



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Respuesta fisiológica y bioquímica de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) afectada por fusariosis (*Fusarium* sp.)

Marisol Cruz Aguilar

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía

Bogotá, Colombia

2012

Respuesta fisiológica y bioquímica de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) afectada por fusariosis (*Fusarium* sp.)

Marisol Cruz Aguilar

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias con Énfasis en Fisiología de Cultivos

Directora:

Dr. Sci., Luz Marina Melgarejo Muñoz
Departamento de Biología – Facultad de Ciencias

Codirectora:

Ph. D., Lilliana María Hoyos Carvajal
Facultad de Agronomía

Línea de Investigación:

Fisiología del estrés en plantas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía

Bogotá, Colombia

2012

*“Si hablo en lenguas humanas y angelicales,
pero no tengo amor, no soy más que un metal
que resuena o un platillo que hace ruido. Si
tengo el don de profecía y entiendo todos los
misterios y poseo todo el conocimiento, y si
tengo una fe que logra trasladar montañas,
pero me falta el amor, nada soy.”*

Pablo de Tarso

Agradecimientos

Al dueño de la vida por regalarme el cumplimiento de tantas hermosas promesas durante este proceso de aprendizaje.

A mi directora de tesis, Dr. Luz Marina Melgarejo Muñoz, por sus enseñanzas, su acompañamiento y su apoyo, y a mi co-directora, Dr. Lilliana María Hoyos Carvajal, por su paciencia y orientación.

A mis compañeros de maestría Laura Victoria Pérez Martínez, Laura Marcela Flórez Gutiérrez y Hernán Emiro Ortiz Caranguay por su apoyo en el montaje y realización de los muestreos, sus consejos y enseñanzas.

A la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres por brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios gracias a la financiación parcial de la maestría.

A la Andrew W. Mellon Foundation quien a través de la Red Latinoamericana de Botánica me otorgó una beca de perfeccionamiento, la cual contribuyó al dominio de técnicas y metodologías desarrolladas en este trabajo.

Al Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, donde se llevaron a cabo los experimentos y mediciones, y al Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, donde recibí el apoyo determinante para aprender todo lo necesario sobre el factor estresante de esta tesis.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación de este trabajo dentro del proyecto macro titulado “Caracterización ecofisiológica de gulupa bajo tres condiciones ambientales en el Departamento de Cundinamarca.

A la facultad de Agronomía, por la financiación parcial de esta tesis mediante la asignación de recursos del Fondo de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia.

Resumen

El reconocimiento de la respuesta fisiológica y bioquímica de gulupa (*P. edulis* Sims) afectada por fusariosis (*F. oxysporum*) se llevó a cabo durante el período de incubación del patógeno en plántulas de 70 días de edad bajo condiciones de invernadero, mediante la medición directa de variables relacionadas con el intercambio de gases en las hojas, la emisión de fluorescencia de la clorofila-a, las características dimensionales y respiratorias del sistema radicular, así como determinaciones del contenido de pigmentos en hoja y de la enzima peroxidasa tanto en hojas como en raíces, con el fin de identificar el punto en que las plantas empiezan a responder ante el estrés, cómo se da esta respuesta fisiológica y cuál de estas mediciones puede servir de indicador temprano de la patogénesis, como base para futuras investigaciones. Los parámetros fotosintéticos analizados dieron cuenta del efecto del patógeno en la disminución de las tasas de asimilación neta, mientras que el sistema radicular mostró una alta variabilidad independiente del proceso de infección. Los resultados sugieren que la disminución en las tasas de asimilación neta son consecuencia de un incremento en las tasas de fotorrespiración, mecanismo foto-protector que pretende emplear la energía luminosa, ATP y NADPH en exceso para prevenir la fotoinhibición, antes que ser consecuencia de la obstrucción del patógeno en los haces vasculares causando disminución en el suministro hídrico, ya que hay evidencia de que las plantas toman medidas correctivas de esta situación manteniendo niveles de agua adecuados a nivel celular.

Palabras clave: *P. edulis* Sims., *F. oxysporum*, fotosíntesis, fotorrespiración, fluorescencia, sistema radical.

Abstract

The recognition of the physiological and biochemical response of gulupa (*P. edulis* Sims.) affected by fusariosis (*F. oxysporum*), was carried out during the incubation period of the pathogen in seedlings of 70 days old under greenhouse conditions, using the direct measurement of parameters related to leaf gas exchange, the fluorescence emission of chlorophyll-a, dimensional and respiratory characteristics of the system radicular, as well as determinations of the content of pigments in leaf and the peroxidase enzyme, both in leaves and in roots, in order to identify the point at which plants start responding to stress, how this physiological response occurs and which of these parameters can serve as an early indicator of pathogenesis, as a basis for future research. Photosynthetic analyzed parameters realized the pathogenic effect of the decrease in the net assimilation rates, while the root system showed high phenotypic variability independent of the infection process. The results suggest that the decrease in net assimilation rates are a consequence of an increase in the rates of photorespiration, photo-protective mechanism which tries to use the light energy, ATP and NADPH in excess for photoinhibition preventing, instead be caused by obstruction of cellular water supply, since there is evidence that plants take corrective measures of this situation maintaining adequate levels of water in cellular level.

Keywords: *P. edulis* Sims, *F. oxysporum*, photosynthesis, photorespiration, fluorescence, roots.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras.....	XII
Lista de tablas	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIV
Introducción	1
1. Respuesta fisiológica y bioquímica en hojas de gulupa (<i>Passiflora edulis</i> Sims) afectadas por fusariosis (<i>Fusarium</i> sp.).....	9
1.1 Estado del Arte	10
1.2 Metodología.....	15
1.3 Resultados y Discusión.....	25
2. Respuesta fisiológica y bioquímica del sistema radical de gulupa (<i>Passiflora edulis</i> Sims) afectada por fusariosis (<i>Fusarium</i> sp.)	49
2.1 Estado del Arte	50
2.2 Metodología.....	51
2.3 Resultados y Discusión.....	52
3. Conclusiones y recomendaciones.....	65
3.1 Conclusiones	65
3.2 Recomendaciones.....	66
A. Anexo: Curvas de calibración de proteínas	69
B. Anexo:Análisis estadístico de las variables en el muestreo no destructivo.....	70
C. Anexo:Análisis estadístico de las variables en el muestreo destructivo.....	78
D. Anexo: Capítulo de Libro	82
E. Anexo: Artículo en revisión	84
Bibliografía	99

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1. Condiciones ambientales diurnas en el invernadero durante el tiempo del experimento	16
Figura 1.2. Sintomatología sugestiva de estado avanzado de fusariosis	17
Figura 1.4. Re-aislamientos a partir de tallos de gulupa	23
Figura 1.5 Impronta de <i>F. oxysporum</i> . 400 Aumentos	24
Figura 1.6. Tasa de asimilación fotosintética máxima para cada día de muestreo.	25
Figura 1.7. Condiciones ambientales diurnas en el invernadero en los días de muestreo	26
Figura 1.8. Contenido Relativo de Agua para cada día de muestreo	27
Figura 1.9. Conductancia estomática para cada día de muestreo.	30
Figura 1.10. Concentración subestomática de CO ₂ para cada día de muestreo.	31
Figura 1.11. Correlación de los parámetros CO ₂ intracelular y conductancia estomática	32
Figura 1.12. Tasa de transpiración para cada día de muestreo	33
Figura 1.13. Eficiencia en el uso de agua y su relación con la apertura estomática.	34
Figura 1.14. Temperatura foliar para cada día de muestreo	35
Figura 1.15. Eficiencia máxima potencial de la fotosíntesis para cada día de muestreo.	37
Figura 1.16. Disipación no fotoquímica de la fluorescencia para cada día de muestreo.	39
Figura 1.17. Quenching fotoquímico para cada día de muestreo.	41
Figura 1.18. Concentración de pigmentos en hoja para cada día de muestreo.	42
Figura 1.19. Relación de clorofila-a y clorofila-b en hoja para cada día de muestreo.	43
Figura 1.20. Eficiencia en el Transporte de Electrones para cada día de muestreo.	44
Figura 1.21. Eficiencia fotoquímica del Fotosistema II para cada día de muestreo	45
Figura 1.22. Actividad específica enzima peroxidasa en hoja, cada día de muestreo.....	46
Figura 1.23. Contenido de proteína en hoja para cada día de muestreo.	46
Figura 2.1. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 4 dpi.	53
Figura 2.2. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 8 dpi.	53
Figura 2.3. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 12 dpi.	54
Figura 2.4. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 16 dpi.	54
Figura 2.5. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 20 dpi.	55
Figura 2.6. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 24 dpi.	55
Figura 2.7. Número de raíces promedio.	56
Figura 2.8. Peso fresco radicular promedio.	57
Figura 2.9. Longitud radicular promedio.	58
Figura 2.10. Grosor radicular promedio.	59
Figura 2.11. Respiración de raíces.	61

Figura 2.12. Actividad específica enzima peroxidasa en raíz cada día de muestreo.....	62
Figura 2.13. Contenido de proteína en raíz para cada día de muestreo.....	63

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1. Escala ordinal para evaluar la severidad de marchitez por Fusarium en gulupa.....	18
Tabla 1.2. Ocurrencia de re-aislamientos del patógeno.....	23

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término	Unidades
A	Tasa de asimilación neta de CO ₂	μmoles CO ₂ m ⁻² s ⁻¹
ADP	Adenosín difosfato	
ATP	Adenosín trifosfato	
Chl	Contenido de Clorofila	mg / g mfv
Ci	Concentración subestomática de CO ₂	Vpm
CRA	Contenido relativo de agua	%
DPI	Días después de inoculación	Días
E	Tasa de transpiración	mmol m ⁻² s ⁻¹
ETR	Tasa de transferencia de electrones en el fotosistema II	μmol e ⁻ /m ² s
Fv/Fm	Eficiencia cuántica fotoquímica máxima potencial del fotosistema II	Adimensional
g	Gramos	g
G _s	Conductancia estomática	mmol m ⁻² s ⁻¹
ha	Hectárea	m ²
HR	Humedad relativa	%
LHC	Complejo cosechador de antena	
mL	mililitro	mL
μL	microlitro	μL
NPQ	Disipación de la fluorescencia no fotoquímica	Adimensional
PSII	Fotosistema II del aparato fotosintético	
PAR	Radiación fotosintéticamente activa	μmol de fotones m ⁻² s ⁻¹
RC	Centro de reacción del fotosistema	
R _D	Respiración en oscuridad	μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹
RuBP	Ribulosa-1,5- bifosfato	
T	Temperatura	°C
t	Tonelada	g
WUE	Eficiencia en el uso del agua	μmol CO ₂ /mmol H ₂ O
WUEi	Eficiencia en el uso del agua intrínseca	μmol CO ₂ /mmol H ₂ O
Φ _{PSII}	Rendimiento cuántico fotoquímico del fotosistema II	
Ψ	Potencial hídrico	MPa

Introducción

La gulupa (*Passiflora edulis* Sims) hace parte de las 500 especies que conforman el género *Passiflora*, el más importante de la familia Passifloraceae (Dhawan *et al.*, 2004).

La relevancia de este género se debe a que agrupa especies de interés ornamental por la exuberancia de sus flores, especies de interés farmacológico debido a la gran cantidad de metabolitos que se han reportado con cualidades antidepresivas, sedantes, calmantes, antiinflamatorias, antiespasmódicas y antibacteriales, entre otras (Vanderplank, 1996; Dhawan *et al.*, 2004), y a que en este grupo se encuentran aproximadamente 60 especies comestibles con variados usos culinarios e industriales (Rêgo *et al.*, 2011).

Colombia es considerado el país con mayor riqueza genética del género *Passiflora* en el mundo (Lobo y Medina, 2009), contando con 167 especies (Ocampo *et al.*, 2007) entre las que se destacan el maracuyá (*Passiflora edulis* Sims. var. *flavicarpa*), la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), la curuba (*Passiflora tripartita* Bailey) y la gulupa (*P. edulis* Sims), las cuales han presentado una importante dinámica en la balanza comercial del país, ocupando para el año 2010 un área total cultivada de 15.729 hectáreas (ha), de las cuales se produjeron 167.255 toneladas (t) de fruta fresca (Base Agrícola Nacional 2009-2011).

Dentro de este grupo de especies cultivadas en el país, la gulupa es el fruto con las estadísticas más bajas tanto en área cultivada como en producción; sin embargo, se destaca por su rápido posicionamiento comercial, principalmente en mercados internacionales, ya que pasó de ser un cultivo con un área cultivada para el año 2000 de 55 ha y una producción de 791 t de fruta fresca (Rodríguez y Bermúdez 2009), a tener un área sembrada durante el 2012 de 1058 has, con una producción de 11151 t de fruta fresca (Agronet, 2012), consolidándose así como el segundo producto de exportación

dentro de la oferta frutícola nacional, con valores de exportación por concepto de su venta a mercados europeos superiores a nueve millones de dólares tanto para ese año como para el siguiente (Proexport Colombia, 2011) y en lo que va corrido del 2012 con ventas al exterior superiores a siete millones ochocientos mis dólares (Agronet, 2012).

Las condiciones agroecológicas apropiadas para el cultivo de gulupa en el país y la creciente demanda por parte de mercados europeos debido a la reciente tendencia a diversificar y aumentar el consumo de frutas y verduras, han impulsado la investigación sobre diversos aspectos de este cultivo, con el fin de consolidar una oferta estable y de alta calidad que responda a las necesidades de los consumidores, a la vez que se constituya en una alternativa rentable para los productores (Lopera *et al.*, 2009).

Dentro de los esfuerzos institucionales que se han adelantado para transferir herramientas tecnológicas al sector productor de gulupa se encuentra el libro editado por la Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas sobre Pasifloráceas en Colombia (Miranda *et al.*, 2009), las cartillas “Cultivando su futuro” del Corredor Tecnológico Agroindustrial (Bonilla *et al.*, 2011), el libro dedicado a la ecofisiología del cultivo (Melgarejo, 2012) y algunos artículos sobre caracterización físico química del fruto (Jiménez *et al.*, 2011), así como sobre tecnología poscosecha (Díaz *et al.*, 2011; Melgarejo y Hernández 2011).

De manera paralela, en el campo del manejo de plagas y enfermedades de la gulupa se han adelantado diversas investigaciones debido a que su control afecta directamente la sanidad e inocuidad del producto, a la vez que su manejo se encuentra directamente relacionado con barreras fitosanitarias o cuarentenarias impuestas a productos importados (Guerrero y Hoyos, 2011).

En los últimos años se ha avanzado significativamente en el campo de la investigación en fitopatología, reportando los agentes etiológicos asociados a las enfermedades más importantes que afectan el cultivo de gulupa en el país (Castaño, 2009), como son: la marchitez vascular y la pudrición del cuello asociadas a *Fusarium* spp. (Ortiz, 2012), la bacteriosis (Benítez, 2010), la virosis (Camelo, 2010) y la roña (Riascos, 2011).

Aunque en el país no existen cifras oficiales de incidencia y severidad de cada una de estas patologías, se reconoce mayor gravedad al considerar las enfermedades vasculares en gulupa (virosis, bacteriosis y fusariosis), debido a que en la actualidad no existen productos químicos o biológicos que permitan su control; y además, porque en este tipo de problemáticas se afecta el organismo completo, lo cual implica que en la mayoría de los casos se requiera la erradicación total de los individuos afectados para así evitar mayor propagación de la enfermedad, con lo cual se incurre en altos costos y pérdidas (Guerrero y Hoyos, 2011).

En la actualidad se considera la virosis como la enfermedad más limitante para el cultivo de gulupa por la severidad de su sintomatología y la complejidad en las pruebas para su adecuado diagnóstico (Guerrero y Hoyos, 2011). Sin embargo, la marchitez vascular producida por *F. oxysporum* y la pudrición del cuello producida por *F. solani* (Ortiz, 2012) se han catalogado igualmente restrictivas (Benítez, 2010), debido a las particulares características biológicas y ecológicas del patógeno que son causa de su extremada agresividad, entre las que se encuentran, tres diferentes tipos de estructuras de dispersión (macroconidias, microconidias y clamidosporas), confinamiento en el tejido vascular de la planta durante la patogénesis, alta diversidad genética y un amplio rango de hospederos que incluye más de cien especies vegetales (Di Prieto *et al.*, 2003; Guerrero y Hoyos, 2011).

A lo anterior se suman las altas tasas de supervivencia de clamidosporas de *Fusarium oxysporum* en el suelo, que superan los 30 años (Ploetz, 2006; Leslie y Summerell, 2006), la falta de tratamientos eficientes para lograr la supervivencia de las plantas afectadas lo que conlleva a la muerte de los sujetos enfermos y la falta de correlación entre la sintomatología y la detección oportuna del agente etiológico responsable de la afección especialmente en las fases iniciales (Ortiz, 2012; Cruz *et al.*, 2012).

Estas dos enfermedades de origen micótico (marchitez vascular producida por *F. oxysporum* y pudrición del cuello producida por *F. solani*) han comenzado a ser consideradas en el establecimiento de cultivos de gulupa en Colombia, siendo de especial cuidado la marchitez vascular producida por *F. oxysporum*, ya que tal como lo expuso Ortiz (2012), el potencial epidemiológico que puede presentar este patógeno en comparación con *F. solani* es mayor debido a que se aisló en un número importante de

muestras, presentó índices de incidencia y severidad superiores, tiempos de incubación más cortos en plantas de diferentes edades, y en general, mayor cantidad de aislamientos con notable capacidad patogénica.

La marchitez vascular producida por *F. oxysporum*, también denominada marchitez por Fusarium o secadera en pasifloras, se conoce desde hace más de medio siglo, cuando se reportó por primera vez en Australia (McKnight, 1951), es producida por poblaciones del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (Gardner, 1989). En Colombia, se ha confirmado a *F. oxysporum* como el agente causal de esta enfermedad en gulupa en la región de Sumapaz (Cundinamarca) (Ortiz, 2012).

Es una enfermedad cuya sintomatología está bien caracterizada en la mayoría de cultivos de interés económico afectados, siendo la gravedad de la misma dependiente de la edad de la planta, la patogenicidad del hongo y el tiempo de incubación transcurrido (Fischer y Rezende, 2008; Ortiz, 2012).

En general, los síntomas son similares en diferentes hospederos y para el caso de gulupa específicamente se ha descrito que en la parte aérea se presentan diversos grados de clorosis, acentuándose en las hojas más jóvenes hasta producir abscisión; se observa marchitez, defoliación y síntomas de deshidratación distribuidos asimétricamente, así como menores tasas de elongación del tallo, sistemas radicales más pequeños y con puntos necróticos y de manera particular, al realizar cortes transversales de tallo o ramas se descubren coloraciones rojizas en los haces vasculares (Roncero *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Ploetz, 2006; Fischer y Rezende, 2008; Castaño, 2009; Guerrero-López y Hoyos-Carvajal, 2011; Cruz *et al.*, 2012; Ortiz, 2012).

Desde hace más de una década se viene avanzando en el reconocimiento de las interacciones morfogenéticas y bioquímicas del proceso de infección de *F. oxysporum*, utilizándolo como modelo de respuesta de hongos fitopatógenos del suelo (Roncero *et al.*, 2003; Di Prieto *et al.*, 2003), donde el primer paso en la interacción entre el patógeno y el hospedero es el reconocimiento de la presencia de las raíces de éste último en el lugar donde están las esporas de resistencia del hongo, ésta señal es estimulada por compuestos volátiles solubles provenientes de los exudados de raíz de la planta (Roncero *et al.*, 2003). Una vez las clamidosporas perciben éstas condiciones, empiezan

a germinar, desarrollándose hasta alcanzar el sistema radical del hospedero (Olivain y Alabouvette, 1999); a continuación, las hifas del hongo empiezan a crecer profusamente formando una red alrededor del punto de penetración (Medgen *et al.*, 1996), el cual se presenta predominantemente en los pelos radicales, aunque en general se ha reportado que puede ser en cualquier parte (Lagopodi *et al.*, 2002). La penetración ocurre en los puntos de unión de las células epidermales sin requerir modificaciones morfológicas especiales por parte de las hifas del patógeno (Medgen *et al.*, 1996), esta penetración se presentan intra e intercelularmente (Olivain y Alabouvette, 1999; Rodríguez-Gálves y Mendgen, 1995) sin que exista ningún reporte de si la obstrucción del ingreso de agua y nutrientes se da a nivel apoplástico o simplástico y siendo actualmente desconocidas las bases estructurales y bioquímicas de esta interacción (Di prieto *et al.*, 2003).

Una vez adentro, el patógeno crece rápidamente en sentido centrípeto alrededor de la estela, preferentemente en la zona de diferenciación de la raíz (Olivain y Alabouvette, 1999), hasta alcanzar el sistema vascular de la planta, específicamente el xilema. En este punto, el hongo utiliza el xilema como un sistema de avenidas por donde puede diseminarse rápidamente, no sólo mediante sus hifas sino también produciendo abundante cantidad de microconidias, las cuales fácilmente pueden circular en el flujo de agua e ir invadiendo toda la planta (Di Prieto *et al.*, 2003).

La presencia del hongo en la planta produce una serie de reacciones de defensa, entre las que se encuentran barreras físicas como geles o gomas y tilosas (Ortiz *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2008) y barreras químicas como diferentes clases de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) o compuestos antifúngicos que inclusive se han reportado en los fluidos xilemáticos, así como enzimas del sistema antioxidante, las cuales pretenden detener la evolución de la infección (Di Prieto *et al.*, 2003).

Dentro de las enzimas del sistema antioxidante, la peroxidasa (E.C. 1.11.1.7) ha demostrado tener un papel importante en infecciones de otros hospederos con *F. oxysporum* (Basalah *et al.*, 1988; He *et al.*, 2001; Ojha y Chatterjee, 2012), no solo por su efecto directo sobre el patógeno, sino por su participación en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno que actúan como mecanismo de defensa vegetal (Caicedo *et al.*, 2009)

Por lo que se conoce hasta el momento, la sintomatología que expresa la planta enferma es consecuencia directa de la obstrucción del sistema hidráulico del hospedero, tanto por la invasión del patógeno, como por la respuesta del sistema de defensa de la planta, interrumpiendo el flujo normal de agua y nutrientes necesarios para el correcto crecimiento y desarrollo de la misma, debido a esto, se ha asimilado la sintomatología de secadera en pasifloras con la sintomatología producida por déficit hídrico (Agrios, 2005; Roncero *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2010).

La marchitez vascular producida por *F. oxysporum* es una enfermedad común en este cultivo, cuyo factor etiológico, así como la sintomatología que expresa la planta están bien definidos; sin embargo, no existen estudios en los que se realice el seguimiento de las respuestas fisiológicas del hospedero durante el período de incubación del hongo y en general, los estudios que analizan estas respuestas vegetales frente a factores bióticos son escasos, siendo pertinente su estudio dado que para cada patosistema ocurre un proceso de infección diferente, el cual depende no solo de las condiciones genéticas, edad, y antecedentes de crecimiento y desarrollo de la planta, sino también del tipo de patógeno, su modo de acción, el tiempo de duración e intensidad de su invasión, así como de las condiciones ambientales en las que se da la interacción patógeno – hospedero (Lanoue *et al.*, 2010; Pascual *et al.*, 2010; Gould *et al.*, 2009; Parimala *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2003).

En este trabajo se realizó el estudio *in vivo* de la respuesta fisiológica de plántulas de gulupa inoculadas con *Fusarium oxysporum*, para que mediante la comprensión de estas respuestas y el conocimiento de las interacciones entre estas variables puedan elegirse indicadores de la presencia del factor estresante y además evaluarse algunos parámetros moleculares en futuras investigaciones.

Objetivo General

Evaluar el comportamiento fisiológico de plántulas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) en respuesta a la infección por *F. oxysporum* en condiciones de invernadero.

Objetivos Específicos

- Dilucidar la respuesta del aparato fotosintético de plántulas de gulupa infectadas con *F. oxysporum*, mediante el análisis de intercambio de gases, análisis de la fluorescencia de la clorofila-a, medición del contenido de pigmentos y de la actividad específica de la enzima peroxidasa, durante el tiempo de incubación del patógeno, para comprender la causa que provoca la disminución en las tasas de asimilación.

- Reconocer la respuesta morfológica y metabólica del sistema radical de plántulas de gulupa infectadas con *F. oxysporum*, mediante el seguimiento de variables morfo-anatómicas, de las tasas de respiración y de la actividad específica de la enzima peroxidasa, durante el tiempo de incubación del patógeno, con el fin de comprender el efecto del patógeno sobre su sitio de ingreso.

1. Respuesta fisiológica y bioquímica de hojas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) afectadas por fusariosis (*Fusarium* sp.)

Las plantas presentan respuestas fisiológicas tendientes a mitigar los efectos nocivos de diversas condiciones estresantes, las cuales incluyen cambios en las tasas de intercambio de gases, cambios en los mecanismos de disipación del exceso de radiación fotosintética, cambios en las tasas de crecimiento de la planta, variaciones en las tasas de síntesis de algunas enzimas y proteínas, y acumulación de algunas hormonas y/o metabolitos (Lushchak, 2011). Numerosos estudios han determinado que en condiciones de estrés producidas por patógenos se disocian los procesos fotosintéticos por diferentes razones dependiendo del tipo de patógeno, su modo de acción en el proceso de patogénesis, el tiempo de duración e intensidad de su invasión, así como por la respuesta misma del hospedero (Lanoue *et al.*, 2010; Pascual *et al.*, 2010; Gould *et al.*, 2009; Parimala *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2003).

En general, el sometimiento de las plantas a cualquier tipo de estrés está asociado con profundos cambios en la respuesta fisiológica de las mismas (Gang *et al.*, 2007). Para el caso de enfermedades producidas por patógenos, los cambios en la fisiología limitan el crecimiento y desarrollo de la planta, afectando también la calidad y cantidad de fruto producido, disminuyendo la producción y por lo tanto, el rendimiento (Pascual *et al.*, 2010). Cada especie responde diferencialmente a distintos tipos de estrés, lo cual está condicionado genéticamente (Larcher, 2003), siendo esta la razón por la cual deben realizarse estudios para cada interacción planta – patógeno.

En el caso de hongos del suelo que ingresan por el sistema radical y avanzan por el sistema vascular se han planteado dos tipos de hipótesis que explican las limitaciones fotosintéticas observadas. Algunos autores, han propuesto que la reducción en las tasas

fotosintéticas se debe al cierre estomático o daños en el aparato fotosintético como resultado de la acción de toxinas, hormonas o metabolitos producidos por el patógeno (Aguirreolea *et al.*, 1995; Hampton *et al.*, 1990; Lorenzini *et al.*, 1997). Mientras que otros sugieren, como se ha planteado para el caso de fusariosis, que es consecuencia de la disminución en el suministro de agua y nutrientes producido por la obstrucción xilemática que ocasiona el patógeno (Agrios, 2005; Bowden y Rouse, 1991; Saeed *et al.*, 1999).

Para el caso específico de *F. oxyspoum* en plántulas de gulupa, hasta el momento, no se conoce la base explicativa de la inhibición fotosintética producida durante el proceso de patogénesis, por lo que con el desarrollo de este capítulo se pretende abordar parte de esta respuesta, sugiriendo la posible explicación fisiológica de lo que ocurre en esta interacción a partir de los resultados obtenidos experimentalmente.

1.1 Estado del Arte

En todos los casos, independientemente del origen de la condición estresante (biótica o abiótica), se inducen cascadas de señalización complejas que promueven la expresión de grupos de genes de defensa vegetal cuya activación transcripcional se produce tempranamente con el fin de superar el factor estresante (Fraire-Velázquez *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de que el metabolismo de las plantas superiores es altamente regulado con el fin de permitir la integración efectiva de este diverso espectro de vías biosintéticas, estos complejos mecanismos moleculares aún no se han comprendido completamente, ni en cuanto a los actores que participan en cada respuesta, ni tampoco a la regulación de algunas señales integrativas, puntos de convergencia o reacciones que se dan simultáneamente frente al estrés (Shao *et al.*, 2008).

La importancia de reconocer las respuestas fisiológicas y bioquímicas diferenciales de un individuo afectado por cualquier tipo de factor estresante es determinante al momento de delimitar el periodo oportuno para realizar estudios comparativos de los perfiles de señalización y expresión temprana a nivel genético y metabólico, con el fin de avanzar en la comprensión de los mecanismos de reconocimiento vegetal que censan los cambios ambientales y cómo se transmite esa información dentro de la planta, lo que asegurará

su supervivencia frente a las condiciones cambiantes a las que se ve expuesta (Wee y Dinneny, 2010).

En general, son más escasos los estudios que analizan la respuesta fisiológica vegetal frente a factores bióticos. En la actualidad hay un gran número de reportes de la expresión diferencial de genes o metabolitos secundarios útiles en las vías de señalización en procesos de patogénesis; sin embargo, cuando se trata del efecto de enfermedades o plagas sobre los diferentes componentes del aparato fotosintético los avances son escasos. En la mayoría de casos se evalúan condiciones de estrés por radiación UV, déficit hídrico y/o altas temperaturas, anegamiento, hipoxia, frío, estrés por exceso de radiación y estrés producido por metales pesados (Dmitriev, 2003; Lushchak, 2011).

Dentro de las respuestas vegetales ante factores estresantes bióticos y particularmente, en cuanto a hongos patógenos del suelo se ha reportado disminución en las tasas de asimilación fotosintética acopladas a disminución en el contenido de agua foliar como consecuencia de un aumento en la resistencia al flujo de agua producido por la presencia del hongo dentro del sistema vascular, así como por la oclusión de vasos xilemáticos producida por la presencia de tilosas (Pascual *et al.*, 2010; Bowden y Rouse, 1991; Saeed *et al.*, 1999; Ortiz, 2012). Estas restricciones provocan una sintomatología muy similar a la que presenta la planta cuando se somete a déficit hídrico, y aunque en la actualidad no existen reportes del efecto de *F. oxysporum* en la fisiología de ninguno de sus hospederos, se ha supuesto que en este patosistema ocurre este tipo de limitación hídrica (Roncero *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Fischer y Rezende, 2008; Ploetz, 2006).

Un gran número de artículos dedicados a la respuesta fisiológica, morfológica y bioquímica de diversas especies vegetales ante diferentes grados de estrés hídrico han demostrado con suficiente evidencia que en estas condiciones se produce una limitación fotosintética independientemente del grado de deshidratación al que se somete la planta (Xiaoling *et al.*, 2011; Chang-Cheng *et al.*, 2010; Sdoodee y Somjun, 2008; McDowell, 2011; Flexas y Medrano, 2002; Berger *et al.*, 2010). Sin embargo, aún no existe consenso en cuanto al mejor método para determinar el grado de deshidratación experimentado por la planta, ya que, en el caso de algunas especies el potencial hídrico

de la hoja o del tallo es mejor indicador que el contenido relativo de agua (Williams y Araujo, 2002; Sdoodee y Somjun, 2008; Swiecki y Bernhardt, 2002), mientras que en otras especies ocurre lo contrario (Hampton *et al.*, 1990; Aguirreolea *et al.*, 1995; Saeed *et al.*, 1999), con lo cual se ha demostrado que el uso de un indicador u otro para establecer el estatus hídrico en condiciones de este tipo de estrés es dependiente de la especie.

