

Efecto de las alcámidas como inductores de tolerancia al estrés biótico en tomate*

Effect of alkamides as tolerance inductors to biotic stress in tomato

Susana González-Morales¹, Adalberto Benavides-Mendoza^{1§}, Ema Laura García-Enciso¹, Edmundo Mario Rodríguez-Campos² y Alberto Flores-Olivas³

¹Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro- Departamento de Horticultura. Cátedras CONACYT. ²Departamento de Ciencias Básicas. ³Departamento de Parasitología Agrícola. Calzada Antonio Narro 1923. Buenavista Saltillo, Coahuila C. P. 25315. Tel: 844 4110303. (sgonzalezmo@conacyt.mx; emlaugaren@gmail.com; edmundo.rdz@uaaan.mx; aflooli50@gmail.com). [§]Autor para correspondencia: abenmen@gmail.com.

Resumen

El objetivo de este estudio fue conocer los efectos histológicos y los relacionados a vigor con la aplicación del extracto de *Heliopsis longipes* sobre plántulas de tomate inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). El extracto de *H. longipes* se asperjó a una concentración de 300 mgL⁻¹ en plántulas de tomate, posteriormente se realizó la inoculación con FOL por inmersión de raíces. Veinte días después se tomaron los datos de incidencia y severidad, encontrándose que la aplicación del extracto provocó una disminución de 15% y 80% respectivamente para estas variables mientras que para altura de la planta se presentó un incremento de 14.3%. En longitud de raíz y peso seco de hojas y tallo se observó un decremento en los resultados; sin embargo, estos valores estuvieron por encima de los obtenidos para plantas inoculadas con FOL. Se encontraron cambios histológicos ocurridos por la infección de FOL así como por la aplicación del extracto, que consistieron en la modificación de la distribución de los haces vasculares en la raíz, así como en el incremento del área relativa del córtex de raíz y tallo y la disminución del número de vasos del xilema de la raíz. Estos resultados indican que la aplicación del extracto tiene un efecto sobre los síntomas de marchitamiento causados por FOL.

Abstract

The aim of this study was to determine the histological effects and those related to vigor with the application of an extract of *Heliopsis longipes* on tomato seedlings inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). *H. longipes* extract was sprayed at a concentration of 300 mgL⁻¹ in tomato seedlings subsequently inoculated with FOL by root immersion. Twenty days later incidence and severity data were taken, finding that the application of the extract caused a decrease of 15% and 80% respectively for these variables whereas for plant height there was an increase of 14.3%. In root length and dry weight of leaves and stem there was a decrease in the results; however, these values were higher than those obtained for plants inoculated with FOL. Histological changes were found by effect of FOL infection as well as for extract application, which consisted in modifying the distribution of vascular bundles in root, as well as increasing the relative area of root and stem cortex and reducing the number of xylem vessels in root. These results indicate that the application of the extract has an effect on wilting symptoms caused by FOL.

Keywords: affinin, *Heliopsis longipes*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* and *Solanum lycopersicum*.

* Recibido: mayo de 2015
Aceptado: agosto de 2015

Palabras claves: afinina, *Heliopsis longipes*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* y *Solanum lycopersicum*.

Introducción

El tomate es uno de los cultivos más importantes desde el punto de vista económico y productivo. Se ha destacado en los últimos años por la incorporación constante de tecnologías para su producción (Rabie and Humiany, 2004). Dentro de las tecnologías de producción de esta hortaliza se encuentran el uso de productos químicos para el control de enfermedades, debido a que los rendimientos en gran parte son afectados por la incidencia de enfermedades causadas por hongos del suelo (Jiménez y Sanabria, 2008).

Una de las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo es la marchitez vascular producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), causante de la disminución de 60% del rendimiento y afectando la calidad del producto (Cai *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2010). Para esta enfermedad se reconocen tres razas del patógeno, que se distinguen por su virulencia en materiales diferenciales de tomate y que contienen diferentes genes de resistencia (Masato *et al.*, 2005). Los cultivares resistentes son hasta el momento la mejor estrategia de control, ya que estos patógenos permanecen en el suelo por décadas (Reis *et al.*, 2004).

En su necesidad por contrarrestar el ataque de plagas y maximizar la producción, la agricultura moderna es altamente dependiente de insumos y plaguicidas sintéticos. Esto ha traído enormes problemas para la salud animal y humana con un impacto ambiental creciente. Uno de los métodos potenciales de reducir la severidad de las enfermedades causadas por patógenos, es la inducción de resistencia en la planta (Baysal *et al.*, 2003). Dicha actividad está asociada a numerosas respuestas de defensa activadas por el hospedero después del contacto con el patógeno (Flores *et al.*, 2009) o con algún inductor biótico o abiótico (Valueva and Mosolov, 2004).

Dentro de la variedad de metabolitos inductores estudiados se encuentran las alcaloides que son ampliamente distribuidos en diferentes familias de plantas, encontrándose en mayor cantidad en raíces de *Heliopsis longipes* (nombre común Chilcuague), siendo la afinina (N-isobutyl-2E, 6Z, 8E-decatrienoamida) su principal constituyente bioactivo y la molécula responsable de los principales efectos biológicos (Molina y García, 2001; Morquecho y López, 2007).

Introduction

Tomato is one of the most important crops from an economic and productive point of view. It has highlighted in recent years by the constant incorporation of technologies for its production (Rabie and Humiany, 2004). Within the production technologies of this vegetable are the use of chemicals for disease control, because yields are largely affected by the incidence of diseases caused by soil fungi (Jiménez and Sanabria, 2008).

One of the most important diseases affecting this crop is vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), causing 60% decrease in yield and affecting product quality (Cai *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2010). Three races of the pathogen are recognized for this disease, which distinguish by their virulence on differential materials of tomato and contain different resistance genes (Masato *et al.*, 2005). Resistant cultivars are so far the best control strategy, as these pathogens remain in the soil for decades (Reis *et al.*, 2004).

In their need to counter the attack of pests and maximize production, modern agriculture is highly dependent on inputs and synthetic pesticides. This has brought enormous problems for animal and human health with a growing environmental impact. A potential method to reduce the severity of diseases caused by pathogens is the induction of plant resistance (Baysal *et al.*, 2003). This activity is associated with numerous defense responses activated by the host after the contact with the pathogen (Flores *et al.*, 2009) or with any biotic or abiotic inductor (Valueva and Mosolov, 2004).

Among the variety of metabolites studied are the alkaloids that are widely distributed in different plant families, being in higher amount in roots of *Heliopsis longipes* (common name Chilcuague), being affinin (N-isobutyl-2E, 6Z, 8E -decenamide) its main bioactive constituent and the molecule responsible for the main biological effects (Molina and García, 2001; Morquecho and López, 2007).

In plants it has been shown that these molecules play an important role in regulating morphogenesis and adaptation processes (López *et al.*, 2006), just as has been expressed *in vitro* assays where affinin promotes growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings, as its importance in signaling and cell proliferation, it is also mentioned its role in reshaping the architecture of roots and aerial part through DHM1 proteins (Pelagio *et al.*, 2013).

