicatus #5*, la cual es referida como kuroshio shot hole borer (KSHB) (SENASICA, 2019).

1.2.1.1.2 Descripción morfológica

Euwallacea fornicatus (Coleópteros: Curculionidae: Scolytinae) es un escarabajo de ambrosial que ha causado durante mucho tiempo un daño económico sustancial. Desde el a principios del siglo XX en adelante, ha sido reconocido como una importante plaga en diversas plantaciones. El área de distribución histórica (y probablemente natural) de la especie morfológica *E. fornicatus* se extiende desde Sri Lanka, a través de Asia sudoriental, hasta Vietnam, China, Taiwán y las islas de Okinawa, Indonesia, Filipinas y Papua Nueva Guinea. El insecto también es invasor y se ha notificado su presencia en Madagascar, Costa Rica, Guatemala, Panamá, Hawaii, Florida, California e Israel. En la presunta zona de distribución nativa del escarabajo, *E. fornicatus* causa daños económicos en las plantaciones de diversas especies de plantas leñosas exóticas (Southamer, y otros, 2017).

Los huevos de *E. fornicatus* son blancos, parcialmente translúcidos, de aproximadamente 0,3 mm de largo, eclosionan en cuatro a seis días. Los huevos fertilizados, diploides (aquellos con información genética tanto materna como paterna) eclosionan en hembras, mientras que los huevos no fertilizados, haploides (aquellos con sólo información genética materna) eclosionan en machos. Por lo general, sólo hay un único huevo masculino por familia.

Las larvas son las típicas larvas del gorgojo: blancas, en forma de C, sin patas, con una cápsula de cabeza naranja. Las larvas del barrenador del té tienen tres estadios, como casi todos los gorgojos. Las larvas se alimentan completamente del hongo simbiótico ambrosial. El estadio larvario se completa en 16-18 días y las larvas de tercer estadio alcanzan unos 3,0 mm de longitud.

Las pupas son blancas, del mismo tamaño que los escarabajos adultos. La pupa haploide del macho es claramente más pequeña que la de la hembra. La etapa de pupa tiene lugar dentro de la misma galería comunal que el desarrollo larvario. Los adultos emergen en siete a nueve días.

Los machos son notablemente más pequeños, 1,5 mm, 2,0 veces más largos que anchos. Sus élitros están fusionados, los ojos son diminutos, y las alas están atrofiadas y no funcionan.

Las hembras adultas miden 1,9-2,5 mm de largo, 2,3 veces más de ancho. Son negros o casi negros, pero los adultos recientemente eclosionados pueden ser marrones. El protórax es tan largo como ancho, redondeado en el frente, con lados paralelos. El borde frontal del protórax tiene una fila de proyecciones similares a una sierra; la superficie de la pendiente frontal del protórax tiene proyecciones similares, pero aquí están dispersas. Los élitros son 1,3 veces más largos que el ancho, 1,3 veces más largos que el protórax. No hay rasgos superficiales visibles en los élitros, con excepción de las hileras de pinchazos (estrías). Los pelos de los élitros están erectos y organizados en hileras (Li, Lucky, & Hulcr, 2018).

Cuadro 1.1.- Mediciones y desarrollo de *Euwallaceae fornicatus*

Ciclo de vida completo	Hembra	Macho
		43.49 ± 0.52 días
Huevos	7.86 ± 0.63 días	
Estadios larvarios.	Instar I	5.37 ± 0.49 días
	Instar II	6.77 ± 0.42 días
	Instar III	5.81 ± 0.39 días
Pupa	9.78 ± 0.79 días	
Adulto	7.90 ± 0.45 días	5.84 ± 0.36 días

(Kumar, Rajkhowa, Sankar, & Rajan, 2011)

1.2.1.1.3 Hospedantes

El EBP puede reproducir y hacer crecer el *Fusarium* en al menos 39 especies conocidas, llamadas hospedadores reproductores. La susceptibilidad relativa entre las especies hospederas es dinámica y variada. Algunos de los hospedadores reproductores más susceptibles parecen ser el arce negundo, aguacate, palo verde, y diversas especies de sicomoro y sauce (Dimson, Kabashima, & Eskalen, 2015).

Euwallacea sp. a través de su simbionte fúngico plantea una amenaza importante para la producción de aguacate (*Persea americana miller*) en Israel y California. Además del aguacate, el escarabajo puede completar su ciclo de vida en al menos otros 20 árboles vivos, incluyendo el saúco (*Acer negundo L.*), el ricino (*Ricinis communis L.*), varios robles (*Quercus spp.*) y el sicomoro de California (*Platanus racemosa Nutt.*). Las encuestas realizadas en 2012 en los condados de Los Ángeles, Orange y San Bernardino, por ejemplo, reveló que el escarabajo había atacado más de 200 especies diferentes de árboles sanos, lo que resultó en graves daños a más de la mitad de ellos. Los escarabajos ambrosiales suelen atacar a los muertos o huéspedes moribundos; por lo tanto, la colonización atípica de diversos huéspedes sanos de *Euwallacea sp.* y varios

otros escarabajos invasores de ambrosiales se atribuye a un desajuste olfativo con los anfitriones extranjeros que encuentra fuera de su hábitat nativo (Freeman, y otros, 2013).

1.2.1.1.4 Signos

Naturaleza y signos del daño: los adultos y las larvas se alimentan dentro de las galerías de brechas de alguna planta. El daño por los escarabajos conduce al debilitamiento de las ramas y a la rotura y proporciona puntos de entrada para el invasor secundario. Se observaron los detalles de las galerías por rama, el número de larvas y el número de agujeros por rama. En la observación de campo se encontró un número máximo de 19 agujeros, 10 larvas y 9 galerías por rama de algún cultivo de plantación (Kumar, Rajkhowa, Sankar, & Rajan, 2011).

Euwallacea fornicatus perfora y hace túneles en los tallos del huésped causando que se rompan. El resultado es que los arbustos de té se debilitan; la recuperación es pobre. Las ramas mueren después de la poda y esto conduce a la quemadura del sol.

Los repetidos ataques de *E. fornicatus* en los sucesivos ciclos de poda causan un debilitamiento crónico severo de los arbustos de té. El ataque inicial empobrece el marco del arbusto y el mantenimiento del follaje. Esto causa un drenaje de las reservas del arbusto. El resultado es una mala cobertura del suelo, que permite un calentamiento excesivo del mismo. Los efectos a largo plazo de la infestación por *E. fornicatus* incluyen la mala recuperación y la muerte de las ramas después de la poda, y el quemado por el sol de las superficies superiores de las ramas después de la poda. La madera muerta y moribunda sucumbe a la putrefacción de la madera causada por hongos secundarios. Las termitas carroñeras limpian la madera muerta, pero tienden a agravar la putrefacción de la madera (CABI, 2019).

1.2.1.1.5 Diseminación

Los escarabajos hembra son negros, de 2.0 a 2.5 mm de largo con un cuerpo fuertemente esclerotizado, alas y piezas bucales bien desarrolladas. En los machos, los ojos, alas y piezas bucales están atrofiados y por lo tanto son incapaces de volar o perforar en la madera dura. Ambas funciones son llevadas a cabo por las hembras. Los escarabajos adultos recién surgidos, de color blanco cremoso/amarillo, se convierten en marrón claro y luego en el característico color negro en seis a doce días. Los escarabajos escólidos pertenecientes a la tribu Xyleborini tienen una relación simbiótica con el hongo ambrosial. Las esporas del hongo son transportadas por los escarabajos en órganos especiales llamados micangios situados en la cavidad bucal de la cabeza. Las esporas del hongo ambrosía que llevan los escarabajos hembra se adhieren a las paredes de las galerías del tallo. Al germinar las esporas, los gusanos y los adultos se alimentan del hongo. Unos días después de emerger de la galería parental, establece su propia galería de 1,5 mm de diámetro en las ramas del arbusto de té. Hay dos tipos de galerías, a saber, la circular y la longitudinal y, más a menudo, ambos tipos de galerías se observan en el mismo tallo o rama que se denomina galería mixta. Casi todas las hembras son fecundadas por los machos menos numerosos y el apareamiento tiene lugar dentro de la galería parental. Las hembras no apareadas también ponen huevos y estos huevos no fertilizados se convierten en machos (James, 2007).

1.2.1.1.6 Epidemiología

Euwallacea sp. es una plaga que puede causar pérdidas económicas en hospedantes de importancia agrícola, forestal y ornamental. En México, el cultivo de aguacate podría ser el hospedante principal, por su importancia económica. Por lo anterior y considerando las directrices emanadas de la NIMF No. 6, Vigilancia, a partir del 2013 se implementaron actividades de vigilancia para la detección oportuna del complejo escarabajo barrenador polífago, a través de las acciones de exploración, rutas de vigilancia y trampeo en sitios de riesgo. En este sentido del 2013 al 2017, se exploraron 76, 207.96 ha., con cultivos

hospedantes para esta plaga, además se instalaron 5, 236 trampas en zonas de cultivos comerciales y zonas con riesgo de introducción, así como 218 rutas de vigilancia. Adicionalmente y como una acción complementaria, en el 2017 se observaron 6,189 sitios de exploración puntual.

En el presente año, las acciones para la vigilancia de *Euwallacea sp.* incluye las estrategias de área de exploración, exploración puntual, rutas de vigilancia y rutas de trampeo, implementadas en los estados de Baja California, Colima, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nayarit, Sinaloa, Sonora, en huertos comerciales de aguacate y zonas identificadas como de mayor riesgo, así como la revisión periódica de plantas centinela en puntos de ingreso del territorio nacional (Arakelian, Eskalen, Eskalen, Kabashima, & Dimson, 2019).

1.2.2 *Fusarium*

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas. Pueden causar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, con una alta mortalidad. Algunas de sus especies producen toxinas que afectan al hombre y animales. De las más de 100 especies de *Fusarium* descritas, sólo 12 de ellas pueden considerarse patógenas para el humano, entre ellas destacan *F. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticilloides*, en orden decreciente de frecuencia (Tapia & Amaro, 2014).

Fusarium es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica y que a la vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando ésta sufre algún tipo de desbalance. Los principales mecanismos de dispersión del patógeno son los movimientos de suelo infectado, el agua de escorrentía y el uso de almácigo infectado. Este hongo tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a sus estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, lo que vuelve inefectiva la rotación de cultivos a corto plazo (Retana, Ramírez Coche, Castro , & Blanco Meneses, 2017).

Al microscopio, la fiálides es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporodoquios) y detalles de las células de los extremos (célula apical y pie). Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovals, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), en cadenas largas o cortas; todas observables a la lupa (40x). Otro tipo de conidios son los mesoconidios, que son similares, pero de menor tamaño que los macroconidios y nunca forman estructuras mucoides. Por último, pueden observarse las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo. Existen distintos medios que permiten su crecimiento; entre ellos, agar papa dextrosa (PDA) (Tapia & Amaro, 2014).

El género *Fusarium* comprende 70 especies descritas, que a su vez están agrupadas en 12 secciones. Cada sección es un conjunto de especies relacionadas entre sí. Más de la mitad de las especies son parásitas de plantas y entre ellas se encuentran algunos de los más serios patógenos del mundo agrícola.

Dentro del género *Fusarium* existen especies que presentan formas con reproducción sexual conocida, como *F. solani*, y otras, como *F. oxysporum*, en las que no se conoce fase sexual. Este hecho dificulta la clasificación, ya que, tradicionalmente las formas sexuales de una especie se han incluido en un grupo diferente y con un nombre distinto de las que presentan las formas sin reproducción sexual (Kikot, 2012).

1.2.2.1 *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum es un organismo muy amplio a nivel de especie, se han clasificado más de 120 diferentes formas especiales (formae specialis). Este término está basado en la infección que produce el patógeno en un hospedante

específico. Las formas especiales a su vez se subdividen en razas, las cuales han sido descritas al basarse en la habilidad del patógeno de infectar diferentes haplotipos o variedades en una especie hospedante (Retana, Ramírez Coche, Castro , & Blanco Meneses, 2017).

El *Fusarium oxysporum* ocasiona marchitez y se presenta en distintos cultivos como cucurbitáceas, tomate, pimientos y chiles picantes. Existen tres tipos de razas, sin embargo, los síntomas son los mismos en todas las variantes y, cuando se habla de razas, es para especificar la resistencia genética que posee la semilla.

El amarilleamiento de las hojas es uno de los primeros síntomas. Las hojas bajas comienzan a perder turgencia y a “colgarse”. Además, esta enfermedad afecta el sistema vascular, y al cortar el tallo longitudinalmente podemos observar manchas de color marrón oscuro o café. Antes de que la planta madure, varias hojas se amarillean y marchitan, afectando el desarrollo de los frutos y el crecimiento de la planta en general (Seminis, 2017).

1.2.2.2 *Fusarium solani*

El género *Fusarium* comprende un grupo amplio y heterogéneo de hongos importantes para la industria alimentaria y farmacéutica, la medicina y la agricultura. *Fusarium solani* es un hongo fitopatógeno y es un importante agente causante de varias enfermedades de los cultivos, como la podredumbre de las raíces y los frutos de *Cucurbita spp.*, la podredumbre de las raíces y los tallos de los guisantes, el síndrome de muerte súbita de la soja, la podredumbre de los pies de los guisantes y la podredumbre seca de las patatas.

La especie morfológica *Fusarium solani* fue descrita por primera vez por C.F.P. Von Martius en 1842 como *Fusisporium solani* de tubérculos de papa podridos, *Solanum tuberosum*. La especie fue transferida al género *Fusarium* por el micólogo italiano Piers A. Saccardo en 1881. *F. solani* fue enmendado por Snyder y Hansen en 1941 para que comprendiera un grupo complejo de especies que están ampliamente distribuidas en los suelos y causan la

putrefacción de los tubérculos, raíces y tallos de las plantas en todo el mundo. Existen al menos 50 linajes de subespecies (Luginhuhl, 2010).

1.2.2.3 *Fusarium euwallaceae*

El escarabajo barrenador polífago *Euwallacea sp.* es un escarabajo invasivo que transmite, entre otros, el hongo fitopatógeno *Fusarium euwallaceae*, el cual es responsable de la enfermedad conocida como marchitez por *Fusarium*. Esta enfermedad bloquea el flujo de agua y nutrientes en el aguacate y en otras 138 especies de árboles, lo que puede ocasionar la muerte de la planta (Reverchon & Eskalen, 2015).

Clasificación taxonómica (DGSV-CNRF, 2014)

Reino: Fungi

Clase: Ascomycota

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocreaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *euwallaceae*

Se ha identificado que *Euwallacea sp.* es vector de *Fusarium euwallacea*, esta asociación provoca la enfermedad conocida como marchitez regresiva de *Fusarium*. El complejo del escarabajo barrenador polífago se ha observado atacando a más de 300 especies de árboles, de las cuales 110 son susceptibles a la muerte regresiva por *Fusarium*, que puede ocasionar entre otros daños la muerte de los árboles (Castillo Cerón, 2018).

1.2.2.4 Enfermedad por *Fusarium euwallaceae*.

Los árboles con infestaciones recientes exhiben pocos síntomas externos. Aunque no hay una lesión visible de la colonización, si se examina la madera en el lugar de infestación del escarabajo se observa una coloración marrón y necrosis del xilema causada por el hongo (DGSV-CNRF, 2014).

Respecto al daño causado por el hongo, dado que este afecta al tejido vascular del árbol, se altera el flujo del agua y de nutrientes causando finalmente la muerte descendente de ramas. Observaciones preliminares sugieren que el hongo se dispersa del punto de infestación a una distancia de al menos 150 cm por medio de las traqueidas. Otros síntomas que se han observado en árboles de aguacate infestados son: marchitamiento de ramas y decoloración de hojas, las ramas con alta producción se rompen frecuentemente en la sección donde las galerías de los escarabajos están establecidas y muerte de árboles jóvenes y adultos (CONABIO, 2016).

1.2.2.5 Micotoxinas de diferentes especies de *Fusarium*

La presencia generalizada de hongos y micotoxinas en especial las de *Fusarium spp.* son muy comunes en todo el mundo, están latentes en las plantas infectadas antes de la cosecha o en los granos de las tiendas, lo cual es de gran preocupación para la salud humana y animal. Las micotoxinas de *Fusarium* más frecuentes son el deoxinivalenol (DON), el 3-acetil deoxinivalenol (3-ADON), el 15-acetil deoxinivalenol (15-ADON), el nivalenol (NIV) y el fusarenol X (Fus-X); Toxina T-2, toxina HT-2, neosolaniol (NEO) y diacetoxiscirpenol (DAS); zearalenona (ZEN), fumonisina B1 (FB1), fumonisina B2 (FB2) y ácido fusárico.

(Shi, y otros, 2016) evaluaron las micotoxinas de 20 de las especies de *Fusarium* más comunes y las clasificaron en los tres grupos siguientes basándose en su caracterización molecular. El grupo I comprendía los productores de ácido fusárico y se dividió a su vez en dos subgrupos. El subgrupo I comprendía *F. fujikuroi*, *F. solani*, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* que producen ácido fusárico y fumonisinas; el subgrupo II comprendía *F. musae*, *F. equiseti*, *F. temperatum*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. concentricum*, *F. sacchari* y *F. andiyazi* que sólo producen ácido fusárico. Según la clasificación de las micotoxinas de *Fusarium*, los productores de tricoteceno de tipo A, que comprenden *F. polyphialidicum*, *F. sporotrichioides* y *F. langsethiae*, formaban el Grupo II, y los productores de tricoteceno de tipo B, que comprenden *F. meridionale*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. poae*, formaban el Grupo III.

1.2.2.6 Resistencia de *Fusarium*

(Van Diepeningen & de Hoog, 2016) mencionan que la resistencia del *Fusarium* a los medicamentos antimicóticos ha sido definida por muchos investigadores. Se sabe que muchos miembros del FSSC (Food Safety System Certification) causan onicomiosis fusaria.

Fusarium solani mostró más resistencia a los agentes antimicóticos que otros. El efecto de los antifúngicos azoles utilizados clínicamente depende de una enzima en particular, lanosterol-14 α -desmetilasa. Si bien los anillos de imidazol o triazol son importantes para conferir el efecto terapéutico en los animales, el epoxiconazol, el propiconazol, el difenoconazol, el bromuconazol y el tebuconazol se utilizan para las plantas. Las especies de *Fusarium* son resistentes a los azólicos (Askun, 2018).

(Tupaki Sreepurna, Al Hatmi, Kindo, Sundaram, & de Hoog, 2016) informaron que los miembros del FSSC, principalmente *F. falciforme* y *F. keratoplasticum*, mostraban una resistencia múltiple a las drogas contra la caspofungina y los azoles. Sólo unos pocos agentes antimicóticos (voriconazol, posaconazol y anfotericina B) mostraron actividad in vitro contra *F. falciforme* y *F. keratoplasticum*.

1.2.3 Importancia de los sauces

Los usos del sauce van desde el punto de vista ecológico, medicinal, artesanal y otros servicios. A nivel ecológico los efectos restauradores permiten la conservación del suelo y el control de la erosión. Se ha utilizado en áreas sujetas a degradación por erosión eólica o hídrica. Las especies del género *Salix* modifican el sustrato y ayudan al establecimiento de otras especies arbóreas. Este enriquecimiento forestal natural permite ser nicho ecológico de aves, roedores e insectos (Álvarez Sierra, 2015).

Las enfermedades más importantes en diversas especies de *Salix sp.* son causadas por hongos que dañan raíz, corteza, brotes y hojas, además de

bacterias que dañan ramas. La importancia del daño ocasionado por dichas enfermedades varía de acuerdo con la finalidad de la plantación. En plantaciones para usos ornamentales los problemas más severos derivan de microorganismos que causan manchas foliares, marchitamientos y defoliación prematura. También se presentan patógenos causantes de enfermedades que conducen a pudrición en la raíz, dañan los tallos y pueden provocar caída repentina de los árboles o rompimiento de ramas (González Díaz, García Velasco, Camacho Cerón, & Nieto Ángel, 2011).

Clasificación taxonómica *Salix bonplandiana* (Kunth, 1817)

Phyllum: Plantae

Subphyllum: Spermatophyta

Clase: Magnoliophytina

Subclase: Magnoliopsida

Orden: Dilenidas

Familia: Salicales

Subfamilia: Salicaceas

Género: *Salix*

Especie: *bonplandiana*

Los sauces, estos miembros de la familia Salicaceae dan madera, fibra, biocombustible y otros productos forestales y desempeñan un papel positivo en la rehabilitación de tierras degradadas, la restauración de paisajes forestales, la mitigación del cambio climático y el sustento de las poblaciones en las regiones templadas y boreales del mundo. Chile, Argentina y otros países de América Latina en 2004 orientaron a promover la contribución de sauces al desarrollo forestal y rural sostenible, en particular en los países en desarrollo y los de economías en transición. Donde se mencionó lo poco que se conocía de la extensión real de los ecosistemas de sauces en la Federación de Rusia, que tiene una de las mayores superficies del mundo de bosques naturales de Salicaceae. En Suecia presentan nuevos usos para los sauces, dentro de estos está la producción de energía y fitorremediación, es decir la limpieza de suelos

contaminados, como también la restauración de parajes degradados utilizando en gran escala agua residuales para regar y fertilizar los bosques de sauces. Los bosques de sauces absorben los contaminantes y el exceso de nutrientes del suelo (FAO, 2005).

Desde el punto de vista medicinal los sauces tienen valiosas propiedades medicinales. La corteza y hojas de estos árboles han sido empleadas desde hace siglos por pueblos en varias partes del mundo para aliviar la fiebre y dolencias tales como el reumatismo. En el siglo XIX se aisló por primera vez el extracto activo medicinal de la corteza de sauce, la salicina (nombre que deriva de salix, el nombre en latín de los sauces). De esta sustancia se deriva el ácido salicílico, muy importante en la industria química y en la medicina, pues a partir de él fue creada una variante, el ácido acetilsalicílico, que no es otra cosa que la mundialmente conocida aspirina (Álvarez Sierra, 2015)

1.2.3.1 Problemas fitopatógenos de los sauces

Las enfermedades más importantes en diversas especies de *Salix sp.* son causadas por hongos que dañan raíz, corteza, brotes y hojas, además de bacterias que dañan ramas. La importancia del daño ocasionado por dichas enfermedades varía de acuerdo con la finalidad de la plantación. En plantaciones para usos ornamentales los problemas más severos derivan de microorganismos que causan manchas foliares, marchitamientos y defoliación prematura. También se presentan patógenos causantes de enfermedades que conducen a pudrición en la raíz, dañan los tallos y pueden provocar caída repentina de los árboles o rompimiento de ramas (González Díaz, García Velasco, Camacho Cerón, & Nieto Ángel, 2011).

Melampsora epitea Thümes, micromiceto común en *Salix babylonica* L. (90 %) perteneciente al grupo de las royas; su principal síntoma son las pústulas (Uredinios) de color amarillo-naranja sobre la superficie de las hojas de sauce, de preferencia en el envés, en donde ocasiona el rompimiento de su epidermis y el aumento del volumen de la hoja y en ciertos casos la formación de agallas; al impedir que se realice efectivamente la fotosíntesis y el paso de nutrientes,

provoca defoliación prematura. Las esporas (uredosporas) son de color amarillo brillante o naranja cuando fresco y pared con espinas o púas (Reséndiz Martínez, Guzmán Díaz, Muñoz Viveros, Nieto de Pacual Pola, & Olvero Coronel, 2015).

1.2.4 Mecanismos de defensa

Las bases moleculares de la resistencia a los patógenos revelan un conjunto de receptores celulares que realizan la detección directa de moléculas patógenas. Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) dentro de la membrana celular detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y las quinasas asociadas a paredes (WAK) detectan patrones moleculares asociados a daños (DAMP) que resultan del daño celular durante la infección. Los receptores con dominios de unión anucleótidos y repeticiones ricos en leucina (NLR) detectan efectores que los patógenos usan para facilitar la infección. Los PRR, WAK y NLR inician una de las muchas cascadas de señalización que aún no se han aclarado por completo. Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), proteínas G, ubiquitina, calcio, hormonas, factores de transcripción (TF) y modificaciones epigenéticas regulan la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR). Esto conduce a varias respuestas que evitan una infección adicional: respuesta hipersensible (HR), producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), modificación de la pared celular, cierre de estomas o la producción de diversas proteínas y compuestos antiplagas (p. Ej., quitinasas, proteasa inhibidores, defensinas y fitoalexinas). Como se entiende ahora por las técnicas moleculares, la resistencia a los patógenos en las plantas involucra varios orgánulos y clases de compuestos proteicos y no proteicos, cada uno de los cuales se requiere para regular la respuesta de defensa (Andersen, Ali, Byamukama, Yen , & Nepal, 2018).

1.3 Planteamiento del problema

En México existen complejos ambrosiales que sirven en los ecosistemas para la aceleración de descomposición de materia orgánica, para derrumbar árboles viejos y que los jóvenes crezcan. Sin embargo, el complejo ambrosial que existe entre el *Euwallacea sp.* y *Fusarium euwallaceae* queda fuera de este mecanismo de descomposición de materia, ya que ataca árboles jóvenes y por su patogenicidad provoca marchitamiento en la planta, hasta llegar a su muerte. Si este hongo llegara a hacer simbiote con los escarabajos nacionales, podría afectar gravemente ecosistemas forestales, paisajes urbanos, zonas agrícolas y entornos diversos en nuestro país, acelerando su distribución y facilitando la dispersión de la plaga. En el 2015 se reportó presencia del escarabajo *Euwallacea sp.* En territorio mexicano, los árboles en los que se obtuvo registro fueron sauces, sin embargo, se considera que puede atacar más de 300 especies, de las cuales la mayoría son especies arbóreas, como pinos, sauces, encino, álamo, árboles que conforman el ecosistema forestal y ornamental mexicano, y no solo eso, sino también de importancia agrícola como aguacates y otros de la familia Lauraceae, cítricos, uvas, entre otros más. Es por eso que la SENASICA hizo pública una alerta hacia cualquier reporte son síntomas y signos en plantas. Por lo tanto, se considera de gran importancia el diseñar y ejecutar estrategias de base científica-tecnológica enfocada en el manejo de la plaga *Euwallacea sp.* – *Fusarium- euwallaceae* con una visión multidisciplinaria e interinstitucional.

1.4 Justificación

El complejo ambrosial que existe entre el escarabajo *Euwallaceae fornicatus* y el hongo *Fusarium euwallaceae* es una plaga que se caracteriza por tener un amplio rango de hospedantes, dado que son más de 200 especies en las que se reportan familias de cultivos agrícolas, familias de árboles forestales y ornamentales, en los que se encuentran cultivos de importancia agrícola como los aguacates, cítricos, papaya, etc. Y forestales como los sauces, pinos, entre otros. Sin embargo, se tiene registro que en suelo mexicano se vio más atraído por los sauces.

Los sauces son una familia de árboles forestales de importancia nacional e internacional, por su importancia agroforestal, su impacto directo para grupos significativos de sectores básicos, forestal y ornamental. Esta familia se ve afectada de manera importante por diferentes enfermedades entre la cual la marchitez por el complejo ambrosial es una de ellas. Sin embargo, el conocimiento básico de la enfermedad, asociada a *Fusarium euwallaceae* ha sido marginalmente abordada. Aun cuando las especies patogénicas de *Fusarium* se han reportado, existe este complejo ambrosial que reduce el tiempo de introducción del patógeno a la planta ya que por medio de las galerías que forma, el hongo no usa mecanismos de ataque a la raíz como regularmente sucede, acelerando su colonización y patogenicidad en la planta.

Dado que ambas plagas invasoras se han dispersado en los Estados Unidos, y geográficamente están muy cercanas del territorio nacional mexicano, y teniendo en cuenta las potenciales afectaciones en caso de su introducción, la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) ha implementado en México el Programa de Vigilancia Epidemiológica (PVE) con el fin de evitar la introducción, la dispersión y el establecimiento de ambas plagas en el país. A pesar de los esfuerzos realizados, el PVE ya detectó por vez primera un espécimen del escarabajo barrenador polífago *Euwallacea nr. fornicatus* en una trampa establecida para el monitoreo en el municipio de Tijuana, Baja California, a 200 m de la frontera con los Estados Unidos. El escarabajo barrenador *Euwallacea*

sp. y su hongo simbiote *Fusarium euwallaceae* son considerados una plaga reglamentada (cuarentenaria), restringida a la zona de Tijuana (FORDECYT, 2017).

En México la superficie agrícola varía entre 20 y 25 millones de hectáreas. Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias que se destinan a controlar plagas, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causan perjuicio o que interfieren con la producción agropecuaria y forestal. Se utilizan plaguicidas para el control de plagas y enfermedades que afectan la producción agrícola. En 2006 el consumo de plaguicidas en México fue de 95 025 toneladas. Estas sustancias representan un riesgo para la salud humana y el ambiente debido a que pueden contaminar suelos, agua, sedimentos y aire (Hernández Antonio & M. Hansen, 2011).

Por lo que con el presente trabajo se busca que con la inoculación del *Fusarium solani* una cepa proveniente de un complejo ambrosial y la aplicación de elicitores en plantas de *S. bonplandiana*, se logre obtener una respuesta defensiva de la planta ante el ataque del hongo, evitando que se propague de manera que produzca muerte en la planta.

El uso irracional de pesticidas sintetizados, ha provocado una gran disminución en la biodiversidad, una contaminación ambiental, de salud pública y resistencia en organismos fitopatógenos. El uso de elicitores disminuye la aplicación de estos pesticidas sintéticos y la reducción de contaminación, brindando a la planta una menor susceptibilidad a patógenos y resistencia a estrés abiótico, lo cual podría tener beneficios para un árbol de importancia forestal y ecológica a nivel nacional e internacional desarrollando una resistencia a situaciones bióticas y abióticas.

Aunado a esto, el diseño de estrategias para el control de la enfermedad se complica con la restricción del trabajo con el hongo patogénico (*Fusarium euwallaceae*) al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) y en el lugar donde ya se encuentra presenta la plaga (Tijuana). Esto hace necesario diseñar metodología para la validación de las estrategias de control que puedan

transferirse al mismo CNRF, y a otros Centros de Investigación en colaboración.
Y establecer estas metodologías empleando un hongo relacionado a un complejo ambrosial no cuarentenado (*Fusarium solani*).

1.5 Hipótesis

La inoculación del hongo *Fusarium solani* proveniente de un complejo ambrosial en *Salix bonplandiana* previamente tratado con elicitores, activa una respuesta defensiva en la planta.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar la respuesta de defensa inducida por elicitores a la infección de *Fusarium solani* en *Salix*.

1.6.2 Objetivos particulares

1. Establecer un protocolo de propagación *in vitro* de *Salix bonplandiana* a partir de semilla y microesqueje
2. Establecer un protocolo de propagación *ex vitro* de *Salix bonplandiana* por esquejes
3. Establecer un modelo de evaluación en la colonización por medio de inoculación de *Fusarium solani* en *Salix bonplandiana*.
4. Evaluar el efecto de elicitores en la colonización de *Fusarium solani* en *Salix bonplandiana*.