En la mayoría de los estudios de estrés hídrico se ha observado una notable disminución del potencial hídrico, el cual se refleja a nivel celular en la disminución del contenido de agua, afectando su turgor y contenido (Berger *et al.*, 2010). Paralelamente a la ocurrencia de estos cambios, se produce un desbalance hormonal en el que se aumenta el contenido de Ácido Abscísico (ABA) y se produce una de las primeras reacciones con las que se ha asociado el estrés por déficit hídrico, que es el cierre estomático (Chang-Cheng *et al.*, 2010; Xiaoling *et al.*, 2011; Flexas y Medrano, 2002). A continuación empiezan a ocurrir limitaciones metabólicas, cuya severidad depende de la intensidad y duración del estrés; en condiciones moderadas, se presentan complicaciones en la síntesis de Adenosin trifosfato (ATP) y en la regeneración de ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP); en condiciones más severas se reduce la actividad fotoquímica y en las peores circunstancias se producen procesos de fotoinhibición, que pueden ser reversibles o irreversibles dependiendo de la persistencia de estas condiciones limitantes (Flexas y Medrano, 2002). En este contexto, se entiende que la disminución en las tasas fotosintéticas bajo condiciones leves o moderadas de déficit hídrico, es producto de limitaciones estomáticas, mientras que bajo condiciones más severas se debe a limitaciones no estomáticas relacionadas con desajustes en el metabolismo fotosintético (Cornic, 2000; McDowell, 2011).

El balance hídrico incluye los procesos de absorción, conducción y pérdida de agua, con lo cual el estrés hídrico se entiende como el resultado de un desequilibrio desfavorable para la planta entre el agua tomada por las raíces y la transpirada por la parte aérea o con dificultad para movilizarse (Marjanović *et al.*, 2005). Este desbalance puede tener diversos orígenes y a su vez, diferentes respuestas adaptativas que incluyen cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y también moleculares y celulares, dentro de los

cuales se incluyen la acumulación significativa de solutos compatibles u osmoprotectantes (Hare *et al.*, 1998).

Se ha encontrado que estos pequeños solutos pueden ser algunos azúcares (fructosa, sacarosa, myo-inositol, trehalosa y fructanos) o metabolitos como prolina, glicin-betaína y ectoína, y son usados por las células de gran cantidad de organismos sometidos a déficit hídrico con funciones que incluyen mecanismos de protección como defensa ante estrés, estabilización de proteínas y enzimas, mantenimiento de turgor y volumen celular y finalmente, acelerando mecanismos de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (Berger *et al.*, 2010).

Hace ya algunos años, se ha llegado al consenso de que una de las mejores metodologías para evaluar el desempeño del aparato fotosintético consiste en la integración de algunas técnicas no invasivas como el análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila-a del fotosistema II, evaluado simultáneamente con otras técnicas como espectroscopía de absorción, análisis de intercambio de gases o imágenes térmicas (Baker, 2008). El análisis de intercambio de gases complementado con el análisis de fluorescencia de la clorofila-a, se ha ido posicionando dentro de los estudios de fisiología y ecofisiología debido al avance en el desarrollo de instrumentos que cada día hacen más versátiles las mediciones y debido a que sus resultados son confiables y dan buena cuenta de las limitaciones y regulaciones del proceso de fotosíntesis (Long y Bernacchi, 2003; Baker *et al.*, 2007).

La fluorescencia de la clorofila-a, es actualmente una de las técnicas más utilizadas para evaluar el efecto del estrés sobre la actividad fisiológica de la planta (DeEll y Toivonen, 2003), es un indicador rápido y sensible para caracterizar los efectos de diferentes tipos de estrés ambiental (temperatura, sequía, alta intensidad luminosa, salinidad, inundación) y de diversos contaminantes como metales pesados, herbicidas y detergentes; así como también de una variedad de compuestos contaminantes del aire (Maxwell y Johnson, 2000); adicionalmente, dado que los procesos fotosintéticos son especialmente sensibles al estrés biótico, el análisis del estado del fotosistema II es un buen indicador del estado de la planta ya que es el punto de partida de todo el proceso fotosintético (Harbinson y Rosenqvist, 2003).

Por otra parte, la fotosíntesis en condiciones estresantes se puede ver afectada no solo en la fase de transducción de energía, de la cual da cuenta el análisis de fluorescencia de la clorofila-a, como ya se dijo anteriormente, sino también en la fase de fijación de carbono por las limitaciones fotoquímicas o estomáticas que puedan llegar a presentarse, y de lo cual da cuenta el análisis de intercambio de gases (Long y Bernacchi, 2003). Estudios recientes han concluido que especialmente en condiciones de estrés hídrico, el análisis de intercambio de gases conduce a aumentar el conocimiento y comprensión de la respuesta vegetal y de los efectos del estrés en los parámetros fotosintéticos (Signarbieux y Feller, 2011), razón por la cual fue una de las metodologías utilizadas en este trabajo junto con el análisis de fluorescencia.

En las células vegetales, los cloroplastos son uno de los lugares más importantes en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), a bajas concentraciones estos compuestos tienen función en la señalización de procesos regulatorios celulares entre los que se incluyen, el mantenimiento del poder oxidativo y reductor de la célula y las respuestas adaptativas frente a condiciones estresantes adversas; sin embargo, en altas concentraciones puede causar daños en membranas, o en otras macromoléculas por su alta reactividad (Munné-Bosch y Peñuelas, 2003; Müller et al., 2001; Wilhelm y Selmar, 2011).

Existen principalmente dos vías que dan origen a ROS en cloroplastos, la transferencia de un electrón al oxígeno molecular en PSI que da origen a la formación del radical superóxido O_2^- y la transferencia de energía desde la clorofila triplete excitada ($^3Chl^*$) al oxígeno molecular, formando el oxígeno singlete (1O_2) en el PSII, estas especies altamente reactivas son las responsables de daño oxidativo directamente en el PSII y recientemente se han vinculado con la inhibición en la regeneración de la proteína D1 en casos de fotoinhibición crónica (Lushchak, 2011; Xiaoling et al., 2011; Chang-Cheng et al., 2010).

Para evitar el estrés oxidativo, la planta utiliza mecanismos enzimáticos (peroxidasa, ascorbato peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa) y/o no enzimáticos (carotenoides), de los cuales existe amplia evidencia que se producen en el

reconocimiento de patógenos y durante la interacción entre el hospedero y su invasor (Jubany-Marí *et al.*, 2010; Oelze *et al.*, 2008; Hong-bo *et al.*, 2008; Potters *et al.*, 2010). Debido a que bajo estas condiciones estresantes se acelera la producción de ROS y por lo tanto del mecanismo antioxidante, se evaluó la actividad específica de la enzima peroxidasa (EC. 1.11.1.7) y su papel en este tipo de estrés biótico.

1.2 Metodología

El montaje del experimento se realizó en el invernadero de vidrio de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología, donde se tienen valores diurnos promedio de radiación fotosintéticamente activa (PAR) de 200 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; temperatura de 27 °C y Humedad Relativa de 65 %, la realización de las mediciones se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Fisiología y Bioquímica Vegetal del mismo departamento, el aislamiento, mantenimiento y elaboración del inóculo del patógeno se hizo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Para la realización del experimento se obtuvieron 100 plántulas de gulupa de 70 días de edad compradas en un vivero que comercializa material vegetal certificado libre de patógenos, ubicado en el municipio de Tena, en el cual previamente se realizaron pruebas de análisis microbiológico de sustrato, confirmando ausencia de microorganismos patógenos (Ortiz, 2012).

Las plántulas se introdujeron al invernadero durante tres semanas previamente a la inoculación del experimento con el fin de aclimatarlas a las condiciones ambientales en las que se desarrolló el experimento (figura 1.1). En esta figura (1.1) se presenta el valor promedio de los datos registrados cada minuto entre las seis de la mañana y las seis de la tarde para cada variable, cada día del experimento. La Humedad Relativa (HR) mantuvo un valor promedio de 65% durante todo el tiempo de muestreo, mientras que los valores de Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) y temperatura presentaron valores promedio de 200 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 27 °C, respectivamente.

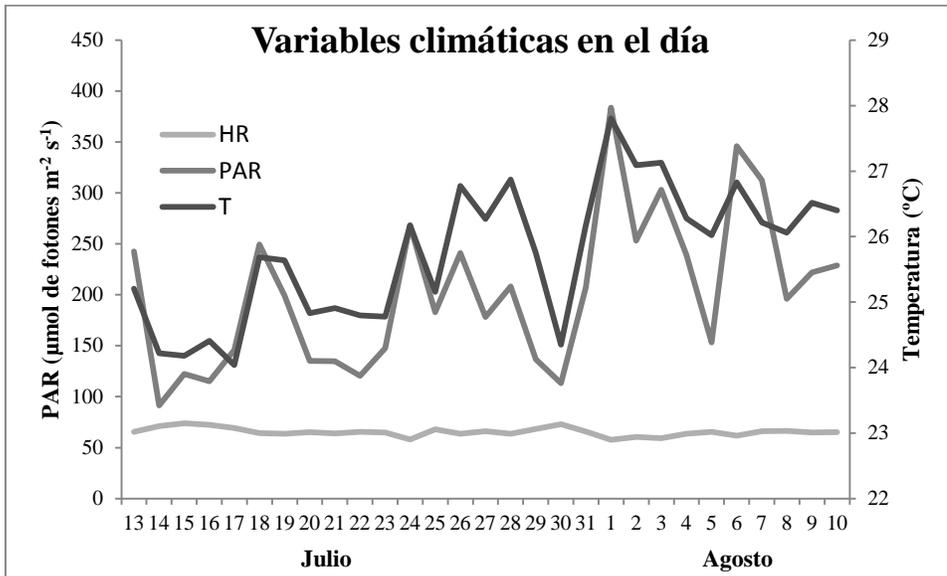


Figura 1.1. Condiciones ambientales diurnas en el invernadero durante el tiempo del experimento

El aislamiento de *F. oxysporum* se hizo a partir de plantas de aproximadamente un año de edad con sintomatología sugestiva avanzada de la enfermedad (Figura 1.2), obtenidas en la Finca San Juanito, Municipio de Granada (1890 msnm, PAR diaria promedio de 250 $\mu\text{mol fotones}/\text{m}^2\text{s}$, temperatura promedio 15°C, HR promedio de 85% y precipitación promedio mensual de 0.01 mm, medidas con estación climática marca Colteín).

En las plantas con sintomatología sugestiva de marchitez vascular producida por *F. oxysporum* no se observó ningún signo externo del patógeno; sin embargo, se observó el cuello de la raíz con vetas rojizas, las ramas primarias y secundarias con marchitamiento y deshidratación, hojas cloróticas y necróticas, frutos deshidratados aun unidos a la planta que no terminan de desarrollarse y adicionalmente producción de yemas y flores detenidas (figura 1.2).



Figura 1.2. Sintomatología sugestiva de estado avanzado de fusariosis

Luego de la caracterización de síntomas tanto en campo como en laboratorio, se obtuvieron explantes a nivel de tallo, que fueron sembrados en medio PDA y purificados en medio SNA (Leslie y Summerell, 2006) a partir de los cuales se prepararon cultivos monospóricos de acuerdo con la metodología descrita por Ortiz (2012). A partir de estos aislamientos, Ortiz (2012) corroboró que este aislamiento corresponde a la especie *F. oxysporum*.

Este aislamiento se mantuvo en condiciones de crio-conservación por tres meses, hasta su resiembra en medio PDA, a partir del cual se preparó en medio líquido extracto de malta (Pancreac, 2003) modificado por Ortiz (2012). En 6 erlenmeyers con 200 mL de extracto de malta estéril cada uno, se adicionaron tres rodajas con micelio joven de *F. oxysporum* en PDA, los cuales se mantuvieron en agitación durante 5 días a 125 revoluciones por minuto. Pasado este período, se sacó una muestra de 100 μ L con micropipeta estéril, se depositó en hematocitómetro Neubauer y se ajustó a la concentración de 10^6 esporas/ml (Ortiz, 2012).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, en el cual se pusieron en contacto 50 plántulas con agua destilada estéril, que en adelante se denominarán plántulas control y 50 plántulas con el inóculo descrito anteriormente, mediante la metodología de inmersión en el medio sin herida (Gardner, 1989 y Vakalouonakis, 1996 modificado por Ortiz, 2012). En un recipiente se colocaron 12 plántulas por vez, con la parte inferior del sistema radical desnudo (Haglund, 1989), a las cuales se adicionaron 400 mL de agua o del inóculo de concentración $1,14 \times 10^6$ conidias/mL, luego de 2 minutos, cada plántula fue trasplantada a un vaso plástico de 400 cc, con suelo estéril

como sustrato, fertilización apropiada (NPK) y en condiciones de riego a capacidad de campo.

Debido a que este es el primer trabajo en el que se realiza el seguimiento de la respuesta fisiológica de la parte aérea de *P. edulis* Sims., durante el período de incubación de *F. oxysporum*, se integró la metodología de intercambio de gases con el análisis de fluorescencia de la clorofila-a, a lo cual se sumó la medición del contenido de algunas variables bioquímicas que den indicios de los procesos que subyacen a la respuesta del aparato fotosintético, para desarrollar indicadores de monitoreo frente al estrés producido y detectar tempranamente la enfermedad, con el fin de determinar el momento oportuno para realizar estudios posteriores de señalización y regulación temprana a nivel genético y metabólico, ya que incluso en el caso del estrés hídrico aún existe desconocimiento sobre la respuesta molecular, a pesar de ser uno de los tipos de estrés más estudiados en el mundo por su relevancia en escenarios futuros de cambio climático (Pinheiro y Chaves, 2011).

Las variables de respuesta en las plántulas se evaluaron antes y después del momento de inoculación y por todo el período de incubación del patógeno, el cual se conoce como el tiempo entre la inoculación y la aparición de síntomas de la enfermedad (Agris, 2005). Aunque el retraso en el crecimiento es uno de los síntomas iniciales reportados para la marchitez por *Fusarium* (Ortíz, 2012), para determinar la finalización del período de incubación del patógeno se utilizó la aparición de la clase 1 en la escala ordinal utilizada para evaluar severidad de marchitez por *Fusarium* en gulupa empleada por Ortíz (2012) como sintomatología de la enfermedad (Tabla 1.2), las mediciones se hicieron en intervalos de 4 días, con lo cual se realizaron evaluaciones los días 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 28 después de inoculación (dpi).

CLASE	DESCRIPCIÓN
0	No hay síntomas
1	Ligera a moderada marchitez, clorosis.
2	Severa marchitez, con decoloración en tallo, defoliación.
3	Muerte de las plántulas

Tabla 1.2. Escala ordinal (modificada de Vakalounakis *et al.*, 2005), empleada para evaluar la severidad de marchitez por *Fusarium* en gulupa (Ortiz, 2012).

De cada grupo (control e inoculadas con *F. oxysporum*) se seleccionaron en forma aleatoria 4 plántulas, para un total de 8, las cuales se mantuvieron durante todo el experimento, a las cuales se les realizó el seguimiento del comportamiento de las variables relacionadas con el intercambio de gases (tasa de asimilación de CO₂ neta máxima, tasa transpiratoria, conductancia estomática, concentración subestomática de CO₂, temperatura de la hoja y Eficiencia en el uso de agua extrínseca (asimilación de CO₂/transpiración = A/E, μmol CO₂/mol H₂O)) e intrínseca (asimilación de CO₂/conductancia estomática = A/g_s, μmol CO₂/mol H₂O)) y medidas de fluorescencia de la clorofila-a (eficiencia cuántica fotoquímica máxima potencial del aparato fotosintético (Fv/Fm), eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Φ_{PSII}), disipación de la fluorescencia fotoquímica y no fotoquímica (qP, qNP y NPQ) y eficiencia en el transporte de electrones (ETR)). Estas mediciones se realizaron en las mismas 3 hojas por cada plántula a la misma hora y bajo las mismas condiciones en cada punto de muestreo.

Las mediciones de intercambio de gases (tasa de asimilación de CO₂ neta máxima, tasa transpiratoria, conductancia estomática, concentración subestomática de CO₂ y temperatura de la hoja) se llevaron a cabo con el Analizador de Gases por Infra Rojo (IRGA) Lc-pro+, marca ADC. Para medir estas se aplicó sobre cada hoja PAR de 1500 μmoles de fotones m⁻² s⁻¹ por 2 minutos previamente a realizar la medición y durante la misma. La tasa de asimilación fotosintética neta máxima se determina en el equipo mediante la aplicación de ciertas fórmulas en las cuales se tiene en cuenta la diferencia entre la concentración de CO₂ en la cámara donde se encuentra la hoja a medir y el ambiente, la conductancia estomática, implican mayor número de estomas abiertos o mayor apertura estomática y viceversa. Los estomas son los orificios, presentes generalmente en el envés de la hoja, por los que se realiza el intercambio de gases (O₂, CO₂ y vapor de agua) y de allí que sea importante confirmar su participación en la reducción de las tasas fotosintéticas, pues no solo desempeñan un papel importante en la disponibilidad de sustrato (CO₂) para la fase de fijación de carbono en la fotosíntesis, sino que también participan en la liberación de calor mediante la transpiración, con lo cual se reduce la presión térmica sobre la lámina foliar (Berger, 2010).

La eficiencia en el uso del agua se puede considerar en dos vías, la Eficiencia extrínseca en el Uso del Agua (WUE = A/E) y la Eficiencia intrínseca en el Uso del Agua (WUEi =

A/g_s), las cuales dan cuenta del costo hídrico asumido por la planta para lograr aumentar su biomasa (Medrano et al., 2007).

Los parámetros obtenidos a partir del análisis de fluorescencia de la clorofila-a, dan cuenta del estado de los procesos y elementos relacionados con la fase fotoquímica de la fotosíntesis y por esto, con su medición y resultados se pretende dilucidar la razón de la disminución en las tasas de asimilación neta en las plántulas afectadas por *F. oxysporum*

Para realizar las mediciones de fluorescencia de la clorofila-a (eficiencia cuántica fotoquímica máxima potencial del aparato fotosintético (Fv/Fm), eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Φ_{PSII}), disipación de la fluorescencia fotoquímica y no fotoquímica (qP, qNP y NPQ) y eficiencia en el transporte de electrones (ETR)), cada hoja medida fue sometida a 45 minutos de aclimatación en oscuridad, en cuarto oscuro y con sobres de cartulina negra individuales, con el fin de oxidar todos los centros de reacción del aparato fotosintético. Posteriormente, con un fluorómetro modulado Marca Hansatech, cada hoja fue sometida a un pulso de luz saturante de 2000 μ moles de fotones/m²s por 0.7 segundos para determinar la eficiencia fotosintética de la planta (Fv/Fm), luego de lo cual se aplicó un rayo de luz actínica de 50 μ moles de fotones/m² s y se realizó una espera de 100 segundos hasta alcanzar la fluorescencia estable (Fs), para poder medir, luego de aplicar otro rayo de luz saturante igual al primero, la tasa de transporte de electrones (ETR), la disipación fotoquímica y no fotoquímica (qP, qN y NPQ) y el rendimiento cuántico del Fotosistema II (Φ_{PSII}).

Con la observación de los resultados de la eficiencia máxima potencial de la fotosíntesis (Fv/Fm) se puede determinar la eficiencia en la transferencia de energía entre el complejo cosechador antena (LHC) y el centro de reacción (CR) del fotosistema II (Baker, 2008) y además este parámetro sirve como indicador de estrés en plantas, ya que esta medida se toma en horas del amanecer y sirve como indicador de la recuperación del aparato fotosintético después de mantenerse en oscuridad durante toda la noche, por lo que valores por debajo de 0,83 revelan efectos del factor estresante sobre la fisiología de la planta (Maxwell y Johnson, 2000; Chang-Hyo et al., 2012).

Las restantes 92 plántulas fueron usadas en muestreos destructivos, para lo cual, en cada día de medición se seleccionaron aleatoriamente 4 plántulas sanas y 4 plántulas enfermas, con el fin de determinar en ellas, el contenido relativo de agua en hojas, así como el contenido de clorofilas, carotenoides, proteínas solubles y actividad de la enzima peroxidasa (EC 1.11.1.7).

El contenido relativo de agua en hojas (CRA) se determinó en diez discos de un cm de diámetro por cada planta, los cuales se pesaron en balanza analítica inmediatamente después de ser cortados con sacabocados (P_{fresco}), posteriormente fueron llevados a cajas de Petri donde se sumergieron en agua destilada por tres horas en oscuridad, luego de lo cual fueron nuevamente pesados ($P_{turgido}$) para ser llevados por 48 horas a secado en horno a 70 °C hasta eliminar todo su contenido de agua y ser pesados por última vez (P_{seco}), con estos datos se calculó el CRA a partir de la siguiente fórmula (Weatherley y Barrs, 1965):

$$CRA = \frac{P_{fresco} - P_{seco}}{P_{turgido} - P_{seco}} * 100$$

El estudio de los pigmentos es importante debido a la variedad de funciones en las que se ven envueltos; forman parte integral del aparato fotosintético, son los principales actores en la captura de luz y también tienen funciones fotoprotectoras a través del apagamiento no fotoquímico (Veres *et al.*, 2006): Por su parte, las enzimas del sistema antioxidante son una característica general de las interacciones compatibles o incompatibles entre plantas y patógenos, que se cree están implicadas en la transducción de señales de respuesta a estrés biótico y abiótico para contrarrestar los efectos tóxicos de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno que se producen en estas circunstancias (Latowski *et al.*, 2010), por lo que se consideró importante abordar su comportamiento para complementar la información obtenida con las metodologías expuestas anteriormente.

Las determinaciones bioquímicas fueron adecuadas a partir de las metodologías descritas para pigmentos por Solarte *et al.* (2010) y para enzima peroxidasa (EC 1.11.1.7) por Moreno *et al.* (2010).

Para las determinaciones bioquímicas se tomaron tres plantas por tratamiento y punto de muestreo, de las cuales se maceraron separadamente raíz y hoja y se pesaron 0,1 g por duplicado adicionándole 0,022 g de PVPP en tubo eppendorf de dos mL de capacidad, cubierto con papel aluminio.

En cada tubo se repitió siete veces el siguiente procedimiento, adicionar 1,5 mL de acetona 80% v/v a -10°C, mezclar en vórtex por 2 minutos y centrifugar por 3 minutos a 8000 rpm, retirando el sobrenadante con micropipeta de 1 mL en frasco ámbar cubierto con papel aluminio (Lichtenthaler, 1987).

Para la determinación del contenido de pigmentos, cada sobrenadante fue llevado a balón de 25 mL y aforado con acetona 80% v/v -10 °C, e inmediatamente se realizaron lecturas en espectrofotómetro a 663 nm, 647 nm y 470 nm, con las cuales se obtuvieron las concentraciones de cada pigmento siguiendo las ecuaciones desarrolladas por Lichtenthaler en 1987, que se indican a continuación:

$$\text{Clorofila } a = 12,25 * \text{Abs}_{663 \text{ nm}} - (2,79 * \text{Abs}_{647 \text{ nm}})$$

$$\text{Clorofila } b = 21,5 * \text{Abs}_{647 \text{ nm}} - (5,1 * \text{Abs}_{663 \text{ nm}})$$

$$\text{Clorofila total} = 7,15 * \text{Abs}_{663 \text{ nm}} + (18,7 * \text{Abs}_{647 \text{ nm}})$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 * \text{Abs}_{470 \text{ nm}} - 1,82 * \text{clorofila } a - (85,02 * \text{clorofila } b)}{198}$$

La actividad enzimática peroxidasa se determinó por medio del método modificado de o-dianisidina/peróxido (Dalisay y Kúc, 1995; Kireyko *et al.*, 2006), en el cual a partir del sedimento obtenido en el procedimiento anterior, se adicionaron 2 mL de buffer fosfato de sodio 110 mM, 3,82% p/v PVP-40, pH 7,2, se agitó durante una hora sobre cama de hielo (4 °C) y se centrifugó una hora a 8000 rpm y 4 °C.

El sobrenadante se separa para la determinación de actividad enzimática peroxidasa y proteína soluble total. Para la primera de estas determinaciones, en la celda de cuarzo del espectrofotómetro se realiza la siguiente reacción: a 80 µL de H₂O₂ se adicionan 100 µL del extracto enzimático, se agita y se adiciona 390 µL de buffer fosfato de sodio 110 mM pH 6,8, se agita y se agrega 30 µL de o-dianisidina, en seguida se lee absorbancia a

460 nm cada cinco segundos durante 120 segundos y se grafican los resultados para obtener el cambio de absorbancia por segundo (Moreno *et al.*, 2010).

Para la determinación de proteínas solubles se agrega a cada pozo de microplacas 25 μ L del extracto enzimático utilizado en el procedimiento anterior, se adicionan 200 μ L de reactivo de Bradford y se realiza lectura de absorbancia a 595 nm, con cuyo resultado se interpola en la curva de calibración realizada previamente (Anexo A).

Finalmente, se concluyó el experimento corroborando que el agente causal de la sintomatología observada, fuese *F. oxysporum*, realizando reaislamientos a partir de 5 explantes de tallo de 3 plántulas control y 3 plántulas inoculadas con el inóculo, seleccionadas al azar, obteniendo los resultados de la tabla 1.2, figura 1.4 y 1.5.

Morfotipo de hongo	Medio de cultivo	Identificación de la plántula	% de ocurrencia
<i>F. oxysporum</i>	PDA	Control	0
<i>F. oxysporum</i>	PDA	Control	0
<i>F. oxysporum</i>	PDA	Control	0
<i>F. oxysporum</i>	PDA	Inoculada con <i>F. oxysporum</i>	100
<i>F. oxysporum</i>	PDA	Inoculada con <i>F. oxysporum</i>	100
<i>F. oxysporum</i>	PDA	Inoculada con <i>F. oxysporum</i>	100

Tabla 1.2. Ocurrencia de re-aislamientos del patógeno

A partir de la observación macro (figura 1.4) y microscópica (figura 1.5) del patógeno reaislado, se llega a la conclusión que corresponde a *F. oxysporum*.

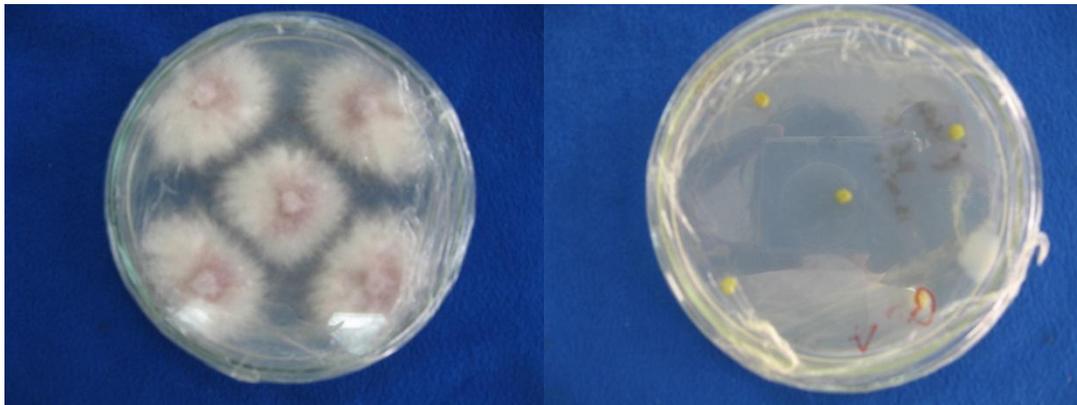


Figura 1.3. Re-aislamientos a partir de tallos de gulupa. Izquierda: Plántulas inoculadas con *F. oxysporum*. Derecha: Plántulas control.



Figura 1.4 Macroconidias de *F. oxysporum*. 1000 Aumentos.
Escala de la barra 5 μm . Cortesía de Ortiz (2012).

En cuanto al análisis estadístico, para las variables destructivas (Contenido Relativo de Agua, actividad Peroxidasa (EC. 1.11.1.7), contenido de proteínas, carotenoides y clorofilas) el experimento se definió como un diseño factorial AxB, en el que el factor A son los grupos de plantas y el factor B, los días, con 2 (Control e inoculadas con *F. oxysporum*) y 8 (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 dpi) niveles respectivamente, en el cual se pretende conocer el efecto de cada factor y de la interacción de ambos en cada variable respuesta. A partir del análisis Q-Q plot se probó la normalidad de los residuos y a partir de pruebas de Levene se corroboró la homogeneidad de varianzas a través de los diferentes niveles de los factores, luego de lo cual se realizaron las respectivas ANOVAS para probar la significancia de las interacciones entre e intra factores en el programa Statistix 9.0.

En el caso de las variables no destructivas (Tasa de Asimilación Neta Máxima - $A_{\text{máx}}$, Transpiración - E, Conductancia estomática - g_s , respiración en oscuridad R_d , concentración subestomática de CO_2 - C_i , temperatura de la hoja, Eficiencia en el uso de agua extrínseco e intrínseco, eficiencia máxima potencial del aparato fotosintético - F_v/F_m , eficiencia fotoquímica del fotosistema II, disipación de la fluorescencia fotoquímica y no fotoquímica - q_P , q_{NP} y NPQ, eficiencia en el transporte de electrones -ETR) se consideró un análisis de medidas repetidas, puesto que se refiere a datos en los cuales la respuesta de cada unidad experimental es observada en múltiples ocasiones (Davis, 2002) por lo que se hizo un análisis de ANOVAS para medidas repetidas multivariado que no requiere cumplir el supuesto de esfericidad en el programa Statistix 9.0.

1.3 Resultados y Discusión

Tasa de asimilación fotosintética máxima

Se puede observar en la figura 1.6, que el efecto de *F. oxysporum* en la fisiología de *P. edulis* Sims, en concordancia con lo reportado en la literatura, produce una marcada disminución en las tasas fotosintéticas en los días posteriores a la inoculación con el patógeno; debe resaltarse que hay disminuciones tanto para las plántulas control como para las inoculadas con el patógeno en comparación con el día 0 dpi, lo cual es evidencia de que las condiciones del experimento y la manipulación del sistema radical tuvieron incidencia sobre la fisiología de las plántulas.

Sin embargo, al comparar el grupo control con el inoculado con el patógeno, puede advertirse (figura 1.6), que en todos los casos la Tasa de asimilación fotosintética neta máxima es inferior en el grupo de plántulas enfermas en comparación con las plántulas control, siendo el día más contrastante el día 24 dpi, en el cual el efecto del patógeno alcanza a disminuir en más de un 70% la tasa fotosintética máxima (Valores de $A_{m\acute{a}x}$ para plántulas control, 7,89 $\mu\text{moles CO}_2/\text{m}^2\text{s}$, y para plántulas inoculadas con el patógeno, 2,12 $\mu\text{moles CO}_2/\text{m}^2\text{s}$; $p=0,000$; $\alpha=0,05$).