En plantas se ha demostrado que estas moléculas juegan un papel importante en la regulación de la morfogénesis y procesos de adaptación (López *et al.*, 2006), de igual manera se ha manifestado en ensayos *in vitro* que la afinina promueve el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, así como su importancia en la señalización y proliferación celular, de igual manera se menciona su papel en la remodelación de la arquitectura de las raíces y la parte aérea a través de las proteínas DHM1 (Pelagio *et al.*, 2013).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue observar el efecto de la aspersión del extracto etanólico de *H. longipes* sobre plántulas de tomate inoculadas con FOL, midiendo el grado de severidad de la enfermedad, variables relacionadas a vigor y los cambios histológicos de tallos y raíces asociados a la respuesta de tolerancia a FOL en la planta.

Materiales y métodos

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*. La cepa utilizada en este trabajo se aisló a partir de raíces de plantas de tomate enfermas obtenidas en el área de Silao, Guanajuato, México (González *et al.*, 2011).

Extracto de *H. longipes*. El extracto de *H. longipes* se elaboró con las raíces secas y molidas de esta planta, colectadas en la Sierra Gorda de Guanajuato. Para obtenerlo, se usó una proporción de 1:10, esto es 1 g de raíz macerada por cada 9 ml de solvente, el cual fue etanol al 98%. El extracto se obtuvo al sumergir el tejido macerado en el solvente a temperatura ambiente, manteniéndolo así durante 30 días. El extracto crudo se filtró con papel filtro Whatman Núm. 1 y se concentró en un Rotavapor (IKA). La determinación de la concentración de afinina se llevó a cabo por medio de HPLC de acuerdo a Ramírez *et al.* (2000).

Prueba *in vivo*. Se llevó a cabo en plántulas de tomate de 5 a 6 hojas verdaderas de la variedad Río Grande, sembradas en charolas de plástico con turba: perlita a una proporción 1:1. La prueba se dividió en seis tratamientos: testigo absoluto (TA), testigo infestado con FOL (FOL), plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* (HL), plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* e inoculadas con FOL (HL+FOL), plantas asperjadas con un producto comercial recomendado para inducir resistencia sistémica en plantas a base de ácido salicílico, el cual se denominó control positivo (C+) y plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas con FOL (C+ +FOL).

Therefore, the objective of this research was to observe the effect of spraying the ethanol extract of *H. longipes* on tomato seedlings inoculated with FOL, measuring the degree of severity of the disease, variables related to vigor and histological changes in stems and roots associated to tolerance response to FOL in plant.

Materials and methods

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*. The strain used in this study was isolated from roots of diseased tomato plants obtained in the area of Silao, Guanajuato, Mexico (González *et al.*, 2011).

H. longipes extract. The extract was prepared from dried and ground roots of this plant, collected in Sierra Gorda, Guanajuato. To obtain it, a ratio 1:10 was used this is 1 g of macerated root per each 9 ml of solvent, which was 98% ethanol. The extract was obtained by immersing the macerated tissue in the solvent at room temperature, maintaining it for 30 days. The crude extract was filtered with Whatman filter paper no. 1 and concentrated in a Rotavapor (IKA). Determining the concentration of affinin was conducted by HPLC according to Ramírez *et al.* (2000).

In vivo testing. It was conducted in tomato seedlings from 5 to 6 true leaves of the variety Río Grande, sown in plastic trays with peat: perlite at a ratio 1:1. The test was divided into six treatments: absolute control (TA), control infested with FOL (FOL), plants sprayed with extract of *H. longipes* (HL), plants sprayed with extract of *H. longipes* and inoculated with FOL (HL + FOL), plants sprayed with a commercial product recommended to induce systemic resistance in plants based on salicylic acid, which was denominated as positive control (C+) and plants sprinkled with positive control and inoculated with FOL (C+ + FOL).

For its application the ethanol extract of *H. longipes* was standardized to provide 300 mg L⁻¹ of affinin, adding 150 ml to each plant. The commercial positive control (the active ingredient is salicylic acid, and is a product recommended to induce resistance to biotic stress in plants) was applied at a concentration of 1.25 ml L⁻¹ water adding 150 ml to each plant both treatments were applied by foliar spray.

Para su aplicación el extracto etanólico de *H. longipes* fue estandarizado para aportar 300 mg L⁻¹ de afinina, agregando 150 ml a cada planta. El control positivo comercial (el ingrediente activo es el ácido salicílico, y es un producto recomendado para inducir resistencia a estrés biótico en plantas) se aplicó a una concentración de 1.25 ml L⁻¹ de agua, agregando 150 ml a cada planta, ambos tratamientos fueron aplicados por aspersión foliar.

Cuatro días después de la aplicación del extracto de *H. longipes*, se inocularon las plantas de los tratamientos FOL, HL+FOL y C++FOL, utilizando la técnica de inmersión de raíces en una solución de esporas de FOL de 10⁶ esporas/ml, durante 15 minutos (Benhamou *et al.*, 1998).

Veinte días después de la inoculación, se tomaron los datos de incidencia y severidad, para esta última variable se utilizó la escala reportado por Diener y Ausubel, 2005; así como las muestras para medir peso seco de raíz, tallo y hojas, altura de planta y longitud de raíz utilizando 20 repeticiones por tratamiento.

A continuación se define la escala de Diener: 0 Planta muerta (100%); 1 hojas viejas muertas y hojas jóvenes con crecimiento detenido (80%); 2 hojas viejas cloróticas y hojas jóvenes con crecimiento detenido (60%); 3 hojas viejas con clorosis vascular y hojas jóvenes con crecimiento detenido (40%); 4 peciolo de hojas con crecimiento detenido (20%); 5 sin síntomas visibles (0%).

Estudio histopatológico. Las muestras para los ensayos histopatológicos se colectaron en dos ocasiones, contando en cada ocasión con 10 repeticiones por tratamiento. El primer muestreo se llevó a cabo a los dos días después de la aplicación del extracto de *H. longipes* y el segundo a los tres días después de la inoculación con FOL que corresponde a seis días después de la aplicación del extracto. Para dicho análisis se realizó la deshidratación de las muestras seguido por la inclusión en parafina, seccionamiento en micrótopo y tinción safranina-verde rápido (Hernández, 1984; Fuentes *et al.*, 2005; Rivero *et al.*, 2007). Las muestras se analizaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss) con cámara integrada y se observaron a 4 y 10 (x) utilizando el programa Pixera Wiewfinder Pro. Las mediciones de área total del lumen de xilema, área de córtex, médula y grosor de pared celular se realizaron con el programa Axio Vision LE Rel. 4.5. El conteo de los vasos del xilema se realizaron tomando en cuenta un cuarto de la imagen por muestra.

Four days after the application of ethanol extract *H. longipes*, plants were inoculated with treatments FOL, HL + FOL and C ++ FOL, using the technique of root immersion in a spores solution of FOL 10⁶ spores/ml for 15 minutes (Benhamou *et al.*, 1998).