1.7 Bibliografía

- AGROACTIVO. (20 de abril de 2018). *agroactivocol*. Obtenido de <https://agroactivocol.com/manejo-integrado-y-preventivo-de-plagas/elicitores-inductores-de-defensas/#:~:text=Los%20mecanismos%20de%20defensa%20inducidos,el%20metabolismo%20de%20la%20planta> . Consultado:
- Álvarez Sierra, Y. A. (2015). *Protocolo de Uso y Aprovechamiento del Sauce en la Actividad Artesanal*. Fundación cultural del putumayo, Departamento de cultura. Putumayo: Fundación cultural del putumayo. Recuperado el 01 de Agosto de 2020
- Álvarez Sierra, Y. A. (2015). *Protocolo de Uso y Aprovechamiento del Sauce en la Actividad Artesanal*. Putumayo: Fundación cultural del putumayo.
- Andersen, E., Ali, S., Byamukama, E., Yen , Y., & Nepal, M. P. (Julio de 2018). Disease Resistance Mechanisms in Plants. *genes*, 9(339). doi:10.3390/genes9070339
- Ángel Restrepo, M., Ochoa Ascencio, S., Fernández Pavía, S., Vazquez Marrufo, G., Equihua Martínez, A., Barrientos PRiego, A. F., . . . Saucedo Carabez, J. R. (2019). Identificación de escarabajos ambrosiales (coleopteros:curculionidae) asociado a árboles de aguacate en michoacan, México. *Folia entomológica Mexicana*, 80-88.
- Arakelian, Eskalen, Eskalen, Kabashima, & Dimson. (Septiembre de 2019). *Aviso público del riesgo y situación actual*. (SADER, Ed.) doi:Pendiente
- Askun, T. (2018). *Introductory Chapter: Fusarium - Pathogenicity, Infections, Diseases, Mycotoxins and Management*. Faculty of Sciences and Arts, Department of Biology. Balikesir: University of Balikesir. doi:http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76507

- Burgos Solorio, A., & Equihua Martínez, A. (31 de diciembre de 2007). Platypodidae y Scolytidae (Coleoptera) de Jalisco, México. *Dugesiana*, 2(14), 59-82. Recuperado el 05 de Julio de 2020, de <https://www.researchgate.net/publication/237283899>
- CABI. (2019). *Euwallacea fornicatus* (tea shot-hole borer). CABI. Recuperado el 05 de julio de 2020, de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/57163#tosummaryOfInvasiveness>
- Castillo Cerón, M. (2018). *Quinto informe mensual Manejo fitosanitario de los ambrosiales*. SENASICA.
- Castrejón Antonio, J., Montesinos Matías, R., Acevedo Reyes, N., Tamez Guerra, P., Ayala Zermeño, M., Berlanga Padilla, A., & Arredondo Bernal, H. (2017). ESPECIES DE XYLEBORUS (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) Asociados a huertos de aguacate en colima, México. (M. Asociados a huertos de aguacate en Colima, Ed.) *Acta Zoológica Mexicana*, 33(1), 146-150. doi:ISSN: 0065-1737
- CONABIO. (Junio de 2016). *SIVICOFF*. Obtenido de http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/MenuPrincipal/07Fichas%20tecnicas_OK/02Fichas%20tecnicas/Fichas%20t%C3%A9cnicas%20CONABIO_especies%20ex%C3%B3ticas/Fichas%20insectos%20ex%C3%B3ticos%20e%20invasores/Euwallacea%20fornicatus.pdf
- DGSV-CNRF. (2014). *Euwallacea sp.- Fusarium euwallaceae Ficha técnica SAGARPA-SENASICA*. México, D.F.: Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.
- Dimson, M., Kabashima, J., & Eskalen, A. (2015). *Escarabajo barrenador polífago + Marchitez (muerte progresiva) por fusariosis*. California: University of California.
- FAO. (2005). *Fao*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a0026s/a0026s02.pdf>

FORDECYT. (2017). *Desarrollo de estrategias de investigación y desarrollo tecnológico acerca de los complejos ambrosiales Xyleborus glabratus/Raffaelea lauricola y Euwallacea sp./Fusarium euwallaceae (plagas invasoras) en los bosques nacionales y en los cultivos agrícolas*. México: CONACYT.

Freeman, S., Sharon, M., Maymon, M., Mendel, Z., Protasov, A., Aoki, T., . . . O'Donnell, K. (2013). *Fusarium euwallaceae* sp. nov. - a symbiotic fungus of *Euwallacea* sp., an invasive ambrosia beetle in Israel and California. *Mycologia*, 1595-1606. doi: 10.3852/13-066

García Avila, C. d., Trujillo Arriaga, F. J., López Buenfil, J. A., González Gómez, R., Carrillo, D., Cruz, L. F., . . . Acevedo Reyes, N. (2016). First report of *Euwallacea nr. fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist*, 99(3). doi:<https://doi.org/10.1653/024.099.0335>

García Enciso, E. L., Robledo Olivo, A., Benavides Mendoza, A., Solís Gaona, S., & González Morales, S. (2018). Efecto de elicitores de origen natural sobre plantas de tomate sometidas a estrés biótico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4212-4221.

González Díaz, G., García Velasco, R., Camacho Cerón, G., & Nieto Ángel, D. (2011). CANCROSIS EN RAMAS DE *Salix bonplandiana* KUNTH CAUSADA POR *Alternaria tenuissima*. En *Can* (págs. 75-86). Texcoco: Redalyc.

González, S. D., Loranca, A. K., Canela, A. A., Lamelas, A., & Ibarra, L. A. (2018). *Los escarabajos escolotinos*. México: Gobierno de México.

Hernández Antonio, A., & M. Hansen, A. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *SciELO*.

James, S. P. (Diciembre de 2007). Studies on certain plant volatiles attracting the shot hole borer, *Euwallacea fornicatus* (Eichhoff) (Scolytidae: Coleoptera) infesting tea. (D. R. Selcasundaram, Ed.) *Bharathiar University*.

Recuperado el 06 de Julio de 2020, de https://www.avocadosource.com/papers/Research_Articles/JamesSachin2007.pdf

Kikot, G. (2012). *Aislamiento e identificación de Fusarium spp. a partir de granos de trigo, Relación entre ocurrencia de la especie y a incidencia de la enfermedad*. Argentina: Universidad de Argentina. Recuperado el 06 de Julio de 2020, de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/18266/l_-_Aislamiento_e_identificaci%C3%B3n_de_Fusarium_spp._a_partir_de_granos_de_trigo.pdf?sequence=6

Kumar, R., Rajkhowa, G., Sankar, M., & Rajan, R. K. (2011). A new host plant for the shoot-hole borer, *Euwallacea fornicatus* (Eichhoff) (Coleoptera: Scolytidae) from India. Assam: Acta Entomologica Sinica.

Kunth. (1817). *Salix bonplandiana*. *Nova Genera et Species Plantarum*, 101.

Luginhuil, S. (2010). *Fusarium solani*. Carolina del norte: NC STATE UNIVERSITY. Obtenido de https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm

Pérez Silva , M., Equihua Martínez , A., Estrada Venegas, E., Muñoz Viveros , A., Valdez Carrasco , J., Sanchez Escudero, J., & Atkinson, T. (Agosto de 2015). Sinopsis de especies mexicanas del género *Xyleborus* Eichhoff, 1894 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Acta Zoológica Mexicana*, 31(2). Recuperado el 05 de Julio de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372015000200011

Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. (2019). *Guía de síntomas y daños del Escarabajo barrenador polífago (Euwallacea sp.)*. SENASICA. Recuperado el 05 de Julio de 2020, de

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/466601/1_GDSyD-CEA_Euwallacea_spV2.pdf

Reséndiz Martínez, J. F., Guzmán Díaz, L., Muñoz Viveros, A. L., Nieto de Pacual Pola, C., & Olvero Coronel, L. P. (20 de Abril de 2015). Enfermedades foliares del arbolado en el Parque Cultural y Recreativo Tezozómoc, Azcapotzalco, D.F. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(30), 106-123. Recuperado el 30 de 10 de 2020

Retana, K., Ramírez Coche, J. A., Castro, O., & Blanco Meneses, M. (27 de Octubre de 2017). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii Asociado a la marchitez del Apio en Costa Rica. *Agronomía costarricense*, 42(1), 115-126. Recuperado el 06 de Julio de 2020

Reverchon, F., & Eskalen, A. (2015). *Coordinación de actividades de investigación y comunicación para combatir la marchitez por Fusarium y el escarabajo polífago barrenador, un complejo ambrosial emergente*. California: SENASICA.

Rodriguez Garcia, C. (ABRIL de 2002). *CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS Salix spp. EN MÉXICO*. Obtenido de UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO: <http://files.departamento-de-productos-forest.webnode.es/200001652-3a8833b810/Rodriguez%20Garcia%20Cristina%202002.pdf>

Seminis. (12 de Junio de 2017). *Seminis*. Obtenido de Bayer Group: <https://www.seminis.mx/blog-que-es-y-como-ataca-el-fusarium/>

SENASICA. (2019). *Complejo escarabajo barrenador polífago Euwallacea sp. - Fusarium euallaceae Ficha Técnica No.62*. Ciudad de México.

Southamer, R., Rugman Jones, P., Thu, P. Q., Eskalen, A., Thibault, T., Hulcr, J., . . . Zong, S. (2017). Tracing the origin of a cryptic invader: phylogeography of the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae:

Scolytinae) species complex. *Agricultural and Forest Entomology*. doi:10.1111/afe.12215

Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista Chilena Infectol*, 31(1), 85-86. Recuperado el 06 de Julio de 2020, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n1/art12.pdf>

Torres Rojo, J. M. (2020). *Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina al año 2020*. Roma: FAO.

Van Diepeningen, A. D., & de Hoog, S. (2016). Challenges in *Fusarium*, a Trans-Kingdom Pathogen. En *Mycopathologia* (Vol. 1, págs. 161-163). Amsterdam, Holanda: Springer. doi:10.1007/s11046-016-9993-7

2. CAPÍTULO

2.1 Establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* de plantas de *Salix sp.* a partir de semillas.

2.1.1 Resumen

El sauce (*Salix bonplandiana*) es una planta vivípara. En condiciones naturales tarda en germinar 12 a 24 horas. El objetivo de este capítulo fue evaluar la germinación y desarrollo de la plántula de *S. bonplandiana* en 2 fases en cultivo *in vitro*.

La primera fase fue la germinación durante 30 días en concentraciones de 0%, 50%, 100%, 150% de medio MS (Murashige & Skoog, 1962) y 0, 1.5% y 3% de sacarosa. La germinación de la semilla se registró en todos los tratamientos a las 24 horas, y el mejor desarrollo de la plántula (longitud de explante, número de hojas y número de raíces) se observó con los medios 150% MS con 1.5% de sacarosa, 100% MS con 3% de sacarosa y 100% MS con 1.5% de sacarosa, al no presentar diferencias significativas entre estos medios es conveniente usar los medios con menor concentración para la propagación *in vitro*.

En la segunda fase en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) se evaluó el desarrollo de las plántulas con diferentes concentraciones de carbón activado y una fitohormona llamada cinetina (cin), durante 60 días se tomaron datos a los 10, 20, 30 y 60 días, los factores que se evaluaron fueron: longitud del explante (LE), número de hojas (NH), número de raíces (NR), número de raíces adventicias (NRA), número de nudos (NN) y número de brotes (NB). Los tratamientos que se emplearon fueron en total 9, con doce repeticiones cada uno, Los tratamientos que se usaron fueron los siguientes: TE1.- MS – 0 g/L CA – 0 mg/L cin; TE2.- MS – 1 g/L CA – 0 mg/L cin - 2; TE3.- MS – 2 g/L CA – 0 mg/L cin; TE4.- MS – 0 g/L CA – 0.5 mg/L cin; TE5.- MS – 1 g/L CA – 0.5 mg/L cin; TE6.- MS – 2 g/L CA – 0.5 mg/L cin; TE7.- MS – 0 g/L CA – 5 mg/L cin; TE8.- MS – 1 g/L CA – 5 mg/L cin; TE9.- MS – 2 g/L CA – 5 mg/L cin. El mejor tratamiento para una micropropagación, de manera económica, rápida y de buen

desarrollo, fue el TE2, donde no se usó cinetina, y solo se usó 1g/L de CA. Sin embargo, no fue significativamente diferente al TE1 en la mayoría de los factores evaluados, que es el control, donde no se usó ni CA, ni cinetina.

Palabras clave: Medio MS, Sauce, sacarosa, germinación, Carbón activado, cinetina.

2.1.2 Introducción

El género *Salix* consiste en alrededor de 300 especies, son árboles y arbustos caducifolios que se encuentran en una amplia gama de hábitats (riberas de ríos, dunas de arena y áreas montañosas). Diversas especies de *Salix* se caracterizan por presentar adaptaciones fisiológicas particulares. Por lo tanto, la importancia económica de la especie está aumentando y emergiendo en una amplia gama de aplicaciones prácticas para restaurar ecosistemas dañados (Ball, Carle , & Del Lungo, 2005). Sin embargo, recientemente se ha detectado una enfermedad vegetal emergente, referida como muerte regresiva por *Fusarium* o “*Fusarium dieback* (FD)” por sus siglas en inglés, la cual se ha detectado en varias plantas en California y Florida. FD es causado por los efectos combinados de un escarabajo (*Scolytinae*) con un complejo ambrosial *Euwallacea fornicatus* y su compañero fúngico simbiótico *Fusarium euwallaceae*. Los escarabajos hembras adultas excavan en un árbol, creando galerías de cría más allá del cambium, que son simultáneamente inoculado con *Fusarium sp.* El hongo coloniza las paredes de la galería y se convierte en la única fuente de alimento para desarrollo de larvas y escarabajos adultos. El hongo invade el tejido vascular del árbol, bloqueando el agua y los nutrientes de las raíces al resto del árbol, eventualmente causando la muerte de las ramas y muerte del árbol (Eskalen, y otros, 2013). Diferentes estudios demuestran que la muerte regresiva causada por *F. Euwallaceae* y su vector *E. fornicatus*, afectan a numerosas familias de árboles, así como especies de cultivos, madera y ornamentales. La globalización y los modernos medios de transporte, han eliminado las barreras naturales que aislaban los complejos ambrosiales, facilitando la introducción de los mismos en nuevas áreas e incrementando el riesgo latente de una nueva asociación del

hongo (*Fusarium euwallaceae*) con un escarabajo nativo que afecte diversas especies de sauce incrementando el riesgo de infestación (Short , y otros, 2017), causando grandes pérdidas de plantas susceptibles al complejo ambrosial como son los árboles de Sauce (*Salix sp*). Por lo anterior es imprescindible generar estrategias que estimulen mecanismos de defensa en plantas de sauce que permitan resistir la enfermedad (Tripathi, Raikhy, & Kumar, 2019).

El *Salix bonplandiana* es un árbol perennifolio, de 6 a 10 m (hasta 15 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 80 cm. Planta originaria de México, ampliamente distribuida desde el suroeste de los Estados Unidos (California, Utah, Arizona), llegando hasta Guatemala a través de casi todo el territorio mexicano (Kunth, 1817).

México cuenta con una superficie estimada con alrededor de 144 millones de hectáreas forestales, equivalente al 74% del territorio nacional. Encontrándose con esto entre los 11 países con mayor superficie forestal, sin embargo; casi 120 millones de hectáreas son severamente explotadas sin un manejo correcto, lo que propicia un gran deterioro, ya que existen diversas actividades que enfrentan los bosques en México, siendo unas de los más amenazantes la minería, la contaminación, la deforestación y la quema de áreas forestales.

La minería abarca 1.5 millones de hectáreas siendo una de las industrias más contaminantes de las áreas vegetales, contaminación de acuíferos (ríos, lagos, pozos, mares) y generación de desechos contaminantes, entre otras. Los productos agrícolas sintéticos, proporcionan contaminación al suelo disminuyendo la biodiversidad genética. En Michoacán se contabiliza 450,000 litros de insecticida, 900,000 toneladas de fungicidas y 30,000 toneladas de fertilizantes en un año, lo que causa contaminación de mantos fríaticos y manantiales de agua.

Solamente del 2001 al 2017 México perdió alrededor de 3.2 millones de hectáreas de bosques, o lo que también se considera un 6% del territorio forestal nacional, lo que significa es una desaparición de flora y fauna autóctona en los bosques nacionales.

El ahuejote (*Salix bonplandiana*) son árboles típicos del paisaje lacustre del sureste de la Ciudad de México. Se distribuye en casi todos los estados del país, en Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.

En la sierra de Quila Jalisco, en los bosques de galería estos sauces son primordiales para mantener la calidad del agua, amortiguar los procesos de sedimentación de los lechos de los ríos, proporcionan protección contra la erosión de los suelos, y proveen de hábitat a la fauna silvestre.

El *Salix bonplandiana* se considera una de las especies forestales que se pueden utilizar para la reforestación, la cual se ha descrito como una planta con potencial para la restauración de zonas degradadas por erosión eólica o hídrica. En algunos estados del país (Ciudad de México y Durango) se ha utilizado con éxito para estos fines. También, se utiliza comúnmente en zonas de cultivo agrícolas como árbol para formar una barrera natural contra el viento. Otra característica de remarcar es su capacidad de tener una tolerancia a sales en el suelo (halófila facultativa) y puede habitar en sitios con baja disponibilidad de nutrientes.

La utilización de las herramientas biotecnológicas como la micropropagación y sus ventajas como el brindarle condiciones óptimas para la propagación de plantas de sauce (*Salix bonplandiana*) permite aumentar la producción de plantas de interés, libres de patógenos, reduciendo el tiempo de propagación y pueda reproducirse con fines de uso ambiental.

La propagación convencional de plantas de *Salix* se puede dificultar debido a que las semillas presentan un período de viabilidad corto y la producción de estacas puede verse afectada por un crecimiento reducido y una latencia estacional (Pierik R.). Por lo que es importante generar estrategias biotecnológicas que acorten los períodos de propagación de plantas de *Salix* como es la micropropagación *in vitro*.

La propagación sexual se logra por medio de semillas, por siembra directa: Los estudios revelan que cerca del 90 % sobrevive con métodos de siembra directa y por regeneración natural (Kunth C. S., 1815).

El cultivo *in vitro* o micropropagación se presenta como una excelente alternativa para superar las dificultades antes mencionadas de los métodos tradicionales, ya que por medio de esta técnica es posible germinar y reproducir clones con alto valor genético y conseguir plantas de alta calidad que pueden llegar incluso a triplicar la velocidad de su multiplicación (Uribe Moraga & Cifuentes G., 2003). En algunos estudios anteriores el uso del medio MS para la propagación de plantas de sauces en cultivo *in vitro* presenta una buena respuesta en la generación de yemas axilares de sauce (Neyra Velasco, 2015), además, se ha observado que el aumento en la concentración de sacarosa (mayor a 3% de sacarosa) no favorece el enraizamiento, ni la formación del número de raíces (Paz da Silva & Vilegas Monter, 2009), por lo anterior en este estudio se empleó una concentración máxima de 3% de sacarosa. El propósito de este estudio fue evaluar bajo condiciones *in vitro*, la germinación de semillas y su desarrollo vegetativo en diferentes concentraciones de medio MS, en combinación con distintas concentraciones de sacarosa (0% (p/v), 1.5% (p/v) y 3% (p/v)) en el medio de cultivo (Gómez Garay, Pintos López , Grau Corbi, & Bueno Pérez, 2014).

La segunda fase tuvo como objetivo producir un protocolo en el desarrollo de micropropagación *in vitro* de *Salix bonpladiana*, donde se quería obtener un medio de cultivo económico que nos brindara un rápido desarrollo, tanto radicular, como foliar, usando medio MS (Murashige & Skoog, 1962) y adhiriendo a esto distintas concentraciones de carbón activado y de la fitohormona cinetina.

2.1.2.1 Germinación de semilla en medio MS

En un estudio con semillas de *Salix variegata* se reportó que la viabilidad de las semillas tiene una duración de 10 días después de salir de la cápsula. También, se ha reportado que en las primeras 24 horas se puede tener hasta el 95% de germinación en sustrato (Fang Qing, Chuan Hua, & Guo Mei, 2013).

2.1.2.2 Importancia del sauce

Desde el punto de vista medicinal los sauces tienen valiosas propiedades medicinales. La corteza y hojas de estos árboles han sido empleadas desde hace siglos por pueblos en varias partes del mundo para aliviar la fiebre y dolencias tales como el reumatismo. En el siglo XIX se aisló por primera vez el extracto activo medicinal de la corteza de sauce, la salicina (nombre que deriva de salix, el nombre en latín de los sauces). De esta sustancia se deriva el ácido salicílico, muy importante en la industria química y en la medicina, pues a partir de él fue creada una variante, el ácido acetilsalicílico, que no es otra cosa que la mundialmente conocida aspirina (Álvarez Sierra, Protocolo de Uso y Aprovechamiento del Sauce en la Actividad Artesanal, 2015).

Los sauces, miembros de la familia Salicaceae dan madera, fibra, biocombustible y otros productos forestales y desempeñan un papel positivo en la rehabilitación de tierras degradadas, la restauración de paisajes forestales, la mitigación del cambio climático y el sustento de las poblaciones en las regiones templadas y boreales del mundo. Chile, Argentina y otros países de América Latina en 2004 orientaron a promover la contribución de sauces al desarrollo forestal y rural sostenible, en particular en los países en desarrollo y los de economías en transición, donde se mencionó lo poco que se conocía de la extensión real de los ecosistemas de sauces en la Federación de Rusia, que tiene una de las mayores superficies del mundo de bosques naturales de Salicaceae. En Suecia se presentan nuevos usos para los sauces, dentro de estos está la producción de energía y fitorremediación, es decir la limpieza de suelos contaminados, como también la restauración de parajes degradados utilizando en gran escala agua residuales para regar y fertilizar los bosques de sauces. Los bosques de sauces absorben los contaminantes y el exceso de nutrientes del suelo (FAO, 2005).

Los usos del sauce van desde el punto de vista ecológico, medicinal, artesanal y otros servicios. A nivel ecológico los efectos restauradores permiten la conservación del suelo y el control de la erosión. Se ha utilizado en áreas sujetas

a degradación por erosión eólica o hídrica. Las especies del género *Salix* modifican el sustrato y ayudan al establecimiento de otras especies arbóreas. Este enriquecimiento forestal natural permite ser nicho ecológico de aves, roedores e insectos (Álvarez Sierra, Protocolo de Uso y Aprovechamiento del Sauce en la Actividad Artesanal, 2015).

Esta especie es característica de los litorales donde forma a menudo masas puras en las zonas intermareales de lagunas costeras y esteros con influencia de agua salada. Crece en ambientes de continuo movimiento de agua y salinidad variable (hipersalino a salobre). Su mejor desarrollo es en litorales someros, con poca pendiente donde la marea entra con mayor facilidad. Se desarrolla en los sitios protegidos contra la acción del oleaje fuerte. Los manglares más productivos se desarrollan en estuarios con lodo fino, compuesto de cieno, arcilla y alto porcentaje de materia orgánica. Los suelos en los manglares de *Rhizophora* contienen generalmente mayores porcentajes de materia orgánica comparado con los suelos de *Avicennia* reportándose cantidades promedios de 49.26 ± 8 ppm. Suelos: sustrato lodoso, turba, negro-arenoso muy húmedo, negro-arcilloso, café claro, areno-arcilloso, zona pantanosa o inundada y roca coralina. Con un pH de 6.6 cuando está saturado de agua y de 2.2 a 3 al secarse. La especificidad de su hábitat hace a los manglares muy sensibles a la perturbación (Kunth, 1817).

2.1.2.3 Fitohormonas

La mayoría, si no la totalidad de la actividad fisiológica de las plantas está regulada por un conjunto de sustancias químicas llamadas hormonas. La presencia de hormonas reguladores del crecimiento en las plantas fue sugerida por primera vez por Julios Von Sachs en la segunda mitad del siglo XIX, cuando indicó que debían existir en las plantas “sustancias formadoras de órganos” que debían ser producidas en las hojas y transportadas hacia abajo al resto de la planta.

Las sustancias de crecimiento son extraídas de los tejidos vegetales y las sustancias sintéticas con efectos reguladores no pueden ser llamadas

hormonas; por lo tanto, debe utilizarse el término “regulador del crecimiento vegetal o fitorreguladores”. Por lo tanto, los define como sustancias mensajeras activas a muy bajas concentraciones (en su mayoría); siendo los lugares de síntesis y de acción y en algunos casos activos en el mismo lugar de su formulación (Rojas Sánchez, 2010).

En la actualidad se han logrado identificar cinco grupos de reguladores de crecimiento, tanto naturales como sintéticos, de acuerdo a las diferencias en sus estructuras y efectos: 1) auxinas, 2) giberelinas, 3) citocininas, 4) etileno, y 5) inhibidores. Siendo las tres primeras llamadas hormonas estimuladoras y las dos restantes hormonas inhibidoras. Así los procesos de elongación celular (auxinas y giberelinas), división celular (giberelinas y citocininas) y desarrollo vegetativo se caracterizan por un predominio de estimuladores, y los procesos de maduración, detención del crecimiento, senescencia y abscisión, por una preponderancia de inhibidores del crecimiento (Franco León, 2015).

2.1.2.4 Citocininas

No se conoce bien la acción fundamental de la citocinina; se supone que se adhiere al RNA de transferencia y, en determinados sitios, provoca el funcionamiento de ciertos codones, controlando así la síntesis de algunas proteínas o enzimas. Otros autores postulan que tiene efecto sobre la síntesis de DNA, y que está comprobado que induce actividad de las amilasas y proteasas y la síntesis de la tiamina y auxinas.

Los efectos típicos fundamentales de la citocinina en la fisiología vegetal son dos:

1. Producir una mayor actividad en ritmo de la mitosis celular.
2. Retardar el envejecimiento o senescencia de los órganos.

Estos efectos fundamentales determinan otros como son: indicio de iniciación del crecimiento en los tallos muchas especies; en efecto inhibitorio sobre el fenómeno de dominancia apical.

Otros efectos generales de las citocininas en plantas incluyen:

- Estimulación de la germinación de semillas
- Estimulación de la formación de frutas sin semilla
- Ruptura del letargo de semillas
- Inducción de la formación de brotes
- Mejora de la floración
- Alteración en el crecimiento de frutos
- Ruptura de la dominancia apical (Rojas Sánchez, 2010).

2.1.2.5 Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos es una herramienta que sirve para propagar diferentes especies vegetales incluido al sauce, y además esta técnica basa su accionar en el uso de un medio de cultivo específico suplementado con componentes tales como: sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento apropiados para hacer que una célula totipotente pueda diferenciarse para obtener una planta completa libre de gérmenes. Los estudios encontrados de la multiplicación del sauce, están dirigidos casi exclusivamente a la multiplicación de forma asexual por método de esqueje, algo que limita su aplicación al proceso de multiplicación masiva y de conservación (López Vera, Solórzano Murillo, Pomagualli, López Vera, & Vergara Vélez, 2016).

Por su alta presencia en México, su importancia en la medicina y la falta de estudios de germinación de plantas de la familia Salicaceae y el consecuente ataque de hongos, uno de gran importancia antes mencionado, en el sistema ambrosial entre *F. euwallaceae* y *Euwallacea fornicatus*, este estudio se realizó ante la falta de experimentos en su germinación y de estudios que demuestren la diferencia entre el nulo agregado de sacarosa, carbón activado, medio MS y cinetina y el uso “recomendado por otros autores”, hasta el exceso de ellos y la

reacción de la planta ante estas variantes en el medio de cultivo. Con este trabajo se buscó obtener una relación de efecto en la ausencia-presencia de sacarosa, medio MS, carbón activado y cinetina.

2.1.3 Materiales y métodos

2.1.3.1 Establecimiento de semillas de *Salix* en medio MS

Se recolectaron frutos del sauce (*S. bonplandiana*) en noviembre del 2019 en Zapopan en el Estado de Jalisco, México (coordenadas DMS 20° 41' 55.69" N 103° 28' 36.72" O) (Figura 2.1A) y se seleccionaron las cápsulas con una coloración verde y amarilla, que contienen las semillas viables, mientras que las cápsulas con una coloración café y negra fueron eliminadas, semillas no viables, (Figura 2.1B). Se extrajeron entre cinco a seis semillas de cada cápsula en condiciones asépticas eliminando el apéndice plumoso (Figura 2.1C). Las semillas se colocaron en una solución de cloro comercial al 1% (v/v) durante 15 min, posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas fueron transferidas al medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) con variaciones en las concentraciones de sales (macroelementos y microelementos). El medio fue adicionado con 8 g/L de agar sin reguladores de crecimiento. El medio fue ajustado a un pH de 5.8 con NaOH, después se esterilizó en autoclave durante 15 min. a una temperatura de 121°C. Se evaluó el desarrollo de las plántulas germinadas a partir de semillas cigóticas establecidas en los diferentes tratamientos de medio de cultivo (Figura 2.1D).