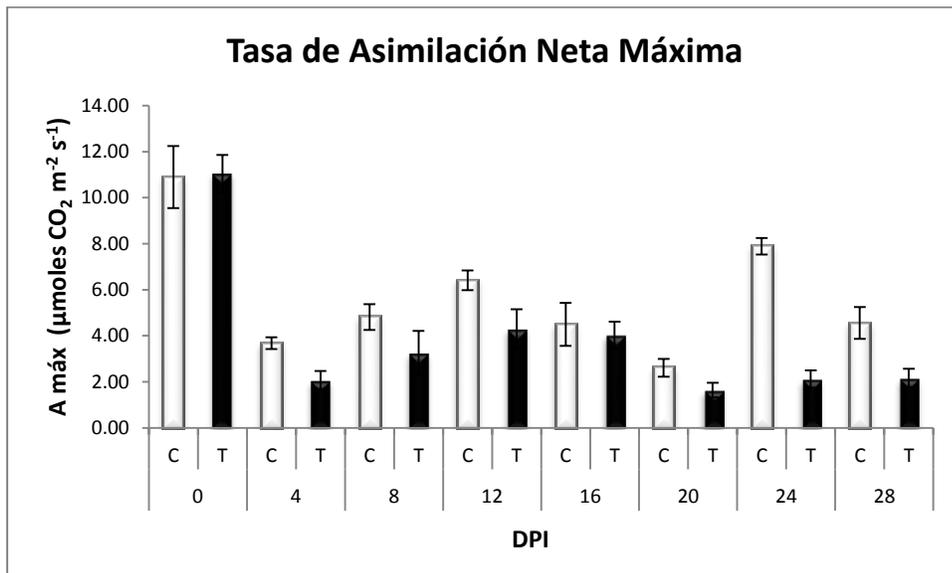


Figura 1.5. Valores promedio de la Tasa de asimilación fotosintética máxima en plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4

El día antes de inoculación las plántulas de *P. edulis* Sims, presentan valores muy cercanos a los máximos reportados para plántulas en condiciones de campo en la región de la sabana de Bogotá, como lo expone Pérez y Melgarejo (2012), la Tasa de asimilación fotosintética neta máxima de plántulas en Chía es de 12,99 $\mu\text{moles CO}_2/\text{m}^2\text{s}$ y en las plántulas del experimento, el día 0 dpi se tienen valores promedio de 10,9 $\mu\text{moles CO}_2/\text{m}^2\text{s}$ y 11,05 $\mu\text{moles CO}_2/\text{m}^2\text{s}$ en cada grupo, sin diferencias estadísticamente significativas para este punto de muestreo ($p= 0.9283$; $\alpha = 0.05$).

Al prestar atención al grupo de plántulas control (figura 1.6., barras blancas), es posible establecer un patrón que coincide con el comportamiento de la radiación fotosintéticamente activa en los días de muestreo (figura 1.7), presentándose una mayor tasa de asimilación en los días de mayor PAR y temperatura (días 24 dpi y 28 dpi).

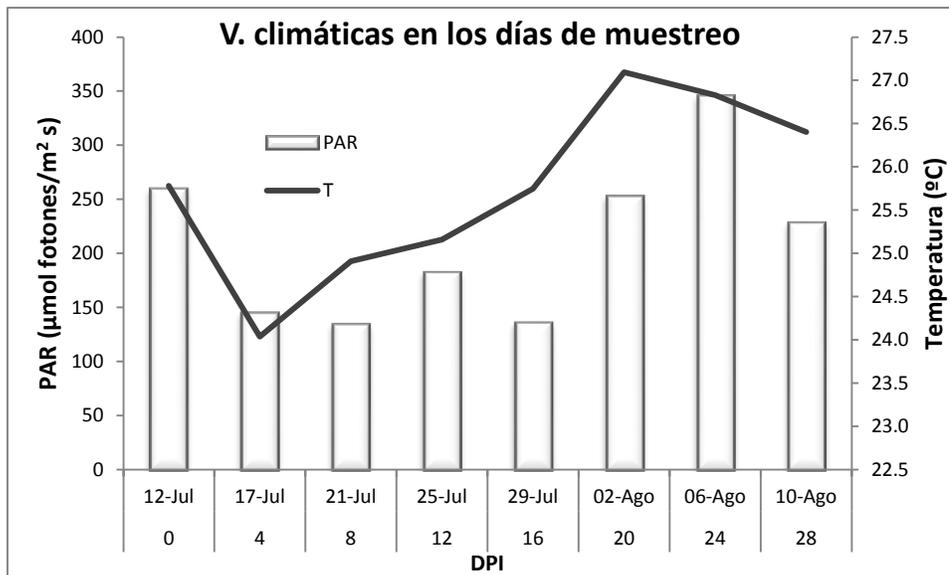


Figura 1.6. Condiciones ambientales diurnas en el invernadero en los días de muestreo

Como se ha reiterado a lo largo de este trabajo, muchos tipos de condiciones estresantes pueden generar un desacople de los procesos fisiológicos normales en las plantas y como se corrobora con estos resultados, *F. oxysporum* tiene un efecto sobre el aparato fotosintético de la gulupa, disminuyendo su Tasa de asimilación fotosintética neta máxima. Sin embargo, se ha reportado para hongos fitopatógenos del suelo que ingresan por vía radical y se sitúan en el tejido xilemático, que paralelamente a la disminución

fotosintética se observa un descenso en el contenido de agua a nivel celular, siendo esta limitación impuesta por la obstrucción del patógeno y a su vez, la responsable de las disminuciones en las tasas de asimilación neta (Pascual *et al.*, 2010; Bowden y Rouse, 1991; Saeed *et al.*, 1999).

Contenido relativo de agua

No obstante, en el comportamiento de la variable Contenido Relativo de Agua– CRA, a partir del día 12 dpi se presentan diferencias estadísticamente significativas (Anexo C) entre las plántulas inoculadas con el patógeno y las plántulas control, pero contrario a lo que se esperaba, las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* tienen mayores porcentajes de CRA, con excepción del día 16 dpi (figura 1.8) mientras que en las plántulas control el nivel de CRA es estable, disminuyendo ligeramente en los días más calurosos (Días 20, 24 y 28 dpi).

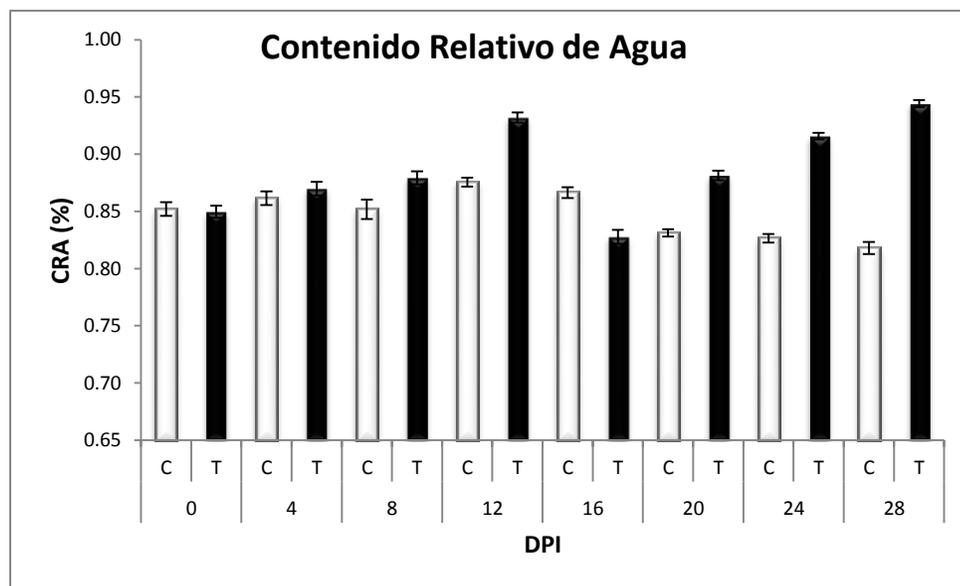


Figura 1.7. Valores promedio del Contenido Relativo de Agua de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4

Estos resultados son contrastantes con lo que ocurre con procesos de infección de otros hongos patógenos del suelo, pues se ha reportado disminución de las tasas de fotosíntesis, así como reducción en los contenidos de agua a nivel celular (Aguirreolea *et*

al., 1995; Hampton *et al.*, 1990; Lorenzini *et al.*, 1997; Pascual *et al.*, 2010; Bowden y Rouse, 1991; Saeed *et al.*, 1999).

Se resalta el hecho de que las plántulas utilizadas en la determinación de este parámetro son diferentes a las utilizadas en las mediciones de la Tasa de asimilación fotosintética neta máxima; sin embargo, debido al tamaño de la muestra y a los pequeños valores de los errores estándar, tanto para cada grupo, como para cada día de muestreo (figura 1.8), se puede deducir que esta es una medida representativa de lo que está ocurriendo en las demás plantas de la población.

El componente hídrico en las plántulas de este experimento se determinó por medio del Contenido Relativo de Agua, debido a que en experimentos preliminares se intentó utilizar el Potencial Hídrico del tallo, como un indicador del estatus hídrico en el órgano de ubicación del patógeno; pero, los resultados obtenidos no daban evidencia del efecto del patógeno en su hospedero (con diferencias estadísticamente significativas solamente en el día previo a la inoculación) y por eso se optó por esta metodología con la cual se da cuenta del balance hídrico de la planta, a la vez que se tienen en cuenta procesos de osmorregulación que pueden darse en plantas sometidas a estrés hídrico (Hare *et al.*, 1998)

El ajuste osmótico es un importante mecanismo de defensa de las plantas en la estrategia de tolerar la condición estresante, con éste se procura mantener un nivel de agua disponible a nivel celular con el fin de continuar con la acumulación de biomasa y mantener el control sobre el potencial eléctrico de membrana, acoplando el metabolismo y las tasas de fotosíntesis a niveles mínimos (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000).

A partir de los resultados obtenidos en CRA (figura 1.8), se sugiere la posibilidad de que estas plántulas de gulupa hagan uso de la acumulación de metabolitos protectores o enzimas del sistema antioxidante, como la peroxidasa, de la cual se ha sugerido tiene un rol frente a fitopatógenos (Basalah *et al.*, 1988; He *et al.*, 2001; Ojha y Chatterjee, 2012). Como se observa en el grupo inoculado con *F. oxysporum*, hay una mayor disponibilidad hídrica a nivel celular, lo cual posiblemente esté relacionado con alguna acumulación de

solutos compatibles tipo azúcares como respuesta a la detección y ajuste metabólico a partir del día 12 dpi ante la obstrucción xilemática al flujo normal de agua.

La disminución en la Tasa de asimilación fotosintética neta máxima puede ser explicada por diferentes razones, puede deberse a razones temporales relacionadas con respuestas al ambiente y a la disponibilidad de agua (procesos de respuesta rápida como cierre estomático, disminución del CO₂ subestomático, disminución de la transpiración o cambios en la temperatura de la hoja) o puede deberse a daños reversibles o irreversibles de los diferentes componentes del aparato fotosintético (daños en la integridad de membranas o destrucción de elementos importantes del aparato fotosintético) e incluso puede ser causada por problemas en las vías metabólicas (disminución de la actividad enzimática o del sustrato necesario para la fotosíntesis) (Ribeiro *et al.*, 2003 y Massacci *et al.*, 2008).

Dado que el contenido relativo de agua a nivel celular no se ve afectado negativamente por la presencia del patógeno, no podría asociarse la disminución en las tasas de asimilación fotosintética máxima con limitaciones hídricas a nivel del cloroplasto, organelo donde suelen confinarse los solutos compatibles, además del citosol (Rontein *et al.*, 2002), y por otra parte, al suponer un alto contenido de osmoprotectantes como medida de tolerancia al estrés en plántulas de gulupa, se puede sugerir que la disminución de las tasas fotosintéticas tampoco debe estar relacionada con el daño de membranas u otros elementos en el proceso fotosintético.

Conductancia estomática

Ya que una de las primeras reacciones con las que suele asociarse la disminución de la tasa de asimilación es el cierre estomático (Chang-Cheng *et al.*, 2010; Xiaoling *et al.*, 2011; Flexas y Medrano, 2002), a continuación se analizan los resultados obtenidos para este parámetro (g_s), con el fin de dilucidar su papel en la limitación fotosintética durante la patogénesis, pues como ya se mencionó con anterioridad la disminución fotosintética puede deberse a limitaciones estomáticas o no estomáticas (Cornic, 2000; McDowell, 2011).

Con los resultados obtenidos (figura 1.6 y 1.9) se corrobora que la gulupa es una especie muy sensible a cambios en las condiciones externas, dado que la velocidad de respuesta

foliar es muy rápida, pues ya a partir del día 4 dpi se ve cómo la respuesta estomática se encuentra altamente correlacionada con la respuesta en la Tasa de Asimilación Fotosintética máxima ($r=0,9109$, Anexo B).

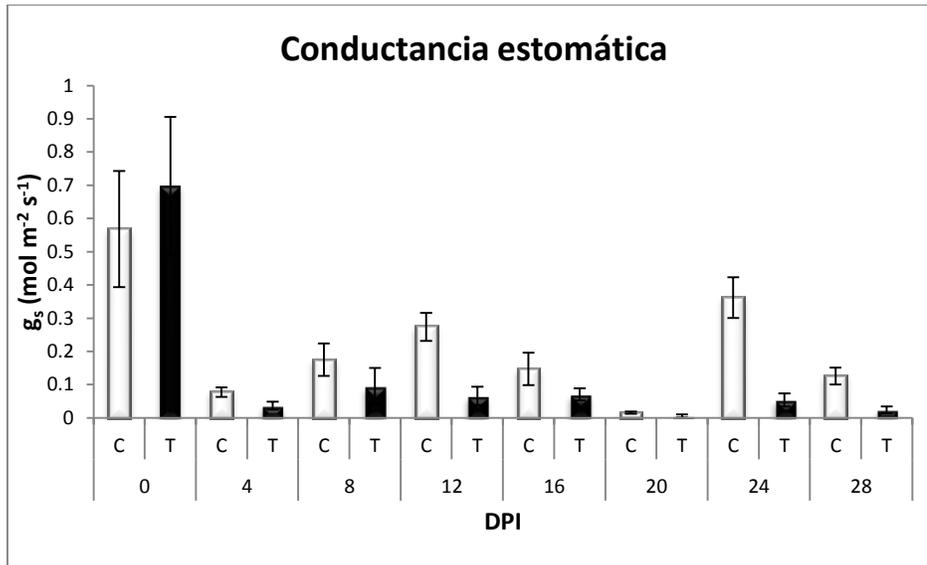


Figura 1.8. Valores promedio de la Conductancia estomática en plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. $n=4$

El comportamiento de estos dos parámetros sigue un patrón muy similar, desde el día 4 dpi se presenta una disminución significativa de los valores de g_s y de $A_{máx}$ tanto para las plántulas control, como para las inoculadas con *F. oxysporum*, cuyos valores no se recuperan durante todo el tiempo del experimento y que son resultado tanto de las variaciones climáticas en el invernadero, como del efecto del hongo fitopatógeno en la fisiología del hospedero. En los días posteriores a la inoculación, las plántulas enfermas siempre presentan una conductancia estomática inferior a la del grupo control, con diferencias estadísticamente significativas entre grupos a partir del día 12 dpi (Anexo B), con lo cual, a pesar de que este parámetro tiene una velocidad de respuesta rápida, el efecto del patógeno tiene pertinencia a partir del día 12 dpi, como sucede con CRA (figura 1.8).

Dentro de lo que se ha reportado en la literatura (Medrano *et al.*, 2007; Chang-Cheng *et al.*, 2010; Xiaoling *et al.*, 2011), los resultados obtenidos se pueden interpretar como una respuesta típica de las plantas ante diferentes clases de estrés (hídrico, por bajas

temperaturas, por baja radiación o por enfermedad), donde la primera reacción es el cierre estomático que conlleva a disminuciones en las tasas fotosintéticas; sin embargo, debido a que por causa del cierre estomático no tiene lugar una disminución consecuente en la disponibilidad de CO₂ (figura 1.10), la reducción de la fotosíntesis no puede atribuirse a limitaciones estomáticas, pues de acuerdo con el modelo para fotosíntesis en plantas C₃ de Farquhar y Sharkey (1982), esto ocurre únicamente si las tasas de fotosíntesis y la concentración intracelular de CO₂ disminuyen mientras se presentan aumentos en la resistencia estomática (Flexas y Medrano, 2002).

Concentración subestomática de CO₂

Para este caso, las concentraciones de CO₂ a nivel intracelular (C_i) no disminuyen proporcionalmente con la reducción en la conductancia estomática (figura 1.10), inclusive no hay diferencias estadísticamente significativas ni entre días, ni entre tratamientos en los días posteriores a la inoculación (Anexo B), a pesar del notable cierre estomático que experimentan las plántulas enfermas en comparación con las control, como consecuencia de la acción del estrés producido por el patógeno.

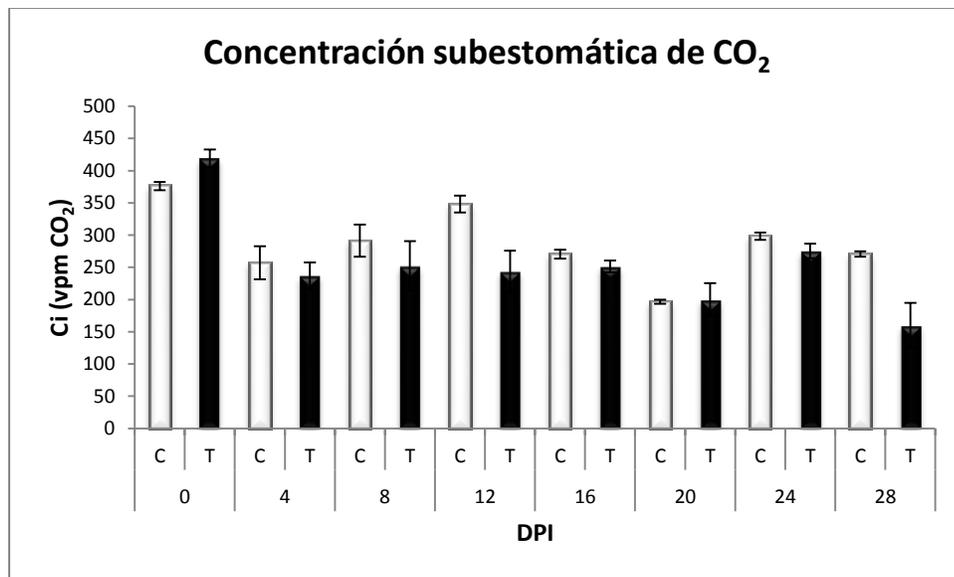


Figura 1.9. Valores promedio de la Concentración subestomática de CO₂ en plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4

De hecho, al analizar la correlación existente entre la disponibilidad de CO₂ intracelular y la conductancia estomática, se puede advertir que las plántulas control (figura 1.11, cuadrados blancas) alcanzan mayores valores de g_s los cuales se encuentran altamente correlacionados con aumentos en C_i ($r=0,849$); mientras que en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* (figura 1.11, cuadrados rojos), en primer lugar, no hay variaciones tan grandes de g_s en comparación con las plántulas control (valores entre 0,01 y 0,1), y adicionalmente, los valores de C_i se alcanzan con mayores o menores valores de conductancia estomática, lo que indica que C_i no depende de g_s para el caso de las plántulas enfermas, confirmando así que la limitación fotosintética es no estomática, ni tampoco debida a la disminución del contenido de agua a nivel celular (figura 1.8).

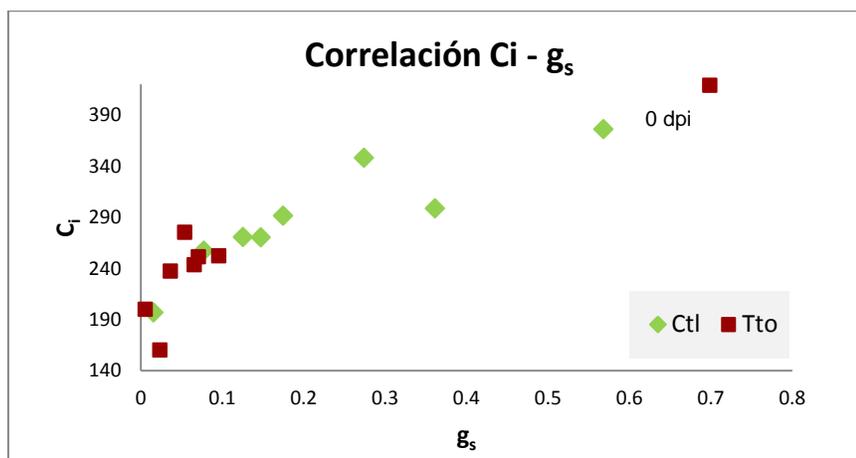


Figura 1.10. Correlación de los parámetros CO₂ intracelular y conductancia estomática

Tasa de transpiración

En cualquier caso, el cierre estomático también tiene como consecuencia la reducción en las tasas de transpiración, E (Farquhar y Sharkey, 1982; Flexas y Medrano, 2002, Medrano *et al.*, 2007; Chang-Cheng *et al.*, 2010; Xiaoling *et al.*, 2011), las cuales en este experimento se ajustan a lo descrito en la literatura, con un patrón de comportamiento muy similar al de las tasas de asimilación neta máxima (figuras 1.6 y 1.12).

Como puede verse (figuras 1.6, 1.9 y 1.12), la apertura o cierre estomático se constituye en un importante mecanismo de control que restringe la difusión del vapor de agua desde la hoja hacia la atmósfera ($r=0,9698$ entre g_s y E , Anexo B), a la vez que controla el ingreso de gas carbónico en el sentido contrario.

En la figura 1.12, se observa que el patógeno también tiene efecto sobre las tasas de transpiración, las cuales se ven disminuidas en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* en todos los puntos de muestreo diferentes a 0 dpi. Los bajos valores de E en las plántulas afectadas por el patógeno implican menor costo hídrico para la planta, como respuesta al efecto del patógeno en la obstrucción del transporte de agua por los vasos xilemáticos.

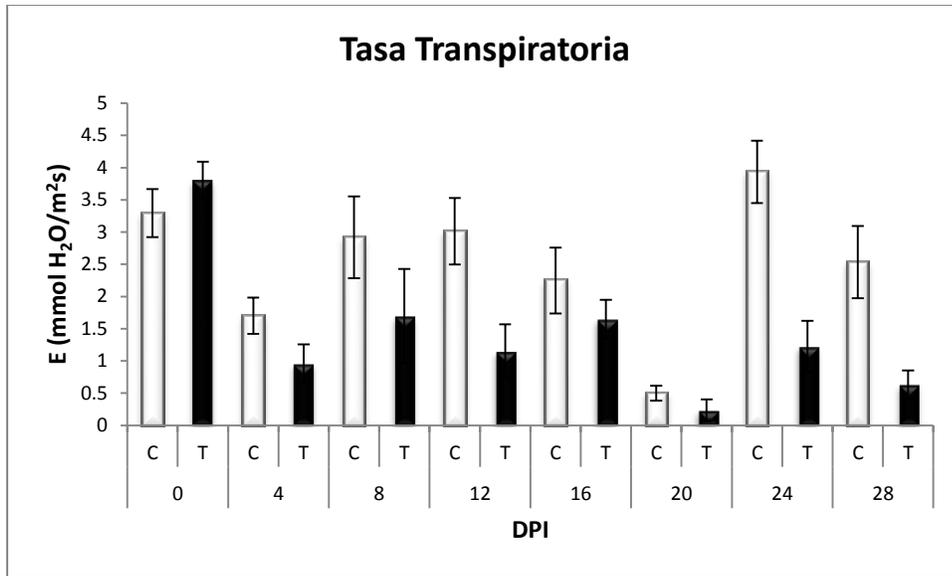


Figura 1.11. Valores promedio de la Tasa de transpiración en plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4

Eficiencia en el uso de agua

En la figura 1.13 puede observarse que en efecto, las plántulas de gulupa responden ajustando su eficiencia en el uso del agua debido a la presencia del estrés biótico producido por *F. oxysporum*, independientemente incluso del cierre estomático.

En las plántulas control indiferentemente del valor de apertura estomática, no se mejora la eficiencia en el uso del agua ni la eficiencia de la transpiración, inclusive a mayor apertura estomática mayor costo hídrico de la regulación fotosintética (figura 1.13-B). Por ejemplo, el día 24 dpi fue un día de alta radiación (PAR= 346 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la cual produjo una apertura estomática importante de 0,4 $\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con la cual se alcanza el mayor valor de $A_{\text{máx}}$ después de iniciado el experimento ($A = 7,89 \mu\text{moles} \text{CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$);

sin embargo, también se produce una de las tasas de transpiración más altas pos inoculación ($E = 3,9 \text{ mmol H}_2\text{O/m}^2\text{s}$), lo cual resulta ser muy costoso para la planta ($\text{WUE}_i = 24,16 \text{ } \mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$), pues implica mucho gasto hídrico producir esa tasa de fotosíntesis, con lo cual se convierte en el día de menor regulación de estos procesos.

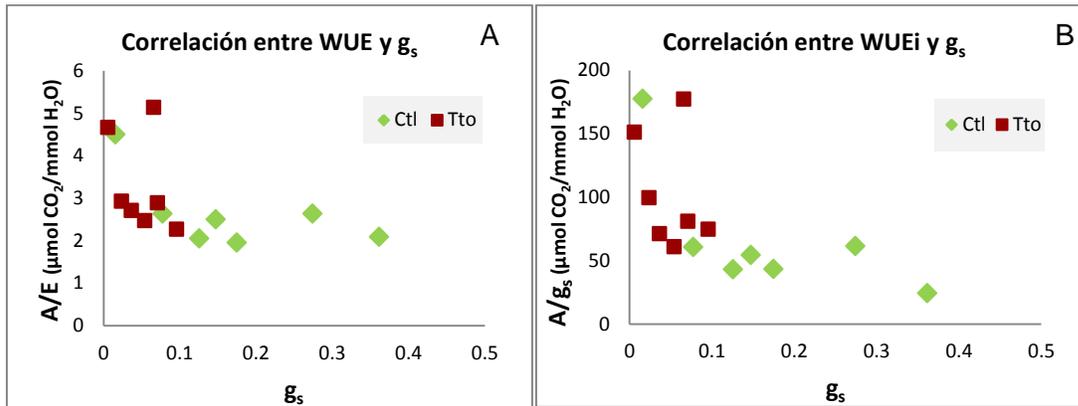


Figura 1.12. Eficiencia en el uso de agua y su relación con la apertura estomática.

En las plántulas inoculadas con el hongo, en contraste, se destacan altos valores de WUE y WUE_i en los días 12 y 20 dpi, los cuales alcanzan a ser el doble del valor de los otros días pos inoculación; esto quiere decir que en estos días (12 y 20 dpi) con similar apertura estomática se pudo llevar a cabo la misma fotosíntesis con la mitad del costo hídrico, procurando así mayor regulación del proceso fotosintético.

Aunque estos resultados son a nivel de hoja y no a nivel de planta, pueden sugerir que esta especie está en capacidad de mantenerse en condiciones donde los requerimientos hídricos sean limitados, lo cual es concordante con los resultados obtenidos en CRA, y que es típico de plantas con estrategias adaptativas de tolerancia a la desecación (Flexas *et al.*, 2004). A partir de estas consideraciones, se pueden proponer futuras investigaciones a nivel de cultivo, teniendo en cuenta que en otros cultivos como la vid, limitaciones hídricas moderadas mejoran la calidad del fruto mientras que las limitaciones hídricas muy severas pueden afectar su tamaño y cantidad (Medrano *et al.*, 2007).

Temperatura foliar

En todos los casos, la transpiración es un proceso vital que dentro de sus objetivos cuenta con la función de refrigerar la hoja, razón por la cual es el determinante principal de la temperatura foliar - TI (Berger *et al.*, 2010); sin embargo, en este caso se encontró

una discutible correlación entre estos dos parámetros ($r=-0,5043$), pues tal como se observa en las figuras 1.12 y 1.14, debido a que las plántulas control tienen tasas de transpiración más altas, la temperatura foliar es menor en este grupo en todos los puntos del muestreo y adicionalmente, al observar por ejemplo el día 20 dpi, que es cuando ocurre el cierre estomático más acentuado de todo el muestreo (figura 1.9), el cual causa las menores tasas de transpiración (figura 1.12), se da la mayor temperatura foliar para ambos grupos (figura 1.14).

Sin embargo, no se encontraron variaciones estadísticamente significativas entre tratamientos en cada punto de muestreo (Anexo B), con lo cual se puede suponer que las plántulas de gulupa afectadas por fusariosis deben utilizar otros mecanismos de disipación de energía calórica, ya que por su reducida conductancia estomática y transpiración no deberían tener valores de temperatura foliar tan similares a los de las plántulas control (diferencias inferiores a $0,5^{\circ}\text{C}$ en la mayoría de los días dpi).

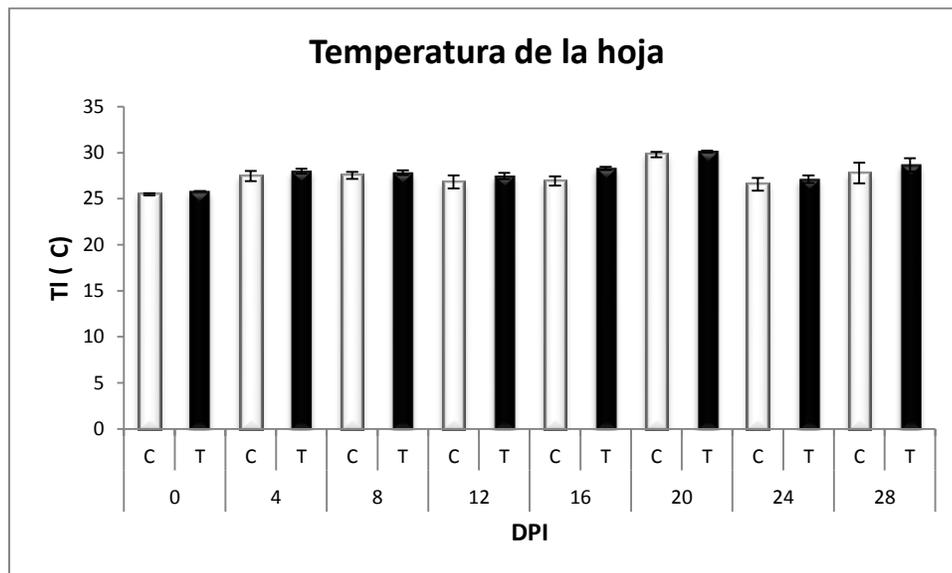


Figura 1.13. Temperatura foliar para cada día de muestreo. Plántulas control (columnas blancas) y plántulas inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras). Valores promedios para cada día. Las barras representan el error estándar. $n=4$

Al comparar las plántulas enfermas con las control, las primeras presentan una apertura estomática disminuida hasta en un 85% para el día 24 DPI (figura 1.9), que causa una reducción en la transpiración de 68% (figura 1.12), mientras que la temperatura de la hoja

prácticamente sea la misma (TI = 26,5 y 27,1 °C, para plántulas control y afectadas por *F. oxysporum*, respectivamente para ese día de muestreo, figura 1.14).