Twenty days after inoculation, severity and incidence data were taken for this variable using a scale reported by Diener and Ausubel, 2005; as well as samples to measure dry weight of roots, stem and leaves, plant height and root length using 20 replications per treatment.

Diener's scale is defined: 0 Dead plant (100%); 1 dead old leaf and young leaves stunted (80%); 2 old chlorotic leaves and stunted young leaves (60%); 3 old leaves with vascular chlorosis and stunted young leaves (40%); 4 leaf petioles with stunted growth (20%); 5 without visible symptoms (0%).

Histopathological study. Samples for histopathological tests were collected twice, counting each time with 10 replications per treatment. The first sampling took place two days after application of the extract *H. longipes* and the second to three days after inoculation with FOL corresponding to six days after application of the extract. For this analysis the sample were dehydrated followed by paraffin embedding, microtome sectioning and safranin-fast green staining was performed (Hernández, 1984; Fuentes *et al.*, 2005; Rivero *et al.*, 2007). Samples were analyzed in a light microscope (Carl Zeiss) with a camera and were observed at 4 and 10 (x) using Pixera Wiewfinder Pro program. Measurements of total area of the lumen from xylem, cortex area, marrow and cell wall thickness were made with Axio Vision LE Rel. 4.5 program. The xylem vessels count were made taking into account a quarter of the image per sample.

Statistical analysis. The experimental design was completely randomized, considering one plant as experimental unit, using 20 replicates per treatment to evaluate incidence, severity, plant height, root length and dry weight of root, stem and leaves. While for analyzing relative cortex area, cell wall thickness, in root and stem, considering 10 replications per treatment, for the variable number of xylem vessels root four replicates per treatment were considered. The data was subjected to an ANOVA test and mean comparison test Tukey ($p > 0.05$) using the statistical software Minitab 16.

To corroborate the assumptions of the statistical model was conducted a residual analysis of variable lumen area from root and stem xylem, resulting in the non-normality

Análisis estadístico. El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar, considerando una planta como unidad experimental y usando 20 repeticiones por tratamiento para la evaluación de incidencia, severidad, altura de planta, longitud de raíz y peso seco de raíz, tallo y hojas. Mientras que para el análisis de área relativa de córtex, grosor de pared celular, en raíz y tallo se consideraron 10 repeticiones por tratamiento, para la variable de número de vasos de xilema de la raíz se tomaron en cuenta 4 repeticiones por tratamiento. A los datos obtenidos se les realizó un ANOVA y una prueba de comparación de medias por medio del método de Tuckey ($p > 0.05$) mediante el programa estadístico de Minitab 16.

Para comprobar los supuestos del modelo estadístico se llevó a cabo un análisis de residuales de la variable área de lumen del xilema de raíz y tallo, resultando la no normalidad de los datos, es por ello que se realizó la transformación de Box-Cox, por lo cual las gráficas en la figura 9 A y B son de los datos transformados (Y) de dichas variables.

Resultados

Incidencia y severidad. Los valores obtenidos para la incidencia (Figura 1) muestran que la aspersión de las plantas de tomate con el extracto de *H. longipes* tuvo un efecto positivo al reducir en 15% la incidencia de la marchitez en las plantas asperjadas con *H. longipes* (HL+FOL) con respecto a FOL. Esto también se observó al evaluar la severidad de los síntomas causados por FOL (Figura 1), donde se encontró una diferencia significativa, los cuales disminuyeron cerca de 80% con la aplicación del extracto (HL+FOL) y con el uso del control positivo (C++FOL) con respecto al testigo infestado (FOL).

Los hongos patógenos del género *Fusarium*, son algunos de los agentes causales del deterioro de la raíz y el tallo basal, dando como resultado el marchitamiento de las plantas (Ignjatov *et al.*, 2012). Para este estudio el uso del extracto de *H. longipes* no inhibió la marchitez por FOL; sin embargo, si disminuyó la severidad de sus síntomas; esto concuerda con Molina *et al.* (2004) que sugieren que la afinina funciona como un factor inductor de defensa potencial, ya que en hojas de *A. thaliana* estimuló la resistencia a *B. cinerea* por efecto de cambios fisiológicos, así como con la activación de genes de desarrollo y defensa relacionados con el estrés, por medio de la acumulación de ácido jasmónico (Méndez *et al.*, 2011).

of the data, which is why transformation of Box --COX was performed, by which graphs in Figure 9 A and B are from the transformed data (Y) of these variables.

Results

Incidence and severity. The values obtained for incidence (Figure 1) show that spraying tomato plants with *H. longipes* extract had a positive effect by reducing 15% the incidence of wilt on plants sprayed with *H. longipes* (HL+FOL) regarding to FOL. This was also observed when evaluated the severity of symptoms caused by FOL (Figure 1), where a significant difference was found, which decreased about 80% with the application of the extract (HL+FOL) and using the positive control (C++FOL) regarding to the infested control (FOL).

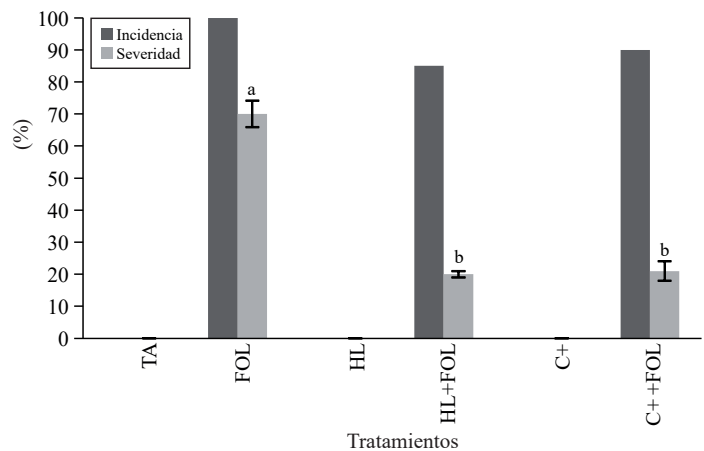


Figura 1. Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la incidencia y severidad de plántulas de tomate. Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $p > 0.05$).

Figure 1. Effect of applying *H. longipes* extract in the incidence and severity of tomato seedlings. Means with the same literal are not statistically different (Tukey, $p > 0.05$).

Fungi pathogens, from genus *Fusarium*, are some of the agents causing root and basal stem deterioration, resulting in plant wilting (Ignjatov *et al.*, 2012). For this study the use of the extract of *H. longipes* did not inhibit wilt by FOL; however, it decreased the severity of its symptoms; this is consistent with Molina *et al.* (2004) who suggest that affin works as a potential inductor factor of defense, as in *A. thaliana* leaves stimulated resistance to *B. cinerea* as a result of physiological changes, as well as activation of genes related to development and defense related to stress, through the accumulation of jasmonic acid (Méndez *et al.*, 2011).