2.1.3.2 Evaluación del efecto de sales y carbohidratos en la germinación de semillas y desarrollo de vitroplantas de *Salix*

Para evaluar el efecto de las sales (macronutrientes y micronutrientes) y vitaminas del medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962), se emplearon diferentes concentraciones del medio MS con 0, 50, 100 y 150% (v/v), en el testigo se colocó agua destilada 0 % (v/v) MS. También se evaluó el efecto de la concentración de carbohidratos (sacarosa) en la germinación y el desarrollo de plántulas a partir de semillas. Se diseñó un experimento con los siguientes

tratamientos: TG1. Control (0 % (v/v) MS sales y 0 % (p/v) de sacarosa), TG2. 0 % (v/v) MS sales y 1.5 % (p/v) de sacarosa, TG3. 0 % (v/v) MS sales y 3 % (p/v) de sacarosa, TG4. 50 % (v/v) MS sales y 0 % (p/v) de sacarosa, TG5. 50 % (v/v) MS sales y 1.5 % (p/v) de sacarosa, TG6. 50 % (v/v) MS sales y 3 % (p/v) de sacarosa, TG7. 100 % (v/v) MS sales y 0 % (p/v) de sacarosa, TG8. 100 % (v/v) MS sales y 1.5 % (p/v) de sacarosa, TG9. 100 % (v/v) MS sales y 3 % (p/v) de sacarosa, TG10. 150 % (v/v) MS sales y 0 % (p/v) de sacarosa, TG11. 150 % (v/v) MS sales y 1.5 % (p/v) de sacarosa, TG12. 150 % (v/v) MS sales y 3 % (p/v) de sacarosa. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16h luz (blanca) /8h oscuridad. Se evaluó el porcentaje de germinación a las 24 horas de establecido el cultivo y los parámetros de desarrollo de la plántula se evaluaron cada 10 días. Los parámetros de desarrollo de la planta incluyeron: longitud del explante (LE), número de hojas (NH), número de raíces (NR) y longitud de raíces (LR). Este último parámetro se consideró una escala del 1 al 3, en el que se les asignó el valor como se explica a continuación:

1. Raíces con longitud de 1 a 5mm.
2. Raíces con longitud de 6mm a 1.5cm
3. Raíces con longitud de 1.6 cm a 3 cm.

2.1.3.3 Evaluación del efecto de carbón activado (CA) y cinetina en el desarrollo de vitroplantas de Salix

Para evaluar el efecto del CA y la cinetina en el medio de cultivo se emplearon diferentes concentraciones de estos en medio MS completo (100% v/v) (Murashige & Skoog, 1962), en el caso del CA se usaron concentraciones de 0, 1 y 2 g/L. También se evaluó el efecto de la concentración de cinetina con 0, 0.5 y 5 mg/L en el desarrollo de plántulas a partir de micropropagación. Se diseñó un experimento con los siguientes tratamientos: TE1. Control (0 g/L de CA y 0 mg/L de cinetina), TE2. 1 g/L de CA y 0 mg/L de cinetina, TE3. 2 g/L de CA y 0 mg/L de cinetina, TE4. 0 g/L de CA y 0.5 mg/L de cinetina, TE5. 1 g/L de CA y 0.5 mg/L de cinetina, TE6. 2 g/L de CA y 0.5 mg/L de cinetina, TE7. 0 g/L

de CA y 5 mg/L de cinetina, TE8. 1 g/L de CA y 5 mg/L de cinetina, TE9. 2 g/L de CA y 5 mg/L de cinetina. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 ° C con un fotoperiodo de 16h luz (blanca) /8h oscuridad. Los parámetros de desarrollo de la plántula se evaluaron a los 10, 20, 30 y 60 días después de haber sido trasplantados a su medio correspondiente. Los parámetros de desarrollo de la planta incluyeron: longitud del explante (LE), número de hojas (NH), número de raíces (NR), número de raíces adventicias (NRA), número de nudos (NN) y número de brotes (NB).

2.1.3.4 Diseño experimental y análisis de datos

Para la germinación y desarrollo se empleó un diseño experimental completamente al azar los datos presentados corresponden a tres repeticiones con 4 semillas por tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Para la micropropagación *in vitro* se empleó un diseño experimental completamente al azar, los datos presentados corresponden a cuatro repeticiones con 3 explantes por tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

2.1.4 Resultados y discusión

2.1.4.1 Germinación de semilla en medio MS

Durante la recolección de los frutos se seleccionaron las cápsulas con una coloración verde y amarilla, las cuales contienen las semillas que ya alcanzaron la maduración del embrión cigótico y en el que la mayoría de ellas son semillas viables, mientras que las cápsulas con una coloración café y negra fueron eliminadas, semillas no viables, (Figura 2.1B). Se extrajeron entre cinco a seis semillas de cada cápsula en condiciones asépticas eliminando el apéndice plumoso (Figura 2.1C) y se realizó el procedimiento de desinfección descrito en la metodología para el establecimiento de la semilla en condiciones *in vitro* (en medio de cultivo semisólido) (Figura 2.1D).

En cuanto al porcentaje de germinación en semillas de *S. bonplandiana*, se presentó una germinación del 100 % en todas las semillas establecidas en cultivo *in vitro* a las 24 h, lo que indica que la variación de la concentración de medio MS y la variación en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo no influye en la germinación de las semillas de *S. bonplandiana* comparado con un estudio en el que se hizo con semillas de *Salix variegata* donde se reportó que la viabilidad de las semillas tienen una duración de 10 días después de salir de la cápsula, por otro lado se ha reportado que en las primeras 24 h se puede tener hasta el 95% de germinación en sustrato (Fang Qing, Chuan Hua, & Guo Mei, 2013).

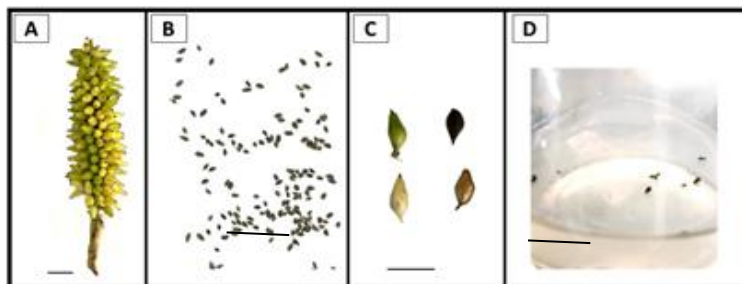


Figura 2.1.- Establecimiento de semillas cigóticas de plantas de *S. bonplandiana* en cultivo *in vitro*.

A: Frutos; B y C: Semillas; D: Semillas establecidas en medio de cultivo *in vitro*. Barra = 0.5 cm.

2.1.4.2 Desarrollo de plántulas a partir de semillas en medio MS

El desarrollo de plántulas en cada tratamiento comenzó a observarse a los 10 días de cultivo *in vitro* (Cuadro 2.1). Los tratamientos TG8, TG9 y TG11 presentan los más altos parámetros de desarrollo evaluados, en el caso de la longitud del explante (LE) se obtuvieron valores entre 0.52 a 0.63 cm, en el caso del número de hojas (NH) se presentaron valores entre 1 a 1.83 en estos tratamientos y también se observó el efecto en el sistema radicular, tanto en el número de raíz (NR), como en la longitud de la raíz (LR).

Cuadro 2.1.- Evaluación de parámetros de desarrollo de plántulas de *S. bonplandiana* en el día 10 de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	LE [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NR ^{o*}	LR ^{o*}
TG1	0.33±0.03 ^{de}	0.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^b	1.00±0.00 ^d
TG2	0.30±0.02 ^e	0.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^b	1.41±0.15 ^{cd}
TG3	0.39±0.04 ^{cde}	0.00±0.00 ^c	1.00±0.00 ^b	2.00±0.00 ^{ab}
TG4	0.46±0.06 ^{bcdde}	0.00±0.00 ^c	0.33±0.14 ^c	0.33±0.14 ^e
TG5	0.53±0.03 ^{abc}	0.50±0.26 ^{bc}	1.17±0.11 ^{ab}	1.67±0.14 ^{abc}
TG6	0.65±0.03 ^a	0.50±0.26 ^{bc}	1.75±0.22 ^a	1.67±0.14 ^{abc}
TG7	0.51±0.05 ^{abc}	0.67±0.28 ^{bc}	1.08±0.08 ^b	1.17±0.11 ^{cd}
TG8	0.63±0.04 ^{ab}	1.00±0.30 ^{ab}	1.42±0.26 ^{ab}	1.58±0.15 ^{bc}
TG9	0.52±0.04 ^{abc}	1.67±0.22 ^a	1.50±0.23 ^{ab}	1.25±0.13 ^{cd}
TG10	0.40±0.04 ^{cde}	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^e
TG11	0.54±0.04 ^{abc}	1.83±0.167 ^a	1.58±0.15 ^{ab}	2.17±0.11 ^a
TG12	0.50±0.02 ^{abcd}	1.33±0.28 ^{ab}	1.08±0.08 ^b	2.08±0.08 ^{ab}

^oLE.- Longitud de explante, NH.- número de hoja, NR.- número de raíz, LR.- longitud de raíz

*En el cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre columnas denotan diferencia significativa (P<0.05)

A los 20 días de cultivo los tratamientos que muestran mayor valor en los parámetros de LE, NH y NR fueron TG7, TG8 y TG11 presentando una longitud del explante (LE) de 0.9, 1.02 y 0.89 cm respectivamente, (Cuadro 2.2). Con respecto al número de hojas los valores se encuentran entre 2.5 y 3.75, estos tratamientos también generaron el sistema radicular. En controversia con este estudio los explantes de *Berberidosis corallina* cultivados en medio MS presentan necrosis en el tejido debido al alto contenido de nitrógeno en el medio de cultivo (Uribe, Delaveau, Garcés, & Escobar, 2008). Mientras que en *Salix bonplandiana* se puede observar que los medios de cultivo MS con 150 %, 100

% y 50 % (v/v) tienen un efecto positivo en la disponibilidad de nutrientes y la influencia de la fisiología de la planta que se ve marcada en la respuesta *in vitro*, (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2.- Evaluación de parámetros de desarrollo de plántulas de *Salix* a los 20 días de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	LE [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NR ^{o*}	LR ^{o*}
TG1	0.36±0.03 ^d	0.00±0.00 ^e	1.58±0.23abc	1.67±0.14 ^{de}
TG2	0.40±0.04 ^d	0.00±0.00 ^e	2.33±0.19abc	2.67±0.14 ^{ab}
TG3	0.49±0.05 ^{cd}	0.00±0.00 ^e	3.08±0.38a	3.00±0.00 ^a
TG4	0.55±0.08 ^{cd}	0.00±0.00 ^e	1.08±0.08bc	1.17±0.11 ^{ef}
TG5	0.71±0.04 ^{bc}	1.16±0.30 ^{de}	2.75±0.86ab	2.17±0.24 ^{bcd}
TG6	0.85±0.03 ^{ab}	1.33±0.28 ^{cd}	2.92±0.29a	2.67±0.14 ^{ab}
TG7	0.90±0.04 ^{ab}	2.50±0.38 ^{abc}	1.83±0.21abc	1.92±0.23 ^{cd}
TG8	1.02±0.05 ^a	3.00±0.35 ^{ab}	2.75±0.31ab	2.67±0.14 ^{ab}
TG9	0.90±0.08 ^{ab}	1.92±0.48 ^{bcd}	2.67±0.40ab	2.67±0.14 ^{ab}
TG10	0.49±0.04 ^{cd}	1.00±0.30 ^{de}	0.75±0.18c	0.67±0.14 ^f
TG11	0.89±0.06 ^{ab}	3.75±0.25 ^a	2.67±0.26ab	2.92±0.08 ^a
TG12	0.70±0.05 ^{bc}	3.00±0.30 ^{ab}	2.25±0.28abc	2.50±0.15 ^{abc}

^oLE.- Longitud de explante, NH.- número de hoja, NR.- número de raíz, LR.- longitud de raíz

*En el cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre columnas denotan diferencia significativa (P<0.05)

2.1.4.3 Altura de las plantas a los 30 días

A los 30 días de cultivo *in vitro* los explantes con mayor altura se observaron en TG11 con una concentración de medio MS al 150 % (v/v) y 1.5 % (p/v) de sacarosa, presentando una altura de 13.1 cm, al igual que los tratamientos TG8, TG9 con 12.4 y 11.5 cm respectivamente, así como en TG7 y TG12 con 11.4 cm (Cuadro 2.3). La longitud de los explantes fue menor en los tratamientos con una concentración de 0% (v/v) de medio MS (TG1, TG2, TG3), así como en los tratamientos TG4 y TG10 donde no se tenía sacarosa en el medio de cultivo. Los tratamientos TG6 y TG9 con 50 % y 100 % de medio MS respectivamente no presentan diferencia significativa en la altura de los explantes, resultados similares se obtuvieron en estudios efectuados en *Catleya*, donde utilizaron medio MS al 25, 50 y 100 % (v/v) para la germinación y desarrollo de plántulas de *catleya*, en la que no se presentó diferencia significativa en la altura de los explantes (Andrade Rodriguez, y otros, 2015). Sin embargo, en este estudio la disminución de sacarosa en los tratamientos con 50% de medio MS como son

TG4 y TG5, con una reducción en la concentración de sacarosa de 1.5 % y 0% respectivamente afecta negativamente en la longitud del explante (6.8 y 8.5 cm) presentando diferencias significativas con los tratamientos con 100 % (v/v) de medio MS (TG7, TG8 y TG9) (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3.- Evaluación de parámetros de desarrollo de plántulas en el día 30 de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	LE [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NR ^{o*}	LR ^{o*}
TG1	4.1±0.32d	0.00±0.00d	2.50±0.50abcde	1.67±0.14cd
TG2	4.9±0.42d	0.17±0.17cd	2.92±0.2abcd	2.67±0.14ab
TG3	6.0±0.51cd	0.00±0.00d	4.25±0.37a	3.00±0.00a
TG4	6.8±1.08cd	0.00±0.00d	1.67±0.22cde	1.33±0.14d
TG5	8.5±0.57bc	1.50±0.42bc	2.33±0.35bcde	2.33±0.26abc
TG6	11.1±0.42ab	2.17±0.27b	3.25±0.43abcd	2.83±0.11ab
TG7	11.4±1.02ab	3.75±0.30a	2.67±0.35abcd	2.25±0.22bc
TG8	12.4±0.43a	4.08±0.42a	3.00±0.35abcd	2.92±0.08ab
TG9	11.5±1.19ab	4.42±0.34a	3.83±0.49ab	2.67±0.14ab
TG10	7.4±0.56cd	2.25±0.30b	0.83±0.17e	1.00±0.21d
TG11	13.1±0.42a	4.75±0.33a	1.58±0.26de	3.00±0.00a
TG12	11.4±0.97ab	4.58±0.40a	3.42±0.53abc	2.58±0.15ab

^oLE.- Longitud de explante, NH.- número de hoja, NR.- número d raíz, LR.- longitud de raíz

*En el Cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre columnas denotan diferencia significativa (P<0.05)

2.1.4.4 Longitud de raíz a los 30 días

Los nutrientes y la sacarosa fueron factores importantes para la longitud de la raíz (Cuadro 2.3); mientras que este parámetro no se vio influenciado por las distintas concentraciones de medio MS, a comparación de otro estudio (Rytter, Weih, & Nordh, 2005), donde demostraron que la biomasa de raíces de 6 variedades de sauce disminuyó con la adición de fertilizante. Sin embargo, el factor que influyó negativamente en la longitud de la raíz fue la ausencia de sacarosa en el medio, como se puede observar en los tratamientos TG1, TG4, TG7 y TG10 (Cuadro 2.3), los cuales presentaron los menores valores en la longitud de raíz, mientras que todos los tratamientos que contienen 1.5% y 3% de sacarosa presentaron los mayores valores en la longitud de raíz, independientemente de la concentración de medio MS empleada. Se puede observar este mismo efecto en plántulas de papaya (Posada Pérez , y otros,

2016) en el que usaron diferentes concentraciones de sacarosa y la longitud de raíz se vio afectada al no usar sacarosa.

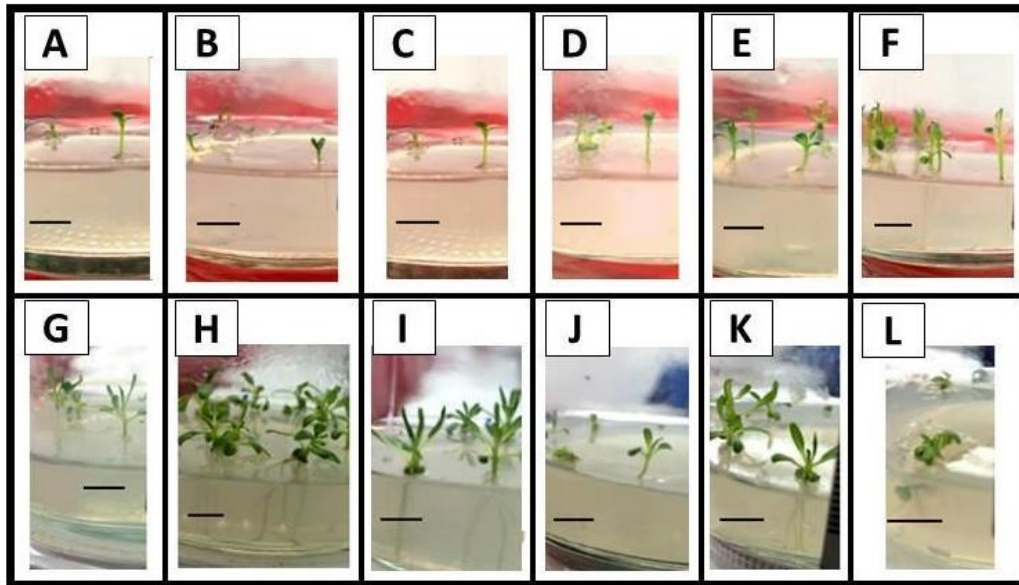


Figura 2.2.- Desarrollo de plántulas de *Salix* a los 30 días de cultivo *in vitro*.

A. TG1.- 0 % (v/v) MS – 0 % sacarosa; B. TG2.- 0 % (v/v) MS - 1.5 % (p/v) sacarosa; C. TG3.- 0 % (v/v) MS – 3 % (p/v) sacarosa; D. TG4.- 50 % (v/v) MS – 0 % (p/v) sacarosa; E. TG5.- 50 % (v/v) MS - 1,5 % (p/v) sacarosa; F. TG6.- 50 % (v/v) MS – 3 % (p/v) sacarosa; G. TG7.- 100 % (v/v) MS – 0 % (p/v) sacarosa; H. TG8.- 100 % (v/v) MS - 1.5 % (p/v) sacarosa; I. TG9.- 100 % (v/v) MS – 3 % (p/v) sacarosa; J. TG10.- 150 % (v/v) MS – 0 % (p/v) sacarosa; K. TG11.- 150 % (v/v) MS - 1.5 % (p/v) sacarosa; L. TG12.- 150 % (v/v) MS – 3 % (p/v) sacarosa. La escala de las barras corresponde a 0.5 mm.

La generación de hojas es un parámetro importante para el desarrollo de la planta, indicando que se está adquiriendo y asimilando de manera correcta los nutrientes, vitaminas y sacarosa. Entre más sea el número de hojas en la planta, más ayudan a su desarrollo; aquellas plantas que tengan más hojas, serán plantas más estables y vigorosas. El incremento en el número de hojas se observa en los tratamientos del TG5 a TG12 (Cuadro 2.3). El promedio máximo que se obtuvo en el número de hojas fue de 4.75 en el TG11, seguido de 4.58 en el TG12, 4.42 en el TG9, 4.08 TG8 y 3.75 TG7 en donde éstos no tuvieron diferencia significativa. En general se puede observar el desarrollo de las plántulas en el día 30 de cultivo en los diferentes tratamientos, observándose

que los tratamientos TG7, TG8, TG9, TG11 y TG12 presentan el mejor desarrollo de la plántula a partir de semilla (Figura 2.2 G-I). En el caso del tratamiento TG7 a TG9 el medio MS se emplea a la concentración normal sugerida por (Murashige & Skoog, 1962), (Figura 2.2 K-L) mientras que en el tratamiento TG11 y TG12 se emplea una concentración de 150 % (v/v) de medio MS. Sin embargo, el empleo de concentraciones de 0 y 50 % (v/v) de medio MS (TG1 a TG6) aunque no afectan el porcentaje de germinación de las semillas, el desarrollo de las plántulas es muy lento (Figura 2.2A-F).

2.1.4.5 Crecimiento de esquejes por medio de micropropagación

A los 10 días realizada la micropropagación los tratamientos con mayor concentración de cinetina (5mg/L); (tratamientos TE7, TE8 y TE9) fueron los que presentaron mejores valores en los parámetros de longitud del explante (LE), número de raíces adventicias (NRA) y número de brotes (NB), aunque no tuvieron diferencia significativa (Cuadro 2.4), resultado similar al trabajo de (Martínez Medina, y otros, 2012), donde la cinetina fue usada durante la fase de multiplicación de los brotes.

El uso de la cinetina en todas las evaluaciones se alcanzó a observar claramente cuando hubo presencia de ella y en donde no. En las primeras tres evaluaciones se observó que mientras más aumentaba el uso de las cinetinas, disminuía el desarrollo del sistema radicular, caso contrario al trabajo desarrollado en café, donde la aplicación de cinetina provocó un mayor desarrollo del sistema radical en las plántulas (Cantos Cevallos, Pinargote Choéz, & Palma Ponce, 2018).

Las citocininas se usan para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos (Yah Chulim, 2011), por lo que el uso de auxinas para la estimulación de brotes radiculares, es necesario para un balance de hormonas, lo que se observó en TE7, que no mostró ninguna raíz. El uso de cinetina, sin alguna auxina, evitó que las plántulas, inclusive a los 60 días, generaran raíces (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4.- Evaluación de parámetros de desarrollo en plántulas de *Salix* a partir de esquejes en condiciones *in vitro*.

Condiciones <i>in vitro</i> (10 días)						
T	LE [cm]^{o*}	NH^{o*}	NR^{o*}	NRA^{o*}	NN^{o*}	NB^{o*}
TE1	1.40±0.41 ^{cd}	0.92±1.38 ^{bc}	1.83±1.53 ^a	0.17±0.40 ^a	4.08±0.29 ^b	3.08±1.44 ^a
TE2	1.38±0.28 ^{cd}	0.92±1.08 ^{bc}		0.08±0.29 ^a	4.08±0.29 ^b	3.08±1.31 ^a
TE3	1.43±0.35 ^{cd}	0.83±1.19 ^{bc}		0.08±0.29 ^a	4.00±0.00 ^b	2.58±1.16 ^{ab}
TE4	1.15±0.29 ^d	2.00±1.54 ^a	0.08±0.29 ^b	0.00±0.00 ^a	4.08±0.29 ^b	3.08±0.99 ^a
TE5	1.43±0.64 ^{cd}	0.25±0.62 ^c		0.08±0.29 ^a	4.08±0.29 ^b	2.25±1.81 ^{ab}
TE6	1.34±0.42 ^d	1.33±1.37 ^{ab}		0.17±0.58 ^a	4.00±0.00 ^b	2.58±0.79 ^{ab}
TE7	1.88±0.54 ^{ab}	1.00±1.04 ^{bc}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^a	4.08±0.29 ^b	3.08±0.79 ^a
TE8	1.74±0.46 ^{abc}	0.50±0.80 ^{bc}		0.00±0.00 ^a	4.00±0.00 ^b	2.08±0.90 ^b
TE9	2.15±0.56 ^a	0.92±0.90 ^{bc}		0.25±0.45 ^a	4.33±0.49 ^a	2.67±0.77 ^{ab}
Condiciones <i>in vitro</i> (20 días)						
T	LE [cm]^{o*}	NH^{o*}	NR^{o*}	NRA^{o*}	NN	NB
TE1	1.44±0.41 ^{de}	3.00±3.10 ^{bc}	3.83±2.038 ^a	0.17±0.40 ^a	4.25±0.62 ^{ab}	3.33±1.44 ^{ab}
TE2	1.49±0.30 ^{cde}	2.83±1.53 ^{bc}		0.08±0.29 ^a	4.25±0.87 ^{ab}	4.25±1.49 ^a
TE3	1.68±0.26 ^{bcd}	2.83±1.90 ^{bc}		0.08±0.29 ^a	4.08±0.29 ^{ab}	3.58±1.17 ^{ab}
TE4	1.25±0.29 ^e	6.83±4.28 ^a	0.17±0.39 ^b	0.08±0.29 ^a	4.17±0.39 ^{ab}	3.42±0.90 ^{ab}
TE5	1.68±0.61 ^{bcd}	2.83±2.62 ^{bc}		0.08±0.29 ^a	4.08±0.29 ^{ab}	3.50±1.83 ^{ab}
TE6	1.47±0.40 ^{cde}	4.00±1.71 ^{bc}		0.17±0.58 ^a	4.00±0.00 ^b	2.92±0.67 ^b
TE7	1.93±0.50 ^{ab}	4.33±3.20 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^a	4.08±0.29 ^{ab}	3.33±0.65 ^{ab}
TE8	1.82±0.53 ^{bc}	2.00±1.41 ^c		0.00±0.00 ^a	4.41±0.79 ^a	3.67±1.07 ^{ab}
TE9	2.22±0.60 ^a	2.17±1.64 ^c		0.25±0.45 ^a	4.25±0.45 ^{ab}	3.42±1.00 ^{ab}
Condiciones <i>in vitro</i> (30 días)						
T	LE [cm]^{o*}	NH^{o*}	NR^{o*}	NRA^{o*}	NN	NB
TE1	1.59±0.36 ^{cd}	4.75±4.81 ^{cd}	7.67±3.75 ^a	0.17±0.39 ^{ab}	4.50±0.91 ^b	4.58±2.35 ^{ab}
TE2	1.69±0.45 ^{bcd}	5.83±1.85 ^{bcd}		0.33±0.65 ^a	5.83±1.70 ^a	6.00±2.29 ^a
TE3	1.78±0.25 ^{bc}	3.92±2.78 ^d		0.08±0.29 ^{ab}	5.17±1.90 ^{ab}	5.08±1.83 ^{ab}
TE4	1.38±0.28 ^d	9.83±5.13 ^a	0.17±0.40 ^b	0.08±0.29 ^{ab}	4.58±1.24 ^b	4.17±1.70 ^b
TE5	1.97±0.54 ^{ab}	4.42±2.68 ^{cd}		0.25±0.45 ^{ab}	4.33±0.49 ^b	4.33±1.72 ^b
TE6	1.65±0.44 ^{bcd}	8.00±2.26 ^{ab}		0.17±0.58 ^{ab}	4.67±1.07 ^b	4.00±1.13 ^b
TE7	2.02±0.54 ^{ab}	6.92±2.91 ^{bc}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	4.25±0.87 ^b	3.67±0.65 ^b
TE8	1.96±0.50 ^{ab}	3.92±1.98 ^d		0.00±0.00 ^b	4.75±1.05 ^b	4.50±1.51 ^b
TE9	2.29±0.69 ^a	4.83±2.66 ^{cd}		0.25±0.45 ^{ab}	4.50±1.00 ^b	4.33±1.92 ^b
Condiciones <i>in vitro</i> (60 días)						
T	LE [cm]^{o*}	NH^{o*}	NR^{o*}	NRA^{o*}	NN	NB
TE1	2.19±0.57 ^{cde}	19.33±11.93 ^{ab}	13.33±6.47 ^a	0.25±0.45 ^{bc}	10.08±6.54 ^{abc}	5.92±2.31 ^{ab}
TE2	2.66±1.14 ^{bcd}	23.17±7.80 ^a	21.0±12.17 ^a	0.75±0.87 ^a	10.67±4.68 ^{abc}	6.75±2.34 ^a
TE3	3.09±0.96 ^{ab}	19.50±5.68 ^{ab}	15.00±7.81 ^{ab}	0.25±0.62 ^{bc}	13.0±3.25 ^a	5.75±1.77 ^{ab}
TE4	1.48±0.33 ^e	19.42±14.12 ^{ab}	5.75±5.40 ^{bc}	0.25±0.62 ^{bc}	5.83±2.83 ^d	4.42±1.62 ^{bc}
TE5	3.04±0.51 ^{ab}	11.33±4.60 ^c	12.0±8.72 ^{ab}	0.58±0.79 ^{ab}	8.08±1.83 ^{bcd}	4.50±2.46 ^{bc}
TE6	2.56±1.12 ^{bcd}	15.58±5.85 ^{bc}	18.7±21.1 ^a	0.17±0.58 ^{bc}	7.83±3.59 ^{cd}	4.17±1.12 ^c
TE7	2.13±0.68 ^{de}	15.42±6.65 ^{bc}	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	5.17±1.12 ^d	4.92±1.24 ^{bc}
TE8	2.96±1.42 ^{abc}	18.17±9.00 ^{abc}	20.0±18.7 ^a	0.08±0.29 ^c	11.75±8.39 ^{ab}	5.25±1.91 ^{abc}
TE9	3.58±1.65 ^a	19.08±8.89 ^{ab}	21.0±6.56 ^a	0.25±0.45 ^{bc}	11.42±4.70 ^{abc}	5.0±1.81 ^{bc}

* T. Tratamiento, LE.- Longitud del explante, NH.- Número de hojas, NR.- Número de raíz, NRA.- Número de raíces adventicias, NN.- Número de Nudos, NB.- Número de Brotes.

° En el Cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre las columnas denotan diferencia significativa LSD (P<0.05).

Los resultados muestran que el TE2 fue el que mayor número de brotes obtuvo, en donde se usó medio MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado con carbón activado (1 g/L). Un resultado similar se observó en el trabajo de (Vaca, y otros, 2018) donde se permitió obtener resultados favorables en el número de brotes en el cultivo del limón.

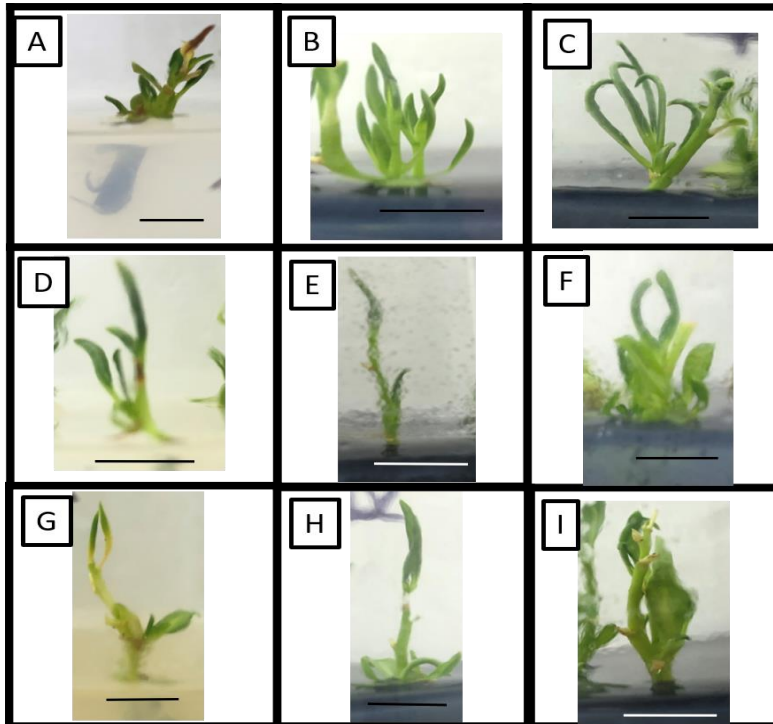


Figura 2.3.- Desarrollo de plantas de Salix a los 30 días de micropropagación *in vitro*

A. TE1.- MS – 0 g/L CA – 0 mg/L cin; B. TE2.- MS – 1 g/L CA – 0 mg/L cin - 2; C. TE3.- MS – 2 g/L CA – 0 mg/L cin; D. TE4.- MS – 0 g/L CA – 0.5 mg/L cin; E. TE5.- MS – 1 g/L CA – 0.5 mg/L cin; F. TE6.- MS – 2 g/L CA – 0.5 mg/L cin; G. TE7.- MS – 0 g/L CA – 5 mg/L cin; H. TE8.- MS – 1 g/L CA – 5 mg/L cin; I. TE9.- MS – 2 g/L CA – 5 mg/L cin; La escala de las barras corresponde a 0.5 cm

En TE3 los resultados coinciden con los logrados por (Borges García & Sosa Tabarez, 2008), con la diferencia que en este trabajo se usó el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) al 100%, mientras que Borges & Sosa emplearon el medio MS al 75% y la adición de carbón activado a una concentración de 2 g/L. En ambos trabajos se demostró que a esa concentración de CA tiene un efecto positivo sobre el número de nudos, en este trabajo se obtuvo una media de 13, lo que indicó el tratamiento con mayor número de nudos.