El parámetro Temperatura Foliar es de importancia en el análisis de las variaciones en el proceso fotosintético por dos razones; primero, porque en general, incrementos en la temperatura inducen cambios en la actividad total, la activación y la estructura de las enzimas, de las cuales depende considerable número de reacciones en el Ciclo de Calvin y segundo, porque aumentos en la temperatura, disminuyen la solubilidad de CO₂, resultando en menor disponibilidad del mismo, a favor del O₂ en el sitio activo de la Rubisco (Galmés *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2005).

Debido a que no hay diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en cada punto del muestreo, no se puede atribuir ningún peso de este parámetro en la disminución de las Tasas de Asimilación Neta Máxima de las plántulas inoculadas con *F. oxysporum*.

Eficiencia máxima potencial de la fotosíntesis (Fv/Fm)

En la apreciación de estos resultados (figura 1.15), se puede advertir que al comparar Fv/Fm con algunos de los parámetros revisados anteriormente ($A_{m\acute{a}x}$, g_s y E, en los que la respuesta se observa desde el día 4 dpi, porque son parámetros de respuesta rápida en gulupa, sensibles a las condiciones ambientales y del montaje del experimento) se encuentra que la eficiencia máxima potencial de la fotosíntesis presenta variaciones que se observan con posterioridad al día 12 dpi para las plántulas inoculadas con *F. oxysporum*. Al ser un parámetro medido en pre-alba, es un indicador que solo muestra diferencias cuando el aparato fotosintético no ha podido restablecerse durante el período nocturno, asociado a procesos de fotoinhibición (Chang-Hyo *et al.*, 2012).

Para las plántulas de gulupa control, el valor de Fv/Fm en ningún punto del muestreo fue inferior a 0.82, lo que quiere decir que, a pesar de las condiciones ambientales fluctuantes en el invernadero, en las que se desarrollaron las plántulas durante el experimento y que condujeron a mayores o menores cierres estomáticos (figura 1.9), provocando mayores o menores Tasas de Asimilación Neta Máxima (figura 1.6) o de

Transpiración (figura 1.12), éstas circunstancias no afectaron la eficiencia en la transferencia de energía en PSII.

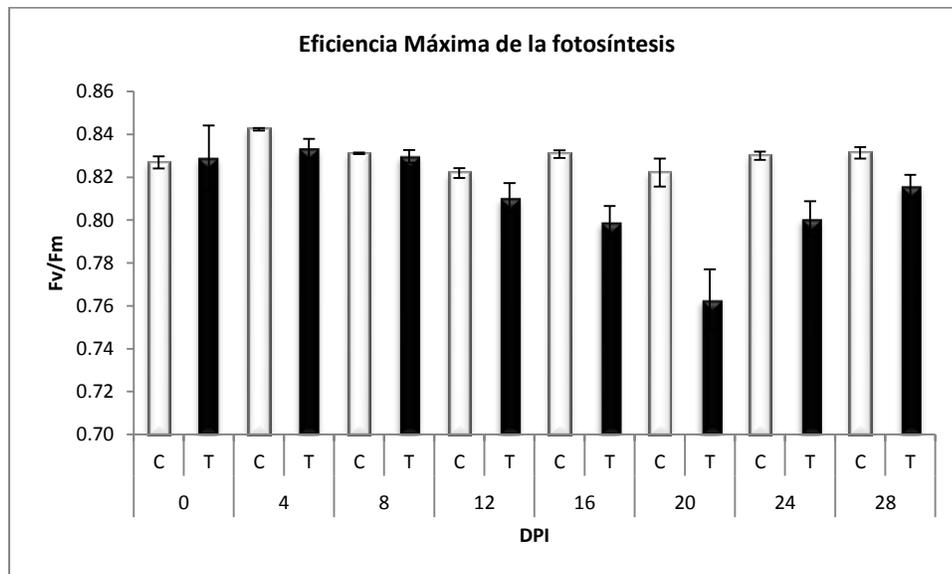


Figura 1.14. Valores promedio de la Eficiencia máxima potencial de la fotosíntesis para plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) en cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4

Por su parte, en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* los valores de Fv/Fm empiezan a ser inferiores a 0.82 a partir del día 12 dpi presentándose diferencias estadísticamente significativas a partir del día 16 dpi, con lo cual se corrobora lo reportado en la literatura; es decir, que este parámetro sirve de indicador del efecto de un factor estresante (Chang-Hyo *et al.*, 2012)), en este caso del patógeno.

Considerando lo anterior, se puede sugerir que la disminución en las tasas de fotosíntesis como consecuencia de la presencia de *F. oxysporum* se debe a cambios en la eficiencia en los procesos de disipación no fotoquímicos asociados con el complejo cosechador de energía (LHC), que indican que las plántulas afectadas por el patógeno muy seguramente recurren a procesos de fotoinhibición dinámica con el fin de disipar el exceso de energía radiante que no pueden llevar a procesos fotoquímicos (Maxwell y Johnson, 2000).

La fotoinhibición es un proceso que se conoce desde hace más de 100 años (Casierra-Posada, 2007), se define como la disminución en la utilización de luz en la fotosíntesis, debido a un exceso de energía radiante (van Wijk y van Hasselt, 1993) y generalmente, se encuentra asociado con un aumento en la disipación no fotoquímica (qN o NPQ), parámetro que indica la tasa de disipación térmica del exceso de energía a nivel del fotosistema II (Wilhelm y Selmar, 2011).

Se dice que corresponde a fotoinhibición dinámica porque como puede observarse (figura 1.15) la disminución de Fv/Fm para las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* inicia el día 12 dpi y termina el día 20 dpi, y en los dos puntos finales de muestreo la variable se va recuperando hasta alcanzar prácticamente los valores normales, lo cual indica que en la respuesta fisiológica de gulupa a *F. oxysporum*, este mecanismo de fotoinhibición se utiliza en un punto de la infección como un mecanismo de fotoprotección temprana pero con el avance de la enfermedad, muy seguramente la planta utiliza otros mecanismos de ajuste de su sistema fotosintético que ya no afecta la transferencia de energía entre el Complejo Cosechador Antena y el Centro de Reacción del fotosistema II.

Disipación no fotoquímica de la fluorescencia

Fv/Fm está asociado con procesos de disipación no fotoquímica (qN o NPQ), ya que dentro de los mecanismos que compiten por la de-excitación de las moléculas de clorofila-a del fotosistema II se encuentra la emisión de calor, la cual se relaciona con el ciclo de las xantofilas que está acoplada en el complejo proteico cosechador de energía (LHC). Por esto, en la literatura se ha reportado que disminuciones en el valor de Fv/Fm, se asocian con aumentos en NPQ, ya que hay restricciones en la transferencia de energía entre LHC y CR de PSII, con lo cual se espera que la energía que no puede ser transferida al Centro de Reacción para procesos fotoquímicos sea llevada al ciclo de las xantofilas, dando como resultado mayores valores de NPQ (Wilhelm y Selmar, 2011; Jahns y Holzwarth, 2012). No obstante, en este caso no se presenta un aumento en NPQ en las plántulas afectadas por *F. oxysporum* (figura 1.16).

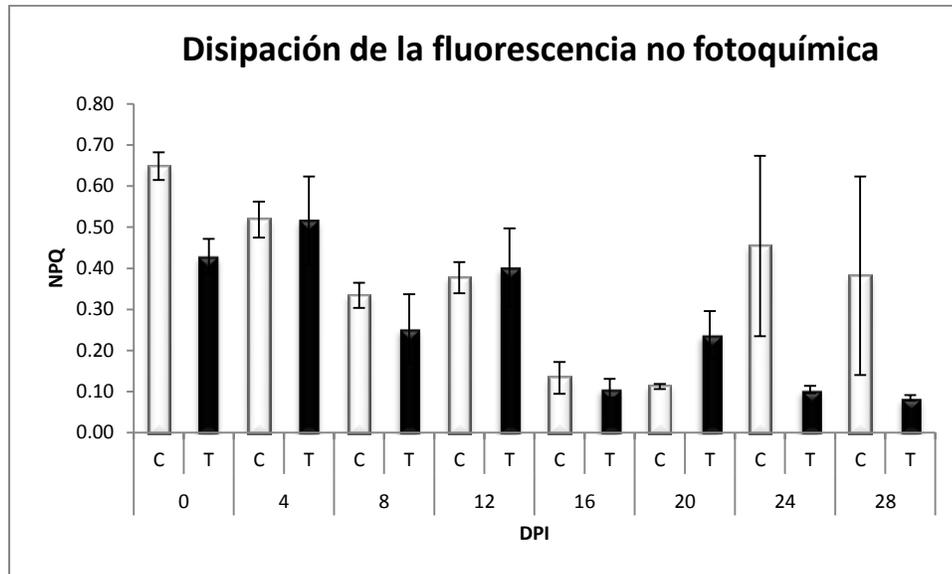


Figura 1.15. Valores promedio de la Disipación no fotoquímica de la fluorescencia para plántulas control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) en cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4

En condiciones de baja luminosidad, los complejos cosechadores antena son útiles para captar eficientemente la energía solar, pero cuando ésta resulta ser excesiva, la capacidad de fijación de CO₂ de la planta se rebasa y entonces, el pH en el lumen disminuye generado por el continuo transporte lineal de electrones entre PSII y PSI (Jahns y Holzwarth, 2012). Este aumento de la acidez se convierte en una señal que permite la activación del ciclo de las xantofilas y del ciclo de luteína, con lo cual la radiación en exceso se disipa por estas vías para evitar sobre reducir la cadena de transporte de electrones (ETR), cuya eficiencia en este experimento no se vio alterada por la presencia del patógeno (figura 1.20).

La estructura y función del Complejo cosechador antena muestra unas propiedades dinámicas que se adaptan rápidamente a grandes fluctuaciones del medio externo y del estado fenológico de la planta (Horton *et al.* 2008). El quenching no fotoquímico (NPQ) es una efectiva demostración de este comportamiento dinámico, que se evidencia tanto para las plántulas control como para las inoculadas con *F. oxysporum* a lo largo del experimento (figura 1.16) y que probablemente no esté asociado exclusivamente con daños provocados por radiación excesiva, ya que los valores promedio de PAR asociados a los días de muestreo no superan el valor más alto de Radiación saturante

obtenido en Chía por Pérez y Melgarejo (2012), el cual fue de 431 μmol fotones/ m^2 s, mientras que el PAR más alto en este experimento se alcanzó el día 24 dpi con un valor de 346 μmol fotones/ m^2 s, a partir de lo cual podría deducirse que las plantas no estuvieron en condiciones realmente estresantes por exceso de energía luminosa.

Sin embargo, el comportamiento altamente variable de NPQ indica que durante el periodo de incubación del patógeno se presentaron otras condiciones que afectaron su regulación sin que necesariamente estos cambios se deban únicamente al efecto del hongo, por lo cual no es posible atribuir un cambio en los mecanismos de disipación por calor asociados al ciclo de las xantofilas en gulupa como consecuencia de la presencia de *F. oxysporum*.

Disipación fotoquímica de la fluorescencia

Una evidencia adicional que corrobora el hecho de que las plántulas de gulupa medidas en este experimento no se sometieron a condiciones estresantes por radiaciones lumínicas excesivas se encuentra en la observación del parámetro qP (figura 1.17), que es un indicador de la proporción de centros de reacción abiertos y cuyas disminuciones están asociadas a cierre de los centros de reacción por saturación lumínica (Maxwell y Johnson, 2000).

En este parámetro (qP) tampoco hay diferencias estadísticamente significativas ni entre grupos, ni entre días, demostrando con ello que disminuciones en F_v/F_m no se deben a que los centros de reacción de PSII se encuentren comprometidos, pues como se observa, tanto las plántulas control, como las inoculadas con *F. oxysporum* tienen la misma proporción de centros de reacción abiertos en cualquier punto de muestreo (figura 1.17).

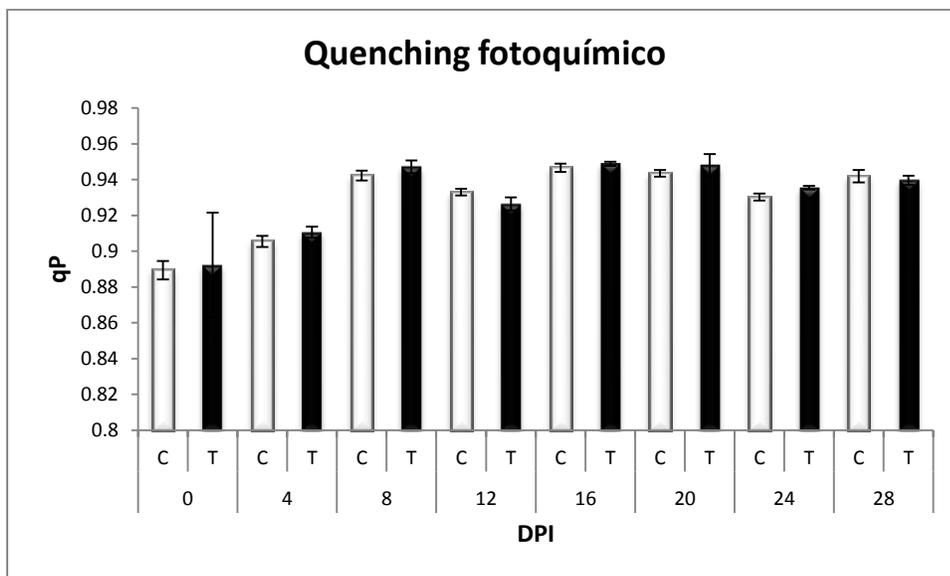


Figura 1.16. Valores promedio del Quenching fotoquímico para plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) en cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4

Contenido de pigmentos

Adicionalmente, se debe contrastar la información obtenida hasta ahora con los resultados bioquímicos en cuanto al contenido de pigmentos, debido a que estas moléculas tienen una reconocida participación en los componentes del aparato fotosintético y en su regulación. Los carotenoides hacen parte importante de los Complejos Cosechadores Antena y están relacionados con los procesos de disipación no fotoquímica (Galmés *et al.*, 2005), así como en procesos de detoxificación en su función de antioxidantes no-enzimáticos, necesarios en el mantenimiento de la integridad de membranas fotosintéticas (Munné-Bosch y Peñuelas, 2003). Por su parte, las clorofilas hacen parte tanto de CR, como de LHC, siendo mayor el contenido de clorofila-a en los Centros de Reacción y de clorofila-b en los Complejos Cosechadores Antena (Xiaoling *et al.*, 2011), por lo que con su observación se añade información a la respuesta del aparato fotosintético de gulupa inoculada con *F. oxysporum*.

Para todos los tipos de pigmentos medidos (Carotenoides y Clorofila a, b y totales) (figura 1.18), se encuentra que no hay diferencias estadísticamente significativas ni entre tratamientos ni entre días de muestreo (Anexo C), con lo cual se corrobora que no existen daños permanentes en PSII debidos a energía recibida en exceso, a pesar de la reducción en Fv/Fm.

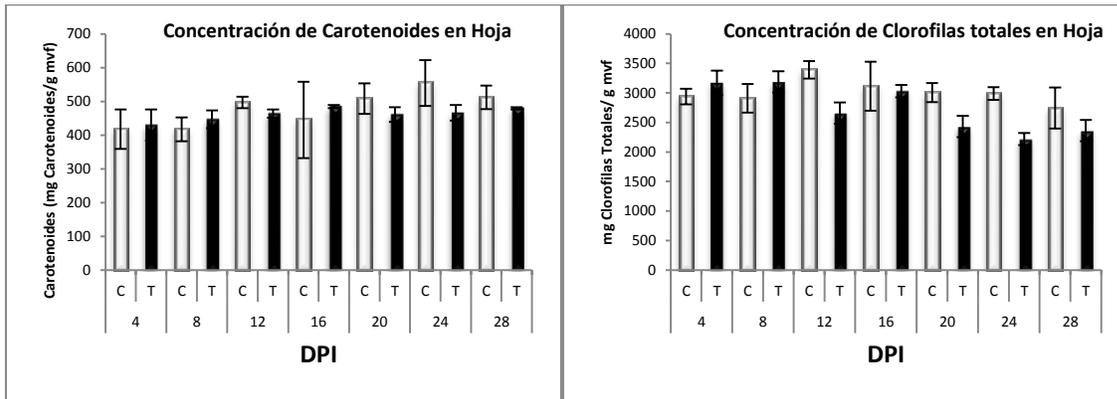


Figura 1.17. Concentración de pigmentos en hoja para cada día de muestreo. Plántulas control (columnas blancas) y plántulas inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras). Valores promedio para cada día. Las barras representan el error estándar. n=6

Sin embargo, al observar la figura 1.18 se advierte particularmente para las plantas inoculadas con el patógeno que los tres puntos finales de muestreo presentan una disminución ligera en los contenidos de pigmentos particularmente de las clorofilas, lo cual explica el no aumento de NPQ en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* (figura 1.16).

Tal como se mencionó previamente, existe una fuerte dinámica regulatoria en el aparato fotosintético, que se hace evidente al considerar la relación entre los dos tipos de clorofilas, este parámetro da cuenta de la proporción de LCH y CR en cada tratamiento y punto del experimento (figura 1.19).

Como se observa en la figura 1.19, hay diferencias estadísticamente significativas en los tres últimos puntos de muestreo, coincidiendo con el comportamiento de la variable F_v/F_m en estos días para las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* (figura 1.15), lo cual explicaría que el comportamiento dinámico de la fotoinhibición no esté asociado con el ciclo de las xantofilas o de luteína (qN o NPQ), sino que es producto del balance del contenido de pigmentos, demostrando con ello su importante papel regulador en el control de la captación y transferencia de energía tanto en LHC como en CR.

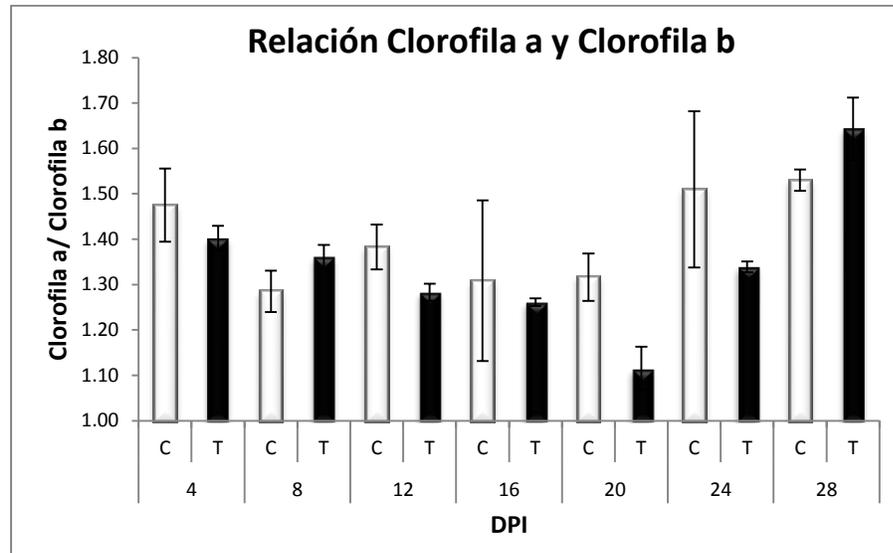


Figura 1.18. Relación de clorofila-a y clorofila-b en hoja de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras). Las barras representan el error estándar. n=6

A partir de lo anterior se puede precisar que para las plántulas de gulupa inoculadas con *F. oxysporum*, Fv/Fm muestra una disminución en la eficiencia de la transferencia de energía entre LHC y CR (figura 1.15), no acoplada a aumentos de NPQ (figura 1.16), lo que significa que la energía recibida se convierte en excesiva, a pesar de no ser energía radiante de saturación (figura 1.7 y 1.17), debido al efecto que causa el patógeno en el aparato fotosintético limitando su capacidad de fijación de CO₂ (figura 1.6). Como consecuencia de la existencia de esta energía sobrante, ocurre una disminución en el contenido de pigmentos (figura 1.18) como mecanismo de foto protección que prevalece sobre otros mecanismos como disipación de energía en exceso por calor (figura 1.16).

Eficiencia en el transporte de electrones

Por otra parte, es interesante observar el comportamiento de la eficiencia en el transporte de electrones - ETR (figura 1.20), que mide la funcionalidad de la transferencia de electrones entre PSII y PSI, en el cual se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas ni entre los tratamientos y los controles, ni entre puntos de muestreo (Anexo B). Dado que la Tasa de asimilación fotosintética neta máxima es diferente entre grupos (figura 1.6), se supondría que la eficiencia en el transporte de electrones tuviese un comportamiento similar para que en las plántulas afectadas por *F.*

oxysporum no se acumulara poder reductor NADPH y energía en forma de ATP, dada la limitada actividad fotosintética obtenida (figura 1.6).

Sin embargo, el hecho de no encontrar diferencias en los valores de ETR, indica que paralelamente a la fijación de dióxido de carbono, deben estar ocurriendo otros procesos de disipación alternativos fotoquímicos, como fotorrespiración o reacción de Mehler, ya que las plántulas afectadas por *F. oxysporum* no lo están haciendo mediante la disipación no fotoquímica (Medrano *et al.*, 2007). Estos resultados son congruentes con lo obtenido en la evaluación del parámetro Φ_{PSII} (figura 1.21), conocido como eficiencia fotoquímica del fotosistema II, y que mide la proporción de luz absorbida por la planta que puede utilizarse en procesos fotoquímicos (Maxwell y Johnson, 2000).

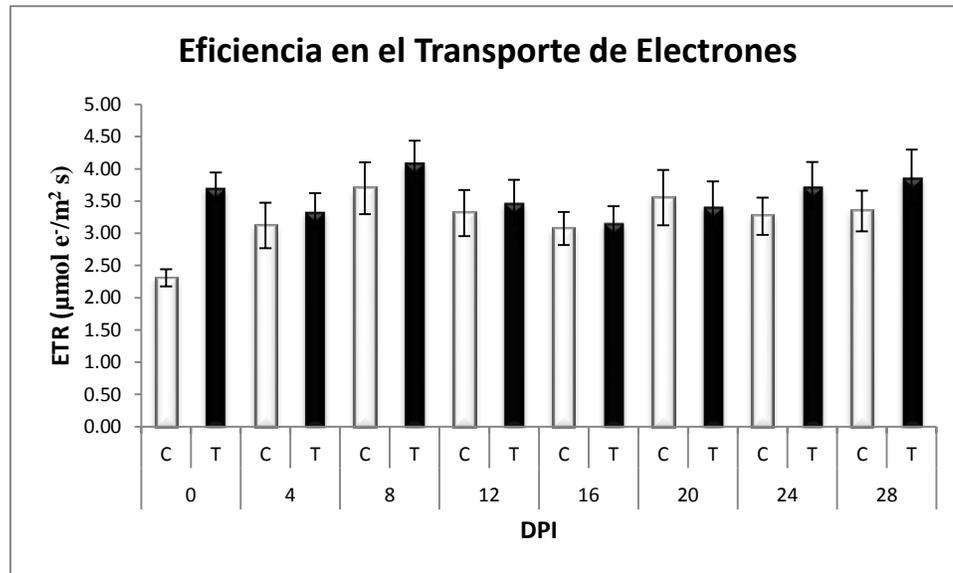


Figura 1.19. Valores promedio de la Eficiencia en el Transporte de Electrones para plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) en cada día. Las barras representan el error estándar. n=4

Eficiencia fotoquímica del fotosistema II

Como puede observarse (figura 1.21), los valores obtenidos son bastante altos y similares para todos los puntos y para los dos grupos de plántulas, sin diferencias estadísticamente significativas (Anexo B), con lo cual se puede deducir, que todas las plántulas tienen la misma capacidad de realizar procesos fotoquímicos, pues todas las plántulas tienen la capacidad de absorber entre un 65% y un 75% de la energía lumínica

recibida durante el muestreo; sin embargo, toda esta energía no se convierte en Asimilación Fotosintética Neta (figura 1.6) por lo que probablemente, lo que sucede es que por la presencia del patógeno, toda esa energía absorbida no se invierte en fotosíntesis sino en otros proceso fotoquímicos.

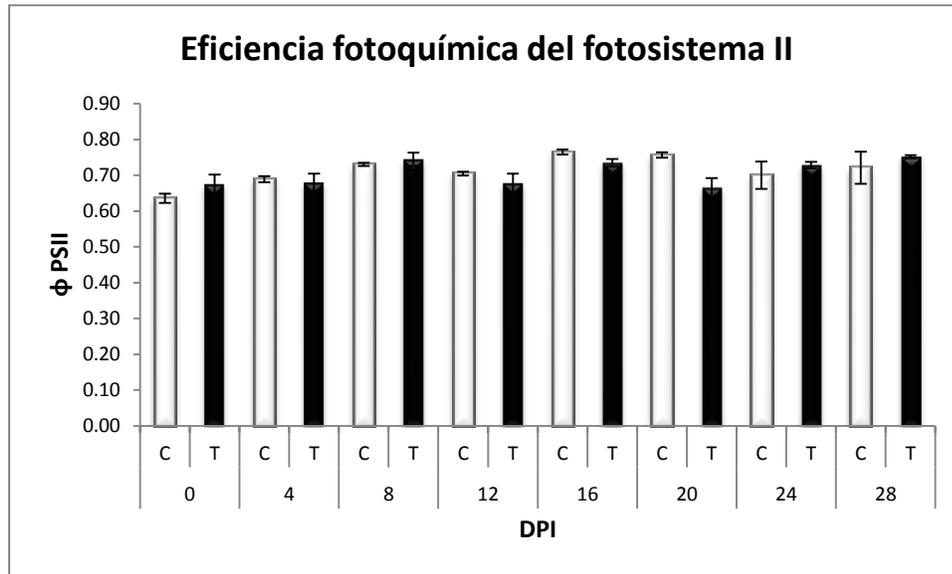


Figura 1.20. Valores promedio de la Eficiencia fotoquímica del Fotosistema II para plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día. Las barras representan el error estándar. n=4

Actividad específica enzimática de la peroxidasa (E.C. 1. 11.1.7)

La actividad enzimática específica es la cantidad de enzima que transforma 1 mmol de sustrato (en este caso peróxido, H_2O_2) por minuto en condiciones estándar, y como puede observarse existen diferencias estadísticamente significativas entre días, pero no entre tratamientos por lo que las variaciones observadas a lo largo del experimento no se deben al efecto del patógeno sino a otras condiciones regulatorias acopladas a las condiciones ambientales que enfrenta la planta (figura 1.22).

A pesar de esperar mayores contenidos de actividad específica de la enzima peroxidasa en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* en respuesta al estrés, es probable que las plántulas presenten otras medidas de protección, por lo cual ni los mecanismos antioxidantes enzimáticos (figura 1.22), ni la disipación de la fluorescencia no fotoquímica (figura 1.16) se han visto afectados por la presencia de la enfermedad, pues para esta

variable tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas (Anexo C). Tampoco es claro el por qué la actividad peroxidasa disminuye a partir del día 16 DPI.

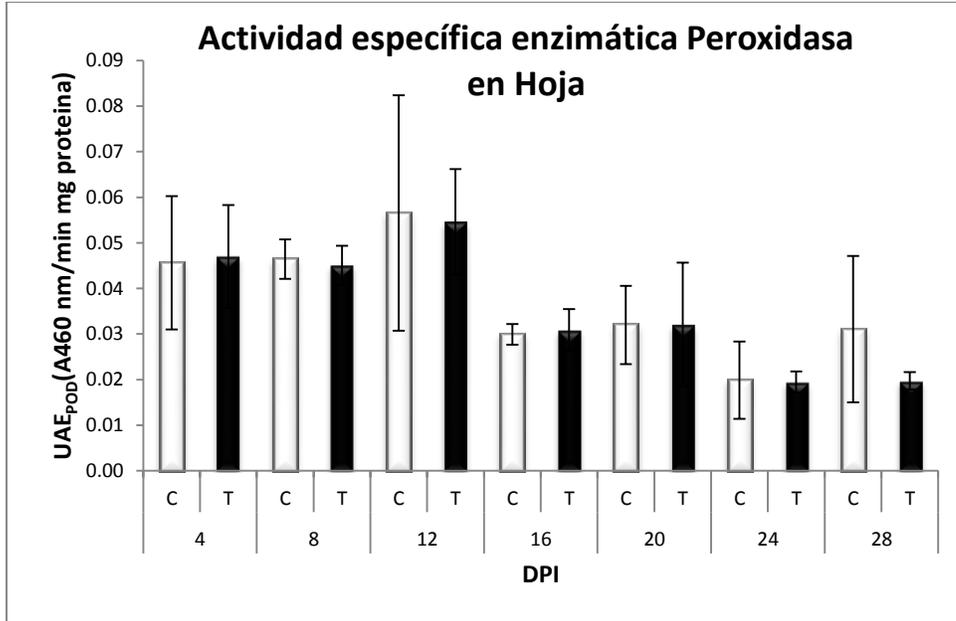


Figura 1.21. Valores promedio de la Actividad específica de la enzima peroxidasa en hoja de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día. Las barras representan el error estándar. n=6

Con lo considerado se puede deducir que en la respuesta del aparato fotosintético de plántulas de gulupa de 70 días de edad afectadas por *F. oxysporum* en condiciones de invernadero, la disminución de las tasas de asimilación neta máxima producidas por el patógeno no se deben a limitaciones hídricas, ni estomáticas, por lo que la causa de su reducción podría estar relacionada con desajustes en el Ciclo de Calvin (disminución en la eficiencia de carboxilación, reducción en la regeneración de ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP), o cantidades de Rubisco funcionales muy limitadas, entre otras) (Flexas y Medrano, 2002; Medrano *et al.*, 2007).

El cierre estomático (figura 1.9) produce disminuciones en la Tasa de transpiración (figura 1.12) y provoca desajustes en las relaciones hídricas, por lo que podría ser el responsable de la activación de mecanismos de reducción en el gasto de agua a nivel celular (figura 1.8) y del incremento en la eficiencia en el uso del agua (figura 1.13); sin

embargo, no estaría asociado con la modificación de procesos que disminuyen la asimilación de CO₂.