Variables de crecimiento. En las variables de altura de planta y longitud de raíz las plantas mostraron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados (Figura. 2), observándose un incremento de 56% en la altura de planta con la aplicación del extracto de *H. longipes* y de 14.3% cuando el extracto se asperjó en las plantas de tomate inoculadas con FOL, para la longitud de raíz el incremento con el uso del extracto correspondió a 84% y cuando se aplicó a plantas infectadas con FOL se presentó una disminución de esta variable 41% con respecto al testigo absoluto.

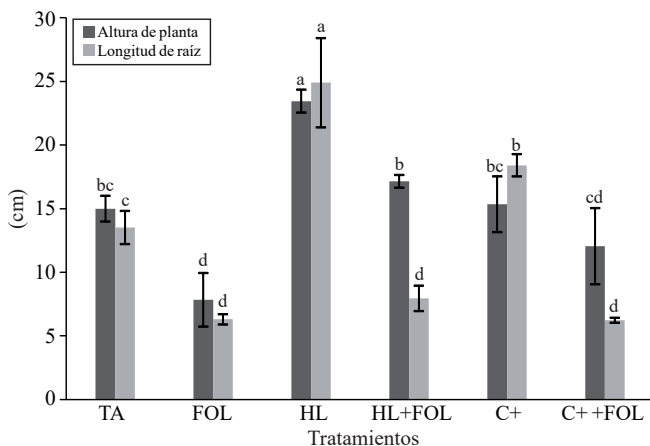


Figura 2. Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en la altura de planta y longitud de raíz en plántulas de tomate. Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $p > 0.05$).

Figure 2. Effect of the application of the extract of *H. longipes* in plant height and root length of tomato seedlings. Means with the same literal are not statistically different (Tukey, $p > 0.05$).

También se encontraron diferencias significativas para el peso seco de hojas, tallo y raíz (Figura 3) observándose incrementos de hasta 185%, 177% y 503% respectivamente cuando las plantas fueron sometidas a la aplicación foliar de *H. longipes*, efecto contrario se encontró cuando el extracto se aplicó a plantas inoculadas con FOL, observándose un decremento de 27%, 18.5% y 17.6% en los valores de peso seco de hoja, tallo y raíz; sin embargo, esta disminución fue menor que la obtenida en las plantas inoculadas con FOL, las cuales tuvieron cerca de 60% en disminución en estas variables. El efecto del extracto de *H. longipes* sobre el desarrollo de la biomasa de hojas, tallo y raíz se atribuye a la acción biológica de las alcaloides presentes en el extracto, especialmente a la afininina. López (2007), indica que por sus efectos fisiológicos y celulares, las alcaloides son capaces de alterar diferentes aspectos de la vida de las plantas y se ha sugerido que se le considere como un regulador del

Growth variables. The variables plant height and root length showed significant differences between treatments (Figure 2), observing an increase of 56% in plant height with the application of *H. longipes* extract and 14.3% when the extract was sprayed on tomato plants inoculated with FOL, for root length the increase with the use of the extract accounted for 84% and when applied to plants infected with FOL a decrease in this variable 41% was present regarding absolute control.

Significant differences for dry weight of leaves, stems and roots (Figure 3) were found, observing increases of up to 185%, 177% and 503% respectively when plants were subjected to foliar application of *H. longipes*, contrary effect was found when the extract was applied to plants inoculated with FOL, showing a decrease of 27%, 18.5% and 17.6% in dry weight values of leaf, stem and root; however, this decrease was lower than that obtained in plants inoculated with FOL, which had about 60% reduction in these variables. The effect of the extract *H. longipes* on biomass development of leaves, stem and root is attributed to the biological action of alkaloids present in the extract, especially afininin. López (2007) indicates that for their physiological and cellular effects, alkaloids are capable of altering different aspects of plant life and has been suggested to be considered as growth regulator or plant hormone. This effect coincides with that reported by Campos *et al.* (2008) who found that alkaloids alter the system, root architecture and shoots; it also affects biomass productivity according to the applied dose.

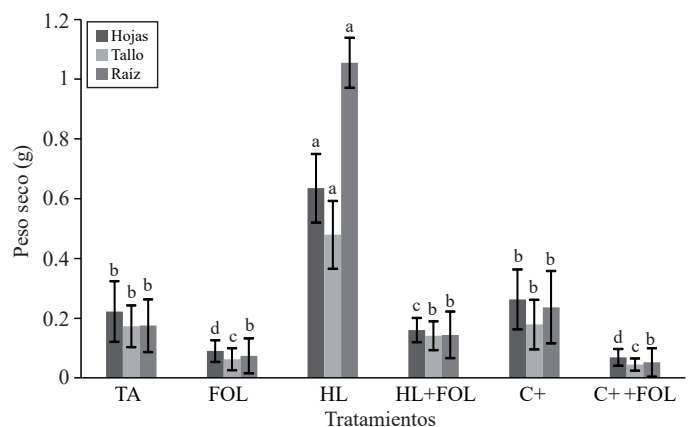


Figura 3. Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* en el peso seco de hoja, tallo y raíz en plántulas de tomate. Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $p > 0.05$).

Figure 3. Effect of applying the *H. longipes* on the dry weight of leaf, stem and root tomato seedlings. Means with the same literal are not statistically different (Tukey, $p > 0.05$).

crecimiento o fitohormona. Este efecto coincide con lo reportado por Campos *et al.* (2008) quienes encontraron que las alcamidas alteran el sistema y la arquitectura de la raíz y brotes, además de afectar la productividad de la biomasa de acuerdo a la dosis aplicada.

Cambios histológicos. En las microfotografías realizadas a la estructura de la raíz (Figura 4) del testigo absoluto (A), *H. longipes* (B) y el producto comercial (C), se observa una diferencia en la organización de la estela o cilindro vascular, en donde se aprecia una alteración en la distribución de los haces vasculares cuando se aplicó el extracto de *H. longipes*. Por otro lado, en las microfotografías del tratamiento inoculado con FOL (D), se puede observar una alteración en la estela, que presenta una diferencia en la distribución de haces vasculares, así como la presencia de un color más oscuro en la tinción de los haces vasculares; lo cual pudiera estar asociado al necrosamiento de estos tejidos provocado por FOL. En el tratamiento de la aplicación del extracto a plantas inoculadas con FOL (E) y la aplicación del producto comercial a plantas inoculadas con FOL (F) se aprecian cambios en la distribución dentro del cilindro vascular.

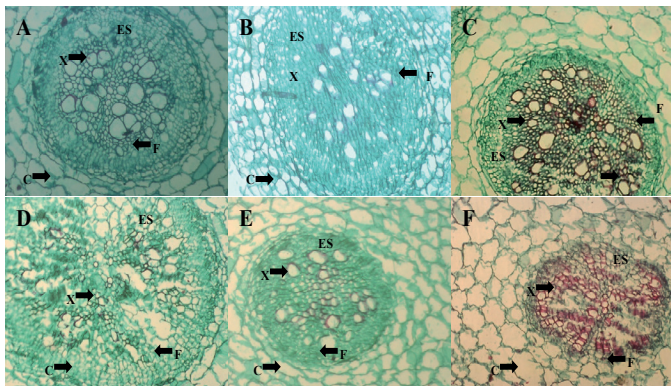


Figura 4. Microfotografías de cortes transversales de raíz de plántulas de tomate (4x) de los tratamientos TA (A), HL (B) y C+ (C) a los dos días de la aplicación del extracto, así como de los tratamientos FOL (D), HL+FOL (E) y C++FOL (F) a los seis días de la aplicación de los tratamientos, que muestran diferencias en la organización celular. C (cortex), ES (estela) X (xilema), F (floema).