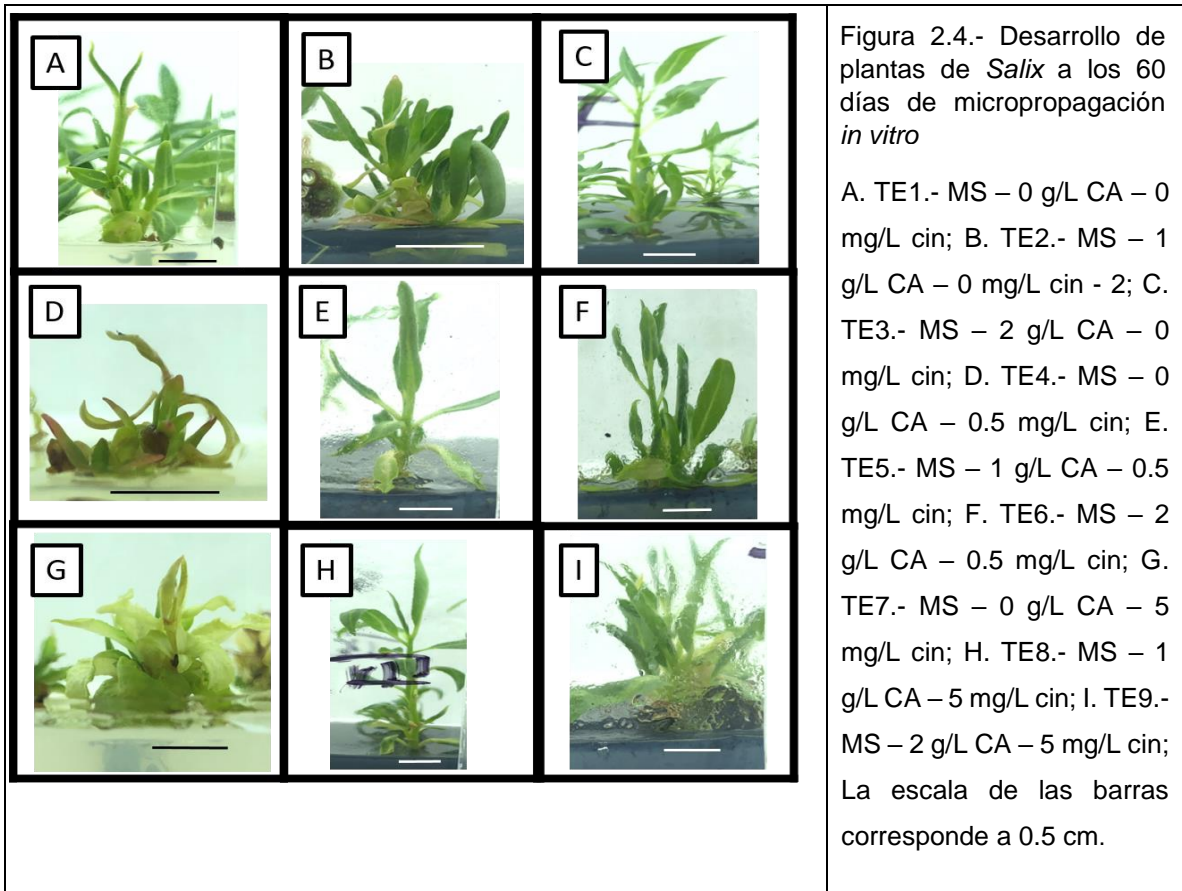
Cuadro 2.5.- Evaluación de parámetros de desarrollo de plántulas de *Salix* en el día 60 de cultivo *in vitro*

Tratamiento	PF ^{o*}	PS ^{o*}
TE1	0.364±0.362 ^{ab}	0.044±0.044 ^{ab}
TE2	0.205±0.087 ^{ab}	0.024±0.006 ^{ab}
TE3	0.190±0.059 ^{ab}	0.022±0.004 ^{ab}
TE4	0.109±0.048 ^b	0.014±0.006 ^b
TE5	0.192±0.137 ^{ab}	0.019± 0.006 ^b
TE6	0.262±0.144 ^{ab}	0.031±0.010 ^{ab}
TE7	0.462±0.363 ^a	0.061±0.029 ^{ab}
TE8	0.181±0.054 ^{ab}	0.021±0.006 ^{ab}
TE9	0.237±0.051 ^{ab}	0.094±0.116 ^a

* PF.- Peso Fresco, PS.- Peso Seco.

° En el Cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre las columnas denotan diferencia significativa LSD (P<0.05).

Aunque no haya una diferencia significativa en los tratamientos para los pesos, tanto peso fresco como peso seco, los que mayor masa mostraron, son aquellos con mayor cantidad de cinetina, donde TE7 con medio MS adicionado con 5 mg/L de cinetina fue en el que se obtuvo mayor peso fresco, y TE9 con medio MS adicionado con 5mg/L y 2 g/L de CA obtuvo una mayor masa en el peso seco. (Grendysz , Wróbel, & Kulpa, Influence of micropropagation with addition, 2017) usando *Salix viminalis* L. se mencionó que los medios con cinetina se consideraron mejores, porque las plantas cultivadas con el uso de esta fitohormona han mostrado mayor masa.



El tratamiento TE7 en ninguna de las evaluaciones presentó brotes radiculares (Figura 2.4 G). Sin embargo, un resultado observado en la imagen es que la planta muestra los inicios de una calogénesis, esto es resultado del uso en proporción de 5 mg/L de Cin sin CA, resultado similar se obtuvo en el trabajo de (Córdova, Cobos, Imán , & Castro, 2014), donde usaron cinetina, para la inducción de calogénesis *in vitro* en tres tipos de explantes de *Myrciaria dubia*.

Trabajo a futuro

Se continuará con las evaluaciones del desarrollo de la plántula hasta el día 60 para poder determinar cuál de estos tratamientos presenta las mejores condiciones para la germinación y crecimiento de las plántulas. Se realizará la optimización de la propagación *ex vitro*, desde la etapa de multiplicación, enraizamiento y aclimatación de las plántulas, para su uso posterior en la evaluación de estrategias de inducción de respuestas de resistencia en plantas de salix contra *Fusarium sp* (infección por complejos ambrosiales).

2.1.5 Conclusiones

En el desarrollo de plántulas a partir de semillas, de los doce tratamientos que se evaluaron en este estudio, los tratamientos TG8, TG9 y TG11 fueron los que destacaron en los parámetros de desarrollo evaluados (longitud del explante, número de hojas, número de raíces y longitud de raíz) en las plántulas *in vitro* de *S. bonplandiana*, sugiriendo que concentraciones de 100 y 150 % de medio MS, así como la presencia de sacarosa (1.5 y 3 %) promueven un mejor desarrollo de las plantas *in vitro*.

En la micropropagación a partir de esquejes la mejor opción, la más económica y con buenos resultados, fue TE1, en contraste con TE2 únicamente hubo diferencia significativa para el Número de raíces adventicias, y con TE9, no hubo diferencia significativa, más que en la longitud del explante (LE), por lo que podemos concluir, que estadísticamente, no es significativamente diferente el usar Carbón activado, ni cinetina, si al final, el desarrollo de la planta, no tendrá significancia.

Al usar 5mg/L de cinetina en TE7 sin carbón activado, la planta presentó callogénesis, evitando que la planta produjera raíces, a diferencia del TE9, que con la misma cantidad de cinetina, pero, con carbón activado en 2g/L, la planta produjo el mayor número de raíces de todos los tratamientos.

2.1.6 Bibliografía

- Álvarez Sierra, Y. A. (2015). *Protocolo de Uso y Aprovechamiento del Sauce en la Actividad Artesanal*. Fundación cultural del putumayo, Departamento de cultura. Putumayo: Fundación cultural del putumayo. Recuperado el 01 de Agosto de 2020
- Álvarez Sierra, Y. A. (2015). *Protocolo de Uso y Aprovechamiento del Sauce en la Actividad Artesanal*. Putumayo: Fundación cultural del putumayo.
- Andrade Rodriguez, M., Vargas Araujo, J., Villegas Torres, O. G., López Martínez, V., Guillen Sánchez, D., & Alia Tejacal, I. (Agosto de 2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de cattleya (*Brassolaelio cattleya*) in vitro. *Interciencia*, 40(8), 549-553. Recuperado el 04 de Agosto de 2020, de <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/10/549-C-ANDRADES5.pdf>
- Ball, J., Carle , J., & Del Lungo, A. (2005). *Contribución de álamos y sauces a la silvicultura sostenible y al desarrollo rural*. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de FAO: <http://www.fao.org/3/a0026s/a0026s02.htm>
- Borges García , M., & Sosa Tabarez, Y. (2008). Efecto de la adición de diferentes concentraciones de carbón activado sobre la multiplicación in vitro de ñame. *Bioteología Vegetal*, 8(2), 87-90. doi:ISSN 1609-1841
- Cantos Cevallos, G., Pinargote Choéz, J., & Palma Ponce, R. (Agosto de 2018). Influencia de la fitohormona kinetina en el crecimiento de plántulas de coffea arábica L. injertadas sobre patrón robusta en vivero. *CFORES*, 6(2), 134-145. doi:ISSN: 1996–2452
- Córdova, A. M., Cobos, M., Imán , S. A., & Castro, J. C. (14 de Marzo de 2014). Un método eficiente para la inducción de callos in vitro en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria*, 5, 25-34.

Recuperado el 28 de 12 de 2020, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v5n1/a03v5n1.pdf>

Eskalen, A., Rugman Jones, P. F., Colleen Lynch, S., Twizeyimana, M., Gonzalez, A., & Thibault, T. (Enero de 2013). Host Range of Fusarium Dieback and Its Ambrosia Beetle (Coleoptera: Scolytinae) Vector in Southern California. *Plant Disease*, 938-951. doi:10.1094/PDIS-11-12-1026-RE

Fang Qing, C., Chuan Hua, W., & Guo Mei, J. (2013). Ecology of *Salix variegata* seed germination. En *Implications for species distribution and conservation in the three Geoges region* (Vol. 88, págs. 243-246).

FAO. (2005). *Fao*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a0026s/a0026s02.pdf>

Franco León, C. L. (2015). *EVALUACIÓN DE ÁCIDOS GIBERÉLICO Y NAFTALENACÉTICO, POR DIFERENTES MÉTODOS DE APLICACIÓN, SOBRE FRUTOS DE SANDÍA*. UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR, CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS. Zacapa: Facultad de ciencias ambientales y agrícolas. Recuperado el 05 de 12 de 2020, de <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2015/06/09/Franco-Carlos.pdf>

Gómez Garay, A., Pintos López, B., Grau Corbi, J., & Bueno Pérez, Á. (2014). Micropropagación de *Populus tremula* L. *Reduca*, 2(7), 1-11. Obtenido de <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/download/1594/1615>

Grendysz, J., Wróbel, J., & Kulpa, D. (2017). Influence of micropropagation with addition. *World Scientific News*, 2(70), 201-2015. Recuperado el 10 de 2020, de <http://www.worldscientificnews.com/wp-content/uploads/2017/01/WSN-702-2017-201-215.pdf>

Grendysz, J., Jacek, W., & Danuta, K. (Abril de 2017). Influence of micropropagation with addition of kinetin on development of a willow (*Salix viminalis* L.). *World Scientific News*, 70, 201-2015. Recuperado el 20 de 10 de 2020, de

https://www.researchgate.net/publication/322931611_Influence_of_micropropagation_with_addition_of_kinetin_on_development_of_a_willow_Salix_viminalis_

- Kunth. (1817). *Salix bonplandiana*. *Nova Genera et Species Plantarum*, 101.
- Kunth, C. S. (1815). *Salix bonplandiana*. En *Nova Genera et Species Plantarum* (Vol. 2, págs. 233-235). París. Recuperado el 2020
- López Vera, M. R., Solórzano Murillo, F. R., Pomagualli, D., López Vera, T. M., & Vergara Vélez, G. E. (Diciembre de 2016). PROPAGACIÓN IN VITRO DEL SAUCE LLORÓN (*Salix Babilonica* Lin.) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES. *Revista de Investigación Talentos*, 3(2), 22-29. doi:ISSN Digital: 2631-2476
- Martínez Medina, S. d., Gomez Kosky, R., Posada Péez, L., Barbón Rodríguez, R., Acosta Suárez, M., Reyes Vega, M., . . . Tejeda González, M. (29 de Noviembre de 2012). Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas in vitro de *Sorghum bicolor* para la formación de callos. *UNAL*. Recuperado el 12 de 2020, de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/download/37293/40412>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 473-497.
- Neyra Velasco, I. M. (2015). *Propagación in vitro del sauce (Salix alba), para uso en defensa ribereña*. Universidad Nacional Agraria de la Selva , Departamento de conservación de suelos y agua. Tingo María: Academia de Conservación de Suelos y Agua. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/1044/CSA2015004.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Paz da Silva, R., & Vilegas Monter, Á. (Diciembre de 2009). Niveles de sacarosa en el enraizamiento in vitro y aclimatación ex vitro de plantulas del portainjerto de vid R110 (*vitis rupestris* *vitis berlandieri*). (R. Paz da Silva, Ed.) *SciELO*, 34(12). Recuperado el 02 de Agosto de 2020, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009001200012
- Pierik, R. L. (s.f.). Rejuvenation and micropropagation. En H. Nijkamp, L. Van Der Plas, & J. Van Aartrijk , *Progress in plant cellular and molecular biology* (págs. 91-101). Kluwer Academic Publisher Dordrecht.
- Pierik, R. (s.f.). Rejuvenation and micropropagation. En H. Nijkamp , L. Van Der Plas, & J. Van Aatrijk (Edits.), *Progress in plant celular and molecular biology* (págs. 91-101). Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- Posada Pérez , L., Padrón Montesinos, Y., Gonzalez Olmedo, J., Rodriguez Sanchez, R., Barbón Rodriguez, R., Norman Montenegro, O., . . . Gómez Kosky, R. (2016). Efecto del pectimorf en el enraizamiento y la aclimatación in vitro de brotes de papaya (*Carica papaya* L.) cultivar maradol roja . *Cultivos tropicales*, 37(3), 50-59. Recuperado el Agosto de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193246976005.pdf>
- Rojas Sánchez, E. L. (2010). *Efecto de la aplicación de extractos de siete especies vegetales del semidesierto mexicano como reguladores del crecimiento*. UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO", INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA. Coahuila: UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO". Recuperado el 23 de 11 de 2020, de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5053/T18320%20ROJAS%20SANCHEZ,%20ELVA%20LILIANA%20%20TESIS.pdf?sequence=1>
- Rytter, R. M., Weih, M., & Nordh, N. E. (Enero de 2005). Determinants of biomass production in hybrid willows and prediction of field performace from pot

studies. *Tree Physiology*, 25, 1197-1206. Recuperado el Agosto de 2020, de https://watermark.silverchair.com/25-9-1197.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAq8wggKrBqkqhkiG9w0BBwagggKcMlICmAIBADCCApEGCSqGSIB3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMSrmh28FmXzMilF_zAgEQglICYoJrUBuj_Fx5CC2jeN0VfGi2FEp-njmSveBRSE1jF4vF

Short , D. P., O'Donnell, K., Stajich , J. E., Huler, J., Kijimoto, T., Berger , M., . . . Kasson , M. T. (2017). PCR Mutiplexes Discriminate Fusarium Symbionts of invasive Euwallacea Ambrosia Beetles that Inflict Damage n Numerous Tree Species Throughout the United States. *Plant Disease*, 101(1), 233-240. doi:<https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1046-RE>

Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (Marzo de 2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance-Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*(17), 48-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002>

Uribe Moraga, M., & Cifuentes G., L. (26 de Abril de 2003). Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación de Legrandia cocinna. *BOSQUE*, 1(25), 129-135. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/1731/173114404012.pdf>

Uribe, M., Delaveau , C., Garcés , M., & Escobar , R. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de Berberidopsis corallina, a partir de segmentos nodales. *SciELO*, 1(29), 58-64. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002008000100007>

Vaca, I., Marulanda , M., Verdesoto, J., Núñez , A., Acurio, R. D., & Chilusia Utreras, V. (4 de Agosto de 2018). Efecto del carbón activado en la germinación y brotación in vitro de Citrus. *Bionatura*, 3(3), 657-664. doi:10.21931/RB/2018.03.03.5

Yah Chulim, J. E. (2011). *ESTUDIO DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL EN LA MORFOGÉNESIS DE Bletia purpurea (Lam.)*. CIATEJ, MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA, Mérida. Recuperado el 9 de 10 de 2020

3. CAPÍTULO

3.1 Propagación de plantas de *S. bonplandiana* a partir de esquejes en condiciones *ex vitro*.

3.1.1 Resumen

Este capítulo es sobre la propagación, desarrollo y enraizamiento rápido de estacas. Se puso a prueba diferentes mezclas de dos sustratos, el primero es peatmoss, un sustrato a base de turba que da soporte a la raíz de la estaca, el segundo es la perlita, que tiene capacidad de retener agua, y crear porosidad. Durante 60 días, cada 15 días se evaluaron, tomando en cuenta los siguientes factores: Longitud de la planta, número de hojas, número de nudos, número de brotes, número de nudos secundarios y número de brotes secundarios. Los tratamientos en total fueron 5, con quince repeticiones cada uno, las mezclas de los tratamientos fueron las siguientes: TEE1.- 100% Peatmoss. TEE2.- 75% Peatmoss - 25% perlita. TEE3.- 50% Peatmoss – 50% perlita. TEE4.- 25% Peatmoss – 75% perlita. TEE5.- 100% perlita. De los tratamientos evaluados para el desarrollo de salix a través de estacas, aquel que contiene un 100% peat moss resultó ser el mejor en cuanto a los parámetros agronómicos determinados. Entre los que destacan número de hojas con un 138.2 ± 67.9 , número de nudos secundarios con un 120.7 ± 57.5 y en número de brotes con un 12.13 ± 10.45 .

3.1.2 Introducción

Los sauces (*Salix bonplandiana*) tienen fácil adaptabilidad a diferentes climas y suelos, por lo tanto, esto les ayuda a tener un rápido enraizamiento con diferentes sustratos, concluyendo un crecimiento rápido y de fácil propagación, además de tener características de fitorremediación de suelos, y es por lo que algunos países buscan reforestar orillas de ríos con estos árboles.

Algunas sales minerales ayudan al crecimiento de plantas en diferentes ecosistemas, que brindan alimento y hábitat para una gran variedad de organismos en estos ecosistemas. Sin embargo, cuando se presenta un exceso

de sales minerales en el medio, generalmente es causado por diversas actividades humanas que contaminan el agua y el suelo. Las fuentes principales de contaminación en los suelos son la agricultura con el exceso de fertilizante junto con el estiércol animal aplicado a cultivos y campos, las aguas pluviales, las aguas residuales, combustibles fósiles por la generación de energía eléctrica, así como desechos de la industria aumentan la contaminación de suelos y mantos freáticos. Plantas con elevada biomasa, tales como los sauces, pueden utilizarse para la fitorremediación de terrenos, en la que se aplican especies vegetales que ayudan a la absorción, translocación y degradación de altas cantidades de sales minerales y metales tóxicos (Valero & de Cárcamo, 2017) (Delgadillo López, González Ramírez, Prieto García, Villagómez Ibarra, & Acevedo Sandoval, 2010).

Por otro lado, el sauce también se puede propagar de forma asexual, por medio de esquejes, la cual ha sido ampliamente reconocida como una práctica fundamental en el campo de las ciencias agrícolas. Muchas especies hortofrutícolas, ornamentales y forestales, presentan en su propagación ciertas características y problemas peculiares, lo cual hace necesario que se sigan tratamientos, pasos y métodos especiales en su producción., por lo que es posible lograr su reproducción a través de métodos asexuales para su perpetuación con diferentes fines. A través de estos métodos de propagación podemos generar clones y esto es gracias a la capacidad de regeneración de tallos y raíces de las que se obtienen las porciones vegetativas para desarrollar. Un clon es un organismo o grupo de organismos que derivan de otro a través de un proceso de reproducción asexual (no sexual), procedente de una sola planta madre (Reyes, 2015).

La reproducción por estacas es uno de los métodos más importante para propagar arbustos y árboles ornamentales y forestales, tanto de especies caducifolias como de especies perennifolias. Las estacas también se usan ampliamente en la propagación comercial tanto de flores como de frutales. La reproducción por estacas consiste en cortar un fragmento de tallo con yemas y enterrarlo. Después se espera hasta que generan raíces para obtener una nueva

planta. Dada su capacidad para formar yemas y raíces adventicias, cualquier parte de la planta puede desarrollarse en un organismo vegetal completo e independiente, con las mismas características genéticas de la planta progenitora (Reyes, 2015).

México cuenta con aproximadamente 64 millones de hectáreas de bosques de clima templado y selvas que abarcan el 32% del territorio nacional. Adicionalmente el país cuenta con 56 millones de ha de matorrales y cerca de 2 millones de ha de vegetación hidrófila. Tales recursos son de gran importancia para el país desde el punto de vista social, económico y ambiental (Torres Rojo, 2020).

Originarios de zonas templadas y subtropicales, los árboles y arbustos de Salicaceae, que incluyen sauces (*Salix spp.*) son de crecimiento rápido y de fácil propagación vegetativa. Muchas de las especies se adaptan a muy diversas condiciones de clima y suelo, desde el calor del desierto chino hasta el frío y el viento de los Andes sudamericanos. Son fáciles de cultivar y constituyen un componente importante de los sistemas agroforestales, a menudo para pequeños agricultores. Suministran una amplia gama de productos madereros, no madereros y servicios (Ball, Carle , & Del Lungo, 2005).

Los sauces tienen un uso ornamental. Sin embargo, se emplea también en la fitorremediación de suelos afectados por sustancias peligrosas (Ghasemi & Mokhtari, 2019), considerada como una alternativa para la eliminación de cianuro de sodio. Esta especie es utilizada para la producción de energía renovable. Al respecto, (Doffo , Achinelli, Rodríguez, & Luquez , 2017) informaron la diversificación de las fuentes renovables como la biomasa forestal, producidas por *Salix*; para ello consideraron que la disponibilidad de agua es el principal factor que determina el rendimiento en biomasa seca, mientras que el genotipo y la densidad de plantación no tienen un efecto significativo en la variable mencionada.

Además, es conocido el uso de esta familia para la obtención del ácido acetilsalicílico o aspirina. Sin embargo, nuevas aplicaciones en el campo de la

medicina y, particularmente, sus efectos antimicrobianos se han informado recientemente. (Wahab, Sallam, Elgaml, Lahloub, & Afif, 2018) determinaron que los extractos metanólicos de hojas y corteza de algunas especies de la familia poseen actividad antibacteriana contra *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. También, (González Alamilla, y otros, 2019) indicaron que los compuestos aislados del extracto hidroalcohólico *S. babylonica* podrían ser una alternativa natural y funcional para el tratamiento de enfermedades causadas por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

En 2015 un complejo ambrosial *Euwallacea sp.-Fusarium euwallaceae*, el cual está compuesto por un insecto vector y un hongo fitopatógeno (de aquí en adelante referidos como plagas invasoras), que en su lugar de origen no son plagas de importancia fitosanitaria. Sin embargo, desde su introducción a los Estados Unidos -presumiblemente, a través del embalaje de mercancías provenientes de Oriente-, estas plagas invasoras han afectado negativamente al sector agrícola y forestal. En el sector forestal, las afectaciones están relacionadas con la muerte de miles de árboles presentes en los bosques, valles ribereños y zonas conurbadas en el sureste y suroeste de los Estados Unidos. Cabe resaltar que muchas otras especies de amplia distribución (aproximadamente 200 especies arbóreas) son afectadas (FORDECYT, 2017), dentro de las cuales se encuentra la familia de las salicáceas.

Tomando en cuenta la gran importancia forestal, ambiental, medicinal y cultural de estos árboles, se realizó esta investigación con el propósito de determinar el método de aplicación de fitohormonas y carbón activado en la micropropagación *in vitro* en el desarrollo de plántulas, como también optimizar el sustrato en el que las estacas de esta planta, se puedan desarrollar de manera adecuada, aumentando y mejorando su desarrollo.

La propagación de plantas es una ocupación fundamental de la humanidad, gracias a ella el hombre ha logrado conservar las características que las hacen útiles. A través del tiempo y en la medida que se ha dispuesto de nuevos tipos

de plantas, se han desarrollado las técnicas para mantenerlas, tales como el uso de invernaderos, los injertos, el empleo de estimulantes para enraizamiento de estacas y acodos (Macagual, 2002).

El método por esquejes consiste en tomar una porción de la planta, por ejemplo, un trozo de tallo, y conseguir que emita raíces para formar un nuevo individuo. Se le llama esqueje, estaca o estaquilla al trozo de tallo, de hoja o de raíz que se pone a enraizar.

En este proceso regenerativo las raíces desarrolladas a partir de un fragmento de tallo, hoja o tejido de yema se denominan raíces adventicias. Para lograr esto, un grupo de células en desarrollo (meristemos), normalmente cercanas al del tejido vascular (que transporta la savia), se diferencian en una serie de raíces iniciales (células radicales), que formarán yemas radicales y posteriormente raíces adventicias. También reciben el nombre de raíces “inducidas” o “de herida” porque, en la mayoría de los casos, sólo se dan si la planta ha resultado dañada en algún punto, por ejemplo, si ha recibido un corte en el tallo (Osuna Fernández).

En plantas leñosas perennes, en las cuales hay una capa o más de floema y xilema secundario, las raíces adventicias de estacas de tallos se originan generalmente en el tejido del xilema secundario joven, pero a veces lo hacen de otros tejidos como son los radios vasculares, el cambium, el floema, las lenticelas o la médula. Para obtener un enraizamiento más rápido y con mayor seguridad de éstas se utilizan productos comerciales que contienen ácidos indolbutírico (IBA) y naftalén acético (ANA), debido a que no son tóxicos en una amplia gama de concentraciones y son eficaces para estimular el enraizamiento de un gran número de especies de plantas.

En general la técnica para propagar por esquejes es: desinfectar manos y herramientas a utilizar, hidratar sustrato, cortar esquejes de 20 a 30 cm. impregnar con hormonas (RADIX 1500 o 10 000 para plantas leñosas), plantar los esquejes, plantar los esquejes que no se deshidraten, colocar en un invernadero con temperatura alrededor de 20 a 24°C, aproximadamente y que

no reciban los rayos del sol directos ni corrientes de aire. El riego se debe hacer cada tercer día, preferentemente por aspersión, al cabo de seis semanas aproximadamente, el esqueje desarrollará raíces por su base y se tendrá una planta nueva (Osuna Fernández).

Las mezclas utilizadas para la producción de plántula deben de ser muy ligeras, tener una alta capacidad de retención agua, circulación de aire y estar libres de enfermedades y malezas. Las mezclas utilizadas para el trasplante se pueden combinar con peatmoss, humus, composta, acondicionadores de suelo y fertilizantes orgánicos aprobados. La necesidad de contar con mezclas libres de enfermedades y malezas favorece a las mezclas de sustratos a base de materiales naturales como el peatmoss y composta, fortalecidos con perlita, vermiculita y fertilizantes orgánicos.

El ambiente en el invernadero es muy efectivo para promover un rápido crecimiento de la planta, pero también resulta en un ambiente apropiado para la rápida reproducción de insectos y enfermedades. Los cultivos en invernadero son producidos en pequeños contenedores que limitan en cierto punto el crecimiento de la raíz y la lixiviación frecuente provoca que el manejo de la fertilización. Por consiguiente, de lo que se trata es de conseguir sustitutos que provean esta fertilización y ambiente propicio para el desarrollo orgánico de la planta.

Los principales sustratos utilizados en México son:

Turbas (peatmoss) material orgánico de estructura mullida, la distribución del tamaño de las partículas estimada por índice de grosor situándose alrededor del 44%, presenta baja densidad aparente (0.07 g/cm^3) y real, porosidad total elevada (96%), suficiente contenido de aire (41% en volumen), alta capacidad de retención de agua total (687mL/L) y agua disponible (25% en volumen). El pH es extremadamente ácido, inferior a 4.0, poniendo de manifiesto la necesidad de encalado. La conductividad eléctrica del extracto de saturación es muy baja, alrededor de 0.5 dS/m. En nutrientes también es muy bajo. La capacidad de intercambio catiónico es muy elevada aumenta con su grado de descomposición.

Este material es muy usado en la producción de plántula. La gran mayoría es de importación (Castellanos, 2003).

Tezontle. - Es un material procedente de la erupción de volcanes y está constituida por silicatos de aluminio, formado por fragmentos de lava porosa, redondos e irregulares. Es uno de los sustratos más usados en México. Tiene el inconveniente de que su granulometría es muy variada, lo cual se puede corregir al mezclar un 70% del material pasado por un tamiz de 3/8 a 1/4 de pulgada también conocido como sello y 30% de la fracción menor de 1/4 de pulgada conocida como arenilla y se obtendrán las siguientes características físicas: densidad aparente = 0.68 g/cm³, espacio poroso = 71%, capacidad de aireación = 32%, agua fácilmente disponible = 23% (Castellanos & Vargas, 2008).

Fibra de coco Es un subproducto del coco que está teniendo mucha aceptación en México dado su bajo costo, facilidad de manejo, sanidad y excelente respuesta agronómica que ha mostrado en los cultivos en que se ha evaluado. Las propiedades de los sustratos han sido estudiadas en el INIFAP Bajío donde se obtuvieron los siguientes valores promedios: densidad = 0.09 g/cm³, capacidad de retención de agua = 63%, capacidad de aireación = 32%, agua fácilmente disponible = 25%, salinidad = 3 a 6 dS/m, capacidad de intercambio catiónico = 40 –53 me 100 g (Castellanos & Vargas, 2008).

Perlita Contiene una granulometría de 0-5 mm de diámetro y con una densidad aparente de 0.1 a 0.12 g/cm³. Posee una buena capacidad de aireación (29%), elevada capacidad retención de agua fácilmente disponible (24.6% en volumen) y un elevado espacio poroso total (85.9 % en volumen). Es un material inerte que no se descompone biológica ni químicamente. Se considera desprovista de nutrientes. Su pH es neutro o ligeramente alcalino (7-7.5) y salinidad muy baja. La capacidad de intercambio catiónico es muy baja (1.5 – 2.5 meq 100 g⁻¹ de suelo) y una capacidad tampón muy limitada. Habrá que tener cuidado con soluciones nutritivas con pH menor de 5 ya que se puede liberar aluminio de la estructura de la perlita (Castellanos, 2003).