Serían las limitaciones no estomáticas las principales comprometidas en la disminución de las Tasas de Asimilación Neta Máxima (figura 1.6), más precisamente algún factor o proceso involucrado en la fase de fijación de carbono, sin que se haya podido dilucidar su origen con precisión.

Esta disminución en la Asimilación de CO₂, hace que la energía incidente sea excesiva, ante lo cual las plántulas de gulupa disminuyen la eficiencia en la transferencia de energía entre los complejos cosechadores antena y los centros de reacción (figura 1.15) mediante la disminución del contenido de pigmentos (figura 1.18), sin provocar daños permanentes en ninguno de estos elementos fotosintéticos (figura 1.17) y sin aumentar la disipación no fotoquímica (figura 1.16).

La eficiencia en el transporte lineal de electrones tampoco se ve alterado con este tipo de estrés biótico (figura 1.20), lo que permite que las plántulas de gulupa mantengan su eficiencia fotoquímica (figura 1.21), la cual debe disiparse en otras reacciones alternativas al Ciclo de Calvin, como Reacción de Mehler o fotorrespiración.

Estos resultados sugieren que debido al cierre estomático se debe producir un desbalance en la concentración de gases, en favor de la presión de oxígeno por el sitio activo de la enzima Rubisco, con lo cual se estimula el proceso fotorrespiratorio, a partir del cual se disipa la energía recibida por los complejos cosechadores de energía lumínica que no se han afectado como consecuencia del estrés (figura 1.17 y 1.18) y se mantiene activa toda la fase de transducción de energía fotosintética (figura 1.20), en la cual no se presentan alteraciones.

Las rutas metabólicas alternativas al proceso fotosintético se han considerado relevantes en términos de regulación y vitales en su función de protección del aparato fotosintético (Igamberdiev y Roussel, 2012). La fotorrespiración es considerada un mecanismo que disipa fotones y electrones, a la vez que consume NADPH y ATP, mientras provee CO₂ como aceptor de electrones dentro del cloroplasto (Asada, 2000), lo cual coincide con la escasa disminución del contenido intercelular de dióxido de carbono en el experimento (figura 1.10).

2. Respuesta fisiológica y bioquímica del sistema radical de gulupa (*Passiflora edulis* Sims) afectada por fusariosis (*Fusarium* sp.)

Las raíces de las plantas son órganos que típicamente crecen y se desarrollan bajo la superficie del suelo respondiendo a una gran variedad de estímulos y barreras ambientales, las cuales en algunos casos se convierten en factores estresantes (Petricka *et al.*, 2012). En la actualidad se sabe que cada especie muestra diferentes patrones de desarrollo de su sistema radical dependiendo de los diferentes factores bióticos y abióticos que enfrenta durante su crecimiento (Chirino *et al.*, 2008).

La interacción entre *F. oxysporum* y gulupa inicia en la rizosfera de la planta y el proceso de infección es complejo y requiere una serie de mecanismos bien regulados, dentro de los cuales se encuentra el reconocimiento mutuo entre patógeno y hospedero, la colonización de la superficie de la raíz, su penetración y posteriormente la invasión de tejidos hasta alcanzar el sistema vascular (Lagopodi *et al.*, 2012; Roncero *et al.*, 2003).

Dado que el punto de ingreso del patógeno es el sistema radical y debido a que la planta puede adoptar estrategias de supervivencia ante condiciones estresantes que incluyen ajustes bioquímicos, anatómicos y morfológicos (Rodríguez-Gamir *et al.*, 2011), se realizaron análisis para determinar el efecto que podría observarse en este órgano durante el período de incubación del patógeno. Se evaluaron algunos parámetros morfo-anatómicos, como longitud, grosor, número de raíces y peso fresco, parámetros fisiológicos como la tasa de respiración de raíces y análisis bioquímicos como actividad de la enzima peroxidasa (EC 1.11.1.7) y proteínas solubles en raíz, con el fin de reunir información sobre el efecto de la infección de *F. oxysporum* en el sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad.

En el estudio del sistema de raíces se requieren algunas mediciones invasivas para su análisis, en este caso se realizaron muestreos destructivos; es decir, que tuvo que usarse una plántula diferente en cada medición y puede que esta sea una de las razones por las cuales, en general para ninguno de los parámetros evaluados se presenta una tendencia claramente diferenciada entre las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* y las control.

2.1 Estado del Arte

Las raíces constituyen el órgano vegetal que provee soporte estructural, a la vez que permite la toma de agua y nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo adecuado, por lo que existe una relación directa entre la supervivencia de la planta y el desarrollo, crecimiento y funcionalidad del sistema radical (Petricka *et al.*, 2012).

Como se había expuesto anteriormente en el capítulo 1, el balance hídrico está determinado por la toma de agua realizada por las raíces, el transporte hídrico dentro de la planta y la pérdida de agua vía transpiración (Marjanović *et al.*, 2005). Dentro de todos estos procesos, el transporte hídrico en condiciones normales se enfrenta a dos barreras importantes de resistencia al flujo, una debida a la apertura estomática y otra relacionada con el sistema radical (Qing-ming y Bin-bin, 2010), con lo cual, este órgano es considerado un elemento clave en la regulación del continuo suelo-planta-atmósfera (Javot y Maurel, 2002) y por ello, ha merecido especial atención de parte del área de la fisiología vegetal, especialmente en el estado de plántula, cuando es más débil a condiciones sub-óptimas y tiene mayor susceptibilidad a perder su habilidad hidráulica (Maurel *et al.*, 2010).

Las raíces son el principal y primer sitio por donde ingresa agua a las plantas y adicionalmente tienen la capacidad vital de censar gran parte de los parámetros físico-químicos del suelo y ajustar su crecimiento y propiedades hidráulicas (Maurel *et al.*, 2010), son determinantes en el mantenimiento del balance hídrico de toda la planta en medio de un entorno dinámico y pueden traducir la percepción de estrés a la parte aérea de la planta, afectando simultáneamente sus características morfológicas y fisiológicas para aumentar la supervivencia del individuo vegetal (Petricka *et al.*, 2012).

Acerca del efecto de *Fusarium* en el sistema radical de sus hospederos, existen estudios a nivel histológico y microscópico (Olivain y Alabouvette, 1999; Jaroszuk-Scisel *et al.*, 2009), molecular (Lagopodi *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2012), análisis de exudados (Benhamou *et al.*, 2001; Lanoue *et al.*, 2002) y la interacción con otros microorganismos (Henkes *et al.*, 2011); sin embargo, no existe ningún reporte del efecto de *F. oxysporum* en las raíces de plántulas de gulupa.

Debido a que este es el primer trabajo en el que se realiza el seguimiento de la respuesta del sistema radical de *P. edulis* Sims., durante el período de incubación de *F. oxysporum*, se realizó una aproximación al comportamiento de algunas características morfo-anatómicas, bioquímicas y fisiológicas pretendiendo integrar estos resultados con la respuesta fisiológica del componente aéreo evaluado en el capítulo 1.

2.2 Metodología

A partir del diseño experimental descrito en el Capítulo 1, en las 92 plántulas usadas en los muestreos destructivos, se realizaron mediciones de la tasa de respiración de raíces, longitud, grosor, número de raíces y peso fresco promedio de las mismas, y adicionalmente se determinó la actividad enzimática peroxidasa y el contenido de proteínas.

La longitud, número y grosor de raíces se obtuvieron mediante el programa Delta-Scan en el cual se digitalizaron los sistemas radicales de cuatro plántulas control y cuatro plántulas inoculadas con *F. oxysporum* en cada punto de muestreo, luego de ser lavadas cuidadosamente con agua.

La tasa de respiración de raíces fue medida en una cubeta de 1 mL, usando un electrodo de oxígeno tipo Clark (disco electrodo Hansatech – Oxylab), en el cual se introduce 1 mL de solución buffer MES y aproximadamente de 0.5 a 1 g de raíces secundarias previamente lavadas y pesadas en balanza analítica. El programa asociado al equipo genera la gráfica de consumo de oxígeno de la cual se obtuvieron 10 tasas por cada

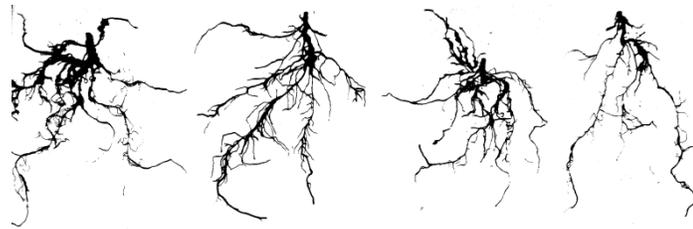
muestra, las cuales se promediaron y se dividieron por el peso fresco para tener las unidades de O₂ consumido por minuto por gramo de peso fresco.

Las raíces utilizadas en las metodologías anteriores se llevaron a nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C, para determinar su actividad enzimática peroxidasa (EC 1.11.1.7) con el mismo procedimiento descrito en el capítulo 1, pero utilizando en la reacción 150 µL de muestra y 340 µL de buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6,8

2.3 Resultados y Discusión

Dependiendo de múltiples factores edáficos (composición química y estructura física del suelo, disponibilidad hídrica y de nutrientes en el sustrato, interacción con otros microorganismos en la rizosfera, etc.), la morfología y arquitectura de las plantas puede modificarse implicando con ello que las alteraciones de su estructura están relacionadas con su funcionalidad en el aprovechamiento de los recursos (Bais *et al.*, 2006).

Estos cambios estructurales están modulados de diferentes maneras, a través de la promoción o disminución del crecimiento de la raíz primaria, a través del crecimiento de raíces laterales, mediante la formación de raíces adventicias o con el incremento de pelos radicales (Osmont *et al.*, 2007). Sin embargo, como se aprecia en las figuras que contrastan el sistema radical de las plántulas control con las inoculadas con *F. oxysporum* en cada día de muestreo, (figuras 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6), no se aprecia un patrón de tamaño o arquitectura particularmente característico en uno u otro grupo, que permita identificar el efecto del patógeno en los rasgos morfo-anatómicos o en las tasas de crecimiento de este órgano.



Plántulas control.

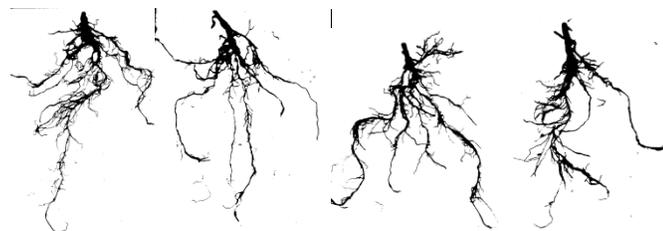


Plántulas inoculadas con *F. oxysporum*.

Figura 2.1. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 4 dpi.



Plántulas control.



Plántulas inoculadas con *F. oxysporum*.

Figura 2.2. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 8 dpi.



Plántulas control.

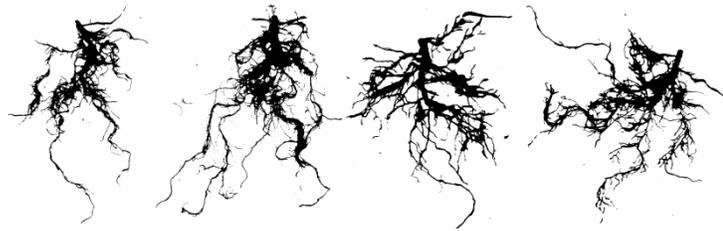
Plántulas inoculadas con *F. oxysporum*.**Figura 2.3.** Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 12 dpi.

Plántulas control.

Plántulas inoculadas con *F. oxysporum*.**Figura 2.4.** Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 16 dpi.

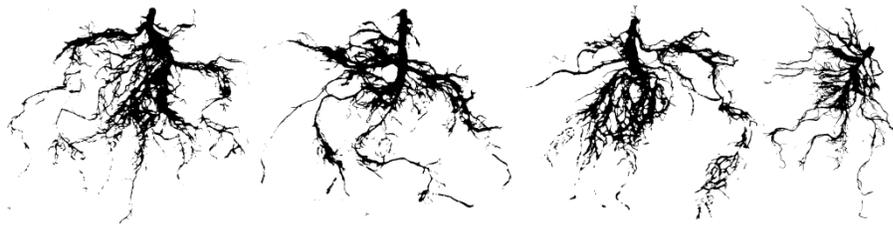


Plántulas control.



Plántulas inoculadas con *F. oxysporum*.

Figura 2.5. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 20 dpi.



Plántulas control.



Plántulas inoculadas con *F. oxysporum*.

Figura 2.6. Sistema radical de plántulas de gulupa de 70 días de edad, Día 24 dpi.

Se observó que hasta el día 16 dpi los sistemas radicales de ambos grupos son más pequeños en comparación con los días posteriores, pero no existe una diferencia marcada entre grupos (figuras 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6). Tal como se ha mencionado previamente, el estudio del componente radical plantea ciertos desafíos por la dificultad en su acceso y el cuidado en su manipulación para no comprometer ninguna estructura, ni afectar su fisiología, por esta razón, a partir de estas imágenes se utiliza un programa que cuantifica algunos de los parámetros morfo-anatómicos en los que se esperaba encontrar diferencias producidas por el efecto del patógeno, como el número de raíces, grosor y largo promedio radicular.

Para el caso del número de raíces promedio, como puede observarse en la figura 2.7, durante la mayor parte del período de incubación del patógeno, no se encuentran diferencias entre ninguno de los dos grupos, solamente en el último punto de muestreo es claro que las plántulas control presentan aproximadamente el doble del número de raíces en comparación con las plántulas afectadas con fusariosis.

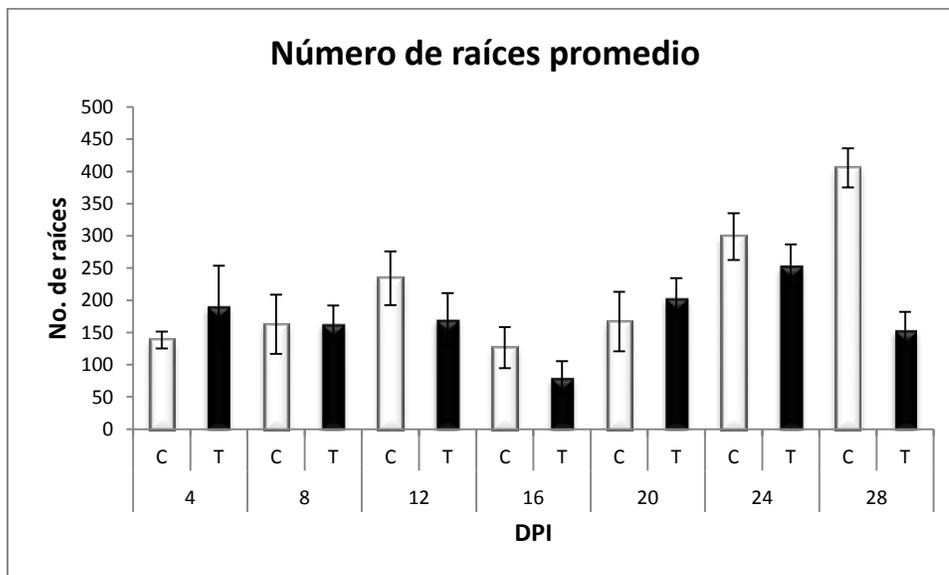


Figura 2.7. Valores promedio del Número de raíces de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4

A partir del comportamiento de esta variable, puede advertirse que aunque el patógeno ingrese por este órgano, su crecimiento continúa principalmente hacia el interior de la planta, permitiendo, de este modo, que el sistema radical siga manteniendo el mismo tamaño y características durante la mayor parte del período de incubación. Sin embargo, llega un momento en el cual el conjunto de procesos alternativos que enfrenta la planta (disminución de la tasa fotosintética, obstrucción de vasos xilemáticos, toxinas elicidadas por el hongo, fotorrespiración incrementada, presencia de especies reactivas de oxígeno, etc.) terminan por afectarla por completo, incluyendo también el sistema de raíces, ante lo cual hay que resaltar que esto sucede en etapas tardías del proceso.

De igual forma, y en concordancia con lo anterior, para el caso del peso fresco se observa que durante la mayoría de los días de muestreo, las diferencias son mínimas, inclusive en el día 24 DPI. Los valores de peso fresco son prácticamente iguales, y en el último día de muestreo hay una diferencia marcada, siendo el peso fresco de las plántulas control casi el triple del de las raíces de las plántulas enfermas (figura 2.8).

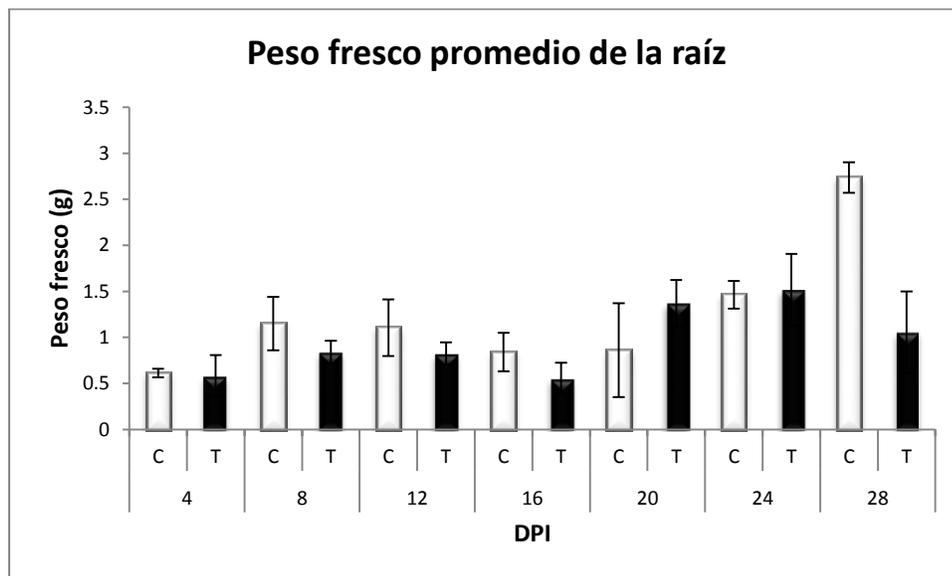


Figura 2.8. Valores promedio del Peso fresco radicular de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4

La observación de las diferencias estadísticamente significativas para el peso fresco ($p=0.0002$, para dpi y $p=0.0046$ entre las interacciones; $\alpha = 0.05$) y número de raíces ($p=0.0005$; $\alpha = 0.05$) entre grupos en el último día de muestreo, sugiere que sí existe un

efecto del patógeno obstruyendo la capacidad hidráulica del sistema radical, lo cual a este nivel, muy seguramente limita la capacidad de división y expansión celular, por lo que la plántula inoculada con *F. oxysporum* no invierte sus escasos recursos en la generación de nuevas raíces, sino que procura mantener la estructura ya existente (figura 2.9 y 2.10), como lo indican estas figuras, durante ninguno de los puntos de muestreo se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni para el longitud, ni para el grosor promedio del sistema de raíces entre grupos (Anexo C).

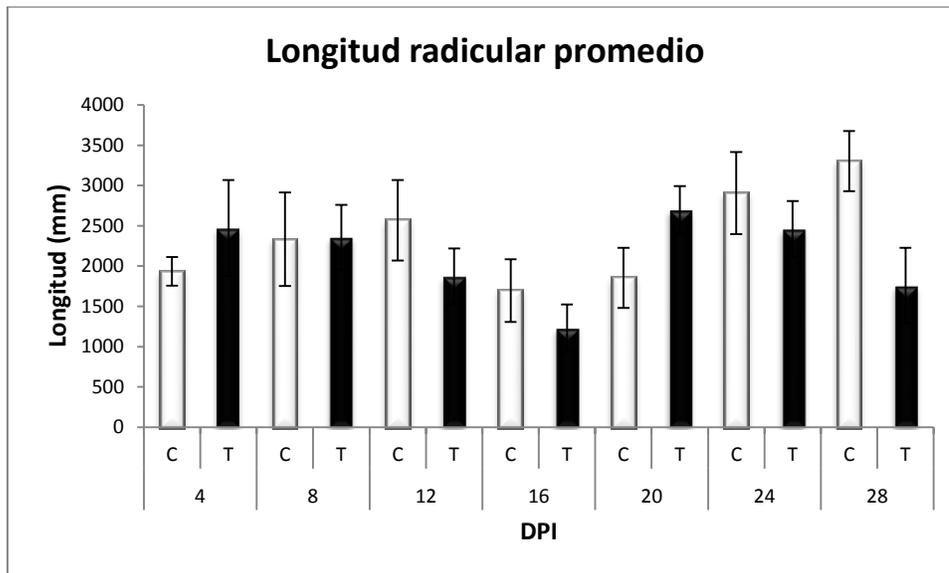


Figura 2.9. Valores promedio de la Longitud radicular de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4.

Estos resultados (figura 2.9 y 2.10) demuestran que la alta variabilidad fenotípica de algunas características morfo-anatómicas del sistema de raíces, es un factor que dificulta la observación del efecto de *F. oxysporum* en este órgano.

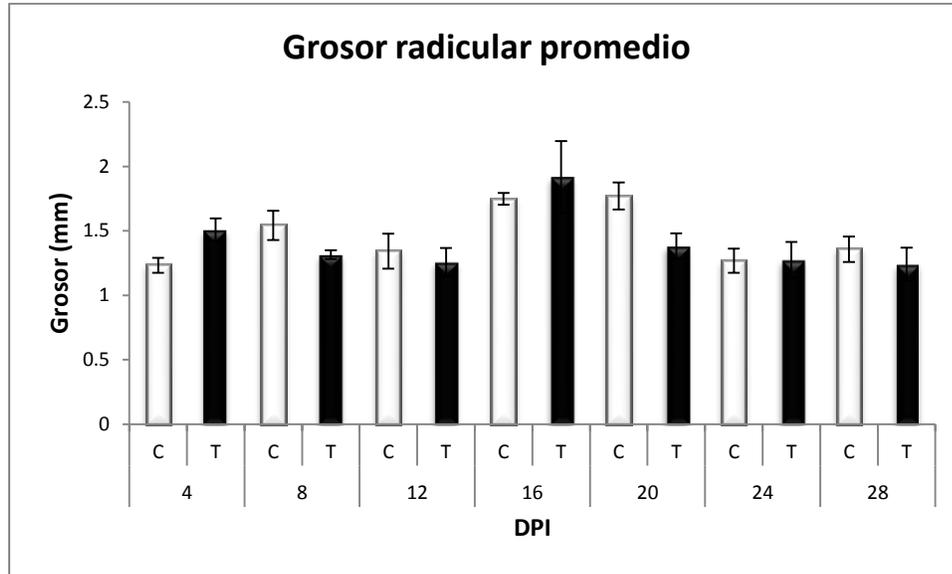


Figura 2.10. Valores promedio del Grosor radicular de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=4.

Por otra parte, a partir de lo considerado se puede sugerir que la respuesta de las plántulas inoculadas con el patógeno es diferente a la respuesta del sistema radical ante condiciones de estrés hídrico, a pesar de que se produce el cierre estomático (figura 1.9) característico de limitaciones en el balance de agua en la planta, el cual se cree es censado por las raíces (Flexas y Medrano, 2002; Xiaoling *et al.*, 2011); sin embargo, no se presenta aumento ni en la longitud, ni en el grosor radicular, el cual se esperaría como una estrategia para aumentar las posibilidades de interceptación y captura del recurso limitante.

Probablemente como este factor no está restringido en el sustrato, la plántula no adopta este tipo de estrategias; sin embargo, dado que se presenta la disminución en la conductancia estomática, se entendería que no solo el sistema radical está en capacidad de censar la obstrucción en el flujo correcto de agua en la planta, sino que otros órganos también intervienen en esa respuesta.

De manera simultánea se evaluó la funcionalidad del sistema radical durante el período de incubación del patógeno, mediante la medición de la tasa de respiración en raíces, en donde se encontró (figura 2.11), que dado que el tamaño del sistema radical de las

plántulas control e inoculadas con *F. oxysporum* fue bastante similar durante la mayor parte del experimento, el comportamiento de esta variable también fue muy similar entre grupos en la mayor parte de los puntos de muestreo sin diferencias estadísticamente significativas, con excepción del día 16 dpi ($p=0.0026$ entre las interacciones de los factores; $\alpha = 0.05$).

La energía producida a través del proceso respiratorio es utilizada en la planta para llevar a cabo múltiples procesos dentro de los cuales se incluyen las reacciones de defensa frente a patógenos y se ha reportado como una de las primeras funciones que se ve afectada durante un proceso de patogénesis (Agris, 2005). En general, se espera que las tasas de respiración de plantas afectadas por patógenos sean superiores en comparación con las de plantas sanas, dado que se supone que en las plantas afectadas ocurren mecanismos de defensa que implican gastos metabólicos superiores principalmente en el sitio de origen de la infección (Pascual *et al.*, 2010).

Por regla general, existe el consenso de que cuanto mayor sea la actividad metabólica de un tejido, mayor será su tasa respiratoria (Taiz y Zeiger, 2006), teniendo en cuenta esta consideración y observando los resultados obtenidos (figura 2.11), es posible sugerir que la respuesta del sistema radical de *P. edulis* Sims, probablemente da cuenta del proceso de patogénesis en las fases iniciales del proceso de infección, pues en la primera medición, día 4 dpi, las plántulas control tienen tasas respiratorias mucho menores, con lo cual, las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* tendrían mayor actividad metabólica en este día, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, donde se encuentra que las tasas respiratorias se ven incrementadas en los momentos iniciales de la infección y que con posterioridad a este esfuerzo de defensa inicial su metabolismo se iguala con el de plantas sin enfermedad, porque es al principio de la patogénesis donde se requiere la síntesis, movilización y acumulación de elementos relacionados con la defensa vegetal (Agris, 2005).

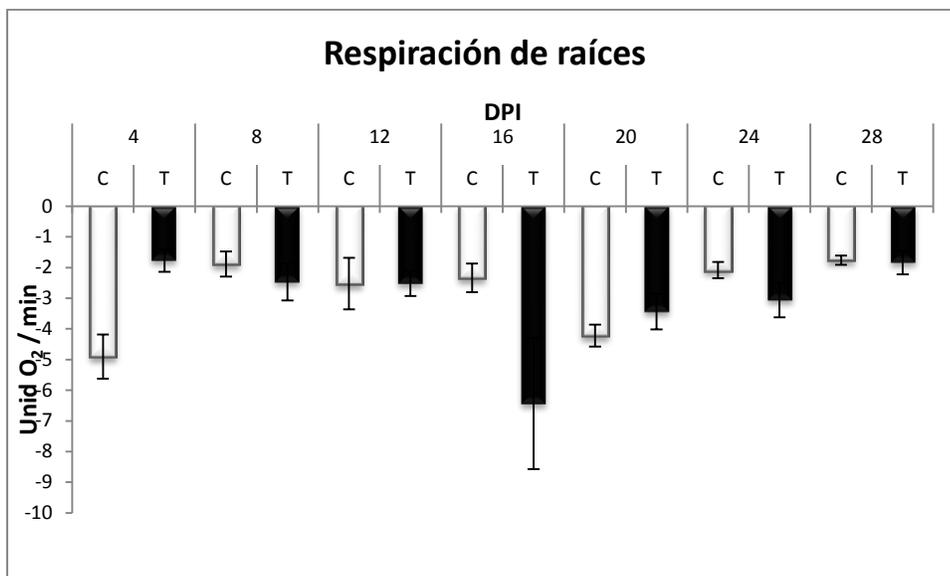


Figura 2.11. Valores promedio de la Respiración de raíces de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=6

Esto implicaría que el metabolismo en plántulas de gulupa afectada por *F. oxysporum* hacia el final del período de incubación podría estar relacionado con otros procesos diferentes al mantenimiento y crecimiento (Parys y Jastrzebski, 2005), probablemente algún tipo de mecanismo de defensa en la producción de gomas o tilosas, dado que se mantiene la misma tasa metabólica de las plántulas control pero menor número de raíces (figura 2.7) y peso fresco (figura 2.8).

Así mismo, como se había planteado anteriormente en el Capítulo 1, el estrés oxidativo es una respuesta celular común ante condiciones estresantes y dado que se sabe que el patógeno se encuentra creciendo en la superficie de las células epidérmicas de raíz antes de ingresar al hospedero y que luego inicia un proceso de crecimiento e invasión a través de este órgano, se espera que haya mayor actividad peroxidasa en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum*; sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 2.12).

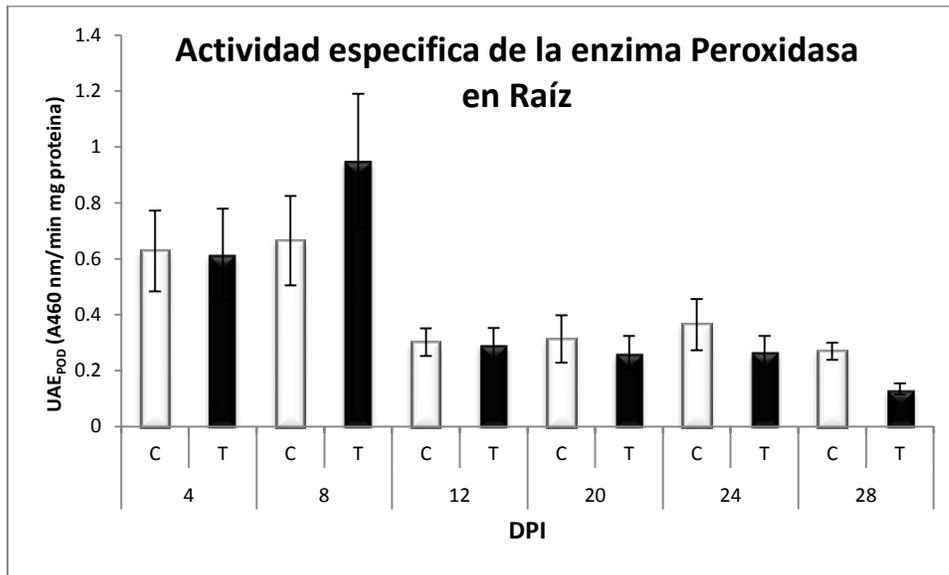


Figura 2.12. Valores promedio de la Actividad específica enzima peroxidasa en raíz de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=6

Similar a lo observado en hoja (figura 1.22), en raíz, durante los primeros días de la patogénesis hay mayor actividad enzimática específica de peroxidasa y posteriormente disminuye; sin embargo, este comportamiento no obedece a la presencia de *F. oxysporum*, ya que no hay diferencias entre grupos.

Se debe resaltar, sin embargo, que la actividad enzimática específica peroxidasa, es diez veces superior en la raíz, en comparación con la hoja, indicando con ello que la actividad peroxidasa es de gran importancia en este órgano, como se ha reportado para otras especies (Melgarejo *et al.*, 2010), lo cual muy seguramente está relacionado con su participación en múltiples procesos fisiológicos (Lagrimini *et al.*, 1997).