Figure 4. Photomicrographs of cross-sections of tomato seedling root (4x) of the TA treatment (A), HL (B) and C+ (C) two days after application of the extract, as well as treatments FOL (D), HL + FOL (E) and C++ FOL (F) at six days after application of the treatments, showing differences in cell organization. C (cortex), ES (wake) X (xylem), F (phloem).

Histological changes. In photomicrographs made to the root structure (Figure 4) the absolute control (A), *H. longipes* (B) and the commercial product (C), there was a difference in stele or vascular cylinder organization, where an alteration is appreciated in the distribution of vascular bundles when the extract of *H. longipes* was applied. Furthermore, in photomicrographs from treatments inoculated with FOL (D), it can be seen a change in stele presenting a difference in the distribution of vascular bundles and the presence of a darker color in staining vascular bundles; which could be associated to necrosis of these tissues caused by FOL. In the treatment extract application to plants inoculated with FOL (E) and the application of the commercial product to plants inoculated with FOL (F) shows changes in distribution within the vascular cylinder.

For stem (Figure 5) there were no qualitative changes with the application of treatments compared to absolute control. Comparing photomicrographs from control (A and D) in the two evaluation dates there were no changes in the structure perhaps due to this time interval the fungus has not colonized yet this tissue.

Quantification of histological variables. In consideration to the relative area occupied by the cortex, it was observed that root samples (Figure 6A) evaluated in the second day of the application of the extract *H. longipes* showed a significant difference, which reflected in a decrease of 7% when the extract is sprayed and 2% when plants were treated with C+, in contrast during the second treatment evaluation showed increases in this variable corresponding to 174% with spraying *H. longipes*, 217% with the use of positive control, 67% in plants inoculated, 173% in those sprayed with extract and inoculated and 178% in plants sprayed with positive control and inoculated.

For the relative cortex area of the stem there were significant differences (Figure 6B), presenting increases of 43% and 79% with the application of the extract and positive control. A similar effect was observed during the second evaluation date where the increases were 203% for plants sprayed with the extract, 192% in plants inoculated, 298% for those plants treated with *H. longipes* and infected with FOL and 220% when the commercial product was used, while when this was applied to non-inoculated plants a 27% decrease was observed in this variable.

The effect in the increase of relative cortex area with the application of *H. longipes* could be beneficial for the plant, since this thickening would delay the entry of the pathogen

En el caso del tallo (Figura 5) no se observaron cambios cualitativos con la aplicación de los tratamientos con respecto al testigo absoluto. Al comparar las microfotografías del testigo (AyD) en las dos fechas de evaluación no se aprecian cambios en la estructura debido quizá, a que a este intervalo de tiempo el hongo aun no colonizaba este tejido.

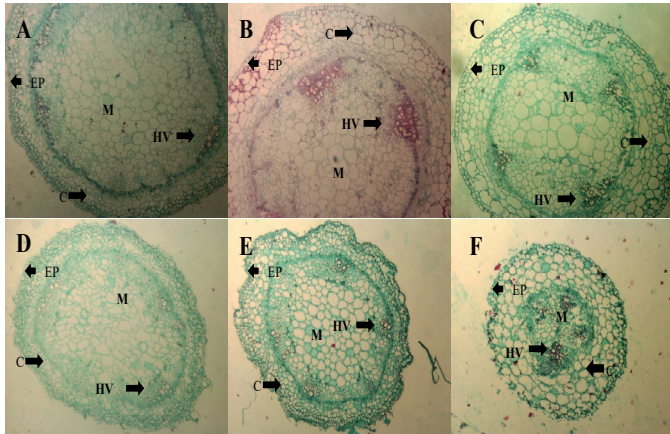


Figura 5. Microfotografías de cortes transversales de tallo de plántulas de tomate (2.5x) de los tratamientos TA (A), HL (B) y C+ (C) a los dos días de la aplicación del extracto, así como de los tratamientos FOL (D), HL+FOL (E) y C++FOL (F) a 4X a los seis días de la aplicación de los tratamientos, que muestran diferencias en la organización celular. C (córTEX), EP (epidermis), M (médula) y HV (haces vasculares).

Figure 5. Micrographs of cross sections of tomato seedlings stalk (2.5 x) TA (A), HL (B) and C + (C) treatments within two days of the application of the extract, as well as treatments FOL (D), HL + FOL (E) and C ++ FOL (F) to 4X six days after application of the treatments, showing differences in cell organization. C (cortex), EP (epidermis), M (bone) and HV (vascular bundles).

Cuantificación de las variables histológicas. En consideración al área relativa ocupada por el córtex, se observó que en las muestras de raíz (Figura 6 A) evaluadas al segundo día de la aplicación del extracto de *H. longipes* se presentó una diferencia significativa, que se reflejó en el decremento de 7% cuando se asperjó el extracto y de 2% cuando las plantas se trataron con C+, en contraste durante la segunda evaluación los tratamientos estudiados mostraron incrementos en esta variable correspondientes a 174% con la aspersión de *H. longipes*, 217% con el uso del control positivo, 67% en las plantas inoculadas, 173% en aquellas asperjadas con el extracto e inoculadas y 178% en plantas asperjadas con el control positivo e inoculadas.

into the vascular cylinder, thereby preventing the rapid spread of the disease, since the vascular system is affected for being obstructed by FOL, preventing water and nutrients flow through it, which results in vascular wilting of the plant. Pharand *et al.* (2002) studied root samples of tomato plants treated with BTH (benzothiadiazole) and found evidence that the growth of the fungus (*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) occurs mainly in the epidermis and in the outside of the cortex, so this effect could be similar to that reported in *Silene vulgaris* plants when grown under drought and stress, since a thicker cortex is important to improve the resistance to dehydration, because in this way, the internal tissues to endoderm are relatively protected against dehydration at the expense of the cortex.