El uso de sustratos no está muy bien estudiado en árboles de importancia forestal es por eso que el objetivo de este capítulo fue evaluar las mezclas de sustratos por sus características físicas y químicas que brindan a la planta y su efecto en los esquejes de Sauce, para optimizar su reproducción por medio de esquejes, obteniendo como parámetros a evaluar longitud de la planta (L), número de hojas (NH), número de brotes (NB), número de brotes secundarios (NBS), número de nudos (NN) número de nudos secundarios (NNS) y número de raíz (NR) con el fin de obtener el mayor número de plantas en el menor lapso de tiempo y plantas más vigorosas con mayor capacidad de adaptabilidad en el ecosistema.

3.1.3 Materiales y métodos

3.1.3.1 Establecimiento de estacas.

Se cortaron estacas de un árbol madre que se encuentra ubicado en Zapopan Estado de Jalisco (coordenadas DMS 20° 41' 55.69" N 103° 28' 36.72" O). Los esquejes fueron de 30 cm de largo con un grosor aproximado entre 1.5 y 2.5 cm una vez cortados se pusieron en una solución de agua con enraizador RADIX® 1500. La solución fue de 10 g/L de RADIX® 10000 durante 72 h a temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) bajo sombra. Una vez transcurrido el tiempo se retiraron de la solución y se colocaron en bolsas con capacidad de 4L que contenían mezclas de sustratos.

Para la realización de los ensayos se localizaron árboles de *Salix bonplandiana* en los alrededores del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) ubicado en Camino Arenero 1227 El Bajío, Zapopan, Jalisco. Se seleccionaron árboles que no presentaran daños o síntomas de enfermedades y se cortaron estacas de las ramas con una longitud aproximada de 30cm.

Los esquejes se sembraron en el sustrato a una profundidad de 5 a 7 cm, permitiendo tener una longitud inicial de las estacas con un intervalo de 22 a 25 cm en la superficie, con aproximadamente seis nudos (Cuadro 3.1), los esquejes

se colocaron en diferentes mezclas de peat moss y perlita, como se describe a continuación; TEE1.-100% peat moss, TEE2.- 75% peat moss y 25% perlita, TEE3.- 50% peat moss y 50% perlita, TEE4.- 25% peat moss y 75% perlita, TEE5.- 100% perlita, se colocaron en condiciones de invernadero a temperatura ambiente. Los riegos se realizaron cada tercer día y se fertilizaron cada semana con 2g/L marca Peter's, 24-8-16 (N-P-K), a cada estaca se le aplicaban 100mL de fertilizante diluido. Los parámetros de desarrollo de las plántulas se evaluaron cada 15 días hasta el día 60 después de haber sido trasplantados al sustrato correspondiente. Los parámetros de desarrollo de la planta incluyeron: longitud de la estaca (L), número de hojas (NH), número de nudos (NN), número de brotes (NB), número de brotes secundarios (NBS), número de nudos secundarios (NNS).

3.1.3.2 Diseño experimental y análisis de datos.

Se empleó un diseño experimental completamente al azar, los datos presentados corresponden a quince repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de LSD ($P < 0.05$).

3.2 Resultados y discusión

Se midió la longitud de la estaca (L) a partir de la sección mostrada en la superficie del sustrato, así como el número de nudos (NN) de los explantes iniciales empleados en el experimento (Cuadro 3.1), las estacas presentan una longitud aproximada de 30 cm, enterrándose entre 5 y 8 cm en el sustrato.

Cuadro 3.1.- Evaluación de parámetros de desarrollo de esquejes de *Salix* en condiciones de invernadero.

T*	L [cm] ^{o*}	NN ^{o*}
TEE1	22.53 ± 2.00 ^c	6.33±1.54 ^a
TEE2	23.97 ± 2.51 ^b	6.33±1.23 ^a
TEE3	24.93 ± 1.70 ^{ab}	6.33±1.05 ^a
TEE4	23.87 ± 1.69 ^{bc}	6.87±2.75 ^a
TEE5	25.57 ± 1.70 ^a	6.87±2.53 ^a

* T. tratamiento, L.- Longitud de la planta, NN.- Número de nudos

^oEn el Cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre las columnas denotan diferencia significativa LSD (P<0.05).

En la presente investigación se empleó una longitud inicial total de la estaca de aproximadamente 30cm. De acuerdo con el trabajo de (Contreras & Ochoa, 2003), se menciona que para una mayor eficiencia agronómica en la propagación vegetativa de las estacas la longitud de la misma debe tener entre 10 y 20 cm.

Cuadro 3.2.- Evaluación de parámetros de desarrollo de estacas de *Salix* a los 15 y 30 días.

Parámetros de desarrollo de estacas de <i>Salix</i> en el día 15						
T	L [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NN ^{o*}	NB ^{o*}	NNS ^{o*}	NBS ^{o*}
TEE1	25.69±3.92 ^a	52.20±26.21 ^a	7.53±2.64 ^b	5.13±2.42 ^{ab}	25.20±10.72 ^b	0.0 ± 0.0 ^a
TEE2	25.41±2.69 ^a	36.0±25.80 ^{ab}	8.93±3.39 ^{ab}	5.60±3.04 ^{ab}	19.73 ± 11.93 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
TEE3	26.57±2.41 ^a	43.53±30.06 ^a	7.27±1.58 ^b	4.67±2.61 ^{ab}	21.00 ± 11.46 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
TEE4	25.80±2.54 ^a	45.73±26.75 ^a	10.00±4.93 ^a	6.33±3.87 ^a	24.47 ± 11.62 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
TEE5	25.70±1.90 ^a	20.73±16.55 ^b	7.87±2.80 ^{ab}	4.20±2.21 ^b	11.87 ± 6.38 ^b	0.0 ± 0.0 ^a

Parámetros de desarrollo de estacas de <i>Salix</i> en el día 30						
T	L [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NN ^{o*}	NB ^{o*}	NNS ^{o*}	NBS ^{o*}
TEE1	55.33±15.05 ^{ab}	102.3±49.1 ^a	7.13±2.00 ^b	11.73±7.94 ^a	62.53±25.13 ^a	4.27±5.12 ^a
TEE2	50.53±12.63 ^{ab}	81.53±31.84 ^{ab}	8.47±2.47 ^{ab}	10.80±3.55 ^{ab}	48.27±22.04 ^{ab}	3.60±5.55 ^{ab}
TEE3	56.43±14.04 ^a	94.47±37.04 ^a	7.20±1.21 ^b	10.93±4.73 ^{ab}	60.20±23.93 ^a	4.47±5.66 ^a
TEE4	46.57±12.13 ^{bc}	83.9±45.6 ^{ab}	9.40± 4.76 ^a	9.53±5.00 ^{ab}	57.13±29.85 ^a	0.93±3.62 ^{bc}
TEE5	38.60±09.77 ^{bc}	56.00±36.11 ^b	8.13±2.20 ^{ab}	6.93±5.47 ^b	35.87±23.37 ^b	0.13±0.52 ^c

* T. tratamiento, L.- Longitud de la planta, NH. - Número de hojas, NN.- Número de Nudos, NB. - Número de Brotes, NBS. - Número de Brotes Secundarios, NNS. - Número de Nudos Secundarios.

^o En el Cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre las columnas denotan diferencia significativa LSD (P<0.05).

La altura de los esquejes a los 15 días no presentó diferencia significativa en el desarrollo con diferentes sustratos (Cuadro 3.2), ya que se trató de enterrar las estacas a la misma profundidad de tal forma que la altura de las mismas sea similar desde el principio del experimento. En la evaluación de los siguientes 45 días se mostró mayor diferencia significativa en la altura de la planta (Cuadro 3.3), el TEE3 50% peatmoss (turba) y 50% perlita fue el mejor sustrato, seguido del TEE1 con 100% de turba, estos fueron los mejores tratamientos en la altura de las plantas. De acuerdo con (Gómez Merino , Trejo Tellez, García Albarado, & Morales Ramos, 2013), quienes encontraron que las plantas más altas fueron sembradas en las de mayor concentración de turba, ya que son las condiciones fisicoquímicas de cada sustrato las que definen el comportamiento de la altura de los esquejes (Simon , Chadwick, & Craker , 1984).

El número de hojas en la planta con diferentes concentraciones de turba y perlita no muestra diferencia significativa, caso similar en el trabajo de (Enríquez Díaz, 2017), donde también se usaron diferentes concentraciones de peat-moss y zeolita, sin embargo, en el número de hojas de las plantas no hubo diferencia significativa.

Cuadro 3.3.- Evaluación de los parámetros de desarrollo de estacas de *Salix* en los días 45 y 60 días.

Parámetros de desarrollo de estacas de <i>Salix</i> en el día 45						
T*	L [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NN ^{o*}	NB ^{o*}	NNS ^{o*}	NBS ^{o*}
TEE1	76.67±23.03 ^{de}	127.5±66.9 ^a	7.13±2.17 ^b	8.53±3.87 ^a	104.2±57.2 ^a	11.00± 9.43 ^a
TEE2	72.33±17.06 ^a	114.5±43.6 ^{ab}	7.80 ±2.27 ^{ab}	9.53±3.54 ^a	86.33±28.00 ^{ab}	7.33±7.20 ^{ab}
TEE3	83.07±16.77 ^a	122.9±42.9 ^{ab}	7.20±1.52 ^b	9.00±3.55 ^a	91.60±30.36 ^{ab}	9.80±6.94 ^a
TEE4	69.90±18.35 ^{ab}	91.13±37.71 ^{bc}	9.67±4.70 ^a	8.60±5.08 ^a	70.80±28.10 ^{bc}	4.40±5.19 ^b
TEE5	56.40±21.63 ^b	74.4±49.4 ^c	8.40±2.77 ^{ab}	7.07±4.43 ^a	55.47±36.49 ^c	2.93±4.42 ^b

Parámetros de desarrollo de estacas de <i>Salix</i> en el día 60						
T*	L [cm] ^{o*}	NH ^{o*}	NN ^{o*}	NB ^{o*}	NNS ^{o*}	NBS ^{o*}
TEE1	97.13±27.99 ^a	138.2±67.9 ^a	7.47±2.39 ^{ab}	8.33±3.89 ^a	120.7±57.5 ^a	12.13±10.45 ^a
TEE2	91.33±17.38 ^{ab}	119.1±41.1 ^{ab}	8.00±2.45 ^{ab}	9.07±3.11 ^a	105.07±36.53 ^{ab}	9.20±7.28 ^{abc}
TEE3	107.53±15.87 ^a	133.7±42.8 ^a	7.94±1.65 ^{ab}	8.40±3.33 ^a	111.87±32.95 ^{ab}	11.00±6.97 ^{ab}
TEE4	91.37±26.38 ^{ab}	108.3±44.2 ^{ab}	9.80±4.68 ^a	8.60±4.98 ^a	88.67±37.88 ^{bc}	6.60±5.46 ^{bc}
TEE5	75.67±29.41 ^b	85.90±58.5 ^b	7.13±4.58 ^b	6.53±4.36 ^a	71.5±49.4 ^c	4.60±5.45 ^c

* T. tratamiento, L.- Longitud de la planta, NH. - Número de hojas, NN.- Número de Nudos, NB. - Número de Brotes, NBS. - Número de Brotes Secundarios, NNS. - Número de Nudos Secundarios.

^o En el cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre las columnas denotan diferencia significativa LSD (P<0.05).

A los 45 días los tratamientos con mayor longitud fueron TEE2, TEE3 y TEE4, sustratos que contienen una composición de turba y perlita, a pesar de contener diferentes concentraciones, donde el tratamiento con mayor altura fue el TEE3 con una longitud de la planta de aproximadamente 83.07cm (Cuadro 3.3), similar a lo reportado por (Ayala Sierra & Valdez Aguilar , 2007) donde probaron diferentes sustratos, presentando una mayor altura de la planta el sustrato que contenía 50% turba y 50% perlita.

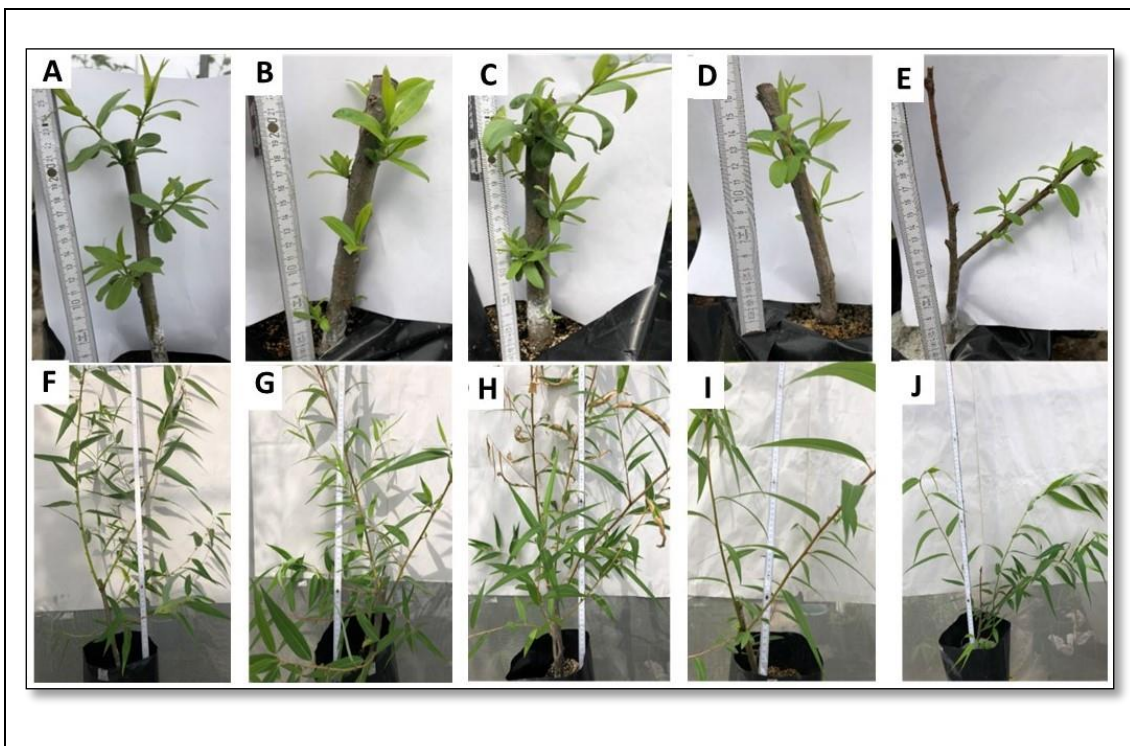


Figura 3.1.- Esquejes de *Salix* en condiciones de invernadero los días 15 y 60 de establecimiento.

(A-E) Esquejes a los 15 días. (F-J) Esquejes a los 60 días; (A y F) TEE1, 100% peat moss; (B y G) TEE2, 75% peat moss y 25% perlita; (C y H) TEE3, 50% peat moss y 50% perlita; (D e I) TEE4, 25% peat moss y 75% perlita; (E y J) TEE5, 100% perlita.

El número de hojas que generaron las estacas en el período evaluado de 60 días (Cuadro 3.3), mostraron diferencias significativas provocadas por los tratamientos en estudio, de los cuales el sustrato de turba al 100% logró el mayor número de hojas (aprox. 138.2), muy similar al tratamiento TEE3 (50% turba y 50% perlita) con aproximadamente 133.7 número de hojas, seguido del

tratamiento TEE2 (75% turba y 25% perlita) que presentó 119.1 número de hojas, mientras que los tratamientos TEE4 (75% perlita y 25% turba) y TEE5 (100% perlita), dieron lugar a plántulas con el menor número de hojas.

Cabe recalcar que en el TEE4 no hay diferencia significativa, caso similar en el trabajo de (Ortega Martínez, Sánchez Olarte, Díaz Ruiz, & Ocampo Mendoza, 2010) en donde los sustratos con menor porosidad como la turba, lograron un mayor número de hojas, a diferencia de aquellos que mostraban mayor porosidad, mostrando diferencia significativa en los sustratos sin tanta porosidad como la perlita en este caso.

3.2.1 Conclusiones

Todos los tratamientos evaluados en esta investigación fueron 100% exitosos en la propagación vegetativa por esquejes, lo que da un indicativo de que la multiplicación de *Salix* por esta vía es viable, ya que todos los esquejes lograron generar plantas independientes que fueron base para establecer la metodología de infección de patógenos, como se indica en capítulos superiores.

En general los mejores parámetros de desarrollo de los esquejes de *Salix* fueron a los 60 días y se observaron en los tratamientos TEE3, TEE2 y TEE1. Los esquejes responden mejor cuando se tiene un porcentaje de peatmoss que puede variar entre 50 a 100% con una combinación de perlita de 0 a 50%, con esta proporción de mezcla se mantenía la humedad y los fertilizantes adicionados durante el proceso para que la planta respondiera más rápidamente. Mientras que con porcentajes mayores de 50% de perlita el desarrollo del esqueje es más lento, presentando los parámetros de desarrollo más bajo comparado con los otros tratamientos (TEE1 al TEE3).

3.2.2 Bibliografía

- Ayala Sierra, A., & Valdez Aguilar, L. (05 de Diciembre de 2007). El polvo de coco como sustrato alternativo para la obtención de plantas ornamentales para trasplante. (Chapingo, Ed.) *Chapingo serie horticultura*, 14(2). doi:ISSN 2007-4034
- Ball, J., Carle, J., & Del Lungo, A. (2005). *Contribución de álamos y sauces a la silvicultura sostenible y al desarrollo rural*. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de FAO: <http://www.fao.org/3/a0026s/a0026s02.htm>
- Castellanos. (2003). *Los sustratos en la producción Hortícola bajo invernadero*. Celaya: INIFAP. Recuperado el 05 de 11 de 2020
- Castellanos, J. Z., & Vargas, P. (2008). *Manual de producción de tomate en invernadero*. México: INTAGRI.
- Contreras, V., & Ochoa, Á. (2003). Estacas cortas y gruesas: Una opción agronómica para la siembra vegetativa de *Gliricidia sepium*. *Zootecnia Tropical*, 21(4). doi:ISSN 0798-7269
- Delgadillo López, A. E., González Ramírez, C. A., Prieto García, F., Villagómez Ibarra, J. R., & Acevedo Sandoval, O. (Agosto de 2010). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *SciELO*, 14(2). Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000200002
- Doffo, G. N., Achinelli, F. G., Rodríguez, M. E., & Luquez, V. M. (2017). Rendimiento de un sistema de rotación corta de alta densidad con *Salix* spp. 38(3), 587-592. doi:10.4067/S0717-92002017000300016
- Enríquez Díaz, G. (2017). GERMINACIÓN Y PRODUCCIÓN DE PLANTULA DE LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum* (Raf.)Shinners.) var. Mariachi Blue EN MEZLAS DE PEAT-MOSS Y ZEOLITA. Estado de México: Centro

Universitario UAEM tenancingo. Recuperado el 03 de 2021, de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/67430/Germinaci%C3%B3n%20y%20producci%C3%B3n%20de%20plantula%20de%20lisianthus-split-merge.pdf?sequence=4>

FORDECYT. (2017). *Desarrollo de estrategias de investigación y desarrollo tecnológico acerca de los complejos ambrosiales Xyleborus glabratus/Raffaelea lauricola y Euwallacea sp./Fuarium euwallaceae (plagas invasoras) en los bosques nacionales y en los cultivos agrícolas*. México: CONACYT.

Ghasemi, R., & Mokhtari, R. (2019). Cyanide acclimation in willow (*Salix babylonica*), a prospect for the phytoremediation of cyanide. *Journal of Plant Process and Function*, 7(28), 61-69. Recuperado el 21 de 08 de 2020, de <http://jispp.iut.ac.ir/article-1-641-en.htm>

Gómez Merino , F. C., Trejo Tellez, L. I., García Albarado, J. C., & Morales Ramos, V. (Mayo de 2013). Lulo (*Solanum quiroense* Lamarck.) como nuevo elemento del paisaje en México: germinación y crecimiento en sustratos orgánicos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(spe5). doi:ISSN 2007-0934

González Alamilla, E., González Cortázar, M., Carranza , B., Rivas Jacobo, M., Herrera Corredor, C., Ojeda Ramírez , D., . . . Rivero, N. (2019). Chemical Constituents of *Salix babylonica* and Their Antibacterial Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Animal Bacteria. *Molecules*, 24. doi:10.3390/molecules24162992

Macagual, C. I. (2002). *Manual de Tecnicas de Propagacion de Especies Vegetales Leñosas Promisorias para el Piedemonte de Caquetá*. doi:ISBN: 958-96882-8-4

Ortega Martínez, L. D., Sánchez Olarte, J., Díaz Ruiz, R., & Ocampo Mendoza, J. (Diciembre de 2010). EFECTO DE DIFERENTES SUSTRATOS EN EL

CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* MILL). *Ra Ximhai*, 6(3), 365-372. doi:ISSN: 1665-0441

Osuna Fernández, H. R. (s.f.). Manual de propagación de plantas superiores. En *Manual de propagación de plantas superiores 2016* (págs. 47-67). Universidad Nacional Autónoma de México.

Reyes, J. (2015). *Guía de técnicas, métodos y procedimientos de reproducción asexual o vegetativa de las plantas*. Santo Domingo.

Simon, J. E., Chadwick, A. F., & Craker, L. E. (1984). *Herbs: An Indexed Bibliography 1971-1980 the Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone*. Archon Books; First Edition. Recuperado el 04 de 2021

Torres Rojo, J. M. (2020). *Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina al año 2020*. Roma: FAO.

Valero, D., & de Cárcamo, M. (11 de Enero de 2017). *La contaminación por nutrientes*. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de FUSADES: <http://fusades.org/lo-ultimo/blog/la-contaminaci%C3%B3n-por-nutrientes-nitrogeno-y-fosforo>

Wahab, G., Sallam, A., Elgaml, A., Lahloub, M. F., & Afif, M. (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of *Salix babylonica* extracts. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 1-6. Recuperado el 30 de 07 de 2020, de https://www.researchgate.net/publication/325229842_Antioxidant_and_antimicrobial_activities_of_Salix_babylonica_extracts.

4. CAPÍTULO

4.1 Evaluación de protección por inducción de resistencia por elicitores (Ácido salicílico y Metil jasmonato) en plantas de salix.

4.1.1 Resumen

Este capítulo tuvo como objetivo establecer una metodología para evaluar la inducción de defensa en *Salix*, considerando el proceso de infección del complejo ambrosial y evaluar visualmente el efecto de los elicitores en *Salix*. Los elicitores son sustancias de fuentes inorgánicas y orgánicas, que pueden inducir efectos fisiológicos y cambios en la activación de respuestas defensivas ante la presencia de patógenos, agentes mecánicos, químicos o ambientales. Se realizaron varios experimentos, donde se evaluaron las diferentes condiciones para introducir el hongo asociado al complejo ambrosial (*Fusarium solani*) en *Salix*: tallos barrenados con esporas a 1×10^4 , 1×10^6 , agua esterilizada, tallos raspados con FC a 100%, 75%, 50%, 25%, 30%, 20%, 10% y 0%, en invernadero de 18°C a 32°C 12 h luz y 12 h oscuridad o en condiciones óptimas de laboratorio 25 ± 2°C 16 h luz y 8 h oscuridad. Se usaron estacas que enraizaron hasta generar una planta viable para perforar con al menos 1 metro de altura, hojas sanas y largas de al menos 12 cm, con 5 repeticiones por tratamiento, se evaluaron en una serie de días diferentes, con datos y parámetros evaluados en cada una de las etapas de este experimento.

4.1.2 Introducción

El proceso de elicitación se define como “la inducción o aumento de la biosíntesis de metabolitos debido a la adición de pequeñas cantidades de elicitores”. Existen gran cantidad de elicitores que, según su origen, pueden ser clasificados en biótico entre los que se incluyen:

- 1) Enzimas, fragmentos de la pared celular de hongos patógenos, polisacáridos derivados de microorganismos (quitina o glucanos) y glicoproteínas.
- 2) Fitoquímicos producidos por las plantas en respuesta a daños físicos, ataques fúngicos o bacterianos, polisacáridos derivados de la pared celular (pectina y celulosa), fragmentos de pectina (formados por la acción de microorganismos sobre la pared celular).
- 3) Quitosano, glucanos, jasmonato de metilo (MeJA), ácido salicílico (SA) y etileno entre otros.

Los elicitores abióticos son sustancias de origen no biológico que pueden ser de origen químico tales como sales inorgánicas, metales pesados y compuestos que perturban la integridad de la membrana plasmática o factores físicos como heridas mecánicas, radiación ultravioleta, temperaturas extremas y altas presiones cuya función principal es inducir las respuestas de defensa que tienen lugar en las plantas (Cai, Kastell, Knorr, & Smetanska, 2012).

En presencia de elicitores, las plantas pueden responder al ataque de patógenos, insectos y herbívoros y a otros estreses bióticos y abióticos mediante la activación de un conjunto de mecanismos de defensa que incluyen la biosíntesis de metabolitos, respuesta hipersensible y barreras de defensa estructurales tales como la deposición de lignina sobre la pared celular (Vasconsuelo & Boland, 2007).

En este experimento se usaron dos elicitores, el ácido salicílico (SA) y Jasmonato de metilo (MeJA). El SA es usado como un componente clave de señalización

en la resistencia a las enfermedades y un regulador de otros procesos fisiológicos importantes ha estimulado un interés considerable en su metabolismo (Chuanfu & Zhonglin, 2011). Se ha documentado la inducción de resistencia a insectos por parte de inductores como el MeJa, la vía del ácido jasmónico (JA) funciona bien contra los insectos al mediar la expresión de defensas tanto directas como indirectas. JA se acumula en las plantas cercanas al sitio del ataque de los herbívoros y estimula la producción de muchos compuestos defensivos. La resistencia inducida en las plantas da como resultado una reducción de las pérdidas debido a los herbívoros, un menor uso de insecticidas, mejores rendimientos de los cultivos y un entorno más seguro para vivir. Además, la inducción de resistencia por inductores como JA y SA ha planteado la posibilidad de utilizar la resistencia inducida a insectos para el manejo de plagas (War, Paulraj, War, & Ignacimuthu, 2011).

Por lo anterior en este trabajo se evaluó en primer lugar el efecto de elicitores en la colonización de *Fusarium solani* en *Salix* en condiciones de invernadero y en segundo lugar se evaluó el efecto de elicitores en la fitotoxicidad del filtrado de *Fusarium solani* en plantas *in vitro*. Para primer objetivo fue necesario establecer un protocolo de inoculación del hongo (*Fusarium solani*) en el tallo barrenado (4.1.3.2), profundidad y concentración de inóculo (4.1.3.3)

4.1.3 Materiales y métodos

4.1.3.1 Establecimiento de estacas de *Salix* en condiciones de invernadero

Se cortaron estacas de un árbol madre que se encuentra ubicado en Zapopan estado de Jalisco (coordenadas DMS 20° 41' 55.69" N 103° 28' 36.72" O). Los esquejes fueron de 30 cm de largo con un grosor aproximado entre 1.5 y 2.5 cm, una vez cortados se colocaron en una solución de agua con enraizador (RADIX 10,000). La solución fue de 10 g/L de RADIX 10,000 durante 72 h a temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) bajo sombra. Una vez transcurrido el tiempo se retiraron de la solución y se colocaron en bolsas con capacidad de 4L que contenían una mezcla de sustratos 50% peatmoss y 50% perlita.

Para la realización de los ensayos se localizaron árboles de *Salix bonplandiana* en los alrededores del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) ubicado en Camino Arenero 1227 El Bajío, Zapopan, Jalisco. Se seleccionaron árboles que no presentaran daños o síntomas de enfermedades y se cortaron estacas con un largo de 30 cm.

Durante cuatro meses los riegos se realizaron cada tercer día y se fertilizaron cada semana con 2g/L, de fórmula 24-8-16 (N-P-K) marca Peter's, a cada estaca se le aplicaban 100mL de fertilizante diluido. Tras cuatro meses de desarrollo de las plantas, se comenzaron a realizar los protocolos de inoculación.

4.1.3.2 Evaluación de la colonización de *F. solani* en heridas de tallo (raspado y barrenado)

Las plantas propagadas por esqueje (ver sección 4.1.3.1) con 3 meses de edad y con un diámetro de tallo entre 1.6 a 2.5 cm, se les realizaron dos tipos de heridas en el tallo (barrenado y raspado). En el caso del barrenado, el daño fue realizado por medio de una aguja con un diámetro de 1mm, la cual fue desinfectada en alcohol 96° para después ser flameada, una vez que se enfrió la aguja, se introdujo al 40 o 20% del grosor del tallo, depende del grosor del tallo, fue la profundidad en la que se introdujo la aguja, se midió con un Vernier

el grosor de cada planta y de cada una de ellas, se sacó la profundidad a la que sería introducida la aguja. Para el raspado se realizó una herida con una hoja de bisturí, hubo dos profundidades de este raspado, al 20% (raspado superficial) y 40% (raspado profundo) respectivamente al grosor de la planta, donde se sacaba el diámetro de la planta para después sacar la profundidad a la que se haría el raspado. La hoja de bisturí se flameaba cada vez que se haría el daño al tallo de la planta.

Los tratamientos sin inóculo solo se les realizó el daño y fueron sellados con plástico (empleye) para evitar la introducción de hongos y bacterias cosmopolitas. A los tratamientos que se les inoculó *Fusarium solani*, aislado de un escarabajo ambrosial nativo. Se realizó una dilución de la suspensión de esporas, para lograr obtener una solución con un número de esporas de 1×10^6 , a partir de esta solución se inocularon las plantas.

Se colocaron tres plantas por tratamiento, una vez que se realizó la herida a los tratamientos correspondientes se les inoculó con la solución de esporas (consultar sección 4.3.1.1), con ayuda de una micropipeta se aplicó 50µL dentro de la herida y posteriormente se selló con plástico (empleye).

Se usaron tres repeticiones por tratamiento con ocho tratamientos (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1.- Tratamientos para el protocolo de infección de *F. solani* en heridas de tallo con raspado y barrenado en plantas de *S.bonplandiana*.

Tratamiento	Tipo de daño	Profundidad	Inoculación	Concentración [esporas/mL]
TAB1	Barrenado	40%	/	0
TAB2	Barrenado	20%	/	0
TAB3	Barrenado	40%	<i>F. solani</i>	1×10^6
TAB4	Barrenado	20%	<i>F. solani</i>	1×10^6
TAR1	Raspado	20%	/	0
TAR2	Raspado	40%	/	0
TAR3	Raspado	20%	<i>F.solani</i>	1×10^6
TAR4	Raspado	40%	<i>F.solani</i>	1×10^6

A los 30 días después de efectuada la inoculación con esporas se cortó el tallo transversalmente dos centímetros arriba y dos centímetros abajo del daño y posteriormente se realizó un corte longitudinal exactamente al radio de la herida

efectuado, posteriormente se determinó el área rectangular del daño mecánico y el área de la colonización del hongo en el tallo de la planta.

4.1.3.3 Evaluación de la colonización de *Fusarium solani* en heridas de tallo a diferentes porcentajes de profundidad del daño por barrenado

Después de que se obtuvo el tipo de daño que ocasionaría una mayor colonización dentro de la planta sin causar su muerte, se buscó hacer un protocolo para determinar la profundidad del barrenado, con el mismo objetivo, por lo que se pusieron con una profundidad del 50% y 80%, con los tratamientos que se describen a continuación.