Finalmente, se cuantificó el contenido de proteínas solubles en cada uno de estos sistemas radicales (figura 2.13) y a pesar de las diferencias que pueden percibirse a simple vista, no existen diferencias estadísticamente significativas ni entre grupos, ni entre días, ni en la interacción.

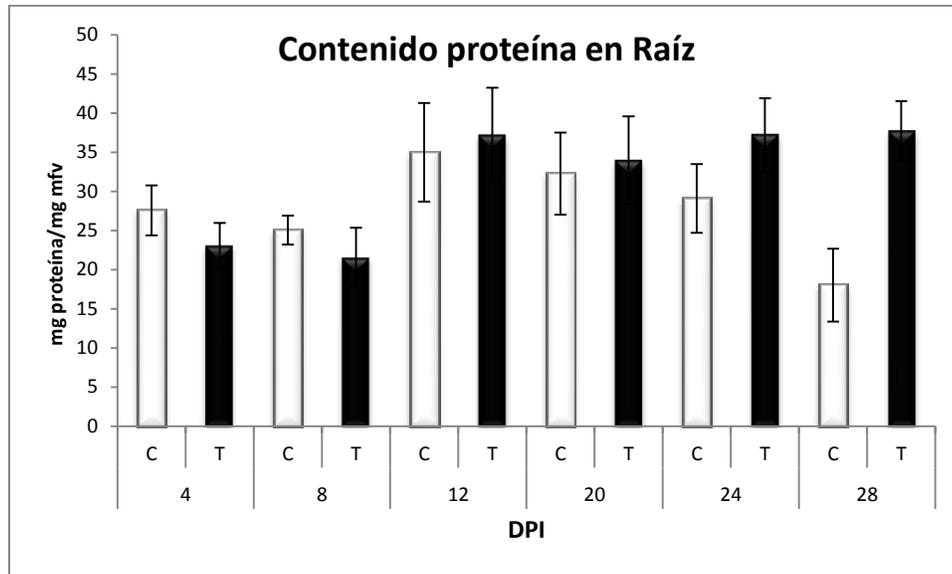


Figura 2.13. Valores promedio del Contenido de proteína en raíz de plántulas de gulupa control (columnas blancas) e inoculadas con *F. oxysporum* (columnas negras) para cada día de muestreo. Las barras representan el error estándar. n=6

En los primeros días el contenido de proteínas es menor y en los días posteriores se incrementa, lo cual en términos generales puede encontrarse directamente relacionado con el tamaño del sistema radical. Para el día 28 dpi se observa mayor contenido de proteína en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* comparadas con el control, probablemente debido a la presencia de tilosas o gomitas que se referencia en la literatura frente al efecto del patógeno, lo cual hace que aumente el contenido proteico.

A partir de lo considerado en cuanto al sistema radical se plantea que a pesar de que este es el órgano de contacto e ingreso del patógeno, esta condición no afecta ni su arquitectura ni su estructura (figuras 2.1 a 2.10), como tampoco se presentan tendencias en su contenido proteico, en la actividad peroxidasa o en la tasa respiratoria que puedan asociarse con la presencia de *F. oxysporum*.

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1 Conclusiones

La presencia de *F. oxysporum* en plántulas de gulupa de 70 días de edad en condiciones de invernadero, causa disminuciones en las tasas de asimilación neta máxima de CO₂, en la conductancia estomática y en las tasas de transpiración, sin embargo, no hay evidencia de que estas disminuciones sean producidas por daños permanentes en la fase de transducción de energía ni por limitaciones estomáticas o hídricas.

Se observa un proceso de fotoinhibición dinámica a partir del día 16 dpi, el cual está relacionado con la dinámica en la relación entre el contenido de clorofila-a y clorofila-b, lo cual se traduce en cambios en la eficiencia en la transferencia de energía entre los complejos cosechadores y los centros de reacción, que hacia el final del experimento regresa a las condiciones originales, evidenciando con ello que hay una respuesta fisiológica como mecanismo de protección en un punto de la patogénesis que es temporal.

Como consecuencia de la disminución de la conductancia estomática se disminuye el suministro de CO₂ y dado que no hay evidencia de disminuciones en la eficiencia fotosintética ni en la eficiencia en el transporte lineal de electrones, se presume que otros procesos alternativos (Reacción de Mehler o fotorrespiración) al Ciclo de Calvin, son favorecidos.

Debido a que no hay disminuciones en la concentración subestomática de CO₂ y dado que no hay evidencias de que la actividad específica de la enzima peroxidasa aumente en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum*, se sospecha que el proceso que se ve

aventajado es la fotorrespiración, ya que este proceso consume ATP, NADPH, electrones y protones, lo cual evita la generación de especies reactivas de oxígeno, la acidificación del lumen que impide la activación del ciclo de las xantofilas, a la vez que se aumenta la concentración de CO₂ para mantener operando el ciclo de Calvin y la actividad de Rubisco.

Este aumento en la tasa fotorrespiratoria inicialmente opera como un mecanismo de foto-protección, pero la permanencia prolongada de esta situación, va inclinando la balanza de manera desfavorable para la planta, lo que finalmente conduce a su marchitamiento y muerte, producidos más que por la falta de recurso hídrico, por el aumento de la tasa de fotorrespiración en detrimento de la asimilación de gas carbónico.

Debido a que no ocurre una disminución en el contenido hídrico a nivel celular, a pesar de que se reportó la presencia del patógeno obstruyendo el tejido xilemático mediante la observación histológica de raíces y tallos de plántulas de gulupa de similar edad e inoculadas con la misma metodología que en este experimento (Cruz *et al*, 2012; Ortiz *et al*, 2012), se supone que la planta recurre a la producción de osmolitos secundarios para mantener el turgor a nivel celular.

En cuanto al sistema radical, en general, el patógeno no afecta de manera directa su desarrollo, pero mediante su efecto en las tasas de asimilación, indirectamente afecta su crecimiento normal.

3.2 Recomendaciones

Para dilucidar la razón por la cual el Contenido Relativo de Agua en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* fue superior al de las plántulas control, se recomienda medir el contenido de osmoprotectantes como azúcares, prolina, glicin-betaína y ectoína, ya que pueden ser usados como indicadores tempranos de estrés.

En futuros trabajos de investigación se recomienda realizar el mismo diseño experimental implementando mediciones simultáneas de fluorescencia de la clorofila-a e intercambio de gases en las plántulas utilizadas en los muestreos de variables destructivas.

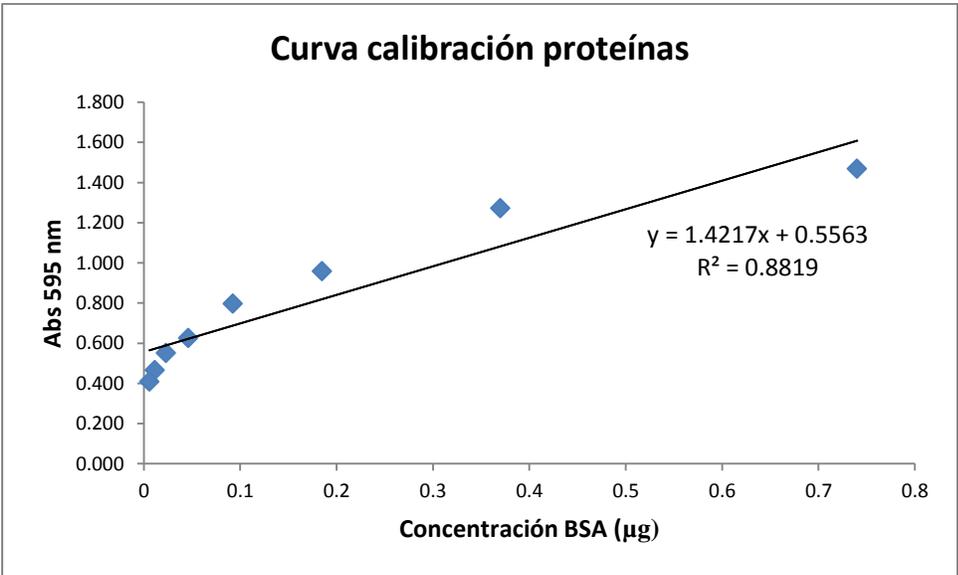
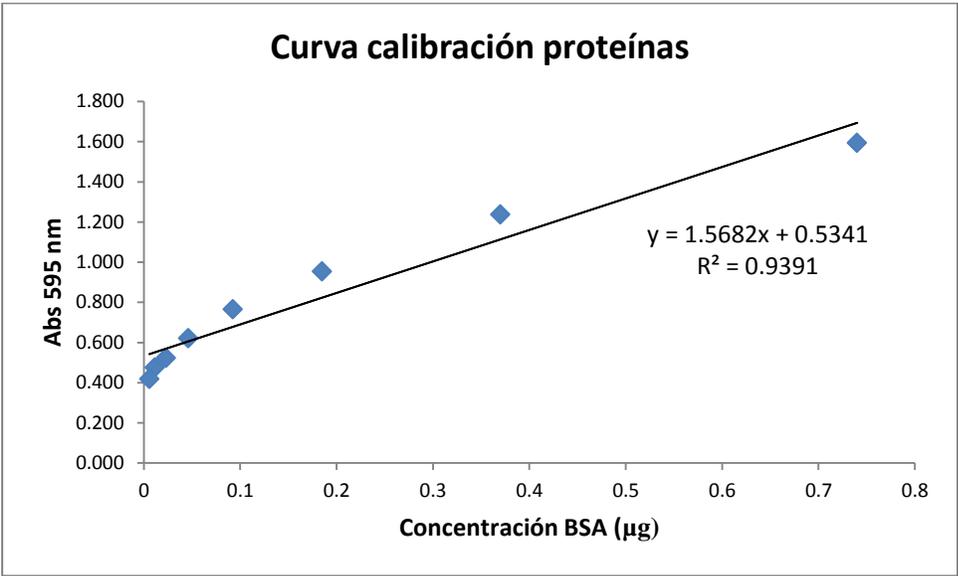
Adicionalmente se sugiere realizar curvas de la respuesta de la Tasa de asimilación fotosintética neta máxima de CO₂ a diferentes niveles de gas carbónico, con el fin de profundizar en la razón por la cual disminuye la Tasa de asimilación fotosintética neta máxima relacionadas con desajustes en la fase de fijación de carbono.

Es necesario confirmar si Fv/fm podría servir como un indicador del estrés, ya que en este experimento dio cuenta de la fotoinhibición dinámica durante algunos días pero no hacia el final del experimento, por lo cual se sugiere realizar curvas diarias del comportamiento de este parámetro.

A partir de los resultados obtenidos en WUE y WUEi se sugiere ampliar esta información a nivel de cultivo, con el fin de optimizar el uso del agua en esta especie en campo.

Finalmente se sugiere explorar nuevas y mejores metodologías para el sistema radical, como las mediciones de conductividad hidráulica de raíz o análisis de exudados, que den cuenta del patógeno en este órgano.

A. Anexo: Curvas de calibración de proteínas



B. Anexo: Análisis estadístico de las variables en el muestreo no destructivo

Statistix 9.0

25/01/2012, 10:19:34 a.m.

Analysis of Variance Table for Amax

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	54.391	54.3906		
DPI	7	417.444	59.6348	9.27	0.0044
Error TTO*DPI	7	45.017	6.4310		
Error	48	86.958	1.8116		
Total	63	603.809			

Grand Mean 4.7503
CV(TTO*DPI) 53.38
CV(Error) 28.33

Analysis of Variance Table for EA

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	19.305	19.3050		
DPI	7	48.832	6.9761	3.26	0.0708
Error TTO*DPI	7	14.974	2.1391		
Error	48	35.017	0.7295		
Total	63	118.128			

Grand Mean 1.9680
CV(TTO*DPI) 74.32
CV(Error) 43.40

Analysis of Variance Table for RD

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.774	0.7744		
DPI	7	103.930	14.8471	19.43	0.0004
Error TTO*DPI	7	5.350	0.7642		
Error	48	61.092	1.2728		
Total	63	171.146			

Grand Mean -1.6834
 CV(TTO*DPI) -51.93
 CV(Error) -67.02

Analysis of Variance Table for T1A

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	6.052	6.0516		
DPI	7	84.967	12.1381	45.53	0.0000
Error TTO*DPI	7	1.866	0.2666		
Error	48	48.449	1.0094		
Total	63	141.334			

Grand Mean 27.606
 CV(TTO*DPI) 1.87
 CV(Error) 3.64

Analysis of Variance Table for WUE

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	4.622	4.62250		
DPI	7	40.768	5.82397	3.85	0.0481
Error TTO*DPI	7	10.597	1.51383		
Error	48	78.207	1.62931		
Total	63	134.194			

Grand Mean 2.9869
 CV(TTO*DPI) 41.19
 CV(Error) 42.74

Analysis of Variance Table for WUEi

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.00017	1.665E-04		
DPI	7	0.00107	1.536E-04	1.13	0.4368
Error TTO*DPI	7	0.00095	1.356E-04		
Error	48	0.00281	5.844E-05		
Total	63	0.00500			

Grand Mean 0.0179
 CV(TTO*DPI) 65.06
 CV(Error) 42.72

Analysis of Variance Table for ciA

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	18236	18236.1		
DPI	7	207548	29649.8	5.55	0.0189
Error TTO*DPI	7	37378	5339.7		
Error	48	81833	1704.9		
Total	63	344995			

Grand Mean 271.78
 CV(TTO*DPI) 26.89
 CV(Error) 15.19

Analysis of Variance Table for gsA

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.12338	0.12338		
DPI	7	2.15936	0.30848	9.09	0.0047
Error TTO*DPI	7	0.23749	0.03393		
Error	48	1.08498	0.02260		
Total	63	3.60520			

Grand Mean 0.1748
CV(TTO*DPI) 105.35
CV(Error) 85.99

Analysis of Variance Table for Amax

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	417.444	59.6348		
TTO	1	54.391	54.3906	8.46	0.0227
Error DPI*TTO	7	45.017	6.4310		
Error	48	86.958	1.8116		
Total	63	603.809			

Grand Mean 4.7503
CV(DPI*TTO) 53.38
CV(Error) 28.33

Analysis of Variance Table for EA

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	48.832	6.9761		
TTO	1	19.305	19.3050	9.02	0.0198
Error DPI*TTO	7	14.974	2.1391		
Error	48	35.017	0.7295		
Total	63	118.128			

Grand Mean 1.9680
CV(DPI*TTO) 74.32
CV(Error) 43.40

Analysis of Variance Table for RD

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	103.930	14.8471		
TTO	1	0.774	0.7744	1.01	0.3476
Error DPI*TTO	7	5.350	0.7642		
Error	48	61.092	1.2728		
Total	63	171.146			

Grand Mean -1.6834
CV(DPI*TTO) -51.93
CV(Error) -67.02

Analysis of Variance Table for T1A

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	84.967	12.1381		
TTO	1	6.052	6.0516	22.70	0.0220
Error DPI*TTO	7	1.866	0.2666		
Error	48	48.449	1.0094		
Total	63	141.334			

Grand Mean 27.606

CV(DPI*TTO) 1.87

CV(Error) 3.64

Analysis of Variance Table for WUE

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	40.768	5.82397		
TTO	1	4.622	4.62250	3.05	0.1241
Error DPI*TTO	7	10.597	1.51383		
Error	48	78.207	1.62931		
Total	63	134.194			

Grand Mean 2.9869

CV(DPI*TTO) 41.19

CV(Error) 42.74

Analysis of Variance Table for WUEi

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	0.00107	1.536E-04		
TTO	1	0.00017	1.665E-04	1.23	0.3044
Error DPI*TTO	7	0.00095	1.356E-04		
Error	48	0.00281	5.844E-05		
Total	63	0.00500			

Grand Mean 0.0179

CV(DPI*TTO) 65.06

CV(Error) 42.72

Analysis of Variance Table for ciA

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	207548	29649.8		
TTO	1	18236	18236.1	3.42	0.1071
Error DPI*TTO	7	37378	5339.7		
Error	48	81833	1704.9		
Total	63	344995			

Grand Mean 271.78

CV(DPI*TTO) 26.89

CV(Error) 15.19

Analysis of Variance Table for gsA

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	2.15936	0.30848		

TTO	1	0.12338	0.12338	3.64	0.0982
Error DPI*TTO	7	0.23749	0.03393		
Error	48	1.08498	0.02260		
Total	63	3.60520			

Grand Mean 0.1748
CV(DPI*TTO) 105.35
CV(Error) 85.99

Analysis of Variance Table for FvFm

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.00563	0.00563		
DPI	7	0.00973	0.00139	1.67	0.2575
Error TTO*DPI	7	0.00583	0.00083		
Error	48	0.00920	0.00019		
Total	63	0.03038			

Grand Mean 0.8194
CV(TTO*DPI) 3.52
CV(Error) 1.69

Analysis of Variance Table for Fi

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.00051	0.00051		
DPI	7	0.05802	0.00829	2.13	0.1697
Error TTO*DPI	7	0.02722	0.00389		
Error	48	0.08365	0.00174		
Total	63	0.16939			

Grand Mean 0.7103
CV(TTO*DPI) 8.78
CV(Error) 5.88

Analysis of Variance Table for ETR

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	2.5361	2.53606		
DPI	7	4.5780	0.65400	1.54	0.2925
Error TTO*DPI	7	2.9797	0.42567		
Error	48	20.9488	0.43643		
Total	63	31.0426			

Grand Mean 3.4094
CV(TTO*DPI) 19.14
CV(Error) 19.38

Analysis of Variance Table for NPQ

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.17222	0.17222		
DPI	7	1.28475	0.18354	3.26	0.0710
Error TTO*DPI	7	0.39437	0.05634		
Error	48	1.76395	0.03675		

Total 63 3.61530

Grand Mean 0.3187

CV(TTO*DPI) 74.47

CV(Error) 60.14

Analysis of Variance Table for qNP

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.05119	0.05119		
DPI	7	0.62805	0.08972	3.82	0.0488
Error TTO*DPI	7	0.16422	0.02346		
Error	48	0.50932	0.01061		
Total	63	1.35279			

Grand Mean 0.2645

CV(TTO*DPI) 57.90

CV(Error) 38.94

Analysis of Variance Table for qP

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.00006	0.00006		
DPI	7	0.02320	0.00331	119.74	0.0000
Error TTO*DPI	7	0.00019	0.00003		
Error	48	0.01175	0.00024		
Total	63	0.03520			

Grand Mean 0.9300

CV(TTO*DPI) 0.57

CV(Error) 1.68

Analysis of Variance Table for FvFm

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	0.00973	0.00139		
TTO	1	0.00563	0.00563	6.76	0.0354
Error DPI*TTO	7	0.00582	0.00083		
Error	48	0.00920	0.00019		
Total	63	0.03038			

Grand Mean 0.8194

CV(DPI*TTO) 3.52

CV(Error) 1.69

Analysis of Variance Table for Fi

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	0.05802	0.00829		
TTO	1	0.00051	0.00051	0.13	0.7289
Error DPI*TTO	7	0.02722	0.00389		
Error	48	0.08365	0.00174		
Total	63	0.16939			

Grand Mean 0.7103

CV(DPI*TTO) 8.78
 CV(Error) 5.88

Analysis of Variance Table for ETR

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	4.5780	0.65400		
TTO	1	2.5361	2.53606	5.96	0.0447
Error DPI*TTO	7	2.9797	0.42567		
Error	48	20.9488	0.43643		
Total	63	31.0426			

Grand Mean 3.4094
 CV(DPI*TTO) 19.14
 CV(Error) 19.38

Analysis of Variance Table for NPQ

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	1.28475	0.18354		
TTO	1	0.17222	0.17222	3.06	0.1239
Error DPI*TTO	7	0.39438	0.05634		
Error	48	1.76395	0.03675		
Total	63	3.61530			

Grand Mean 0.3187
 CV(DPI*TTO) 74.47
 CV(Error) 60.14

Analysis of Variance Table for qNP

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	0.62805	0.08972		
TTO	1	0.05119	0.05119	2.18	0.1832
Error DPI*TTO	7	0.16422	0.02346		
Error	48	0.50932	0.01061		
Total	63	1.35279			

Grand Mean 0.2645
 CV(DPI*TTO) 57.90
 CV(Error) 38.94

Analysis of Variance Table for qP

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	0.02320	0.00331		
TTO	1	0.00006	0.00006	2.03	0.1970
Error DPI*TTO	7	0.00019	0.00003		
Error	48	0.01175	0.00024		
Total	63	0.03520			

Grand Mean 0.9300
 CV(DPI*TTO) 0.57
 CV(Error) 1.68

Statistix 9.0

25/05/2012, 11:04:09 a.m.

Spearman Rank Correlations, Corrected for Ties

Amax	EA	ETR	Fi	Fv	NPQ	RD		
EA	0.8664							
ETR	-0.2597	-0.0490						
Fi	-0.2174	-0.1314	0.2031					
Fv	0.2750	0.3409	-0.0232	0.2567				
NPQ	0.3976	0.3406	-0.1921	-0.8348	0.1819			
RD	0.3445	0.3099	-0.1717	-0.1056	0.3634	0.2510		
TlA	-0.6111	-0.5043	0.5445	0.0870	-0.2944	-0.2177	-0.2755	
WUE	-0.1920	-0.5787	-0.1889	-0.0780	-0.2201	-0.0808	-0.0665	
WUEi	-0.6851	-0.9161	-0.1217	-0.1444	0.1433	0.2279	0.1850	
ciA	0.7610	0.8471	-0.2082	-0.2817	0.2396	0.4324	0.2369	
gsA	0.9064	0.9675	-0.1542	-0.1700	0.3463	0.3665	0.3399	
qNP	0.3819	0.3188	-0.1898	-0.8462	0.1527	0.9980	0.2365	
qP	-0.3508	-0.2881	0.1545	0.5849	-0.3382	-0.6294	-0.2572	

	TlA	WUE	WUEi	ciA	gsA	qNP
WUE	0.0722					
WUEi	-0.2890	0.1293				
ciA	-0.6545	-0.4935	0.3050			
gsA	-0.6215	-0.4603	-0.8871	0.8982		
qNP	-0.2017	-0.0606	0.2230	0.4106	0.3437	
qP	0.3628	-0.0277	-0.2914	-0.3393	-0.3437	-0.6134

Maximum Difference Allowed Between Ties 0.00001

Cases Included 64 Missing Cases 0

C. Anexo:Análisis estadístico de las variables en el muestreo destructivo

Spearman Rank Correlations, Corrected for Ties

Area	CRA	Grosor	Largo	No	Peso		
CRA	-0.2404						
Grosor	0.3731	-0.3184					
Largo	0.9053	-0.1388	-0.0092				
No	0.7348	-0.1262	-0.2101	0.8860			
Peso	0.7479	-0.1533	-0.0077	0.8287	0.8380		
Resp	0.3247	0.2008	-0.0830	0.3824	0.3831	0.3935	
Respira	-0.3247	-0.2008	0.0830	-0.3824	-0.3831	-0.3935	

Maximum Difference Allowed Between Ties 0.00001

Cases Included 56 Missing Cases 8

Spearman Rank Correlations, Corrected for Ties

Area	CRA	Grosor	Largo	No	Peso	CRA	-
0.0246							
Grosor	0.2355	0.1016					
Largo	0.9020	-0.1483	-0.1473				
No	0.7521	-0.3372	-0.2960	0.8916			
Peso	0.7329	-0.3207	-0.1123	0.8155	0.8024		
Resp	0.5840	0.1303	0.0882	0.5337	0.4882	0.6333	
Respira	-0.5840	-0.1303	-0.0882	-0.5337	-0.4882	-0.6333	

Maximum Difference Allowed Between Ties 0.00001

Cases Included 28 Missing Cases 4

Spearman Rank Correlations, Corrected for Ties

Carotenos	Chl	Chl~01	Chl~02	PROTHOJA	PROTRAIZ	UAEHOJA	
Chl	0.4448						
Chl~01	0.2662	0.7830					
Chl~02	0.3879	0.9604	0.9174				
PROTHOJA	-0.0687	0.0237	0.0116	0.0131			
PROTRAIZ	0.0726	-0.2952	-0.2329	-0.2739	0.1923		
UAEHOJA	-0.5405	-0.0085	0.0631	0.0275	-0.3604	-0.1429	
UAERAIZ	-0.3732	0.3199	0.3719	0.3591	0.0445	-0.5758	0.5145
UAHOJA	-0.4880	0.1127	0.2324	0.1738	0.2252	-0.0723	0.7182
UARAIZ	-0.4185	0.2754	0.3450	0.3248	0.2422	-0.0505	0.5383

	UAERAIZ	UAHOJA
UAHOJA	0.5726	
UARAIZ	0.7590	0.7228

Maximum Difference Allowed Between Ties 0.00001

Cases Included 36 Missing Cases 6

Statistix 9.0

21/05/2012, 08:32:31 p.m.

Means of CRA for DPI*TTO

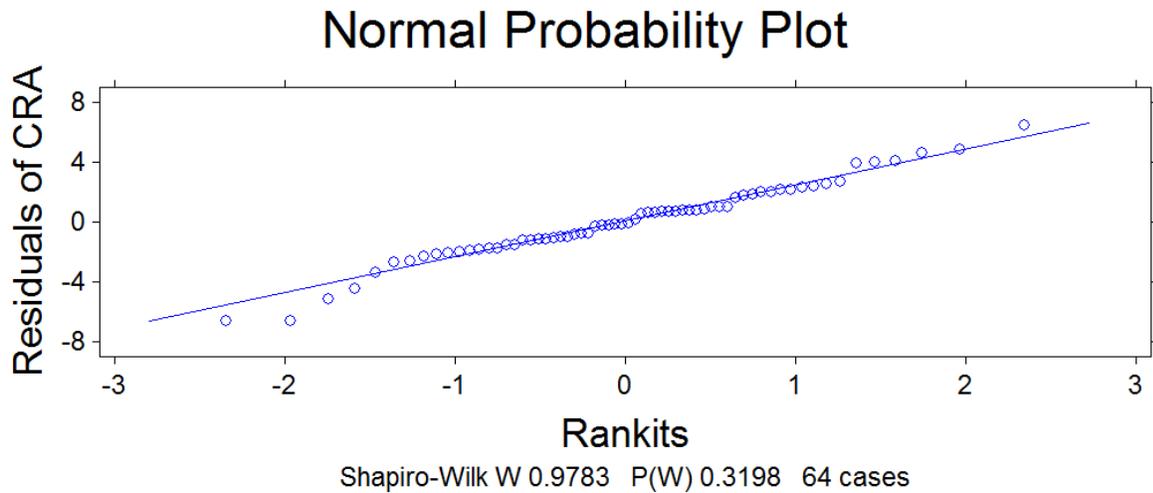
DPI TTO	Mean	DPI TTO	Mean
0 C	0.8517	16 C	0.8664
0 T	0.8523	16 T	0.8278
4 C	0.8615	20 C	0.8308
4 T	0.8699	20 T	0.8818
8 C	0.8598	24 C	0.8286
8 T	0.8735	24 T	0.9173
12 C	0.8738	28 C	0.8180
12 T	0.9342	28 T	0.9441
Observations per Mean		4	
Standard Error of a Mean		0.0145	
Std Error (Diff of 2 Means)		0.0204	

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of CRA for DPI*TTO

DPI TTO	Mean	Homogeneous Groups
28 T	0.9441	A
12 T	0.9342	AB
24 T	0.9173	ABC
20 T	0.8818	ABCD
12 C	0.8738	ABCD
8 T	0.8735	ABCD
4 T	0.8699	BCD
16 C	0.8664	BCD
4 C	0.8615	BCD
8 C	0.8598	CD
0 T	0.8523	CD
0 C	0.8517	CD
20 C	0.8308	D
24 C	0.8286	D
16 T	0.8278	D
28 C	0.8180	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0204
 Critical Q Value 5.106 Critical Value for Comparison 0.0738
 Error term used: Error, 48 DF

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.



Analysis of Variance Table for CRA - Factorial

Source	DF	SS	MS	F	P
DPI	7	0.01864	0.00266	3.18	0.0075
TTO	1	0.02407	0.02407	28.78	0.0000
DPI*TTO	7	0.03948	0.00564	6.75	0.0000
Error	48	0.04013	0.00084		
Total	63	0.12231			

Grand Mean 0.8682 CV 3.33

Analysis of Variance Table for CRA Dia 0

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	5.083E-07	5.083E-07	0.00	0.9801
Error	6	0.00453	7.556E-04		
Total	7	0.00453			

Grand Mean 0.8520 CV 3.23

Analysis of Variance Table for CRA Dia 4

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.00014	1.416E-04	0.35	0.5765
Error	6	0.00244	4.062E-04		
Total	7	0.00258			

Grand Mean 0.8657 CV 2.33

Analysis of Variance Table for CRA Dia 8

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.00037	0.00037	0.17	0.6908
Error	6	0.01284	0.00214		
Total	7	0.01321			

Grand Mean 0.8667 CV 5.34

Analysis of Variance Table for CRA Dia 12

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.00730	0.00730	44.87	0.0005
Error	6	0.00098	0.00016		
Total	7	0.00827			

Grand Mean 0.9040 CV 1.41

Analysis of Variance Table for CRA Dia 16

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.00298	0.00298	2.20	0.0082
Error	6	0.00810	0.00135		
Total	7	0.01108			

Grand Mean 0.8471 CV 4.34

Analysis of Variance Table for CRA Dia 20

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.00521	0.00521	7.89	0.0038
Error	6	0.00396	0.00066		
Total	7	0.00918			

Grand Mean 0.8563 CV 3.00

Analysis of Variance Table for CRA Dia 24

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.01573	0.01573	64.49	0.0002
Error	6	0.00146	0.00024		
Total	7	0.01719			

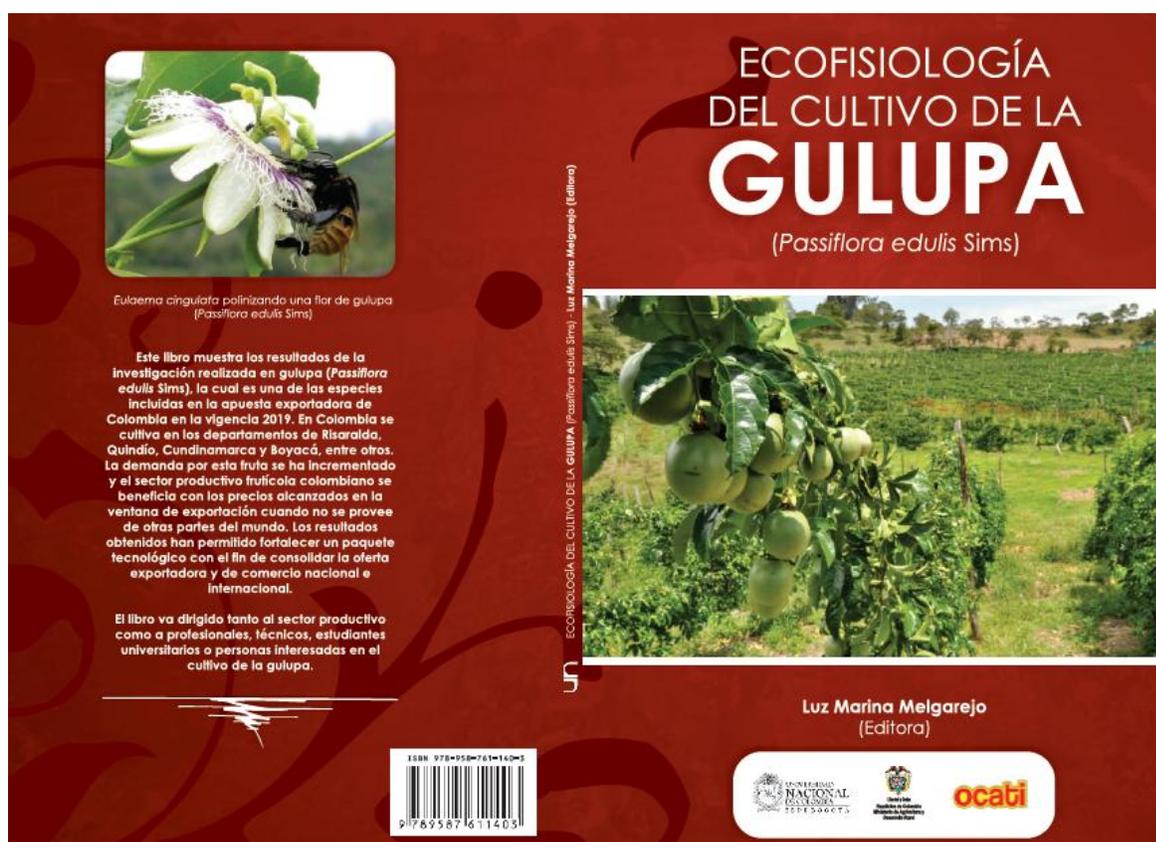
Grand Mean 0.8729 CV 1.79

Analysis of Variance Table for CRA Dia 28

Source	DF	SS	MS	F	P
TTO	1	0.03181	0.03181	32.85	0.0012
Error	6	0.00581	0.00097		
Total	7	0.03762			

Grand Mean 0.8810 CV 3.53

D. Anexo: Capítulo de Libro



CAPÍTULO 5

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE LA GULUPA (*Passiflora edulis* Sims) FRENTE AL ATAQUE POR *Fusarium* spp.