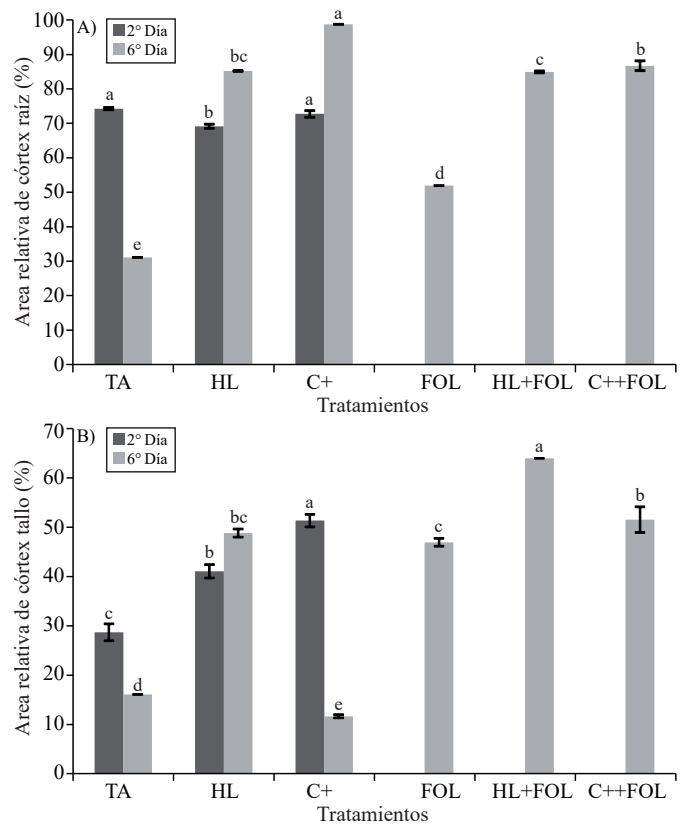


Figura 6. Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* sobre el área relativa de córtex en muestras de raíz (A) y tallo (B) de plántulas de tomate para dos fechas de evaluación. Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $p > 0.05$).

Figure 6. Effect of applying the *H. longipes* on the relative area of root cortex samples (A) and stem (B) of tomato seedlings for two evaluation dates. Means with the same literal are not statistically different (Tukey, $p > 0.05$).

Para el área relativa del córtex del tallo hubo diferencias significativas (Figura 6B), presentándose incrementos de 43% y 79% con la aplicación del extracto y el control positivo. Efecto similar se observó durante la segunda fecha de evaluación, donde los incrementos fueron 203% para las plantas asperjadas con el extracto, 192% en plantas inoculadas, 298% para aquellas plantas tratadas con *H. longipes* e infectadas con FOL y de 220% cuando se usó el producto comercial, mientras que cuando este se aplicó a plantas no inoculadas se observó una disminución de 27% en esta variable.

El efecto en el incremento del área relativa del córtex con la aplicación de *H. longipes* pudiera ser beneficioso para la planta, ya que este engrosamiento retrasaría la entrada del patógeno al cilindro vascular, evitando así la rápida proliferación de la enfermedad, ya que el sistema vascular es el que se ve afectado al ser obstruido por FOL, impidiendo la circulación de agua y nutrientes a través de él, lo cual trae como consecuencia la marchitez vascular de la planta. Pharand *et al.* (2002) estudiaron muestras de raíz de plantas de tomate tratadas con BTH (benzotiadiazol) y encontraron evidencia de que el crecimiento del hongo (*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) ocurre principalmente en la epidermis y en la parte externa del córtex, por lo que este efecto podría ser similar a lo reportado en plantas de *Silene vulgaris* cuando son cultivadas en condiciones de sequía y estrés, ya que un mayor grosor del córtex es importante para mejorar la resistencia a la deshidratación, pues de esta manera, los tejidos internos a la endodermis están relativamente protegidos contra la deshidratación a expensas del córtex.

Al evaluar el número de vasos de xilema de la raíz se observaron diferencias significativas (Figura 7), donde en la primera evaluación se encontró que la aplicación del producto comercial incrementó el número de vasos del xilema en 47% con respecto al testigo absoluto, mientras que en las plantas asperjadas con el extracto de *H. longipes* se presentó un decremento en esta variable correspondiente a 41%. Para la segunda evaluación se observó un menor número de los vasos del xilema para todos los tratamientos con respecto al testigo, siendo el tratamiento con el producto comercial el que contó con un 24% menos.

No se observaron diferencias estadísticas en el grosor de la pared celular de los vasos del xilema (Figura 8) así como en el área del lumen (Figura 9) correspondiente a las estructuras de raíz y tallo para ninguno de los tratamientos aplicados.

By assessing the number of xylem vessels of the root showed significant differences (Figure 7), where the first evaluation found that the application of the commercial product increased the number of xylem vessels at 47% compared to absolute control, while in plants sprayed with the extract of *H. longipes* showed a decrease in this variable corresponding to 41%. For the second evaluation fewer xylem vessels were observed for all treatments compared to control, being the treatment with the commercial product which had 24% less.

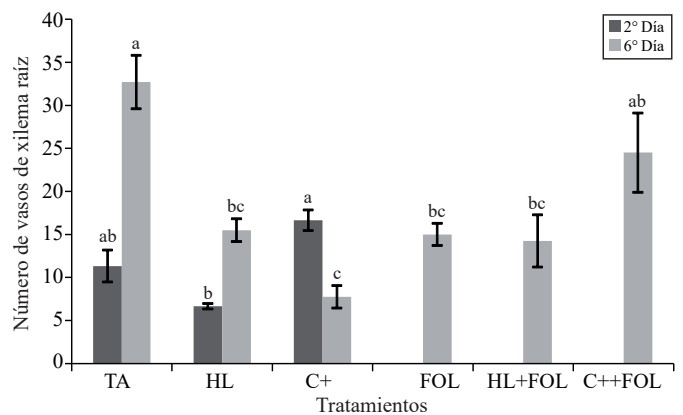


Figura 7. Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* sobre el número de vasos de xilema en muestras de raíz de plántulas de tomate para dos fechas de evaluación. Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $p > 0.05$).

Figure 7. Effect of applying *H. longipes* extract on the number of xylem vessels in samples of tomato seedlings following two evaluation dates. Means with the same literal are not statistically different (Tukey, $p > 0.05$).

No statistical differences were found in the thickness of the cell wall of the xylem vessels (Figure 8) and the lumen area (Figure 9) corresponding to root and stem structure for none of the applied treatments.

Plants infected with *F. oxysporum* showed necrosis in xylem vessels, which can lead to possible alterations in carbohydrates distribution and causes difficulties in water transport, which leads to wilt symptoms (Norueg, 1983). It has been reported that *Fusarium* species cause wilt following a similar pattern of infection; penetrate through root and colonize the stem of the plant's vascular system (Turlier *et al.*, 1994). Colonization is restricted to both resistant and susceptible cultivars to the region as initial entry of the pathogen, due to vessel occlusion by gels, callose and tylose deposition (Takken and Rep, 2010);