Para este experimento se emplearon plantas propagadas por esqueje (ver sección 4.3.1.1) con cuatro meses de edad y con un diámetro de tallo entre 1.6 a 2.5 cm, se les realizaron heridas de barrenado con diferente profundidad. Cada tratamiento contenía cinco repeticiones (plantas). A diferencia del protocolo anterior, en este se usó un taladro y una broca (0.5mm de diámetro) para realizar el barrenado, la broca se sumergió en alcohol 96° y se flameó cada vez que se cambiaba de planta. Para los tratamientos sin inoculación, se le puso como sustancia, agua esterilizada, a los otros tratamientos se agregó su correspondiente suspensión de esporas a 1×10^4 y 1×10^6 , se les agregó con una micropipeta 50µL de solución y después se sellaron con plástico (Emplaye) para evitar que se derramara la sustancia.

Cuadro 4.2.- Tratamiento para el protocolo de infección por barrenado de tallo a diferentes profundidades en plantas de *S. bonplandiana*

Tratamiento	Tipo de daño	Profundidad	Inoculación	Concentración [esporas/mL]
TP1	Barrenado	50%	/	0
TP2	Barrenado	80%	/	0
TP3	Barrenado	50%	<i>F. solani</i>	1×10^4
TP4	Barrenado	80%	<i>F. solani</i>	1×10^4
TP5	Barrenado	50%	<i>F. solani</i>	1×10^6
TP6	Barrenado	80%	<i>F. solani</i>	1×10^6

A los 30 días después de efectuada la inoculación con esporas se cortó el tallo transversalmente dos centímetros arriba y dos centímetros abajo del daño y posteriormente se realizó un corte longitudinal exactamente al radio de la herida efectuada, posteriormente se determinó el área rectangular del daño mecánico y el área de la colonización del hongo en el tallo de la planta.

4.1.3.4 Evaluación de la inducción de resistencia por elicitores (AS y MeJa) en plantas de *S. bonplandiana* en condiciones de invernadero.

En este experimento se emplearon plantas obtenidas a partir de semillas, las cuales fueron germinadas en condiciones *in vitro* en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), sin recambios de medio de cultivo, en condiciones de fotoperiodo (16h luz/8h oscuridad) a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Transcurridos cuatro meses bajo esas condiciones las plantas fueron trasplantadas en sustrato (1:1 peatmoss-perlita) en charolas con domo en condiciones de fotoperíodo de 16h luz/8h oscuridad, a una temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se les agregó enraizador en polvo directamente a la raíz (Radix® 10,000), y se mantuvieron bajo estas condiciones durante cinco meses. Posteriormente se trasplantaron a sustrato (1:1 peatmoss-perlita) en bolsas con una capacidad de 4L; durante el trasplante se les agregó enraizador en polvo directamente en la raíz (Radix® 10,000) y cada semana se realizaron fertilizaciones con una solución de 24-8-16 de NPK (Peters) a una concentración de 1g/L hasta que se adicionaron los elicitores a las plantas (durante 3 meses).

Para el experimento se emplearon las plantas obtenidas en condiciones *in vitro* descritas anteriormente con 12 meses de edad, con 1 m de altura y un grosor de tallos de entre 1.6 a 2.5 cm aproximadamente. En el día -5 (días previos a la inoculación del hongo) se agregaron los elicitores a la planta por medio de aspersión en las hojas de planta, se hicieron tres atomizaciones por planta, considerando que a cada planta se le agregaba un volumen aproximado de 200µL de elicitor, en concentraciones finales de 0.1mM de MeJA y 0.5mM de SA., Para el día cero se realizaron las perforaciones al 80% de profundidad, dependiendo el grosor de cada planta, la metodología para la perforación e

inoculación fue realizado por medio de un taladro y una broca de 0.5mm de diámetro, la cual fue desinfectada en alcohol 96° para después ser flameada. Una vez que se enfrió la broca, se introdujo al 80% del grosor del tallo, depende del grosor del tallo fue la profundidad en la que se introdujo la broca, se midió con un Vernier el grosor de cada planta y de cada una de ellas, se sacó la profundidad a la que sería introducida la broca. A los tratamientos que se les inoculó *F. solani*, se realizó una dilución de la suspensión de esporas, para lograr obtener una solución con un número de esporas de 1×10^6 por mL. Los tallos fueron evaluados en los días 0, 1, 3, 5 y 15 días después de la inoculación del hongo, cada día de evaluación contenía cinco repeticiones de cada tratamiento y se montaron seis tratamientos (Cuadro 4.3), los cuales tenían 25 repeticiones cada uno. Sin embargo, en los días 0, 1, 3, 5 y 15 se evaluaban, 5 repeticiones de cada tratamiento. En los tratamientos sin inóculo solo se les realizó el daño y se les aplicó agua esterilizada y fueron sellados con plástico (empleye) para evitar la introducción de hongos y bacterias cosmopolitas. La aplicación tanto de solución con esporas como la de agua estéril, fue de 50 μ L dentro de la herida y después se sellaba con empleye.

Cuadro 4.3.- Descripción de tratamientos para la inducción de elicitores en tallos de plantas de *Salix* infectadas con *F. solani* en condiciones de invernadero.

Tratamiento	Descripción
TFE1	Testigo
TFE2	0.5 mM Ácido salicílico (SA)
TFE3	1×10^6 esporas/mL de <i>Fusarium solani</i> (Fso)
TFE4	0.5 mM de SA + 1×10^6 esporas/mL de Fso
TFE5	0.1 mM de Metil-Jasmonato (MeJa)
TFE6	0.1 mM de MeJa + 1×10^6 esporas/mL de Fso

Después de la inoculación de las plantas con esporas de *F. solani* se evaluaron a los días 0, 1, 3, 5 y 15 días, se tomaron fotos de la planta, así mismo se cortó el tallo transversalmente dos centímetros arriba y cinco centímetros abajo del daño y posteriormente se realizó un corte longitudinal exactamente al radio de la herida efectuada, posteriormente se calculó el área rectangular del daño mecánico y el área de la colonización del hongo en el tallo de la planta.

4.1.3.5 Obtención del filtrado del cultivo de hongos (FC).

Como fuente de inóculo para la producción del FC se utilizaron esporas de *Fusarium solani*. Se inocularon 5 mL de una suspensión de esporas de 1×10^6 esporas/mL en matraces Erlenmeyer de 1 L con 0.5 L de medio PDB (Potato Dextrose Broth). En seguida se colocaron en agitación a 200 rpm a 28°C y en oscuridad total durante 7, 15 y 30 días, esto para conocer el tiempo necesario para la producción de metabolitos fitotóxicos. Posteriormente, se recolectó el producto formado en cada tiempo y se centrifugó a 3000 rpm a 25°C durante 5 min para la separación del micelio. Después, en campana de flujo laminar se filtró el sobrenadante con filtros de papel. El FC se recuperó en recipientes esterilizados, se pesó y almacenó a -20°C hasta su uso.

4.1.3.6 Establecimiento de los protocolos de evaluación *in vitro* con el FC proveniente de *F. solani*.

Se colectaron frutos del sauce (*S. bonplandiana*) y se seleccionaron las cápsulas con una coloración verde y amarilla, que contienen las semillas viables, mientras que las cápsulas con una coloración café y negra fueron eliminadas (semillas no viables). Después del proceso de desinfección las semillas fueron establecidas en condiciones *in vitro* en los diferentes tratamientos de medio de cultivo para el evaluar el desarrollo de las plántulas (Figura 1 D).

Los frutos se recolectaron en noviembre del 2019 en Zapopan en el Estado de Jalisco, México (coordenadas DMS 20° 41' 55.69" N 103° 28' 36.72" O). En condiciones asépticas las cápsulas fueron separadas del fruto y se disectaron cuidadosamente para extraer las semillas. Las semillas se colocaron en una solución de cloro comercial al 1% (v/v) durante 15 min, posteriormente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas fueron transferidas al medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) donde germinaron. El medio fue adicionado con 8 g/L de agar sin reguladores de crecimiento. El medio fue ajustado a un pH de 5.8 con NaOH después se esterilizó durante 15 min. a una temperatura de 121°C.

Se realizó la multiplicación de plantas de *S. bonplandiana* por microesquejes hasta que tuvieron una altura de aproximadamente 2cm en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 ° C en fotoperíodo de 16h luz y 8h oscuridad.

4.1.3.7 Evaluación de fitotoxicidad de los FC de *F. solani* en hoja de *S. bonplandiana*.

Para evaluar las concentraciones del filtrado a las que se expondría las plantas *in vitro* se evaluaron 10 tratamientos, cada uno con 3 repeticiones, en los tratamientos se usaron distintas concentraciones del FC. Se realizó una herida superficial (raspado) con un pincel con las cerdas recortadas removiendo la capa cerosa de las hojas de *Salix bonplandiana*, provenientes de plantas de invernadero con una longitud aproximada de 12 cm de largo. Las hojas seleccionadas fueron extraídas de la parte intermedia del tallo de la planta de *S. bonplandiana*. Posteriormente en condiciones de asepsia, se realizó la siguiente manipulación, las hojas cortadas se sumergieron tres veces en una solución estéril de cloro comercial al 6% durante intervalos de tiempo de 5 s; posteriormente se limpió la superficie de la hoja (tanto del haz como del envés) con un algodón con alcohol al 70% y después se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, finalmente se dejaron secar sobre una toalla de papel. Después se colocaron en una caja de Petri esterilizada donde se les removió la cera del haz de la hoja, por medio de un raspado con ayuda de la punta de un pincel con las cerdas recortadas, las hojas se colocaron en un recipiente de plástico con una cama de papel toalla que se humedecía con agua estéril 2mL diarios para mantener la humedad dentro del recipiente de plástico, en el área de la herida se aplicó una gota de 25 μ L de filtrado en diferentes concentraciones (Cuadro 4.4). El recipiente estuvo bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C.

Cuadro 4.4.- Tratamientos y controles establecidos para la evaluación de la fitotoxicidad del FC en hojas de *S. bonplandiana* en condiciones *in vitro*.

TRATAMIENTO	FC [%]	ESTERILIZADO (SI / NO)	ML FC/ ML AGUA
CHF1	0	Sí	0mL /0.25mL
THF1	10	Sí	0.1mL /0.9mL
THF2	25	Sí	0.25mL /0.75mL
THF3	50	Sí	0.50mL /0.50mL
THF4	100	Sí	0.25mL /0mL
CHF2	0	Sí	0mL /0.25mL
THF5	10	No	0.1mL /0.9mL
THF6	25	No	0.25mL /0.75mL
THF7	50%	No	0.50mL /0.50mL
THF8	100%	No	0.25mL /0mL

El FC que se obtuvo se dividió en dos partes iguales, un frasco en el que se mantuvo en las condiciones que se mencionaron en el procedimiento de la sección 4.1.3.5 y otro que se esterilizó en autoclave, este último paso para evaluar si se mantenía la misma fitotoxicidad con el FC estéril (calor húmedo 121°C por 15 min) al FC que no se esterilizó (Figura 4.1).

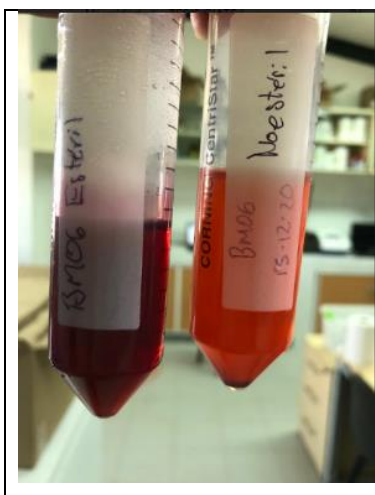


Figura 4.1.- Filtrado estéril (izquierda) y filtrado no estéril (derecha).

Posteriormente se efectuó una segunda evaluación con el filtrado estéril y no estéril con menores concentraciones (Cuadro 4.5)

Cuadro 4.5.- Tratamientos que se usaron en el punto (4.1.4.4) con los filtrados de la (figura 4.1).

TRATAMIENTO	FC [%]	ESTERILIZADO (SI / NO)
CHF1	0	Sí
THF1	10	Sí
THF2	20	Sí
THF3	30	Sí
CHF2	0	Sí
THF4	10	No
THF5	20	No
THF6	30	No

4.1.3.8 Establecimiento del protocolo *in vitro* con el FC y elicitores a diferentes concentraciones

Una vez determinada la concentración de filtrado a emplear en las plantas *in vitro*, se evaluó si el filtrado y elicitores a distintas concentraciones no causaban la muerte de las plantas *in vitro* (Cuadro 4.6).

Cuadro 4.6.- Tratamientos de evaluación del efecto de elicitores en hojas de salix.

Tratamiento	Producto agregado	Concentración	Volumen/Planta
TEH1	Agua estéril	-	50µL
TEH2	*FC	10%	50µL
TEH3	*MeJa	1X10 ⁻⁵ M	50µL
TEH4	*MeJa	1X10 ⁻⁷ M	50µL
TEH5	*SA	1X10 ⁻⁵ M	50µL
TEH6	*SA	1X10 ⁻⁷ M	50µL

*FC.- filtrado del cultivo de hongos, Metil jasmonato (MeJA. Methyl jasmonate), ácido salicílico (SA. Salicylic Acid)

Las filas remarcadas con rojo fue el tratamiento que se seleccionó para los experimentos posteriores.

Los tratamientos se evaluaron el día 0 y el 4to después de que se montó, el resultado se tomó en base a la clorosis mostrada, no se tomaron datos cuantificables. Este contenía cuatro repeticiones cada tratamiento, las plantas de un mismo tratamiento se encontraban en una misma unidad experimental.

4.1.3.9 Evaluación de la inducción de protección con elicitores a plantas *in vitro* ante los compuestos fitotóxicos del FC de *F. solani*

Una vez que se aseguró que las concentraciones de elicitores y filtrado no mataban a las plantas de *Salix in vitro*, se estableció el experimento para evaluar la protección de los elicitores ante los compuestos fitotóxicos del FC de *F. solani* a una concentración del 10%

Después de que se cumpliera un mes de haberse realizado la micropropagación de *Salix*, se seleccionaron plantas con altura de al menos 6cm y más de 5 hojas. En el día -5 se hizo la aplicación de los elicitores a sus tratamientos correspondientes (Cuadro 4.7).

Cuadro 4.7.- Tratamientos del experimento de la inducción elicitores ante el FC.

Clave	Tratamiento	<i>Días de evaluación</i>						
		D-5*	D0*	D1*	D2*	D3*	D5*	D15*
TIE1	Testigo		M(5)	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)
TIE2	1x10 ⁻⁵ M de SA	+	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)
TIE3	<i>F. solani</i>			M(5)	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)
TIE4	1x10 ⁻⁵ M de SA + <i>F. sol.</i>	+		M(5)	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)
TIE5	1x10 ⁻⁵ M de MeJa	+	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)
TIE6	1x10 ⁻⁵ M de MeJa + <i>F. sol.</i>	+		M(5)	M(5)	M(5)	M(5)	M(5)

(+) Día en el que se aplicó el elicitor. M=Toma de muestras (5 plantas)
Las plantas se mantuvieron a 25 ± 2 ° C con un fotoperiodo de 16h luz (blanca) /8h oscuridad.

4.1.3.10 Diseños experimentales y análisis de datos

Para la colonización de *F. solani* en heridas de raspado y barrenado se empleó un diseño experimental completamente al azar los datos presentados corresponden a tres repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de Tukey (P<0.05).

Para evaluar la profundidad del barrenado y las concentraciones de esporas se empleó un diseño experimental completamente al azar, los datos presentados

corresponden a cinco repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En el experimento la evaluación en la inducción de resistencia por elicitores (AS y MeJa) en plantas de *Salix* en condiciones de invernadero se empleó un diseño experimental completamente al azar, los datos presentados corresponden a cinco repeticiones por tratamiento, en cada uno de los cinco días evaluados. Los datos obtenidos durante el experimento se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se determinó por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Con el establecimiento del protocolo *in vitro* con el FC y elicitores a diferentes concentraciones se empleó un diseño experimental completamente al azar, no hubo datos, las evaluaciones corresponden a cuatro repeticiones por tratamiento, se sometió a una comparación de clorosis a lo largo de los días en la planta para determinar la concentración adecuada.

Para la evaluación de protección con elicitores a plantas *in vitro* ante los compuestos fitotóxicos del FC de *F. solani* se empleó un diseño experimental completamente al azar, los datos presentados corresponden a cinco repeticiones por tratamiento, en cada uno de los seis días evaluados. No se tomaron datos.

4.1.4 Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en la variable de área infectada en los siguientes cuadros y/o figuras se les restó el área de daño por manejo de cada unidad experimental, por lo que se cuantificó únicamente el avance que se obtenía de la inoculación.

4.1.4.1 Evaluación de la colonización de *F. solani* en heridas de tallo (raspado y barrenado).

Después de causar heridas de raspado y barrenado en el tallo en la planta de *Salix* con ayuda de material estéril, los tratamientos TAB1 y TAB2 solamente

mostraron daño mecánico causado por las heridas efectuadas durante el procedimiento de barrenado, sin embargo, no se observó daño alguno causado por la infección de microorganismos (fenolización del tejido), ya que después de realizarse la herida en el tallo, esta se envolvió con plástico para evitar la infección por algún microorganismo cosmopolita, por lo que solamente se observó en el área de la herida un daño mecánico.

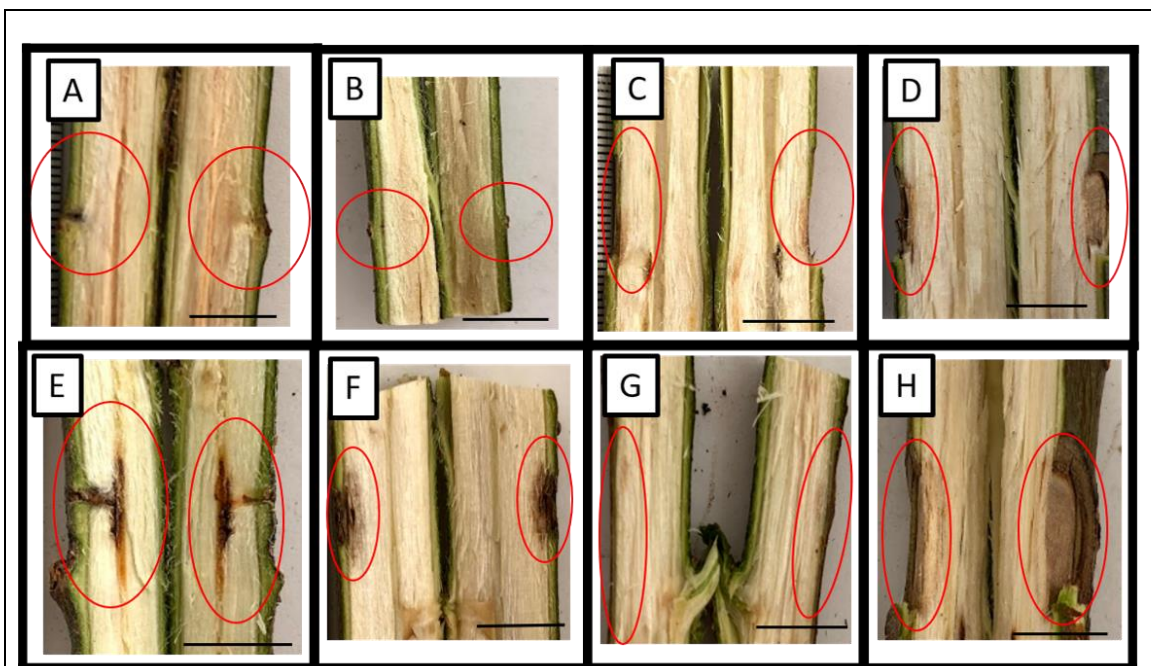


Figura 4.2.- Infección con *F. solani* en plantas de *S. bonplandiana* a los 30 días de inoculación. A. TAB1.- Barreno profundo; B. TAB2.- Barreno superficial; C. TAR1.- Raspado profundo; D. TAR2.- Raspado superficial; E. TAB4.- Barreno superficial + *F. solani*; F. TAB3.- Barreno profundo + *F. solani*; G. TAR4.- Raspado superficial + *F. solani*; H. TAR3.- Raspado profundo + *F. solani*.

En cambio, con los tratamientos TAB3 y TAB4, que fueron inoculados con esporas de *F. solani* la planta mostró una Respuesta de Hipersensibilidad (RH), (Figura 4.2 E-F), se reconoce por la presencia de varias células muertas con coloración café en el sitio de infección (Sanzón Gómez & Zavaleta Mejía, 2011). La RH se define como una muerte rápida de células vegetales asociada con la restricción del crecimiento de patógenos (Mur, Kenton , Lloyd , Ougham , & Prats, 2007). A los 30 días de inoculado el tallo se logró observar que al ser una mayor profundidad en el TAB3 el área media de infección fue mayor con 47.67 ± 5.51

mm² en comparación con el tratamiento TAB4 con 42.0±20.0 mm², sin embargo, no lo suficiente para mostrar diferencia significativa (Cuadro 4.8).

Cuadro 4.8.- Evaluación de parámetros de daño de tallo e infección de *F. solani*.

Tratamiento	Herida de tallo por barrenado		Tratamiento	Herida de tallo por raspado	
	AD [mm ²] ^{°*}	AI [mm ²] ^{°*}		AD [mm ²] ^{°*}	AI [mm ²] ^{°*}
TAB1	8.0±0.0ab	NP	TAR1	39.3±23.9b	NP
TAB2	6.67±1.15b	NP	TAR2	54.67±9.87b	NP
TAB3	9.33±1.15a	47.67±5.51a	TAR3	120.67±17.01a	NP
TAB4	10.00±2.0a	42.0±20.0a	TAR4	67.3±20.0b	NP

* AD. - Área de daño, AI. - Área infectada. En el área infectada del TB3 y TB4 se realizó una resta del área de daño.
[°] En el Cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre las columnas denotan diferencia significativa LSD (P<0.05).
 NP.- No Presentó

En los tratamientos en los que se efectuó un daño por raspado tanto en los controles (TAR1 y TAR2) (Cuadro 4.7) como en los tratamientos donde se llevó a cabo la inoculación de esporas de *F. solani* (TAR3 y TAR4) (Figura 4.2 C-D y G-H), solamente se presenta un daño mecánico y no presenta ninguna clase de necrosis dentro del tallo, lo que sugiere que con este tipo de daño *F. solani* no logra infectar la planta, por este método a los 30 días después de efectuada la herida.

4.1.4.2 Evaluación de la colonización de *F. solani* en heridas de tallo con diferentes porcentajes de profundidad del daño por barrenado

A los 30 días de causar el daño por barrenado en los controles (TP1 y TP2), solo se observa un daño mecánico, sin embargo, no se observó el daño causado por infección de hongo (Cuadro 4.9).

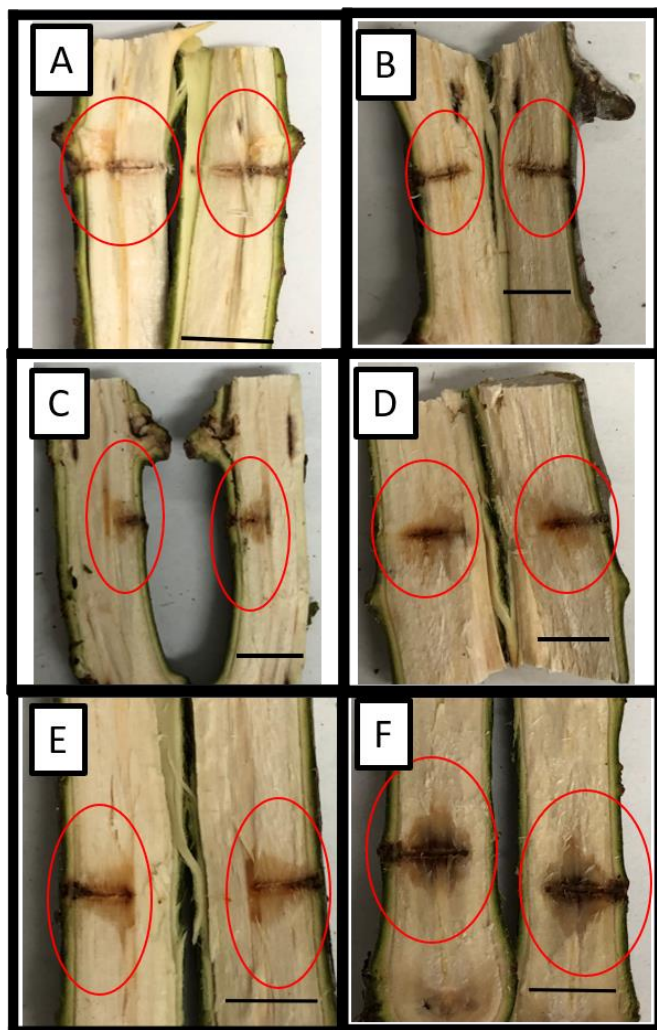


Figura 4.3.- Infección de *F. solani* en plantas de salix después de 30 días de inoculación en heridas de tallo por barrenado a diferentes profundidades (50 y 80% de daño).

A.TP1.- 50% de barrenado + agua, B. TP2.- 80% de barrenado + agua, C. TP3.- 50% de barrenado + 1×10^4 esporas de *F. solani*, D. TP4.- 80% de barrenado + 1×10^4 esporas de *F. solani*, E. TP5.- 50% de barrenado + 1×10^6 esporas de *F. solani*, F. TP6.- 80% de barrenado + 1×10^6 esporas de *F. solani*.

Estadísticamente (Cuadro 4.9) hubo diferencias significativas del área infectada entre los tratamientos inoculados con esporas de *F. solani* (TP3, TP4, TP5 y TP6), en el que se observó un menor daño en el tratamiento TP3 seguido del tratamiento TP4 con 1.2 veces más comparado con el tratamiento TP3, ambos tratamientos se inocularon con una concentración de 1×10^4 esporas/ mL de *F. solani*, sin embargo, la profundidad del daño por barrenado fue menor en el tratamiento TP3 (50% de daño por barrenado) comparado con el TP4 el cual tiene un 80% de daño por barrenado (Cuadro 4.9, Figura 4.3 C-D).

Cuadro 4.9.- Evaluación de parámetros en la profundidad del barrenado en plantas de *Salix*.

Tratamiento	AD [mm ²] ^{o*}	AI [mm ²] ^{o*}
TP1	12.40±0.89	0.00±0.00e
TP2	20.00±3.74	0.00±0.00e
TP3	12.00±1.41	69.60±19.92d
TP4	19.20±3.03	178.0±45.3c
TP5	14.80±1.10	133.2±17.98b
TP6	20.40±4.98	261.6±37.5a

* AD. - Área de daño, AI. - Área infectada.

° En el Cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre las columnas denotan diferencia significativa LSD (P<0.05).

En el caso de los tratamientos TP5 y TP6 presentaron más daño de infección por el hongo comparado con los tratamientos inoculados con menor concentración de esporas de *F. solani*, tratamientos TP3 y TP4 (1X10⁴ esporas/mL). También se observó el mismo comportamiento con respecto al área de daño causado por barrenado, presentando el tratamiento TP6 (80% de daño por barrenado) un área de daño por infección de 1.96 veces más comparado con el tratamiento TP5 y 1.47 veces más comparado con el tratamiento TP4, que tiene el mismo porcentaje de daño por barrenado (80% de daño por barrenado) pero con una menor concentración de esporas de *F. solani*. Estos resultados concuerdan con los reportados por (González Cárdenas , Maruri García, & González Acosta, 2005) donde el aumento de la concentración de esporas incrementó la muerte celular de las plantas, provocando una mayor mortalidad en aquellas con mayor concentración de esporas.

4.1.4.3 Inducción de resistencia por elicitores (AS y MeJa) en platas de salix en condiciones de invernadero.

En el caso del experimento establecido en tallos de plantas jóvenes provenientes de cultivo *in vitro* no se observaron síntomas por la colonización del hongo en el día 15 (Figura 4.4), solamente se observa el daño mecánico causado por la herida generada por el barrenado (cuadro 4.10).

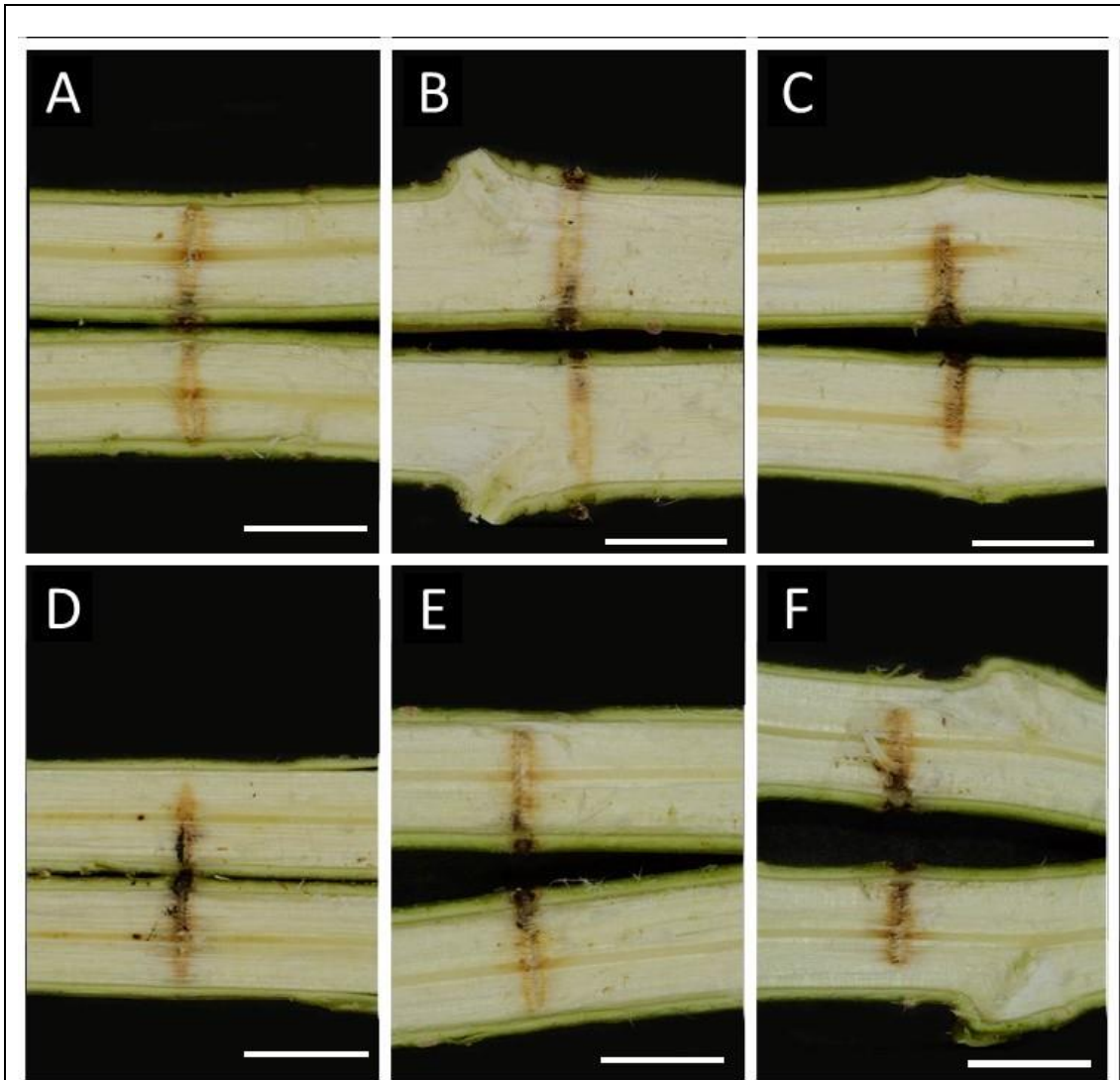


Figura 4.4.- Inducción de elicitores en plantas de *Salix* infectadas con *F. solani* (después de 15 días) en heridas de 80% de daño por barrenado en tallo bajo condiciones de invernadero.