Marisol Cruz Aguilar¹, Liliana Hoyos Carvajal², Luz Marina Melgarejo^{1,3}

¹Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

²Laboratorio de fitopatología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia

³ Autor para correspondencia: lmmelgarejo@unal.edu.co

La gulupa es uno de los cultivos tropicales que por sus particulares propiedades organolépticas (Jiménez et al., 2011; Díaz et al., 2011) ha alcanzado en la última década gran aceptación en los mercados europeos. Dentro de los países que participan en la oferta de este producto, Colombia se destaca por su gran potencial productor; de hecho, durante el año 2010 Colombia exportó US\$9,2 millones en gulupa, ocupando este producto el segundo renglón de exportación dentro de las frutas, después de la uchuva (Proexport Colombia, 2011).

A pesar de la creciente demanda la producción nacional no ha crecido al ritmo esperado, debido, entre otras causas, a los problemas fitosanitarios que afectan al cultivo, el cual es susceptible a diferentes microorganismos (virus, bacterias, nemátodos y hongos) que han presentado aumento en su incidencia y severidad a medida que incrementa el área sembrada, y a que las prácticas agrícolas y culturales en campo no tienen un fundamento técnico adecuado (Guerrero-López y Hoyos-Carvajal, 2011). Dentro de las enfermedades más limitantes se presenta la secadera o fusariosis, la cual compromete la producción por su efecto devastador, pues no existen productos fungicidas que logren eficientemente el control del patógeno y la planta infectada irremediablemente muere (Castaño, 2009).

La marchitez por *Fusarium*, marchitez vascular o secadera en pasifloras, se conoce desde hace más de medio siglo, cuando se reportó por primera vez en Australia (McKnight, 1951). Es una enfermedad producida por hongos del suelo del género *Fusarium*, específicamente por poblaciones del complejo de especies *Fusarium oxysporum* (Gardner, 1989). Este hongo es un habitante frecuente del suelo,

E. Anexo: Artículo en revisión

Histopathological features of infections caused by *F. oxysporum* and *F. solani* in purple passion fruit plants (*Passiflora edulis* Sims).

Emiro Ortiz¹, Marisol Cruz², Luz Marina Melgarejo², Xavier Marquínez³, Lilliana Hoyos-Carvajal¹

¹Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia

²Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

³Laboratorio de Anatomía y Cultivo de tejidos Vegetales, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

Author for correspondence: Lilliana Hoyos-Carvajal. E. mail: limhoyosca@unal.edu.co

RESUMEN

La gulupa *Passiflora edulis* Sims, se ha posicionado en el segundo lugar dentro de las frutas de exportación de Colombia, siendo el mercado europeo su destino principal. Sin embargo, su producción se ve afectada por diferentes enfermedades que incluyen la presencia de fusariosis. En este trabajo se presentan las características histopatológicas de diferentes tejidos afectados por los patógenos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*; ambos microorganismos producen efectos similares en la planta: colonización de los vasos del xilema por hifas y microconidias; hipertrofia e hiperplasia del xilema, cambium y floema; destrucción de fibras xilares y de amiloplastos en las células de parénquima; y producción de geles por parte de la planta. Sin embargo, se observan diferencias en el mecanismo de colonización, *F. solani* ingresa y se concentra principalmente en la zona del cuello, mientras que *F. oxysporum* penetra por la raíz y se moviliza por el sistema vascular colonizando completamente la planta.

Palabras clave: *Passiflora edulis* Sims, *F. oxysporum*, *F. solani*, histopatología, colonización.

ABSTRACT

The purple passion fruit *Passiflora edulis* Sims, is the second fruit exported in Colombia and the European market is the most important destination. However, this production is affected by several diseases, like fusariosis. This paper presents the histopathological features from different tissues affected by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*. Both microorganisms produce similar responses in plant: xylem vessels colonized by hyphae and microconidia, hypertrophy and hyperplasia in xylem, cambium and phloem cells; xylem fibers destructed, and amyloplasts in parenchyma cells; and also the production of gels in plant. However, there are some differences in the colonization mode of each pathogen, while *F. solani* penetrates and is concentrated mainly in the collar zone, *F. oxysporum* penetrates by roots and move through vascular system of the whole plant.

Keywords: *Passiflora edulis* Sims, *F. oxysporum*, *F. solani*, histopathology, colonization.

RESUMO

O roxo de maracujá *Passiflora edulis* Sims., foi posicionado em segundo lugar na exportação de frutas da Colômbia y mercado europeu é o principal destino. No entanto, a produção é afetada por várias doenças incluindo a presença de fusariose. Este trabalho apresenta as características histopatológicas de diferentes tecidos afetados por patógenos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani*; ambos os organismos produzem efeitos semelhantes sobre a planta: colonização dos vasos do xilema por hifas e microconídios, hipertrofia e hiperplasia das cambium, xilema e floema; destruição de fibra xilares e amiloplastos em células parenquimatosas, também a produção de géis pela planta. No entanto, existem diferenças no mecanismo de colonização, *F. solani* entra e se concentra principalmente na área do pescoço, enquanto *F. oxysporum* penetra nas raízes e move-se através do sistema vascular para totalmente colonizam a planta.

Palavras-chave: *Passiflora edulis* Sims., *F. oxysporum*, *F. solani*, histopatologia, a colonização.

INTRODUCTION

The purple passion fruit –gulupa- (*Passiflora edulis* Sims) belongs to the family Passifloraceae, and for Colombia is an important export product as fresh fruit (Proexport Colombia, 2011); in this crop there are important problems in production, such as phytosanitary problems (Castaño-Zapata, 2009).

Among the diseases associated with wilt have been reported Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* and collar rot caused by *F. solani* (Ortiz and Hoyos-Carvajal, 2011). These two diseases have similar symptoms that can cause confusion in diagnosis (Fischer and

Rezende, 2008). In both cases, there is mild leaf chlorosis and unequal drying of the aerial parts in the early stages of infection; the symptoms are emphasized later, defoliation is presented, the vascular system turns from brown to red and finally death occurs in the plant. In collar rot, there is widespread necrosis of 2 to 10 cm wide at the collar of the plant, where they eventually may be orange small points corresponding to the perithecia of the pathogen (Ploetz, 2006).

Regarding the mechanism of infection, *F. oxysporum* produces hyphae that directly penetrate root epidermal walls (Mendgen et al., 1996). Then the mycelium advances intercellularly through the cortex of the root until it reaches the xylem vessels which used as a pathway for rapid colonization of the host, particularly through microconidia (Bishop and Copper, 1983). Wilt symptoms appear as a result of severe water stress due mainly to blockage of vessels, due accumulation of fungal mycelium, toxin production and host defense responses, which include production of gels, tyloses, and proliferation parenchymal cells (Beckman, 1987).

Although several studies have focused on the histological response of different hosts to infection by *F. oxysporum* and *F. solani*, are not adequate information available on this subject on many Passifloraceae, that have been reported as susceptible to Fusarium wilt (McKnight, 1951; Gardner, 1989; Ploetz, 1991; Ploetz, 2003) and collar rot (Cole et al., 1992; Ponte, 1993; Fischer et al., 2005; Pegg et al., 2002). Only, Emchembe and Mukiibi (1976, cited by Ploetz, 2003) reported that in tissues of passion fruit plants affected by *Nectria haematococca* (*F. solani*) arises invasion and colonization in cortical parenchyma and xylem.

Due to the limiting conditions for fusariosis in gulupa and lack of knowledge in the area of pathology, that allow establish management measures of this disease, the aim of this study was determine the histopathological features of gulupa plants infected with *F. oxysporum* and *F. solani*, contributing with descriptions of distribution of each pathogen in different plant tissues, its colonization and tissue alterations produced in the plant by infection.

MATERIALS AND METHODS

Samples of gulupa tissues were processed with natural and induced infections by *F. oxysporum* and *F. solani* in root, collar and stem. Sections were taken with natural infection of a crop of nine months, located in the area of Venecia (Cundinamarca, Colombia), located at 4°01'41.8" (latitude N), 74°31'17.7" (longitude W) and a height of 1794 meters above sea level.

In order to analyze artificially inoculated tissues, plants of gulupa with 2 and 4 months of age, were inoculated with strains of *F. oxysporum* and *F. solani* respectively. These strains were isolated from purple passion fruit plants (Ortiz and Hoyos-Carvajal, 2011). The plants were cultivated in the greenhouse of the Faculty of Agronomy, Universidad

Nacional de Colombia, Bogotá (average temperature 25 °C and relative humidity 70%). Inoculation of *F. oxysporum* was conducted by immersion of roots without wound in a conidial suspension produced in liquid malt extract media (MS), with a concentration of 1x10⁶ conidia / mL (Gardner, 1989; Vakalounakis, 1996, modified). Inoculation with *F. solani* was made by direct contact between young mycelium disks, developed on potato dextrose agar (PDA) and the collar of plant, there was induced a small incision (Ploetz, 1991; Fischer et al., 2005). Samplings were made in plants once time these shown symptoms, at 37 dpi (days post inoculation) to *F. oxysporum*, and 90 dpi for *F. solani*. In both cases, were performed histological analyses in sections of root, collar and stem. Simultaneously, re-isolation of pathogens was achieved in PDA, in order to confirm the causality of disease.

Sections were fixed in FAA (10% formalin - 5% acetic acid – 85% alcohol to 70%) for 24 h, then dehydrated in EtOH series (70, 80, 85, 90, 96% and absolute EtOH) -24 hours each- and rinsed in terbutanol 100% for 24 h. Were subsequently included in a mixture of terbutanol: paraffin 1:1 v/w and later in pure paraffin (Paraplast plus paraffin at 60°C), for a period of 24 h per pass. Finally, the blocks with the samples were cut with a rotation microtome Minot-type model 820 Spencer (American Optical, Delhi).

For the staining process, were tested different techniques: safranin - fast green (Conn, 1953), periodic acid - Schiff reagent (PAS) (Bancroft and Stevens, 1982), amended in conducting of a contrast with fast green for 2 seconds, and astra blue - basic fuchsin double staining (Kraus et al., 1998).

RESULTS

Anatomy on purple passion fruit plants (gulupa) healthy tissues

In stem cross-sections of 18 weeks plants (Figure 1A) is observed a monostratified epidermis, constituted by polygonal cells covered by a thinner cuticle; the cortex is formed by one or two layers of collenchyma and six to eight layers of parenchyma with sporadic presence of amyloplasts and drusen. The primary vascular system is an eustele; however, at this stage of development, the plants show secondary growth. The cambial zone consists of 3 or 4 rows of isodiametric cells; the secondary xylem there is arranged in rows more or less defined, with large vessels with a diameter of approximately 105 to 160 µm, abundant radial and paratracheal parenchyma with lignified walls and evident amyloplasts, tracheids and occasional xylem fibers. The primary xylem presents non-lignified parenchyma and vessels of smaller diameter, also limits internally with the pith which ends in a central cavity. The primary and secondary phloems are limited externally by periphloematic fibers, and are spaced peripherally in packages by ray parenchyma cells. Phloem (Figure 1B), is characterized by larger sieve cells and smaller companion cells.

In transverse section of the collar (figura 1C), can be seen histological distribution similar to those described for stem, with the epidermis replaced by periderm (cork, phellogen and phelloderm) and frequent lenticels; the ray parenchyma cells have numerous amyloplasts, who stated a differential staining according to the technique used (Figure 1D, E). In addition to the vessels and rays parenchyma, there are a large number of xylem fibers with conspicuous secondary walls (Fig. 1D, E). Central region is characterized by the presence of a compact pith made up of parenchymal cells.

Roots with secondary growth are characterized by the presence of a parenchymatic secondary cortex whose outermost cells display cell division and incipient lignification of the walls (exodermis), even without formation of phelloderm. The secondary phloem is not limited externally by periphloematic fibers as in the stem. In the secondary xylem fibers and tracheids are abundant which are bounded by ray parenchyma cells as in the collar (Figure 1F). In the center there is no pith, instead the primary xylem reveals that the primary roots are diarchic.

According to Figure 1 D-F, can be compared the effect of each one stain in the different cellular types constituted each tissue. The xylem vessels are easily recognized in all types of staining by its characteristic size, and are common not to see any content within these. Xylem parenchyma cells in all cases are recognized by their cytoplasmic contents rich in amyloplasts, which acquire different colors depending to the polysaccharide interaction with the specific dye. Using PAS, tissue is stain an intense magenta (Figure 1D) due to reactions of polysaccharides with periodic acid and Schiff's reagent (Conn, 1953), with astra blue - basic fuchsin acquire a light pink translucent (Figure 1E), similar to that presented by Kraus et al., 1998. Safranin - fast green, stain with a light green (Figure 1F), which is due to mark the cytoplasm (Conn, 1953).

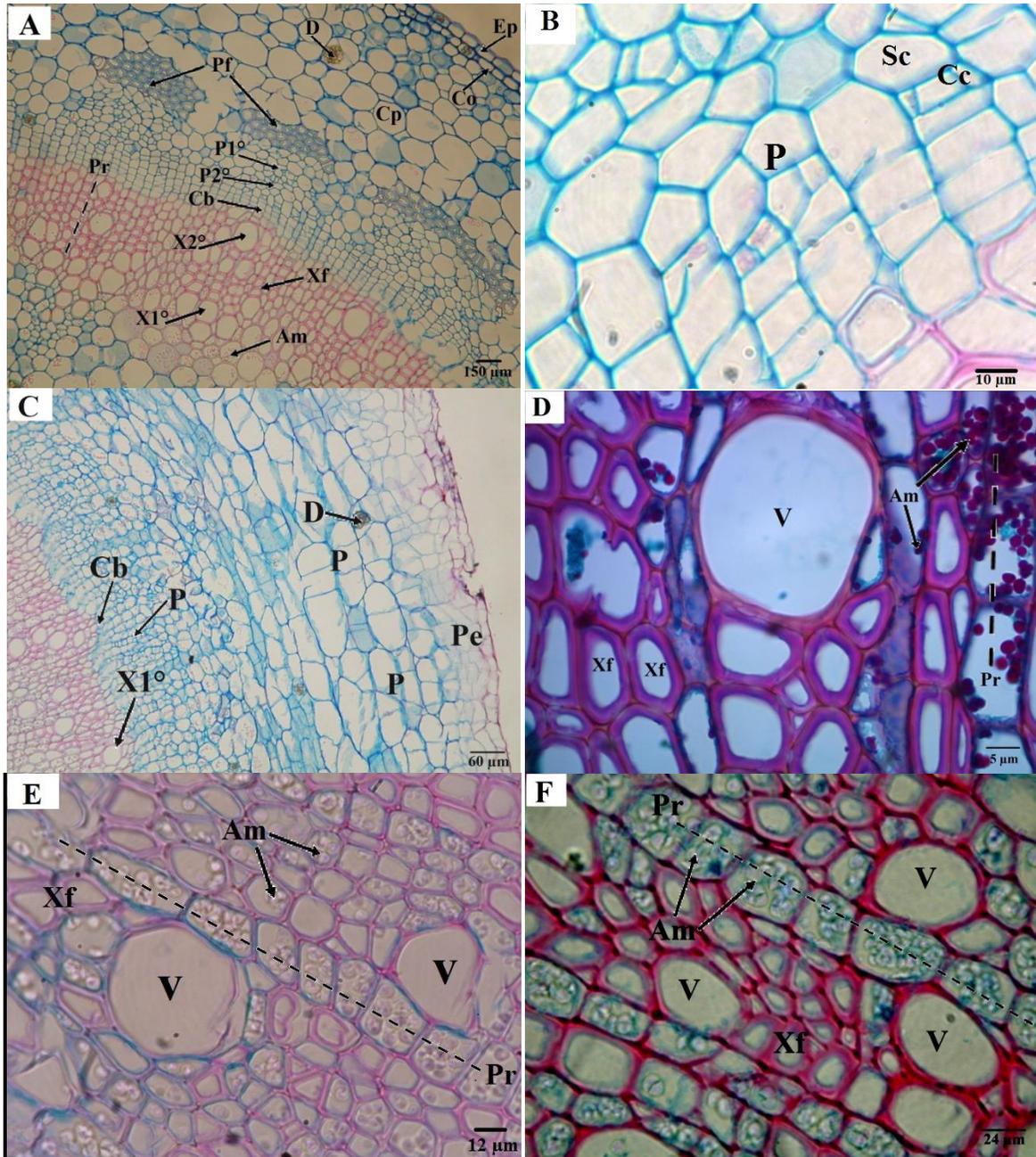


Figure 1. Transversal section of health tissue on purple passion fruit plants (gulupa). Stem (A, B), collar (C, D, E) and root (F). A, B, C, E: astra blue–basic fuchsin double staining; D: periodic acid - Schiff reactive (PAS); F: safranin - fast green. Ep, epidermis; Co, collenchyma; Cp, cortical parenchyma; Pf, periphloematic fibers; Cb, cambium; X1 °, primary xylem; X2 °, secondary xylem; P1°, primary phloem, P2°, secondary phloem, V, vessel; Pr, ray parenchyma cells; Xf, xylem fibers; Am, amyloplasts; D, druse; P, phloem; Sc, sieve cell; Cc, companion cell; Pe, periderm. A, C: 10X; B, D: 100X; E, F: 40X.

Histopathology of infections caused by *F. oxysporum* on purple passion fruit plants tissue (Fusarium wilt)

Figure 2 shows cross sections of the collar (A, B), stem (C and D), and root (E and F) of plants inoculated with *F. oxysporum* (37 dpi), which shown the presence of the pathogen colonizing xylem vessels and radii parenchyma. Some xylem vessels have a significant colonization by hyphae and microconidia of pathogen, which become more evident in observations to 100 X (Figure 2, A-C). Can also be seen absence of amyloplasts in ray parenchyma cells and significant degradation of xylem fibers thus compared with healthy tissues, as well as the production of gels (Figure 2B) as defense mechanism by the plant (Beckman, 1987). Gels and pathogen structures were differentiated by the contrast obtained staining with astra blue - basic fuchsin, which turns color blue the polysaccharides presents in wall cell, and dye in red color those structures suberized or cutinized (Kraus et al., 1998). Therefore, structures of the pathogen were stained blue, due to the presence of chitin and glucan in the wall cell, and the gels were stained red, suggesting polymerization processes with suberizant or lignificant agents type polyphenols (Beckman and Roberts, 1995).

Regarding the phloem (Figure 2D), is noted that in all cells was generalized disruption, with loss of cell shape, associated with hypertrophy and hyperplasia, so was not possible to identify sieve cells, companion cells and phloem parenchyma (compare Figure 1B).

Interpretations of cross sections from mature roots showed a greater presence of pathogen structures colonizing vessels and parenchyma that in stem and collar, as well as changes in the shape of the cell walls in the xylem fibers and presence of gels in vessels (Figure 2 E, F compare Figure 1F). The microconidia are distinguished by their well-defined ellipsoidal shape, which are abundant in vessels (Figure 2C), whereas the hyphae are presented as individual cylindrical filamentous structures colonizing vessels and ray parenchyma cells (Figure 2A) or grouped with microconidia obstructing xylem vessels (Figure 2A, B).

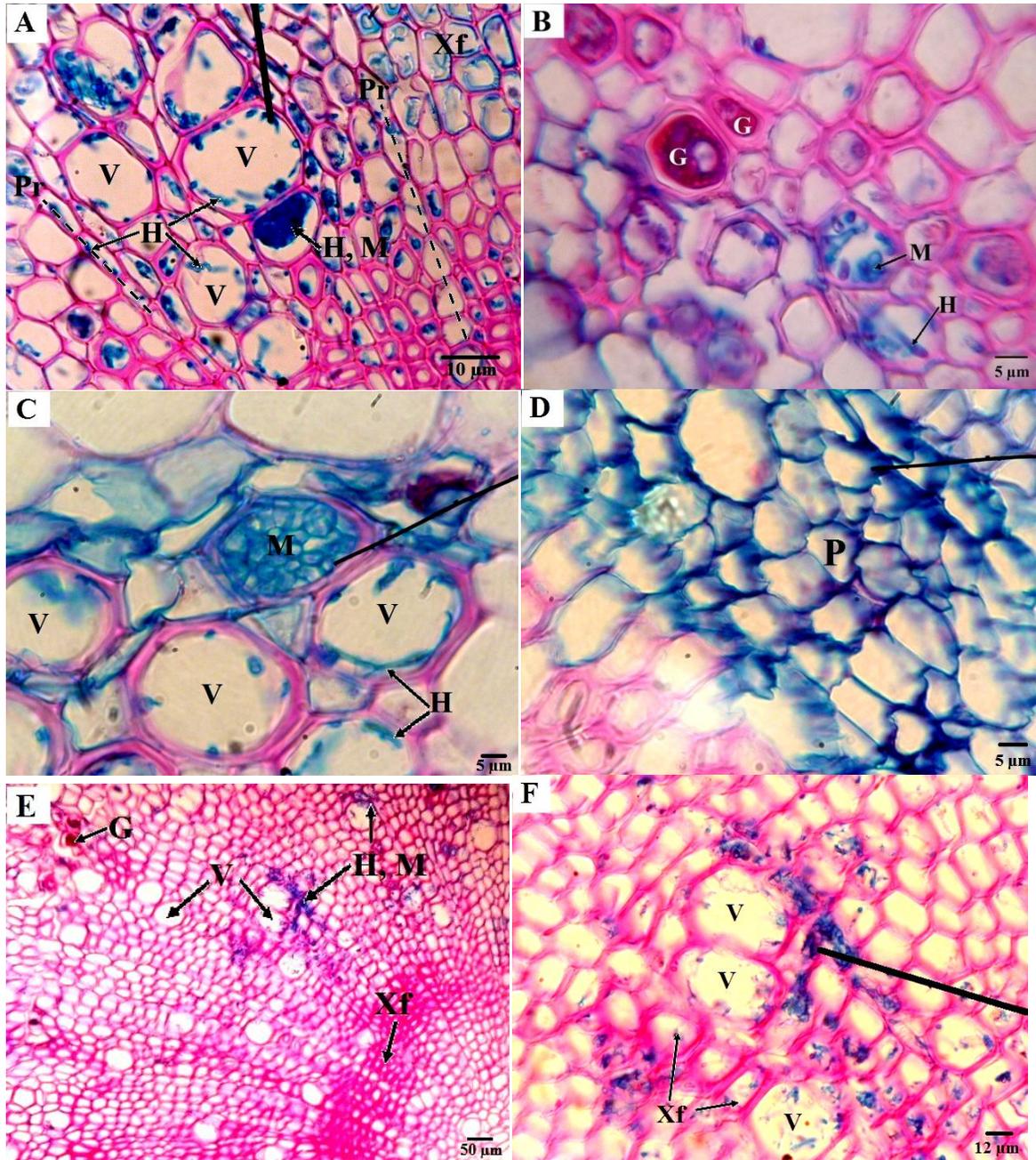


Figure 2. Infections induced by *F. oxysporum* on seedlings of purple passion fruit plants at 37 dpi. Cross sections of collar (A, B), stem (C, D) and root (E, F). AF, astra blue–basic fuchsin double staining. The tip of the indicator shows hyphae (A), xylem vessel occluded by microconidia (C), alterations in phloem (D), hyphae and microconidia (F). V, xylem vessel; Pr, ray parenchyma cells; Xf, xylem fibers; P, phloem; H, hyphae of *F. oxysporum*; M, microconidia of *F. oxysporum*; G, gel. A-D: 100X; E: 10X; F: 40X.

Histopathology of infections caused by *F. solani* on purple passion fruit plants tissue (Collar rot).

Tissue samples derived from natural infections, cross-section of collar (Figure 3A-D), shown a profuse tissue pathogen colonization to the periderm tissues, with structures corresponding to conidiophores and microconidia on the epidermis (Figure 3A), revealing a pattern of progression through parenchyma, those cells were dyed brown (Figure 3 B and C). Associated with this, was marked disruption and lack of differentiation, due to processes of hypertrophy and hyperplasia. The lumen of xylem vessels in the collar revealed the presence of hyphae of the pathogen (Figure 3D), and as a defense mechanism of the plant, was an abundant production of gels, often associated with hyphae. In contrast in stem cuttings was not possible to observe structures of the pathogen, but was noted the presence of fewer gels (Fig. 3E). In root cuttings no evidence pathogen colonization; however, was found large amount of gels in the vessels (data not shown). PAS staining allowed a clear differentiation of the gels, due its composition that include polysaccharides such as pectin and hemicellulose, which were stained intense fuchsia, verifying results reported by Conn (1953), for this type of staining.

Induced infections showed a similar histologic response natural infections in the collar, with a pronounced reaction hypertrophy and hyperplasia in cells of the cambium (Fig. 3F); however, unlike natural infections, it was possible to detect at level of stem the presence of hyphae and gels in the lumens of the vessels.

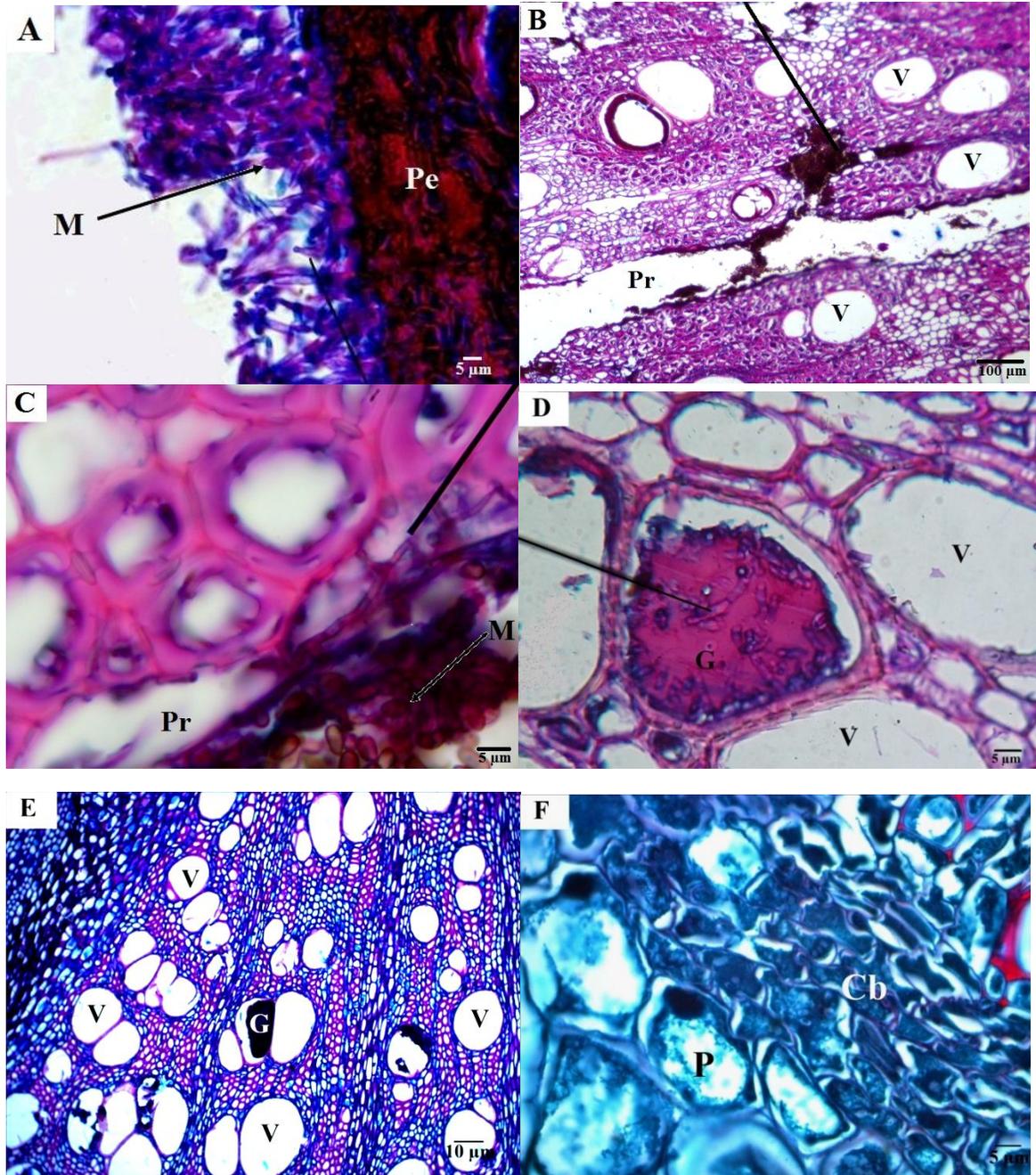


Figure 3. Natural and induced infections of *Fusarium solani* in purple passion fruit plants. Natural infections in nine months plants (A - E), induced infections at 90 dpi (F). Cross sections of collar (A-D, F) and stem (E). The tip of arrow shows conidiophore (A), pathogen structures (B), hyphae (C) and hyphal tip (D). A-E, PAS staining; F, safranin - fast green staining. V, xylem vessels; Pr, ray parenchyma cells; Pe, periderm; Cb, cambium; P, phloem; M, microconidia; G gel. A, C, D, F: 100X; B: 10X; E: 40X.