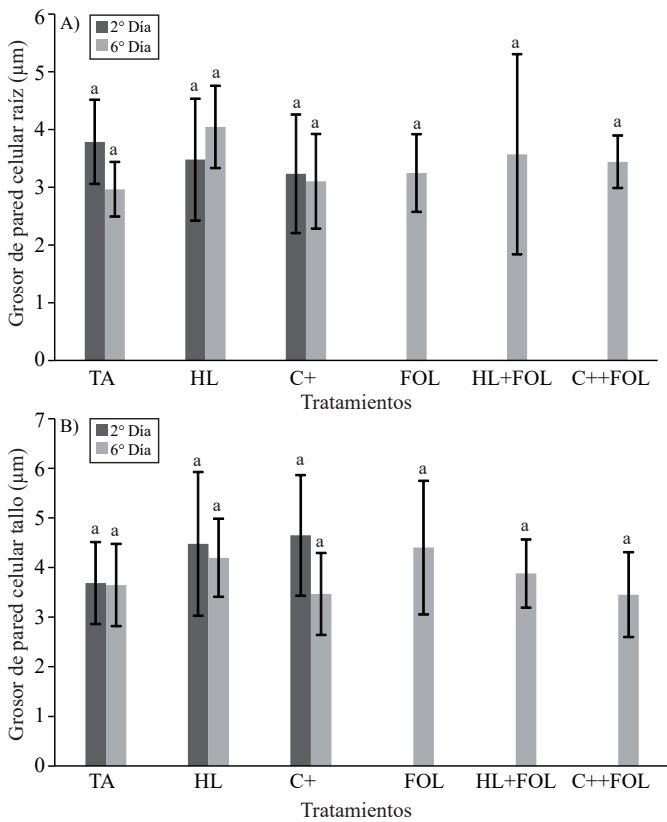


Figura 8. Efecto de la aplicación del extracto de *H. longipes* sobre el grosor de pared celular del xilema de muestras de raíz (A) y tallo (B) de plántulas de tomate analizadas para dos fechas de evaluación. Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $p > 0.05$).

Figure 8. Effect of application of *H. longipes* extract on cell wall thickness of xylem Root samples (A) and stem (B) of tomato seedlings tested for two evaluation dates. Means with the same literal are not statistically different (Tukey, $p > 0.05$).

Las plantas infectadas con *F. oxysporum* mostraron necrosamiento en los vasos del xilema, los cuales pueden conducir a posibles alteraciones en la distribución de carbohidratos y ocasionar dificultad en el transporte de agua, lo que con lleva a la sintomatología de marchitez (Norueg, 1983). Se ha reportado que las especies de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas el sistema vascular (Turlier *et al.*, 1994). La colonización se restringe tanto en cultivares resistentes como susceptibles a la región de entrada inicial del patógeno, debido a la oclusión de los vasos por gels, deposiciones de calosa y tilosas (Takken y Rep, 2010); sin embargo, en este estudio no se

however, in this study no structural barriers associated to passive defense response of plants related to the application of elicitor molecules were observed, this coincides with that described by Araujo *et al.* (2008), who evaluated banana plants inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *ubense* treated with fungicides and plant extracts, who found no changes in the conducting tissues of root and stem, which was attributed to the products used, which did not allow these changes or the pathogen did not favor their formation; or it could be that continuous colonization promoted that gels calloses were degraded by effect of pectolytic enzymes from the pathogen and tyloses growth was inhibited (González *et al.*, 2012).

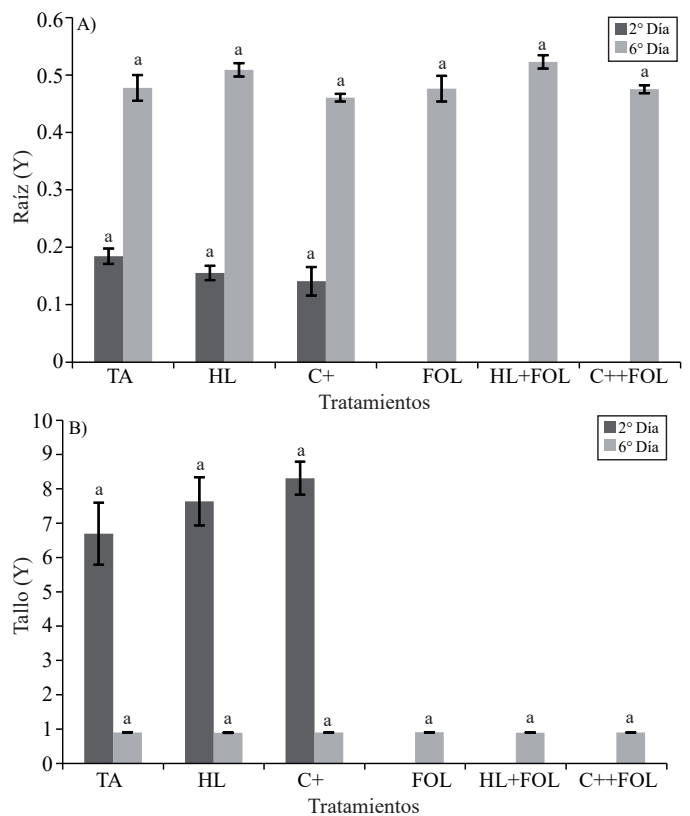


Figura 9. Datos transformados (Y) de los valores obtenidos del estudio de la aplicación del extracto de *H. longipes* sobre el área del lumen de muestras de raíz (A) y tallo (B) de plántulas de tomate para dos fechas de evaluación. Medias con literales iguales no difieren estadísticamente (Tukey, $p > 0.05$).

Figure 9. Data processed (Y) values obtained from the study of the application of the extract of *H. longipes* on the lumen area of root samples (A) and stem (B) of tomato seedlings for two testing dates. Means with the same literal are not statistically different (Tukey, $p > 0.05$).

observaron barreras estructurales asociadas a la respuesta pasiva de defensa de las plantas relacionada con la aplicación de moléculas elicitoras, esto coincide con lo descrito por Araujo *et al.* (2008), quienes evaluaron plantas de plátano inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. cubense tratadas con fungicidas y extractos vegetales, quienes no encontraron alteraciones en los tejidos conductores de raíz y tallo, lo que se atribuyó a que los productos utilizados, no permitieron estas alteraciones o que el patógeno no estimuló su formación; o bien pudo ocurrir que la colonización continúa promovió que los geles y calosas fueran degradados por el efecto de enzimas pectolíticas del patógeno y el crecimiento de las tilosas fuera inhibido (González *et al.*, 2012).

El efecto de *H. longipes* y el C+ sobre el número de vasos de xilema posiblemente tenga una función positiva para la planta disminuyendo la vulnerabilidad del xilema frente a la cavitación causada por el ataque de patógenos que afectan el sistema vascular (Sobrado, 2007; Pouzoulet *et al.*, 2014).

Conclusiones

La aplicación del extracto de *H. longipes* reduce la severidad de síntomas de marchitez en las plántulas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. De igual manera, las plantas tratadas con el extracto presentan un efecto promotor de crecimiento, incrementando la altura, longitud de raíz y en biomasa total de la planta, además de cambios morfológicos en raíz y tallo sobre el área de la corteza y la médula. Por lo que el extracto de *H. longipes* pudiera actuar induciendo el sistema de defensa en las plantas de tomate, además de su favorable actividad como fitohormona, promoviendo el crecimiento vegetal.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de una beca a nivel doctorado (21511) para la realización de dicho proyecto de investigación.

Literatura citada

Araujo, D.; Rodríguez, D. y Sanabria, M. E. 2008. Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, causante del Mal de Panamá a algunos extractos vegetales y fungicidas. Venezuela. Fitopatología Venezolana. 21(2):2-8.