A.TFE1.- Agua, B. TFE2.- 0.5mM de ácido salicílico (SA), C. TFE3.- 1×10^6 esporas de *F. solani*, D. TFE4.-0.5mM de ácido salicílico + 1×10^6 esporas de *F. solani*, E. TFE5.- 0.1mM de Metil Jasmonato. F. TFE6.- 0.1mM de MetilJasmonato + 1×10^6 esporas de *F. solani*. Medida de la barra 1cm.

Por lo que se sugiere que en experimentos futuros se realicen cortes histológicos que permitan observar si existe colonización del hongo en los tejidos de la planta, así como estudios a nivel bioquímico y molecular que permitan determinar si se está disparando la respuesta de inducción de resistencia por elicitores en los tratamientos que se les aplicó tanto el elicitor como el hongo. Esperando

observar que el uso del elicitor (SA y MeJA) permita la activación de una respuesta defensiva de la planta ante patógenos.

Cuadro 4.10.- Evaluación del daño de tallo en el experimento de la inducción de resistencia por elicitores en plantas de *S.bonplandiana*

Tratamiento	AD [mm ²] ^{o*}	AI [mm ²] ^{o*}
TFE1	14.4±2.61	0.00±0.00a
TFE2	10.8±1.09	0.00±0.00a
TFE3	15.60±1.67	0.00±0.00a
TFE4	15.20±2.28	0.00±0.00a
TFE5	14.40±1.67	0.00±0.00a
TFE6	16.0±1.41	0.00±0.00a

* AD. - Área de daño, AI. - Área infectada.

° En el Cuadro se representa la media con la desviación estándar y las diferentes letras entre las columnas denotan diferencia significativa Tukey (P<0.05).

4.1.4.4 Fitotoxicidad de los FC de *F. solani* en hojas de *Salix*.

La colorimetría de las heridas en las hojas muestra distintas etapas de necrosis por las proteínas fitotóxicas (Velásquez Valle & Reveles Torres, 2017) en los controles (CHF1, remoción de cera y aplicación de agua esterilizada), (CHF2, remoción de cera y aplicación de agua esterilizada) se observa una clorosis y un verde mate, ya que el daño es únicamente mecánico, sin avance como los que llevan un porcentaje del FC dentro de las heridas, sin embargo la diferencia de avance en la necrosis no es significativo conforme aumenta la concentración del FC. (Cuadro 4.11).

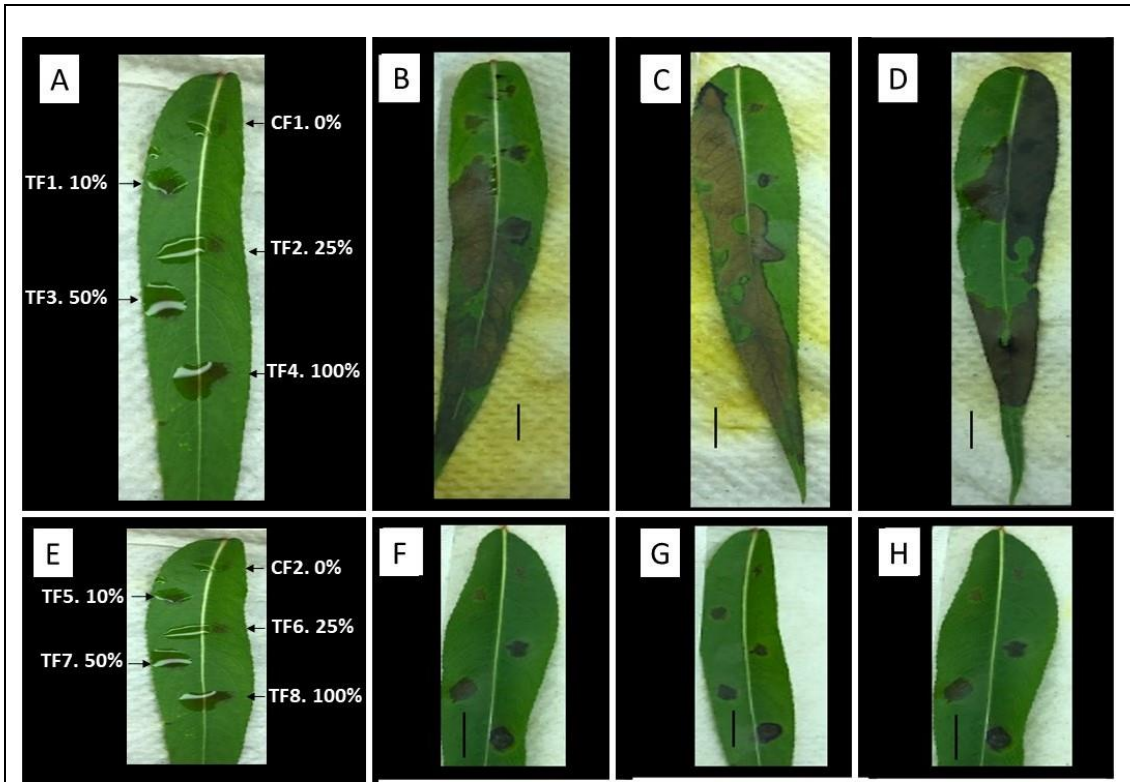


Figura 4.5.- Evaluación de fitotoxicidad de FC (0 al 100%) en hojas de Salix en condiciones *in vitro* 0 a 100% de FC (día 3).

(A y E). Distribución de gotas de tratamientos en hoja de Salix; (B-D) Tratamientos estériles CF1 a la TF4; (F-H) Tratamientos no estériles CF2, TF5 a la TF8. La barra corresponde a 1cm

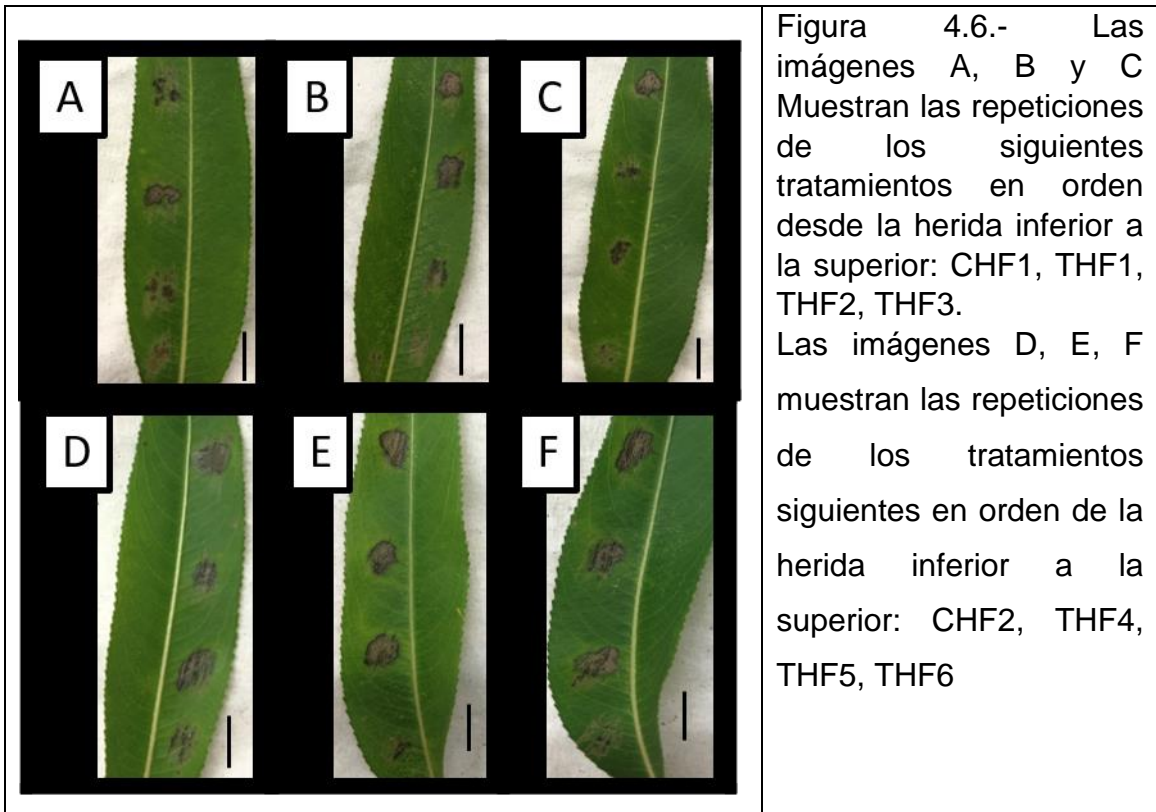
Cuadro 4.11.- Evaluación de los parámetros de fitotoxicidad de los FC en hojas de Salix

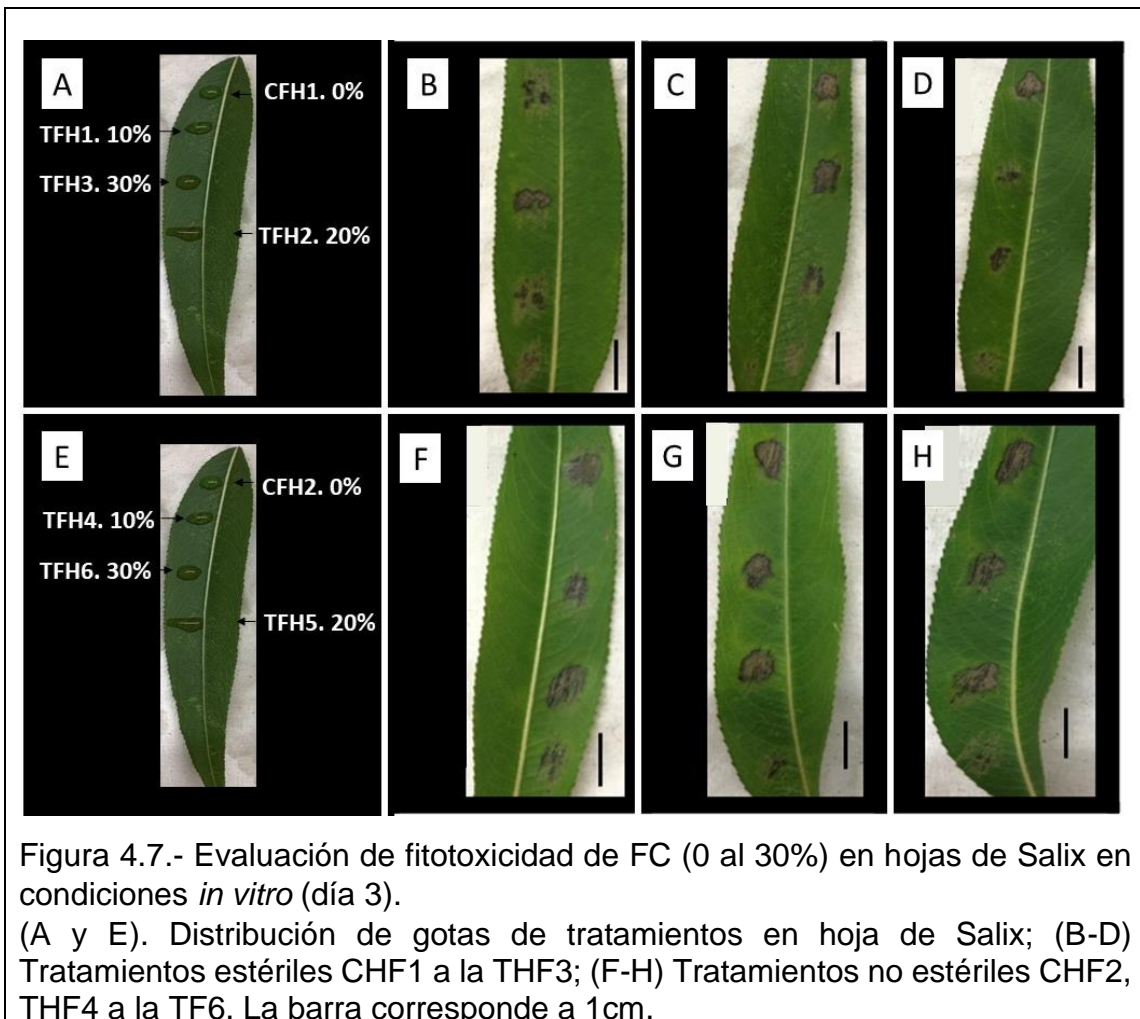
Tratamiento	AT [mm ²]*	Coloración*
CHF1	48.0±0.0	Clorosis
THF1	48.0±0.0	Gris
THF2	48.0±0.0	Gris oscuro
THF3	48.0±0.0	Negro
CHF2	48.0±0.0	Verde mate/Gris
THF4	48.0±0.0	Gris claro
THF5	60.0±0.0	Gris/Gris claro
THF6	60.0±0.0	Gris/Gris oscuro

* AT. - Área Total.

Los tratamientos con aplicación del filtrado fueron THF1 (concentración 1:10 del filtrado diluido en agua), THF2 (concentración 2:10 del filtrado diluido en agua),

THF3 (concentración 3:10 del filtrado diluido en agua), THF4 (concentración 1:10 del filtrado diluido en agua esterilizados), THF5 (concentración 2:10 del filtrado diluido en agua esterilizados), THF6 (concentración 3:10 del filtrado diluido en agua esterilizados). En el que THF1 al THF3 fueron esterilizados por calor húmedo mientras que los THF4 al THF6 no se esterilizaron por calor húmedo.

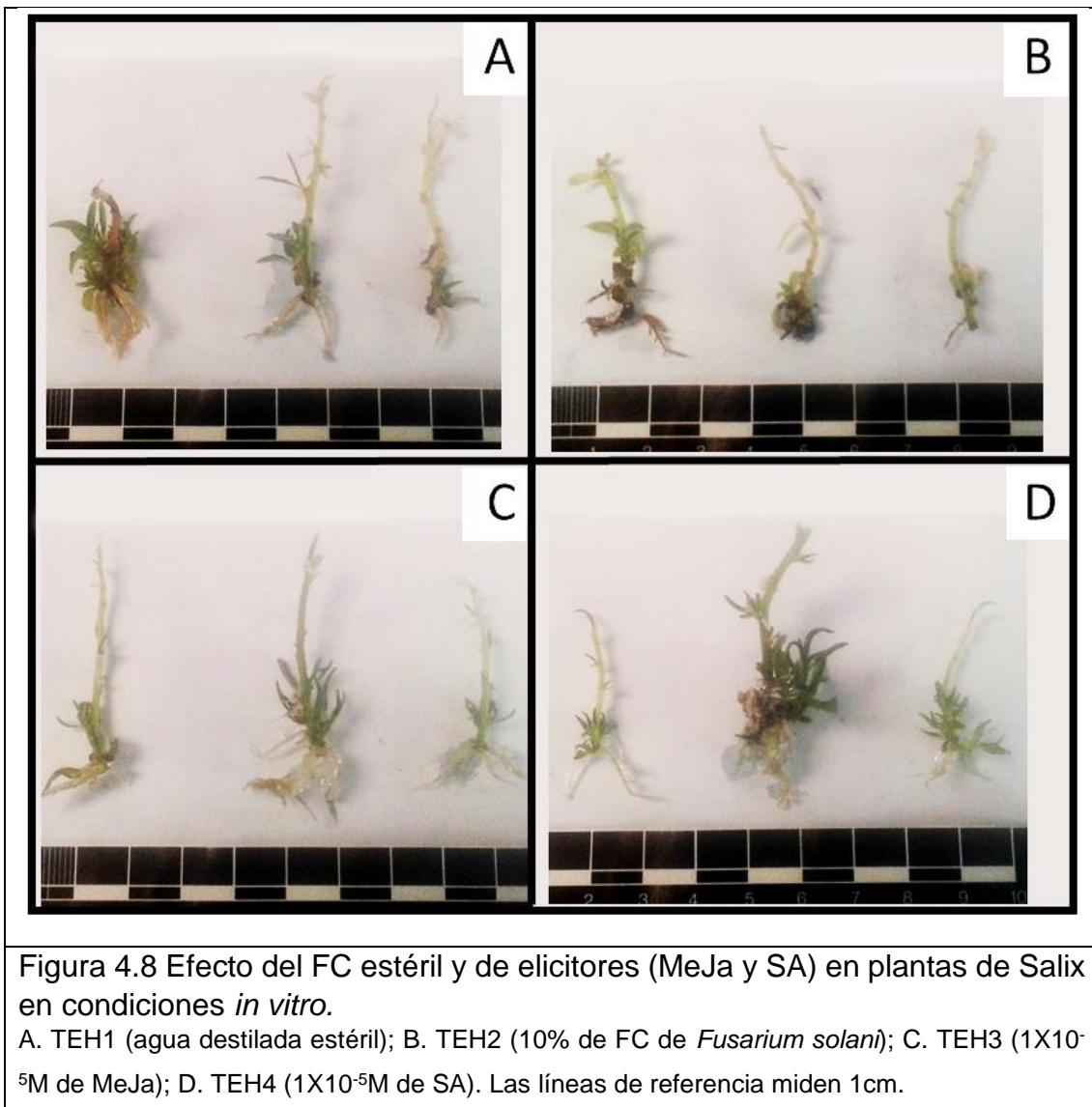




4.1.4.5 Establecimiento del protocolo *in vitro* con el FC y elicitores a diferentes concentraciones

Después de establecer que la concentración óptima del filtrado de *Fusarium solani* a usar en las hojas de salix en condiciones *in vitro* es al 10% (FC estéril), se estableció un experimento para evaluar si esta concentración del filtrado de *Fusarium solani* no era tóxico en las plantas de salix *in vitro* por lo menos durante los primeros 5 días después de adicionar el filtrado (TEH2). También se evaluó si la adición de un volumen de 50microlitos a una concentración de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de Metiljasmonato (TEH3 y TEH4), así como la adición de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y $1 \times 10^{-7} \text{M}$ de ácido salicílico (TEH5 y TEH6) en plantas de salix en condiciones *in vitro* no era tóxico para las plantas en los primeros 5 días. En este experimento se observó que la adición del filtrado a una concentración de 10% y los elicitores (MeJa y SA) a las concentraciones más elevadas ($1 \times 10^{-5} \text{M}$) no mataban las

plantas *in vitro* en los primeros 5 días después de agregar los 50 microlitros de cada uno de los tratamientos (figura 4.8), basado en las observaciones de este experimento se determinó que las concentraciones a emplear para el siguiente experimento (inducción de protección con elicitores a plantas de salix *in vitro* ante los compuestos fitotóxicos del FC del *F. solani*) es de 10% de FC del filtrado de *Fusarium solani* y de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ tanto para el MeJa como para el SA.



4.1.4.6 Inducción de protección con elicitors a plantas de *S. bonplandiana* en condiciones *in vitro* ante los compuestos fitotóxicos del FC de *F. solani*.

En este experimento se adicionó en el día -5 los elicitors (SA y MeJa), es decir 5 días antes de adicionar el filtrado (FC) de *F. solani*, transcurridos 5 días después de adicionar los elicitors, se adicionó el FC de *F. solani* a los tratamientos correspondientes (TIE3, TIE4, TIE6), considerándose este día como el día cero. Se realizaron muestreos de plantas de salix para cada uno de los tratamientos (Cuadro 4.7) los días cero, uno, dos, tres, cinco y quince, con la finalidad de realizar estudios bioquímicos en un futuro cercano. En este estudio solamente se tomaron fotografías en el día 15 del experimento, sin embargo, no se observaron diferencias visuales entre los tratamientos, por lo que se sugiere realizar los estudios bioquímicos para determinar si existen diferencias entre los tratamientos a nivel bioquímico.

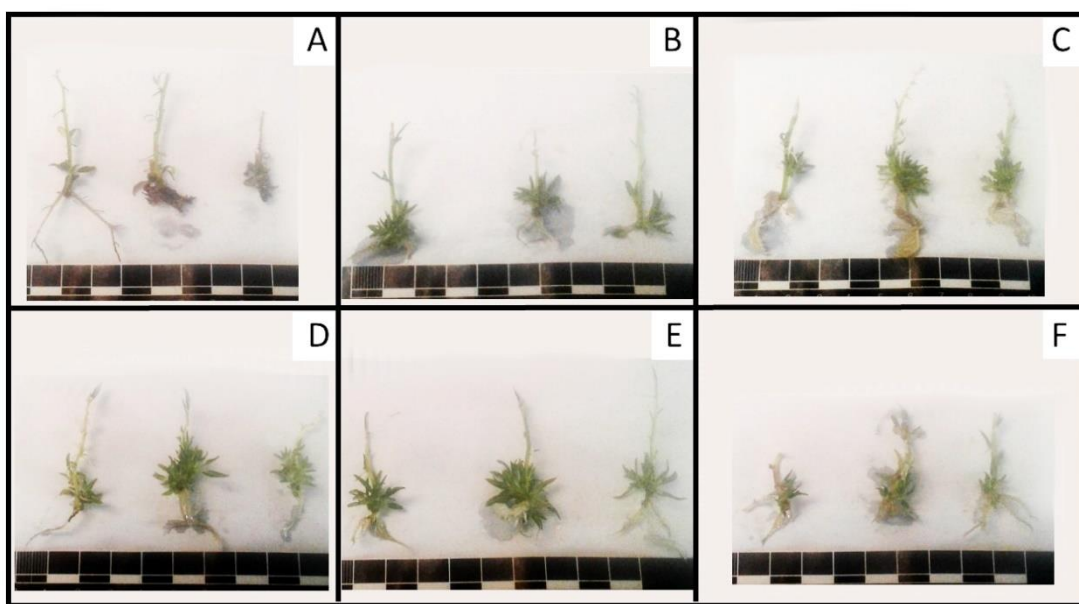


Figura 4.9 Inducción de protección con elicitors (SA y MeJa) a plantas de *salix* en condiciones *in vitro* ante los compuestos fitotóxicos del FC de *F. solani* a los 15 días después de realizar la inoculación del FC.

A. TIE1 (agua destilada estéril); B. TIE2 ($1 \times 10^{-5} \text{M}$ de SA); C. TIE3 (10% de FC de *F. solani*); D. TIE4 ($1 \times 10^{-5} \text{M}$ de SA+10% de FC de *F. solani*); E. TIE5 ($1 \times 10^{-5} \text{M}$ de MeJa); F. TIE6 ($1 \times 10^{-5} \text{M}$ de MeJa+10% de FC de *F. solani*). Las líneas de referencia miden 1 cm.

4.1.5 Conclusiones

Los estudios previamente realizados en este capítulo son una alternativa a contener la diseminación de las plagas, ya que para lograrlo debemos controlar el insecto vector, el escarabajo (*Euwallacae fornicatus*) y el hongo simbiote (*Fusarium solani*) en salix, que por su fácil adaptabilidad a sustratos y alto porcentaje de enraizamiento se puede acelerar la reproducción y así obtener nuevos modelos de investigación, un mejor entendimiento del mecanismo de acción del hongo y de las respuestas defensivas que se provocan en la planta y así mitigar el avance y controlar la incidencia de la enfermedad que este complejo ambrosial provoca en el extenso grupo de fitofamilias que logra afectar, con estos y otros estudios que se enfoquen al comportamiento, forma de infección y las condiciones que requiere inclusive de podría erradicar por completo la enfermedad al obtener ensayos en los que se evalúen distintas moléculas involucradas.

En el experimento 4.1.4.1 se evaluó a los 30 días de haberse inducido el daño e inoculación a sus debidos tratamientos, en los tratamientos que se realizó únicamente el barrenado, podemos observar que el daño que se muestra es meramente mecánico. Sin embargo, en los tratamientos que se indujo una aplicación de esporas, hay una necrosis alrededor del daño mecánico, inclusive podemos observar que si la colonización llegase al xilema se extiende por esa ruta. A comparación de aquellos que solo se les realizó un raspado, ya sea con inóculo o sin inóculo, el avance y colonización del hongo es nulo, esto puede ser debido al cambio de hábitat dentro del mismo, estos hongos provenientes de complejos ambrosiales están acostumbrados a que el insecto vector provoque una serie de galerías, un daño un poco más similar al barrenado que al raspado. Los parámetros que se evaluaron fueron el área dañada por la herida mecánica y área infectada por el hongo respectivamente con cada tratamiento.

En el experimento 4.1.4.2 los tratamientos que no se les realizó una inoculación se observa claramente un daño únicamente mecánico, sin ninguna clase de

avance alrededor de las células muertas por este daño, con forme era mayor la concentración de esporas por mililitro, era mayor el área infectada, al igual que conforme más profundo fuera el barrenado, mayor área para inoculación obtenía el hongo simbiote. En cada tratamiento con inoculación muestra una diferencia significativa por una diferencia en la profundidad del barrenado y una diferencia en la concentración de las esporas por mililitro aplicadas en la herida. Los parámetros evaluados en este experimento fueron el área dañada por el barrenado y el área infectada por el hongo, la toma de datos fue a los 30 días de haberse ejecutado el experimento.

En el estudio 4.1.4.3 la última fase de los experimentos con estacas y plantas *ex vitro* en condiciones de invernadero se hizo la toma de datos a tan solo 15 días de haberse montado el estudio. Los resultados a tan corto tiempo no fueron favorables visualmente, ya que no se alcanza a observar claramente un avance o diferencia marcada entre los que fueron controles, los que únicamente se les hizo un daño mecánico y aplicación de elicitores o inclusive los que fueron inoculados y rociados con elicitores. Para poder obtener datos observables es posible que tengamos que dejar este estudio al menos 30 días al igual que en los anteriores. En este experimento es necesario que se lleve a cabo más adelante un estudio de rutas y moléculas que se activan en los diferentes daños que se manejaron, es posible que en aquellos que únicamente se les realizó un daño mecánico también tengan alguna clase de respuesta defensiva por parte de la planta en conjunto con los elicitores y hacer una comparación con el control y también con los que se les hizo una inoculación, ya que el hacer estudios bioquímicos dentro de este estudio sería importante ver la diferencia de rutas o mecanismo de respuesta que existe dentro de la planta.

En la siguiente etapa del experimento se realizó un filtrado del micelio del hongo, para ver la reacción fitotóxica que provocaba en algunas heridas de la planta, lo que se obtuvo a los 3 días fue que si se ponía dentro de la herida mayor concentración del 50% esterilizado este filtrado, provocaba un daño altamente tóxico para las hojas de la planta, y un avance necrótico en la hoja, es importante medir la diferencia de daño entre el filtrado que fue esterilizado y el que no fue

esterilizado, ya que posiblemente el aumento de temperaturas haya creado una activación de alguna proteína o cambios en el que provocaron en extremo un mayor daño necrótico sobre el que no se esterilizó, el experimento se volvió a repetir pero, con menor concentración y obtuvimos una respuesta positiva de parte de la hoja a la concentración de filtrado, no hubo avance en alguna clase de colonización sobre las células vegetales pero, al tercer día si se mostró una diferencia en la clorosis de las heridas, entre mayor fuera la concentración, la necrosis del área fue más marcada, se sugiere que las próximas evaluaciones se establezcan bajo estas condiciones para lograr resultados más certeros y confiables que ayuden a comprender en condiciones controladas el comportamiento del filtrado, que nos permita hacer mejores predicciones al momento de evaluar en campo y en plantas cultivadas *in vitro* para generar estrategias efectivas para controlar la enfermedad y saber que reacciones existen dentro de la planta.

4.1.6 Trabajo a futuro

El estudio debe seguir, montar más experimentos y de los mismo estudiar las moléculas y la bioquímica de la planta es indispensable para comprender mejor las reacciones metabólicas incluidas en la herida, inoculación y presencia del filtrado en la planta, y quizá podamos lograr que estos vuelvan a su estado natural de origen, un complejo ambrosial que su hábitat es el consumo y descomposición de árboles senescentes, o si quiera controlar la enfermedad o el índice de mortandad en los árboles de importancia forestal, medicinal, agrícola y cultural.

4.1.7 Bibliografía

- Cai, Z., Kastell, A., Knorr, D., & Smetanska, I. (Octubre de 2012). Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell*, 31, 461-477. doi:<https://doi.org/10.1007/s00299-011-1165-0>
- Chuanfu , A., & Zhonglin, M. (Mayo de 2011). Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(6), 412-428. doi:doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x.
- Diaz Puentes, L. N. (Diciembre de 2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 257-267. Recuperado el 2021, de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v10n2/v10n2a30.pdf>
- González Cárdenas , J. C., Maruri García, J. M., & González Acosta, A. (2005). Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente casual de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. *Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana, Campus Tuxpan.*, 5(1), 45-47. Recuperado el Noviembre de 2021, de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2221589.pdf>
- Mur, L. J., Kenton , P., Lloyd , A. J., Ougham , H., & Prats, E. (Diciembre de 2007). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59(3), págs. 501-520. doi: doi:10.1093/jxb/erm239
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 473-497.
- Sanzón Gómez, D., & Zavaleta Mejía, E. (Junio de 2011). Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del

ataque por fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2).
doi:ISSN 2007-8080

Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance Salicylic acid and its functional analogs. *ELSEVIER*, 17, 48-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002>

Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (Marzo de 2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance-Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*(17), 48-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002>

Vasconsuelo, A., & Boland, R. (Mayo de 2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(5), 861-875. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.01.006>

Velásquez Valle, R., & Reveles Torres, L. R. (Diciembre de 2017). Necrosis foliar; nuevo síntoma asociado a la pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum*) en Durango y Zacatecas, México. *Revista mexicana de micología*, 46. doi:ISSN 0187-3180

War, A. R., Paulraj, M. G., War, Y. M., & Ignacimuthu, S. (Noviembre de 2011). Herbivore- and elicitor-induced resistance in groundnut to asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera:Noctuidae). *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1769-1777. doi:10.4161/psb.6.11.17323

5. Bibliografía general

AGROACTIVO. (20 de abril de 2018). *agroactivocol*. Obtenido de <https://agroactivocol.com/produccion-agricola/elicitores-inductores-de-defensas/#:~:text=Los%20mecanismos%20de%20defensa%20inducidos,el%20metabolismo%20de%20la%20planta>.