DISCUSSION

The colonization of *F. oxysporum*, was observed in all organs of purple passion fruit plants analyzed (root, stem and collar), this corroborates the mechanism of penetration by the root system and ability to colonization through the vascular system. The process of colonization through the vascular system has been widely documented by Bishop and Cooper (1983), in tomato and pea cultivars susceptible to *F. oxysporum*.

Collar infections, shown that colonization by *F. solani* occurred from the periderm to the pith through the ray parenchyma cells. A similar response is reported by Stahl et al., (1994), in infections caused by mutants of *N. haematococca* (*F. solani* f.sp. pisi) in peas, on which after penetration of the epidermis, follows colonization of cortical parenchyma by inter and intracellular growth, with radial advance of the hyphae. Cells of the parenchyma act as a path that facilitates the movement of the pathogen. However, according Shigo and Marx (1977), the ray cells of the parenchyma can also act as a defense mechanism that restricts lateral colonization by the processes of compartmentalization.

In stem tissue affected by natural infection of *F. solani*, were not found evidence of fungi structures, supports the idea that this pathogen tends to be located on the collar, which is associated with the symptoms observed in the field. Nevertheless, over induced infections were observed structures of the pathogen in the stem (data not shown), indicating the possible colonization through the xylem. Similarly, studies by Stahl et al., (1994), noted that after the disintegration of vascular parenchyma, colonization occurred in the vascular system.

In injuries caused by both pathogens *F. oxysporum* as *F. solani* are evident hyphae and microconidia in the lumen of the vessels, also formation of gels which constitutes a defense response in infected plants. Gel formation could limit the spread fungal by occlusion of the vessels; in this research was frequently observed gels associated with hyphae in the lumen of the vessels.

Alterations observed in the cambium associated with hypertrophy and hyperplasia in infections with *F. solani* could generate the morphological changes observed in xylematic parenchyma cells. According Ouellette et al. (2006), histopathological studies of Fusarium wilt suggest that the disorders happening in tissues outside the xylem, are due to an apparent reaction to changes that take place in the cells of the cambium. Meanwhile, the phloem cells also changed in cell differentiation due to invasion by these pathogens. According to Beckman and Roberts (1995), hypertrophy of vascular parenchyma cells may be an important part of defense. Ouellette et al., (2006) report that in this type of cell proliferation may involve the production of growth-promoting substances, including ethylene.

Another consistent response, was reduction of amyloplasts in parenchyma cells, this could be a mechanism by which the plant depletes carbohydrates present in amyloplasts due stress effect produced by the pathogen. Saniewska et al., (2004), reported in trials with *F. oxysporum* f.sp. tulipae the gradual degradation of starch granules in infected tulip bulbs. Additionally, the change in shape of the walls in fibers, mainly in root tissue,

suggests processes lignin degradation. Studies on the biochemical characteristics of *F. oxysporum*, have demonstrated enzymatic activity to degrade cell walls in carnation (Niemann et al., 1991).

Finally, when are compared results of the different stains used in this study, there was evidence that the techniques of astra blue, basic fuchsin and PAS allow the differentiation of pathogen structures, the cell organelles and histological defense structures of the plant; however, the astra blue–basic fuchsin double staining offers better resolution.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Ministry of Agriculture and Rural Development of Colombia (contact number +571-3341199), for supporting this research. The laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agronomy and laboratorian Wadith de León; the Laboratory of Anatomy and Plant Tissue Culture and the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, National University of Colombia.

REFERENCES

Bancroft J, Stevens A (1982) Theory and Practice of Histological Techniques. 2nd Ed. NY. Churchill Livingstone.

Beckman CH (1987) The Nature of Wilt Diseases of Plants. St. Paul, MN. The American Phytopathological Society. APS Press.

Beckman CH, Roberts EM (1995) On the Nature and Genetic Basis for Resistance and Tolerance to Fungal Wilt Diseases of Plants. En: Andrews JH, Tommerup IC (Eds.) Advances in Botanical Research. Vol 21. Incorporating Advances in Plant Pathology. Londres Reino Unido. Academic Press. pp. 36-72.

Bishop D, Cooper RM (1983) An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. Physiological Plant Pathology 23: 323–343.

Castaño-Zapata J (2009) Enfermedades importantes de las pasifloráceas en Colombia. En Miranda D, Fischer G, Carranza C, Magnitskiy S, Casierra-Posada S, Piedrahita W, Flórez LE (Eds). Cultivo, poscosecha y comercialización de las Pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Bogotá. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. pp 223-244.

Cole DL, Hedges TR, Ndwora T (1992) A wilt of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis* Sims) caused by *Fusarium solani* y *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. Tropical Pest Management 38: 362-366.

- Conn HJ (1953) Biological stain. 6th.Ed. Commission on standardization of biological stain. Geneva, N.Y. Biotech Publications.
- Fischer IH, Lourenco SA, Martins MC, Kimati H, Amorim L (2005) Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causada por *Nectria haematococca*. *Fitopatologia Brasileira* 30: 250-258.
- Fischer IH, Rezende JA (2008) Diseases of passion flower (*Passiflora* sp.). *Pest Technology*. 2(1):1-19.
- Gardner D (1989) Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* to Banana Poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. *Plant disease* 73: 476-478.
- Kraus JE, Sousa HC, Rezende MH, Castro NM, Vecchi C, Luque R (1998) Astra Blue and Basic Fuchsin Double Staining of Plants Materials. *Biotechnic and Histochemistry* 73 (5): 235-243.
- McKnight T (1951) A wilt disease of the passion vine (*Passiflora edulis*) caused by a species of *Fusarium*. *Queensland Journal of Agricultural Science* 8: 1-4.
- Mendgen K, Hahn M, Deising H (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34: 364-386.
- Niemann GJ, Boon JJ, Pureveen JB, Eijkel G, Van der Heijden E (1991) A microanalytical approach to plant tissue characterization: A comparative study of healthy and fungus-infected carnation by pyrolysis mass spectrometry. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 19: 213-236.
- Ortiz E, Hoyos-Carvajal L (2011) Caracterización patogénica de aislamientos de *Fusarium oxysporum* provenientes de cultivos de gulupa en la región del Sumapaz. *Memorias, XXX Congreso Colombiano y XIV Latinoamericano de Fitopatología*. *Fitopatología Colombiana* 35: 45.
- Ouellette G, Mohamed C, Simard M (2006) Histopathology of *Fusarium* wilt of staghorn sumac (*Rhus typhina*) caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *callistephi* race 3. III. Host cell and tissue reactions. *Phytoprotection* 87(1): 17-27.
- Pegg KG, Willingham SL, O'Brien RGO, Cooke AW, Coates LM (2002) Base rot of golden passion fruit caused by a homothallic strain of *Fusarium solani*. *Australasian Plant Pathology* 31: 305-306.
- Ploetz R C (1991) Sudden wilt of passionfruit in southern Florida caused by *Nectria haematococca*. *Plant Disease* 75: 1071-1073.
- Ploetz RC (2003) *Diseases of Tropical Fruit Crops*. Wallingford, UK. CABI Publishing.
- Ploetz RC (2006) *Fusarium-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops*. *Phytopathology* 96(6): 648-652.

Ponte JJ (1993) As doenças do maracujá-amarelo no nordeste do Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura 15: 11-14.

PROEXPORT Colombia, <http://www.proexport.com.co/noticias/proexport-y-coca-cola-en-alianza-para-promocionar-frutas-colombianas-al-exterior-0> (Noviembre, 2011).

Saniewska A, Dyki B, Jarecka A (2004) Morphological and histological changes in tulip bulbs during infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae*. *Phytopathologia Polonica*. 34: 21-39.

Shigo AL, Marx HG (1977). Compartmentalization of decay in trees. U.S. For. Serv. Agric. Info. Bull. 405.

Stahl O, Theuerkauf A, Heitefuss R, Schäfer W (1994) Cutinase of *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f. sp. *lisi*) is not required for fungal virulence or organ specificity on pea. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 7(6): 713-725.

Vakalounakis, D. J. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov. *Plant Disease*. 80: 313–316.

Bibliografía

Agrios GN. 2005. Vascular wilts caused by ascomycetes and deuteromycetes (mitosporic fungi). P 522-526. En: Agrios GN. 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press, New York. 948 p.

Agronet, 2012. Informe Cadena Productiva de Passifloras. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 9 p.

Aguirreolea J, Irigoyen J, Sánchez-Díaz M, Salaverri J. 1995. Physiological alterations in pepper during wilt induced by *Phytophthora capsici* and soil water deficit. Plant Pathology. 44:587–96.

Asada K. 2000. The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. Philosophical Transactions of the Royal Society. 355: 1419 – 1431.

Base Agrícola Nacional 2009-2011. PASSIFLORAS. Corporación Colombia Internacional – CCI. En: Parra M, Aguilar OE, 2011. Diagnóstico de la Cadena Productiva de Pasifloras en Colombia. 35 p.

Baker NR, Harbinson J, Kramer DM. 2007. Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves. Plant, Cell and Environment. 30: 1107–1125.

Baker NR. 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *In Vivo*. Annual Review Plant Biology. 59:89 – 113.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. Annual Review Plant Biology. 57: 233 – 266.

Basalah MO, Bahkali AH, Mohammad S. 1988. Peroxidase activity in extracts of eggplant (*Solanum melongena* E.) fruits inoculated with isolates of some fungi. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 29: 275-279.

Benhamou N, Bélanger RR, Rey P, Tirilly Y. 2001. Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. Plant Physiology and Biochemistry. 39: 681–698.

- Benítez S. 2010. Caracterización del agente etiológico de la enfermedad denominada “mancha de aceite” en cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en zonas productoras de Colombia. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 107 p.
- Barbier-Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, Ephritikhine G, Frachisse JM, Maurel C. 2000. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 199 – 218.
- Berger B, Parent B, Tester M. 2010. High-throughput shoot imaging to study drought responses. *Journal of Experimental Botany*. 61 (13):3519–3528.
- Bonilla CR, Villamil JA, Reyes P. 2011. Cultivando su futuro – Gulupa *Passiflora edulis* Sims. Universidad Nacional de Colombia: Corredor Tecnológico Agroindustrial, Bogotá, 40 p.
- Bowden RL, Rouse DI. 1991. Effects of *Verticillium dahliae* on gas exchange of potato. *Phytopathology*. 81:293–301.
- Caicedo O, Higuera BL, Martínez S. 2009. Inducción de actividad peroxidasa y de fenoles totales como respuesta del fruto de lulo (*Solanum quitoense* L.) al patógeno causal de la antracnosis. *Revista Colombiana de Bioquímica*. 38: 25 – 42.
- Camelo V. 2010. Detección e identificación de los virus patógenos de cultivos de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 60 p.
- Casierra-Posada F. 2007. Fotoinhibición: Respuesta fisiológica de los vegetales al estrés por exceso de luz. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*. 1 (1): 114 – 123.
- Castañó J. 2009. Enfermedades importantes en las pasifloráceas en Colombia. p 223-244. En Miranda D., G Fischer, C Carranza, S Magnitskiy, F Casierra Posada, W Piedrahita y LE Flórez (eds). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá. 95 p.
- Chang-Cheng L, Yu-Guo L, Ke G, Yuan-Run Z, Guo-Qing L, Li-Fei Y, Rui Y. 2010. Influence of drought intensity on the response of six woody karst species subjected to successive cycles of drought and rewatering. *Physiologia Plantarum* 139: 39–54.
- Chang-Hyo G, Suk-Min K, Seokchan K, Young-Joo K, Hyeun-Jong B. 2012. Photosynthesis and Environments: Photoinhibition and Repair Mechanisms in Plants. *Journal Plant Biology*. 55: 93–101.

Chehri K, Salleh B, Yli-Mattila T, Reddy KRN, Abbasi S. 2011. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 18: 341–351.

Chirino E, Vilagrosa A, Hernández EI, Matos A, Vallejo VR. 2008. Effects of a deep container on morpho-functional characteristics and rootcolonization in *Quercus suber* L. seedlings for reforestation in Mediterranean climate. *Forest Ecology and Management* 256: 779–785.

Cornic G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends Plant Science* 5: 187–188.

Cruz M, Hoyos LM, Melgarejo LM. 2012. Respuesta fisiológica de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims) frente al ataque por *Fusarium* spp. p 91 – 113 En: Melgarejo LM (ed). *Ecofisiología del cultivo de la gulupa*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 144 p.

Dalisay RF, Kúc JA. 1995. Persistence of reduced penetration by *Colletotrichum lagenarium* into cucumber leaves with induces systemic resistance and its relation to enhanced peroxidase and chitinase activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 336-341.

Dalisay RF, Kúc JA. 1995. Persistence of reduced penetration by *Colletotrichum lagenarium* into cucumber leaves with induces systemic resistance and its relation to enhanced peroxidase and chitinase activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 336-341.

Davis CS. 2003. *Statistical Methods for the Analysis of repeated measurements*. New York: Springer-Verlag. 415 p.

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A, 2004. *Passiflora*: a review update. *Journal of Ethnopharmacology* 94:1 – 23.

DeEll J, Toivonen P. 2003. *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Kluwer academic. N.J., USA. 259 p.

Di Prieto A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MI. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. 4 (5):315–325

Díaz RO., Moreno L., Pinilla R., Melgarejo LM., Martínez O, Hernández S., P. Fernández-Trujillo JP. Postharvest behavior of purple passion fruit in Xtend® bags during low temperature storage. Aceptado 2011. *Acta Horticulturae*.

Dmitriev AP. 2003. Signal Molecules for Plant Defense Responses to Biotic Stress. *Russian Journal of Plant Physiology*. 50 (3): 417–425.

Farquhar GD, Sharkey TD. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis, *Annuals Review Plant Physiology*. 33: 317–345.

Fischer IH, Rezende JA. 2008. Diseases of passion flower (*Passiflora* sp.). *Pest Technology*. 2(1):1-19.

Flexas J, Medrano H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C₃ Plants: Stomatal and Non-stomatal Limitations Revisited. *Annals of botany*. 89:183 – 189.

Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD. 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biology* 6:269–279.

Fraire-Velázquez S, Rodríguez-Guerra R, Sánchez-Calderón L. 2011. Abiotic and Biotic Stress Response Crosstalk in Plants. p 3 – 26. En: Shanker A, Venkateswarlu B (eds). *Abiotic Stress Response in Plants – Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. InTech Publisher. Published On line. (<http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-response-in-plants-physiological-biochemical-and-genetic-perspectives>) 346 p.

Galmés J, Flexas J, Keys AJ, Cifre J, Mitchell RAC, Madgwick PJ, Haslam RP, Medrano H, Parry MAJ. 2005. Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and in species with persistent leaves. *Plant, Cell and Environment*. 28: 571–579.

Gardner DE. 1989. Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae* to banana poka and other *Passiflora* spp. in Hawaii. *Plant Disease*. 73:476-478.

Gould N, Reglinski T, Northcott GL, Spiers M, Taylor JT. 2009. Physiological and biochemical responses in *Pinus radiata* seedlings associated with methyl jasmonate-induced resistance to *Diplodia pinea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 121–128.

Guerrero-López E, Hoyos-Carvajal LM. 2011. Buenas prácticas agrícolas (BPA) con énfasis en el manejo integrado de plagas y enfermedades de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: Fondo Nacional de Fomento Hortifrutícola. Bogotá. 43 p.

Hampton RE, Wullschleger SD, Oosterhuis DM. 1990. Impact of *Verticillium* wilt on net photosynthesis, respiration and photorespiration in field-grown cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 37:271–80.

Harbinson J, Rosenqvist E. 2003. An introduction to chlorophyll fluorescence. p. 1 – 29. En: DeEll J, Toivonen P. 2003. *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. Kluwer academic. N.J., USA. 259 p.

Hare PD, Cress WA, Van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environment*. 21: 535 – 553.

He Ch, Hsiang T, Wolyn DJ. 2001. Activation of defense responses to *Fusarium* infection in *Asparagus densiflorus*. *European Journal of Plant Pathology*. 107: 473 – 483.

Henkes GJ, Jousset A, Bonkowski M, Thorpe MR, Scheu S, Lanoue A, Schurr U, Rose UR. 2011. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 maintains carbon delivery to *Fusarium graminearum*-infected roots and prevents reduction in biomass of barley shoots through systemic interactions

Hong-bo S, Li-ye Ch, Ming-an S, Jaleel CA, Hong-mei M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 433 – 441.

Horton P, Johnson MP, Pérez-Bueno ML, Kiss AZ, Ruban AV. 2008. Photosynthetic acclimation: Does the dynamic structure and macro-organisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states?. *FEBS Journal* 275: 1069–1079.

Igamberdiev AU, Roussel MR. 2012. Feedforward non-Michaelis–Menten mechanism for CO₂ uptake by Rubisco: Contribution of carbonic anhydrases and photorespiration to optimization of photosynthetic carbon assimilation. *BioSystems* 107: 158– 166.

Islam N, Nizam S, Verma PK. 2012. A highly efficient *Agrobacterium* mediated transformation system for chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* using DsRed-Express to follow root colonization. *Microbiological Research* 167: 332– 338.

Jahns P, Holzwarth AR. 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1817:182–193.

Jaroszuk-Scisela J, Kureka E, Rodzick B, Winiarczyk K. 2009. Interactions between rye (*Secale cereale*) root border cells (RBCs) and pathogenic and nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Mycological research* 113: 1053 – 1061.

Javot H, Maurel C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*. 90: 301 – 313.

Jiménez AM, Sierra CA, Rodríguez-Pulido FJ, González-Miret ML, Heredia FJ, Osorio C. 2011. Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*. 44:1912–1918.

Jubany-Marí T, Munné-Bosch S, Alegre L. 2010. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 351 – 358.

Kireyko AV, Veselova IA, Shekhovtsova TN. 2006. Mechanisms of peroxidase oxidation of o-dianisidine, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, and o-phenylenediamine in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 32: 71-77.

Lagrimini LM, Joly RJ, Dunlap JR, Liu TY. 1997. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Molecular Biology*. 33: 887–895.

Lagopodi AL, Ram AFJ, Lamers GEM, Punt PJ, Van den Hondel CaMJJ, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. 2002. Novel Aspects of Tomato Root Colonization and Infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Revealed by Confocal Laser Scanning Microscopic Analysis Using the Green Fluorescent Protein as a Marker. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15 (2): 172 – 179.

Lanoue A, Burlat V, Henkes GJ, Koch I, Schurr U, Röse USR. 2010. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. *New Phytologist*. 185: 577–588.

Latowski D, Surówka E, Strzalka K. 2010. Regulatory Role of Components of Ascorbate–Glutathione Pathway in Plant Stress Tolerance. En: Anjum NA, Umar S, Chan MT (eds.), *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Springer Science and Business Media. London. 443 p.

Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Professional. USA. 388 p.

Lobo M y Medina CI, 2009. Recursos genéticos de pasifloráceas en Colombia. p 7 – 17. En Miranda, D., G Fischer, C Carranza, S Magnitskiy, F Casierra Posada, W Piedrahita y LE Flórez (eds). *Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba*. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá. 95 p.

Long SP y Bernacchi CJ. 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany*. 54 (392): 2393 – 2401.

Lopera MM, Homez JO, Ordóñez MM, Pabón H. 2009. *Guía ambiental hortifrutícola de Colombia*. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Asociación Hortifrutícola de Colombia – ASOHOFrucol. Bogotá, 92 p.

Lorenzini G, Guidi L, Nali C, Ciompi S, Sodatini GF. 1997. Photosynthetic response of tomato plants to vascular wilt diseases. *Plant Science*. 124:143–52.

Lushchak VI. 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 153:175–190.

Marjanović Z, Uehlein N, Kaldenhoff R, Zwiazek JJ, Weiß M, Hampp R, Nehls U. 2005. Aquaporins in poplar: What a difference a symbiont makes! *Planta*. 222: 258-268.

Massacci A, Nabiev SM, Pietrosanti L, Nematov SK, Chernikova TN, Thor K, Leipner J. 2008. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:189-195.

Maurel C, Simonneau T, Sutka M. 2010. The significance of roots as hydraulic rheostats. *Journal of Experimental Botany*. 61(12): 3191–3198.

McDowell NG. 2011. Mechanisms Linking Drought, Hydraulics, Carbon Metabolism, and Vegetation Mortality. *Plant Physiology*. 155: 1051–1059.

McKnight T. 1951. A wilt disease of the passion vine (*Passiflora edulis*) caused by a species of *Fusarium*. *Queensland Journal of Agricultural Society*. 8:1-4.

Medrano H, Bota J, Cifre J, Flexas J, Ribas-Carbó M, Gulías J. 2007. Eficiencia en el uso del agua por las plantas. *Investigaciones Geográficas*. 43:63 – 84.

Melgarejo LM, Matiz A, Moreno AL, Cruz M. 2010. Absorción, traslocación y acumulación de cadmio en plantas de *Avicennia germinans* y *Rhizophora mangle*. Informe final de Proyecto financiado por Fundación para la promoción de la ciencia y tecnología, Banco de la República, Universidad Nacional de Colombia, 125 pp.

Melgarejo LM (ed). 2012. Ecofisiología del cultivo de la gulupa. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 144 p.

Melgarejo LM, Hernández S (eds.). 2011. Fisiología poscosecha de la gulupa. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 58 p.

Mendgen K, Hahn M, Deising H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34: 364 – 386.

Miranda D, Fischer G, Carranza C, Magnitskiy S, Casierra-Posada F, Piedrahíta W y Flórez LE (eds.). 2009. Cultivo, poscosecha y comercialización de la pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá. 358 p.

Moreno L, Crespo S, Pérez W, Melgarejo LM. 2010. Pruebas bioquímicas como herramientas para estudios en fisiología. p 187 – 248. En: Melgarejo LM (ed.). Experimentos en fisiología vegetal. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 277 p.

Müller P, Xiao-Ping L, Krishna NK. 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*. 125: 1558–1566.

- Munné-Bosch S, Peñuelas J. 2003. Photo- and antioxidant protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. *Annals of Botany*. 92: 385–391
- Ocampo J, Coppens d'Eeckenbrugge G, Restrepo M, Jarvis A, Salazar M, Caetano C. 2007. Diversity of Colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana* 8 (1): 1 – 45.
- Oelze ML, Kandlbinder A, Dietz KJ. 2008. Redox regulation and overreduction control in the photosynthesizing cell: Complexity in redox regulatory networks. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780: 1261–1272.
- Ojha S, Chatterjee NC. 2012. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediated through salicylic acid and *trichoderma harzianum*. *Journal of plant protection research*. 52(2):220 – 225.
- Olivain C, Alabouvette C. 1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytologist*. 141:495-510.
- Osmont KS, Sibout R, Hardtke C. 2007. Hidden Branches: Developments in Root System Architecture. *Annual Review Plant Biology*. 58: 93 – 113.
- Ortiz HE. 2012. Etiología de enfermedades asociadas a fusariosis en el cultivo de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 106 p.
- Ortiz E, Cruz M, Melgarejo LM, Marquínez X, Hoyos-Carvajal L. 2012. Histopathological features of infections caused by *F. oxysporum* and *F. solani* in purple passion fruit plants (*Passiflora edulis* Sims). Sometido en *Tropical Plant Pathology*. 15 Mayo 2012.
- Pancreac Química S.A. 1996. Manual Básico de Microbiología. Cultimed. 4a. Edición. 267 p.
- Parimala P, Prabhu IM, Muthuchelian K. 2009. Physiological response of yellow vein mosaic virus-infected bhendi (*Abelmoschus esculentus*) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74:129–133.
- Parys E, Jastrzebski H. 2005. Light-enhanced dark respiration in leaves, isolated cells and protoplasts of various types of C₄ plants. *Journal of Plant Physiology* 163: 638–647.
- Pascual I, Azcona I, Morales F, Aguirreolea J, Sánchez - Díaz M. 2010. Photosynthetic response of pepper plants to wilt induced by *Verticillium dahliae* and soil water deficit. *Journal of Plant Physiology* 167: 701–708

- Pérez LV, Melgarejo LM. 2012. Caracterización ecofisiológica de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims) bajo tres condiciones ambientales en el departamento de Cundinamarca. p 11 – 32. En: Melgarejo LM (ed). Ecofisiología del cultivo de la gulupa. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 144 p.
- Pérez P, Morcuende R, Martín del Molino I, Martínez-Carrasco R. 2005. Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO₂, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and Experimental Botany* 53: 13–27.
- Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN. 2012. Control of Arabidopsis Root Development. *Annual Review of Plant Biology*. 63: 563 – 590.
- Pinheiro C, Chaves MM. 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of Experimental Botany*, 62 (3): 869 – 882.
- Ploetz R. 2006. Fusarium-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops. *Phytopathology* 96: 648-652.
- Potters G, Horemans N, Jansen MAK. 2010. The cellular redox state in plant stress biology - A charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 292 – 300.
- Proexport Colombia. <http://www.proexport.com.co/noticias/proexport-y-coca-cola-en-alianza-para-promocionar-frutas-colombianas-al-exterior-0>. Consultado Noviembre 2011.
- Qing-ming L, Bin-bin L. 2010. Comparison of Three Methods for Determination of Root Hydraulic Conductivity of Maize (*Zea mays* L.) Root System. *Agricultural Sciences in China*. 9(10): 1438 – 1447.
- Rêgo MM, Rêgo ER, Bruckner CH, Otoni WC, Pedroza CM, 2011. Variation of gynogenic ability in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions. *Plant Breeding* 130: 86 – 91.
- Riascos D. 2011. Caracterización etiológica de la roña de la gulupa *Passiflora edulis* Sims. en la región del Sumapaz. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. 90 p.
- Ribeiro RV, Machado EC, Oliveira RF. 2003. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:167–173.
- Rodríguez LF y Bermúdez LT, 2009. Economía y gestión del sistema de producción de pasifloráceas en Colombia. p 303 – 326. En Miranda D, G Fischer, C Carranza, S Magnitskiy, F Casierra Posada, W Piedrahita y LE Flórez (eds). Cultivo, poscosecha y comercialización de las pasifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá. 95 p.

Rodríguez-Galvés E y Mendgen K. 1995. Cell Wall synthesis in cotton roots after infection with *Fusarium oxysporum*. *Planta* 197: 535-545.

Rodríguez-Gamir J, Ancillo G, González-Mas MC, Primo-Millo E, Iglesias DJ, Forner-Giner MA. 2011. Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 636 – 645.

Roncero MI, Hera C, Ruiz-Rubio M, García FI, Madrid MP, Caracuel Z, Calero F, Delgado-Jarana J, Roldan-Rodríguez R, Martínez-Rocha AI, Velasco C, Roa J, Martín-Urdiroz M, Córdoba D, Di Prieto A. 2003. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:87–98.

Rontein D, Basset G, Hanson A. 2002. Metabolic Engineering of Osmoprotectant Accumulation in Plants. *Metabolic Engineering* 4:49–56.

Saeed IAM, McGuidwin AE, Rouse DI, SharkeyTD. 1999. Limitation to photosynthesis in *Pratylenchus penetrans*- and *Verticillium dahliae*-infected potato. *Crop Science*. 39:1340 – 1346.

Sdoodee S, Somjun J. 2008. Measurement of stem water potential as a sensitive indicator of water stress in neck orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 30 (5): 561 – 564.

Shao H-B, Chu L-Y, Shao M-A, Cheruth AJ, Mi H-M. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies*.331: 433–441.

Signarbieux C, Feller U. 2011. Non-stomatal limitations of photosynthesis in grassland species under artificial drought in the field. *Environmental and Experimental Botany* 71:192–197.

Solarte ME, Moreno L, Melgarejo LM. 2010. Fotosíntesis y pigmentos vegetales. p 107 – 122. En: Melgarejo LM (ed.). *Experimentos en fisiología vegetal*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 277 p.

Sun Q, Rost TL, Matthews MA. 2008. Wound-induced vascular occlusions in vitis vinifera (vitaceae): tyloses in summer and gels in winter. *American Journal of Botany*. 95(12): 1498 – 1505.

Swiecki TJ, Bernhardt E. 2002. Evaluation of Stem Water Potential and Other Tree and Stand Variables as Risk Factors for *Phytophthora ramorum* Canker Development in Coast Live Oak. *USDA Forest Service General* 184: 787 – 798.

Taiz L, Zeiger E. 2006. *Plant physiology*. Sinauer Associates. Fourth edition. Massachusetts. EUA. 764 p.

Vakalounakis, DJ. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. radicis-cucumerinum f. sp. nov. *Plant Disease*. 80: 313–316.

Vanderplank J, 1996. *Passion flowers and passion fruit*, 2a Ed. MIT Press, Cambridge. 224 p. En: Rêgo MM, Rêgo ER, Bruckner CH, Otoni WC, Pedroza CM. 2011. Variation of gynogenic ability in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions. *Plant Breeding* 130: 86 – 91.

van Wijk KJ, van Hasselt PR. 1993. Photoinhibition of photosystem II *in vivo* is preceded by down-regulation through light-induced acidification of the lumen: consequences for the mechanism of photoinhibition *in vivo*. *Planta* 189: 359-368

Veres S, Toht VR, Láposi R. Oláh V, Lakatos G, Mészáros I. 2006. Carotenoid composition and photochemical activity of four sandy grassland species. *Photosynthetica* 44 (2): 255-261.

Weatherley PE, Barrs C. 1965. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal Plant Physiology*. 15: 413-28.

Wee CW, Dinneny JR. 2010. Tools for high-spatial and temporal-resolution analysis of environmental responses in plants. *Biotechnology Letters* 32:1361–1371.

Wilhelm C, Selmar D. 2011. Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 168: 79–87.

Williams LE, Araujo FJ. 2002. Correlations among Predawn Leaf, Midday Leaf and Midday Stem Water Potential and their Correlations with other Measures of Soil and Plant Water Status in *Vitis vinifera*. *Journal of American Society of Horticulture Science*. 127 (3): 448 – 454.

Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 355, 1517 – 1529.

Xiaoling L, Ning L, Jin Y, Fuzhou F, Faju Ch, Fangqing Ch. 2011. Morphological and photosynthetic responses of riparian plant *Distylium chinense* seedlings to simulated Autumn and Winter flooding in Three Gorges Reservoir Region of the Yangtze River, China. *Acta Ecologica Sinica* 31: 31–39.