The effect of *H. longipes* and C+ on the number of xylem vessels may have a positive role for the plant reducing xylem vulnerability against cavitation caused by the attack of pathogens that affect the vascular system (Sobrado, 2007; Pouzoulet *et al.*, 2014).

Conclusions

The application of *H. longipes* extract reduces the severity of wilt symptoms in tomato seedlings inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Similarly, plants treated with the extract exhibit a growth promoting effect, increasing height, root length and total biomass of the plant, besides morphological changes in root and stem on the cortex area and marrow. So the *H. longipes* extract could act inducing the defense system in tomato plants, besides its favorable phytohormone activity, promoting plant growth.

End of the English version



- Baysal, Ö.; Soylu, E. M. and Soylu, S. 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Reino Unido. Plant Pathol. 52(6):747-753.
- Benhamou, N. and Belanger, R. 1998. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato 1. Estados Unidos. Plant Physiol. 118(4):1203-1212.
- Cai, G.; Gale, I. R.; Scheider, R. W.; Kistler, H. C.; Davis, R. M.; Elias, K. S. and Miyao, E. M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. Estados Unidos. Phytopathology. 93(8):1014-1022.
- Campos, C. J. C.; Pelagio, F. R.; Raya, G. J.; Méndez, B. A.; Ortiz, C. R. and López, B. J. 2008. Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. Irlanda. Plant Sci. 174(2):165-173.
- Diener, A. C. and Ausubel, F. M. 2005. Resistance to *Fusarium oxysporum* 1, a dominant arabidopsis disease-resistance gene, is not race specific. Estados Unidos. Genetics. 171(1):305-321.
- Flores, J. B.; Puente, E. O. R.; Félix, E. A.; Ponce, J. F.; Cruz, M.; Juárez, O. G. y Ortega, A. M. G. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. México. Rev. Fitotec. Mex. 32(4):319-326.
- Fuentes, L.; Mesa, A. R.; Ruíz, M. L.; Peláez, M. I. y Fernández, M. 2005. Estudio histológico en callos de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184. Cuba. Pastos y Forrajes. 28(3):199-209.
- González, I.; Yailén, A. y Peteira, B. 2012. Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. Cuba. Rev. de Protección Vegetal. 27(1):1-7.
- González, M. S.; Flores, L. M. L.; Benavides, M. A. y Flores, O. A. 2011. Actividad inhibitoria del extracto de *Heliopsis longipes* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. México. Rev. Mex. Fitopatol. 29(2):146-153.

- Hernández, S. M. 1984. Manual de laboratorio de citología y citogenética. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Saltillo, Coahuila, México. 92 p.
- Ignjatov, M.; Milošević, D.; Nikolić, Z.; Gvozdanović-Varga, J.; Jovičić, D. and Zdjelar, G. 2012. *Fusarium oxysporum* as causal agent of tomato wilt and fruit rot. Serbia. Pesticidi i fitomedicina 27(1):25-31.
- Jiménez, C. y Sanabria, N. 2008. Población final de *Trichoderma harzianum* en el control de la marchitez vascular en tomate causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Venezuela. Fitopatología Venezolana. 21:29-30.
- López, B. J. 2007. Alcamidas hacia la nueva era agrícola. México. Revista Ciencia y Desarrollo. 33(205):60-67.
- López, J. B.; Acevedo, G. H.; Ramírez, E. C.; Molina-Torres, J. T. and Herrera, L. E. 2006. Novel signals for plant development. Reino Unido. Current Opinion Plant Biol. 9(5):523-529.
- Masato, K.; Yumiko, K.; Gen, O.; Isamu, Y.; Tohru T. and Tsutomu, A. 2005. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, *MAT1*, and *pgl*, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. Japón. J. General Plant Pathol. 71(4):263-272.
- Méndez, B. A.; Calderón, V. C.; Ibarra, L. E.; Raya, G. J.; Ramírez, C. E.; Molina, T. J.; Guevara, G. A. A.; Bucio, B. J. and Herrera, E. L. 2011. Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. Estados Unidos. PloS one. 6(11):e27251.
- Molina, T. J. y García, C. A. 2001. Alcamidas en plantas: distribución e importancia. México. Avance y Perspectiva. 20:377-387.
- Molina, T. J.; Salazar, C. C. J.; Armenta, S. C. and Ramírez, C. E. 2004. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinins and reduced amides. Estados Unidos. J. Agric. Food Chem. 52(15):4700-4704.
- Morquecho, A. C. and López, J. 2007. Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. España. The Int. J. Develop. Biol. 1:34-41.
- Pelagio, F. R.; Ortiz, C. R. and López, B. J. 2013. *dhm1*, an *Arabidopsis* mutant with increased sensitivity to alkamides shows tumorous shoot development and enhanced lateral root formation. Países Bajos. Plant Mol. Biol. 81(6):609-625.
- Pharand, B.; Carisse, O. and Benhamou, N. 2002. Cytological aspects of compost-mediated induced resistance against fusarium crown and root rot in tomato. Estados Unidos. Phytopathology. 92(4):425-438.
- Pouzoulet, J.; Pivovarov, A.; Santiago, L. and Rolshausen, P. E. 2014. Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. Suiza. Frontiers in Plant Sci. 5:1-11.
- Rabie, G. H. and Humiany, A. A. 2004. Role of VA mycorrhiza on the growth of cowpea plant and their associative effect with N₂ fixing and P-solubilizing bacteria as biofertilizer in calcareous soil. Finlandia. J. Food Agric. Environ. 2(3-4):186-192.
- Ramírez, C. E.; Lucas, V. L.; Virgen, C. G. y Molina, T. J. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. México. Agrociencia. 34(2):207-215.
- Reis, A.; Giordano, L. D. B.; Lopes, C. A. and Boiteux, L. S. 2004. Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. Brasil. Crop Breed. Appl. Biotechnol. 4:495-502.
- Rivero, M. G. C.; Quirós, G.; Sánchez, U. A. B. y Sanabria, M. E. 2007. Morfoanatomía de sépalos y pedúnculo del fruto de *Psidium guajava* L., estructuras de preferencia del ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). Venezuela. Rev. Fac. Agron. 24(1):135-140.
- Sobrado, M. A. 2007. Relationship of water transport to anatomical features in the mangrove *Laguncularia racemosa* grown under contrasting salinities. Reino Unido. New Phytologist. 173(3):584-591.
- Srivastava, R.; Khalid, A.; Sing, U. S. and Sharma, A. K. 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. Estados Unidos. Biol. Control. 53(1):24-31.
- Takken, F. and Rep, M. 2010. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. Reino Unido. Molec. Plant Pathol. 11(2):309-314.
- Turlier, M. F.; Epavier, A. and Alabouvette, C. 1994. Early dynamic interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* and the roots of *Linus usitatissimum* as revealed by transgenic GUS-marked hyphae. Canada. Canadian J. Bot. 72(11):1605-1612.
- Valueva, T. A. and Mosolov, V. V. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. Rusia. Biochem. 69(11):1305-1309.