Álvarez Sierra, Y. A. (2015). *Protocolo de Uso y Aprovechamiento del Sauce en la Actividad Artesanal*. Fundación cultural del putumayo, Departamento de cultura. Putumayo: Fundación cultural del putumayo. Recuperado el 01 de Agosto de 2020

Álvarez Sierra, Y. A. (2015). *Protocolo de Uso y Aprovechamiento del Sauce en la Actividad Artesanal*. Putumayo: Fundación cultural del putumayo.

Andersen, E., Ali, S., Byamukama, E., Yen, Y., & Nepal, M. P. (Julio de 2018). Disease Resistance Mechanisms in Plants. *genes*, 9(339). doi:10.3390/genes9070339

Andrade Rodriguez, M., Vargas Araujo, J., Villegas Torres, O. G., López Martínez, V., Guillen Sánchez, D., & Alia Tejacal, I. (Agosto de 2015). Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *Cattleya* (*Brassolaelio cattleya*) in vitro. *Interciencia*, 40(8), 549-553. Recuperado el 04 de Agosto de 2020, de <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/10/549-C-ANDRADES5.pdf>

Ángel Restrepo, M., Ochoa Ascencio, S., Fernández Pavía, S., Vazquez Marrufo, G., Equihua Martínez, A., Barrientos PRiego, A. F., . . . Saucedo Carabez, J. R. (2019). Identificación de escarabajos ambrosiales (coleopteros:curculionidae) asociado a árboles de aguacate en michoacan, México. *Folia entomológica Mexicana*, 80-88.

Angeles Espino, A., Valencia Botín, A., Virgen Calleros, G., Ramirez Serrano, C., Paredes Gutierrez, L., & Hurtado de la Peña, S. (2012). MICROPROGAPACIÓN DE AGAVE (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) A TRAVÉS DE YEMAS AXILARES. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 694.

- Arakelian, Eskalen, Eskalen, Kabashima, & Dimson. (Septiembre de 2019). *Aviso público del riesgo y situación actual*. (SADER, Ed.) doi:Pendiente
- Askun, T. (2018). *Introductory Chapter: Fusarium - Pathogenicity, Infections, Diseases, Mycotoxins and Management*. Faculty of Sciences and Arts, Department of Biology. Balikesir: University of Balikesir. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.76507>
- Ayala Sierra, A., & Valdez Aguilar, L. (05 de Diciembre de 2007). El polvo de coco como sustrato alternativo para la obtención de plantas ornamentales para transplante. (Chapingo, Ed.) *Chapingo serie horticultura*, 14(2). doi:ISSN 2007-4034
- Ball, J., Carle, J., & Del Lungo, A. (2005). *Contribución de álamos y sauces a la silvicultura sostenible y al desarrollo rural*. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de FAO: <http://www.fao.org/3/a0026s/a0026s02.htm>
- Borges García, M., & Sosa Tabarez, Y. (2008). Efecto de la adición de diferentes concentraciones de carbón activado sobre la multiplicación in vitro de ñame. *Biotecnología Vegetal*, 8(2), 87-90. doi:ISSN 1609-1841
- Burgos Solorio, A., & Equihua Martínez, A. (31 de diciembre de 2007). Platypodidae y Scolytidae (Coleoptera) de Jalisco, México. *Dugesiana*, 2(14), 59-82. Recuperado el 05 de Julio de 2020, de <https://www.researchgate.net/publication/237283899>
- CABI. (2019). *Euwallacea fornicatus* (tea shot-hole borer). CABI. Recuperado el 05 de julio de 2020, de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/57163#tosummaryOfInvasiveness>
- Cai, Z., Kastell, A., Knorr, D., & Smetanska, I. (Octubre de 2012). Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell*, 31, 461-477. doi:<https://doi.org/10.1007/s00299-011-1165-0>
- CAMPO VIVO. (08 de 2017). CAMPO VIVO. Obtenido de <https://campovivo.com.mx/agricultura-organica/>

- Cantos Cevallos, G., Pinargote Choéz, J., & Palma Ponce, R. (Agosto de 2018). Influencia de la fitohormona kinetina en el crecimiento de plántulas de *coffea arábica* L. injertadas sobre patrón robusta en vivero. *CFORES*, 6(2), 134-145. doi:ISSN: 1996–2452
- Castellanos. (2003). *Los sustratos en la producción Hortícola bajo invernadero*. Celaya: INIFAP. Recuperado el 05 de 11 de 2020
- Castellanos, J. Z., & Vargas, P. (2008). *Manual de producción de tomate en invernadero*. México: INTAGRI.
- Castillo Cerón, M. (2018). *Quinto informe mensual Manejo fitosanitario de los ambrosiales*. SENASICA.
- Castrejón Antonio, J., Montesinos Matías, R., Acevedo Reyes, N., Tamez Guerra, P., Ayala Zermeño, M., Berlanga Padilla, A., & Arredondo Bernal, H. (2017). ESPECIES DE XYLEBORUS (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE: SCOLYTINAE) Asociados a huertos de aguacate en colima, México. (M. Asociados a huertos de aguacate en Colima, Ed.) *Acta Zoológica Mexicana*, 33(1), 146-150. doi:ISSN: 0065-1737
- Chuanfu , A., & Zhonglin, M. (Mayo de 2011). Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(6), 412-428. doi:doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x.
- CONABIO. (Junio de 2016). *SIVICOFF*. Obtenido de http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/MenuPrincipal/07Fichas%20tecnicas_OK/02Fichas%20tecnicas/Fichas%20t%C3%A9cnicas%20CONABIO_especies%20ex%C3%B3ticas/Fichas%20insectos%20ex%C3%B3ticos%20e%20invasores/Euwallacea%20fornicatus.pdf
- CONABIO. (2017). *Banco Nacional de Germoplasma Vegetal*. Obtenido de www.conabio.gob.mx/remib/bangev-uach.html
- Contreras, V., & Ochoa, Á. (2003). Estacas cortas y gruesas: Una opción agronómica para la siembra vegetativa de *Gliricidia sepium*. *Zootecnia Tropical*, 21(4). doi:ISSN 0798-7269

- Córdova, A. M., Cobos, M., Imán, S. A., & Castro, J. C. (14 de Marzo de 2014). Un método eficiente para la inducción de callos in vitro en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria*, 5, 25-34. Recuperado el 28 de 12 de 2020, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v5n1/a03v5n1.pdf>
- Coronado, J. a. (2000). *Coronado, James, an Analisis de las investigaciones en fitoproteccion publicadas en la Revista MIP (Manejo Integrado de Plagas)*.
- Cortés, A. G. (Mayo de 2010). *Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro*. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/293/T20228%20GOVEA%20CORTES%2c%20ALINA%20GUADALUPE%20%20MONOG..pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cuara., L. F. (2013). *Manual básico para la producción agrícola orgánica 1*. Metrocert.
- Delgadillo López, A. E., González Ramírez, C. A., Prieto García, F., Villagómez Ibarra, J. R., & Acevedo Sandoval, O. (Agosto de 2010). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *SciELO*, 14(2). Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000200002
- DGSV-CNRF. (2014). *Euwallacea sp.- Fusarium euwallaceae Ficha técnica SAGARPA-SENASICA*. México, D.F.: Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.
- Díaz Puentes, L. N. (Diciembre de 2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 257-267. Recuperado el 2021, de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v10n2/v10n2a30.pdf>

- Dimson, M., Kabashima, J., & Eskalen, A. (2015). *Escarabajo barrenador polífago + Marchitez (muerte progresiva) por fusariosis*. California: University of California.
- Divo de Sesar, M. D. (2004). *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. Recuperado el 20 de Octubre de 2020, de https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n4316_Divod eSesar.pdf
- Doffo , G. N., Achinelli, F. G., Rodriguez, M. E., & Luquez , V. M. (2017). Rendimiento de un sistema de rotación corta de alta densidad con *Salix* spp. *38*(3), 587-592. doi:10.4067/S0717-92002017000300016
- Dominguez Rosales, M. S., & González jiménez, M. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y ciencia*, 53-54.
- EcuRed. (2015). *EcuRed*. Obtenido de https://www.ecured.cu/Agricultura_convencional
- EcuRed. (2016). *EcuRed*. Obtenido de https://www.ecured.cu/Agricultura_convencional
- EcuRed. (2017). *EcuRed*. Obtenido de https://www.ecured.cu/Revoluci%C3%B3n_verde
- Enríquez Díaz, G. (2017). GERMINACIÓN Y PRODUCCIÓN DE PLANTULA DE LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum* (Raf.)Shinners.) var. Mariachi Blue EN MEZLAS DE PEAT-MOSS Y ZEOLITA. Estado de México: Centro Universitario UAEM tenancingo. Recuperado el 03 de 2021, de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/67430/Germinaci%C3%B3n%20y%20producci%C3%B3n%20de%20plantula%20de%20lisianthus-split-merge.pdf?sequence=4>
- Eskalen, A., Rugman jones , P. F., Colleen Lynch, S., Twizeyimana, M., Gonzalez, A., & Thibault , T. (Enero de 2013). Host Range of *Fusarium* Dieback and Its Ambrosia Beetle (Coleoptera: Scolytinae) Vector in

Southern California. *Plant Disease*, 938-951. doi:10.1094/PDIS-11-12-1026-RE

Eun A, J., Kumar Tewari, R., Eun Joo , H., & Kee Yoeup, P. (23 de Diciembre de 2008). In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Springer*(96), 307-315. doi: 10.1007/s11240-008-9488-4

Fang Qing, C., Chuan Hua, W., & Guo Mei, J. (2013). Ecology of *Salix variegata* seed germination. En *Implications for species distribution and conservation in the three Geoges region* (Vol. 88, págs. 243-246).

FAO. (2003). ¿Es la Certificación Algo para Mí? *RUTA/FAO*, 3.

FAO. (2003). Agricultura Orgánica, Ambiente y Seguridad Alimentaria. *Nadia El-Hage Scialabba* , 20.

FAO. (2003). *Los aspectos económicos de la agricultura de conservación*. Obtenido de http://www.fao.org/tempref/agl/agll/docs/ecconsagr_s.pdf

FAO. (2005). *Fao*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a0026s/a0026s02.pdf>

FAO. (2018). *FAO*. Obtenido de <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/overview/fao-and-post-2015/sustainable-agriculture/es/>

FAO. (2020). *ORGANIC AGRICULTURE*. Obtenido de <http://www.fao.org/organicag/oa-faq/oa-faq1/es/>

FORDECYT. (2017). *Dearrollo de estrategias de investigación y desarrollo tecnológico acerca de los complejos ambrosiales Xyleborus glabratus/Raffaelea lauricola y Euwallacea sp./Fuarium euwallaceae (plagas invasoras) en los bosques nacionales y en los cultivos agrícolas* . México: CONACYT.

Franco León, C. L. (2015). *EVALUACIÓN DE ÁCIDOS GIBERÉLICO Y NAFTALENACÉTICO, POR DIFERENTES MÉTODOS DE APLICACIÓN, SOBRE FRUTOS DE SANDÍA*. UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR, CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS. Zacapa: Faculta de ciencias

- ambientales y agrícolas. Recuperado el 05 de 12 de 2020, de <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2015/06/09/Franco-Carlos.pdf>
- Franquesa, M. (11 de 05 de 2016). *Agroptima*. Obtenido de <https://www.agroptima.com/es/blog/agricultura-convencional/>
- Freeman, S., Sharon, M., Maymon, M., Mendel, Z., Protasov, A., Aoki, T., . . . O'Donnell, K. (2013). *Fusarium euwallaceae* sp. no.- a symbiotic fungus of *Euwallacea* sp., an invasive ambrosia beetle in Israel and California. *Ecologia*, 1595-1606. doi: 10.3852/13-066
- García Avila, C. d., Trujillo Arriaga, F. J., López Buenfil, J. A., González Gómez, R., Carrillo, D., Cruz, L. F., . . . Acevedo Reyes, N. (2016). First report of *Euwallacea nr. fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist*, 99(3). doi:<https://doi.org/10.1653/024.099.0335>
- García Enciso, E. L., Robledo Olivo, A., Benavides Mendoza, A., Solís Gaona, S., & González Morales, S. (2018). Efecto de elicitores de origen natural sobre plantas de tomate sometidas a estrés biótico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4212-4221.
- Ghasemi, R., & Mokhtari, R. (2019). Cyanide acclimation in willow (*Salix babylonica*), a prospect for the phytoremediation of cyanide. *Journal of Plant Process and Function*, 7(28), 61-69. Recuperado el 21 de 08 de 2020, de <http://jispp.iut.ac.ir/article-1-641-en.htm>
- Gómez Garay, A., Pintos López, B., Grau Corbi, J., & Bueno Pérez, Á. (2014). Micropropagación de *Populus tremula* L. *Reduca*, 2(7), 1-11. Obtenido de <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/download/1594/1615>
- Gómez Merino, F. C., Trejo Tellez, L. I., García Albarado, J. C., & Morales Ramos, V. (Mayo de 2013). Lulo (*Solanum quiroense* Lamarck.) como nuevo elemento del paisaje en México: germinación y crecimiento en sustratos orgánicos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(spe5). doi:ISSN 2007-0934

- González Alamilla, E., González Cortázar, M., Carranza , B., Rivas Jacobo, M., Herrera Corredor, C., Ojeda Ramírez , D., . . . Rivero, N. (2019). Chemical Constituents of *Salix babylonica* and Their Antibacterial Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Animal Bacteria. *Molecules*, *24*. doi:10.3390/molecules24162992
- González Cárdenas , J. C., Maruri García, J. M., & González Acosta, A. (2005). Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente casual de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. *Facultad de Ciencias Biológicas y Aropecuarias de la Universidad Veracruzana, Campus Tuxpan.*, *5*(1), 45-47. Recuperado el Noviembre de 2021, de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2221589.pdf>
- González Díaz, G., García Velasco, R., Camacho Cerón, G., & Nieto Ángel, D. (2011). CANCROSIS EN RAMAS DE *Salix bonplandiana* KUNTH CAUSADA POR *Alternaria tenuissima*. En *Can* (págs. 75-86). Texcoco: Redalyc.
- González, S. D., Loranca, A. K., Canela, A. A., Lamelas, A., & Ibarra, L. A. (2018). *Loes escarabajos escolotinos*. México: Gobierno de México.
- Grendysz , J., Wróbel, J., & Kulpa, D. (2017). Influence of micropropagation with addition. *World Scientific News*, *2*(70), 201-2015. Recuperado el 10 de 2020, de <http://www.worldscientificnews.com/wp-content/uploads/2017/01/WSN-702-2017-201-215.pdf>
- Grendysz, J., Jacek , W., & Danuta, K. (Abril de 2017). Influence of micropropagation with addition of kinetin on development of a willow (*Salix viminalis* L.). *World Scientific News*, *70*, 201-2015. Recuperado el 20 de 10 de 2020, de https://www.researchgate.net/publication/322931611_Influence_of_micropropagation_with_addition_of_kinetin_on_development_of_a_willow_Salix_viminalis_

- Hernández Antonio, A., & M. Hansen, A. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sediments. *SciELO*.
- Imaginario, A. (23 de 05 de 2019). *Significados*. Obtenido de <https://www.significados.com/revolucion-verde/>
- INIA. (2015). *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. Obtenido de <https://www.inia.cl/ejes-estrategicos/agricultura-sustentable/>
- INTAGRI. (2015). *INTAGRI*. Obtenido de <https://www.intagri.com/articulos/horticultura-protegida/produccion-de-pepino-en-invernadero>
- James, S. P. (Diciembre de 2007). Studies on certain plant volatiles attracting the shot hole borer, *Euwallacea fornicatus* (Eichhoff) (Scolytidae: Coleoptera) infesting tea. (D. R. Selcasundaram, Ed.) *Bharathiar University*. Recuperado el 06 de Julio de 2020, de https://www.avocadosource.com/papers/Research_Articles/JamesSachin2007.pdf
- Kikot, G. (2012). *Aislamiento e identificación de Fusarium spp. a partir de granos de trigo, Relación entre ocurrencia de la especie y a incidencia de la enfermedad*. Argentina: Universidad de Argentina. Recuperado el 06 de Julio de 2020, de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/18266/l_-_Aislamiento_e_identificaci%C3%B3n_de_Fusarium_spp._a_partir_de_granos_de_trigo.pdf?sequence=6
- Kumar, R., Rajkhowa, G., Sankar, M., & Rajan, R. K. (2011). A new host plant for the shoot-hole borer, *Euwallacea fornicatus* (Eichhoff) (Coleoptera: Scolytidae) from India. Assam: *Acta Entomologica Sinica*.
- Kunth. (1817). *Salix bonplandiana*. *Nova Genera et Species Plantarum*, 101.
- Kunth, C. S. (1815). *Salix bonplandiana*. En *Nova Genera et Species Plantarum* (Vol. 2, págs. 233-235). París. Recuperado el 2020

- Li, Y., Lucky, A., & Hulcr, J. (Febrero de 2018). *University of Florida*. (U. o. Florida, Ed.) Recuperado el 06 de Julio de 2020, de IFAS: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/trees/beetles/tea_shot_hole_borer.htm
- Lieseback, M., & Naujoks, G. (2004). Approaches on vegetative propagation of difficult-to-root *Salix caprea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*(79), 239-247. doi:10.1007/s11240-004-0665-9
- López Vera, M. R., Solórzano Murillo, F. R., Pomagualli, D., López Vera, T. M., & Vergara Vélez, G. E. (Diciembre de 2016). PROPAGACIÓN IN VITRO DEL SAUCE LLORÓN (*Salix Babilonica* Lin.) A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES. *Revista de Investigación Talentos*, 3(2), 22-29. doi:ISSN Digital: 2631-2476
- Luginhuhl, S. (2010). *Fusarium solani*. Carolina del norte: NC STATE UNIVERSITY. Obtenido de https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm
- Macagual, C. I. (2002). Manual de Tecnicas de Propagacion de Especies Vegetales Leñosas Promisorias para el Piedemonte de Caquetá. doi:ISBN: 958-96882-8-4
- Martínez Medina, S. d., Gomez Kosky, R., Posada Péez, L., Barbón Rodríguez, R., Acosta Suárez, M., Reyes Vega, M., . . . Tejeda González, M. (29 de Noviembre de 2012). Efecto de dos citoquininas, ácido ascórbico y sacarosa en la obtención de plantas in vitro de *Sorghuym bicolor* para la formación de callos. *UNAL*. Recuperado el 12 de 2020, de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/download/37293/40412>
- Mendoza, C. G. (2016). Crecimiento, producción y absorción nutricional del cultivo de pepino . *Tecnológico de Costa Rica*, 13.

- Morales, R. G. (2010). *Agricultura Orgánica*. Sinaloa: Universidad Autónoma Agraria.
- Mur, L. J., Kenton , P., Lloyd , A. J., Ougham , H., & Prats, E. (Diciembre de 2007). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, 59(3), págs. 501-520. doi: doi:10.1093/jxb/erm239
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM*, 473-497.
- Neyra Velasco, I. M. (2015). *Propagación in vitro del sauce (Salix alba), para uso en defensa ribereña*. Universidad Nacional Agraria de la Selva , Departamento de conservación de suelos y agua. Tingo María: Academia de Conservación de Suelos y Agua. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/1044/CSA2015004.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ortega Martínez, L. D., Sánchez Olarte, J., Díaz Ruiz, R., & Ocampo Mendoza, J. (Diciembre de 2010). EFECTO DE DIFERENTES SUSTRATOS EN EL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE TOMATE (*Lycopersicum esculntum* MILL). *Ra Ximhai*, 6(3), 365-372. doi:ISSN: 1665-0441
- Osuna Fernández, H. R. (s.f.). Manual de propagación de plantas superiores. En *Manual de propagación de plantas superiores2016* (págs. 47-67). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Paz da Silva, R., & Vilegas Monter, Á. (Diciembre de 2009). Niveles de sacarosa en el enraizamiento in vitro y aclimatación ex vitro de plantulas del portainjerto de vid R110 (*vitis rupestris vitis berlandieri*). (R. Paz da Silva, Ed.) *SciELO*, 34(12). Recuperado el 02 de Agosto de 2020, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009001200012

- Pérez Silva , M., Equihua Martínez , A., Estrada Venegas, E., Muñoz Viveros , A., Valdez Carrasco , J., Sanchez Escudero, J., & Atkinson, T. (Agosto de 2015). Sinopsis de especies mexicanas del género *Xyleborus* Eichhoff, 1894 (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Acta Zoológica Mexicana*, 31(2). Recuperado el 05 de Julio de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372015000200011
- Pierik, R. L. (s.f.). Rejuvenation and micropropagation. En H. Nijkamp, L. Van Der Plas, & J. Van Aatrijk , *Progress in plant cellular and molecular biology* (págs. 91-101). Kluwer Academic Publisher Dordrecht.
- Pierik, R. (s.f.). Rejuvenation and micropropagation. En H. Nijkamp , L. Van Der Plas, & J. Van Aatrijk (Edits.), *Progress in plant celular and molecular biology* (págs. 91-101). Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- Ponce, N. L. (2013). *ENTRE LA AGRICULTURA CONVENCIONAL Y LA AGROECOLOGIA*. . Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/12482/CaldasMejiaRobertoFelipe2013.pdf?sequence=1>
- Posada Pérez , L., Padrón Montesinos, Y., Gonzalez Olmedo, J., Rodriguez Sanchez, R., Barbón Rodriguez, R., Norman Montenegro, O., . . . Gómez Kosky, R. (2016). Efecto del pectimorf en el enraizamiento y la aclimatación in vitro de brotes de papaya (*Carica papaya* L.) cultivar maradol roja . *Cultivos tropicales*, 37(3), 50-59. Recuperado el Agosto de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193246976005.pdf>
- Programa de Vigilancia Epidemiologica Fitosanitaria. (2019). *Guía de síntomas y daños del Escarabajo barrenador polífago (Euwallacea sp.)*. SENASICA. Recuperado el 05 de Julio de 2020, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/466601/1_GDSyD-CEA_Euwallacea_spV2.pdf
- Reséndiz Martínez, J. F., Guzmán Díaz, L., Muñoz Viveros, A. L., Nieto de Pacual Pola, C., & Olvero Coronel, L. P. (20 de Abril de 2015). Enfermedades

foliares del arbolado en el Parque Cultural y Recreativo Tezozómoc, Azcapotzalco, D.F. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(30), 106-123. Recuperado el 30 de 10 de 2020

Retana, K., Ramírez Coche, J. A., Castro , O., & Blanco Meneses, M. (27 de Octubre de 2017). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii Asociado a la marchitez del Apio en Costa Rica. *Agronomía costarricense*, 42(1), 115-126. Recuperado el 06 de Julio de 2020

Reverchon, F., & Eskalen , A. (2015). *Coordinación de actividades de investigación y comunicación para combatir la marchitez por Fusarium y el escarabajo polífago barrenador, un complejo ambrosial emergente*. California: SENASICA.

Reyes, J. (2015). *Guía de técnicas, métodos y procedimientos de reproducción asexual o vegetativa de las plantas*. Santo Domingo.

Rodriguez Garcia, C. (ABRIL de 2002). *CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS Salix spp. EN MÉXICO*. Obtenido de UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO: <http://files.departamento-de-productos-forest.webnode.es/200001652-3a8833b810/Rodriguez%20Garcia%20Cristina%202002.pdf>

Rojas Sánchez, E. L. (2010). *Efecto de la aplicación de extractos de siete especies vegetales del semidesierto mexicano como reguladores del crecimiento*. UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO", INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA. Coahuila: UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO". Recuperado el 23 de 11 de 2020, de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5053/T18320%20ROJAS%20SANCHEZ,%20ELVA%20LILIANA%20%20TESIS.pdf?sequence=1>

Rytter, R. M., Weih, M., & Nordh, N. E. (Enero de 2005). Determinants of biomass production in hybrid willows and prediction of field performace from pot

studies. *Tree Physiology*, 25, 1197-1206. Recuperado el Agosto de 2020, de https://watermark.silverchair.com/25-9-1197.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAq8wggKrBqkqhkiG9w0BBwagggKcMlICmAIBADCCApEGCSqGS1b3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMSrmh28FmXzMilF_zAgEQglICYoJrUBuj_Fx5CC2jeN0VfGi2FEp-njmSveBRSE1jF4vF

Sánchez del Castillo, & Escalante, E. R. (1989). *Un sistema de producción de plantas: hiroponia, principios y métoos de cultivo*. México: UA Chapingo.

Sanzón Gómez, D., & Zavaleta Mejía, E. (Junio de 2011). Respuesta de hipersensibilidad, una muerte celular programada para defenderse del ataque por fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2). doi:ISSN 2007-8080

Satacruz Ruvalcaba, F., Gutierrez Pulido, H., & Rodriguez Garay, B. (Marzo de 1999). *ReseachGate*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/227019082_Efficient_in_vitro_propagation_of_Agave_parrasana_Berger

Seminis. (12 de Junio de 2017). *Seminis* . Obtenido de Bayer Group: <https://www.seminis.mx/blog-que-es-y-como-ataca-el-fusarium/>

SENASICA. (2019). *Complejo escarabajo barrenador polífago Euwallacea sp. - Fusarium euallaceae Ficha Técnica No.62*. Ciudad de México.

Shi, W., Tan, Y., Wang , S., Gardiner, D. M., De Saeger, S., Liao, Y., . . . Wu, A. (26 de Diciembre de 2016). Mycotoxigenic Potentials of Fusarium Species in Varioues culture Matrices Revealed by Mycotoxin Profiling. 9, 6. (M. Antonio, Ed.) *Toxins*. doi:doi:10.3390/toxins9010006

Short , D. P., O´Donnell, K., Stajich , J. E., Huler, J., Kijimoto, T., Berger , M., . . . Kasson , M. T. (2017). PCR Mutiplexes Discriminate Fusarium Symbionts of invasive Euwallacea Ambrosia Beetles that Inflict Damage n Numerous Tree Species Throughout the United States. *Plant Disease*, 101(1), 233-240. doi:<https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1046-RE>

- Simon , J. E., Chadwick, A. F., & Craker , L. E. (1984). *Herbs: An Indexed Bibliography 1971-1980 the Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone*. Archon Books; First Edition. Recuperado el 04 de 2021
- Soto, J. (16 de Febrero de 2020). *Deforestación, ¿qué es, quien la causa y por qué debería importarnos?* (GREENPEACE, Ed.) Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de GREENPEACE: <https://www.greenpeace.org/mexico/blog/4074/deforestacion-que-es-quien-la-causa-y-por-que-deberia-importarnos/#:~:text=M%C3%A9xico%20ocupa%20uno%20de%20los,C%C3%A1mara%20de%20Diputados%20en%202017>.
- Southamer, R., Rugman Jones, P., Thu, P. Q., Eskalen , A., Thibault, T., Hulcr, J., . . . Zong, S. (2017). Tracing the origin of a cryptic invader: phylogeography of the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) species complex. *Agricultural and Forest Entomology*. doi:10.1111/afe.12215
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista Chilena Infectol*, 31(1), 85-86. Recuperado el 06 de Julio de 2020, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v31n1/art12.pdf>
- Torres Rojo, J. M. (2020). *Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina al año 2020*. Roma: FAO.
- Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance Salicylic acid and its functional analogs. *ELSEVIER*, 17, 48-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002>
- Tripathi, D., Raikhy, G., & Kumar, D. (Marzo de 2019). Chemical elicitors of systemic acquired resistance-Salicylic acid and its functional analogs. *Current Plant Biology*(17), 48-59. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2019.03.002>

- Tupaki Sreepurna, A., Al Hatmi, A., Kindo, A. J., Sundaram, M., & de Hoog, S. (2016). Multidrug-resistant *Fusarium* in keratitis: a clinico-mycological study of keratitis infections in Chennai, India. *Wiley mycoses*(28). doi:DOI: 10.1111/myc.12578
- Uribe Moraga, M., & Cifuentes G., L. (26 de Abril de 2003). Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación de *Legrandia cocinna*. *BOSQUE*, 1(25), 129-135. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de <https://www.redalyc.org/pdf/1731/173114404012.pdf>
- Uribe, M., Delaveau , C., Garcés , M., & Escobar , R. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *SciELO*, 1(29), 58-64. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002008000100007>
- Vaca, I., Marulanda , M., Verdesoto, J., Núñez , A., Acurio, R. D., & Chilusia Utreras, V. (4 de Agosto de 2018). Efecto del carbón activado en la germinación y brotación in vitro de Citrus. *Bionatura*, 3(3), 657-664. doi:10.21931/RB/2018.03.03.5
- Valero, D., & de Cárcamo, M. (11 de Enero de 2017). *La contaminación por nutrientes*. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de FUSADES: <http://fusades.org/lo-ultimo/blog/la-contaminaci%C3%B3n-por-nutrientes-nitrogeno-y-fosforo>
- Van Diepeningen, A. D., & de Hoog, S. (2016). Challenges in *Fusarium*, a Trans-Kingdom Pathogen. En *Mycopathologia* (Vol. 1, págs. 161-163). Amsterdam, Holanda: Springer. doi:10.1007/s11046-016-9993-7
- Vasconsuelo, A., & Boland, R. (Mayo de 2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172(5), 861-875. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.01.006>
- Velásquez Valle, R., & Reveles Torres, L. R. (Diciembre de 2017). Necrosis foliar; nuevo síntoma asociado a la pudrición de la raíz de chile (*Capsicum*

annuum) en Durango y Zacatecas, México. *Revista mexicana de micología*, 46. doi:ISSN 0187-3180

Wahab, G., Sallam, A., Elgaml, A., Lahloub, M. F., & Afif, M. (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of *Salix babylonica* extracts. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 1-6. Recuperado el 30 de 07 de 2020, de https://www.researchgate.net/publication/325229842_Antioxidant_and_antimicrobial_activities_of_Salix_babylonica_extracts.

War, A. R., Paulraj, M. G., War, Y. M., & Ignacimuthu, S. (Noviembre de 2011). Herbivore- and elicitor-induced resistance in groundnut to asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (lepidoptera: noctuidae). *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1769-1777. doi:10.4161/psb.6.11.17323

Wida Utami, E. S., & Hariyanto, S. (3 de Febrero de 2019). Germinación in vitro de semillas y desarrollo de plántulas de una rara orquídea nativa de Indonesia *Phalaenopsis amboinensis* JJSm. (S. Hayat, Ed.) *Hindawi*, 1-6. doi:<https://doi.org/10.1155/2019/8105138>

Yah Chulim, J. E. (2011). *ESTUDIO DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL EN LA MORFOGÉNESIS DE Bletia purpurea (Lam.)*. CIATEJ, MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA, Mérida. Recuperado el 9 de 10 de 2020