



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA
EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA



APLICACIÓN DE *Bacillus* spp. PARA EL
CONTROL BIOLÓGICO DE *Fusarium oxysporum*
Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici* EN TOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.)

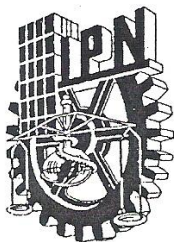
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA

MARTÍN GERARDO LUGO MARTÍNEZ

GUASAVE, SINALOA; MÉXICO NOVIEMBRE DE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave el día 27 del mes Octubre del año 2011, el (la) que suscribe Martín Gerardo Lugo Martínez alumno (a) del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente con número de registro B091688, adscrito a CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza y cede los derechos del trabajo intitulado Aplicación de *Bacillus* spp. para el control biológico de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección m.lugo85@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Martín Gerardo Lugo Martínez



SIP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Guasave, Sinaloa. a 15 de Agosto del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA en su sesión ordinaria No. 8 celebrada el día 15 del mes de Agosto conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Lugo	Martínez	Martín Gerardo
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)

Con registro:

B	0	9	1	6	8	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Aplicación de *Bacillus* spp. para el control biológico de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.),

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Probar el efecto antagonista de nueve bacterias seleccionadas *in vitro* e *in planta*, sobre *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en semillero.

Probar el efecto antagonista de las bacterias seleccionadas a nivel semillero sobre *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *radicis-lycopersici* en rizoconos.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza y Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis


Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza


Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez

Aspirante

Presidente del Colegio


Ing. Martín Gerardo Lugo Martínez


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR-IPN
UNIDAD SINALOA
D.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave siendo las 16:00 horas del día 27 del mes de Octubre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis titulada:
Aplicación de *Bacillus* spp. para el control biológico de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Presentada por el alumno:

Lugo	Martínez	Martín Gerardo
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro: B 0 9 1 6 8 8

aspirante de:

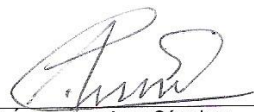
Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

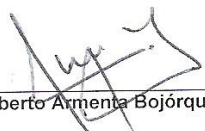
LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

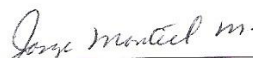

Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez


Dra. Melina López Meyer


Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez


Dr. Héctor Abelardo González Ocampo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

El presente trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio de **Ecología molecular de la rizosfera** del Departamento de **Biotecnología Agrícola** del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección del Dr. **Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza** E-mail: **imaldona@ipn.mx** Domicilio laboral: Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250 CP: 81100 Colonia: San Joachin, Ciudad: Guasave, Estado: Sinaloa, Fax: 01(687)8729625, Teléfono: 01(687)8729626; y el Dr. **Miguel Ángel Apodaca Sánchez** E-mail: **esavf@hotmail.com** Domicilio laboral: Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa, Calle 16 y Av. Xaparaqui CP: 81110, Juan José Ríos, Sinaloa, Tel./Fax: 01(687)8960908. El presente trabajo fue apoyado económicamente a través los proyectos SIP 20091542, SIP 20101321 y proyectos CECyT 2009 CECyT 2010. **Martín Gerardo Lugo Martínez** fue apoyado con una beca CONACYT de tesis de maestría con la clave **230070**.

AGRADECIMIENTOS

A ti Señor, por haberme llenado de bendiciones durante este período de vida en el cual estuve preparándome para mi posgrado.

A mis maestros del Instituto por ayudar a mi formación.

Al CIIDIR Sinaloa por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios en las instalaciones del Instituto.

A mis directores de tesis, el Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza (Dr. Nacho) y el Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez (Dr. Apodaca) como una muestra de mi aprecio, les agradezco la orientación que siempre me otorgaron, sus consejos, asesoría, por compartir sus conocimientos conmigo y con ello lograr un aprendizaje de investigación y trabajo con éxito.

A mis tutores Dra. Melina López Meyer, Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez y Dr. Héctor Abelardo González Ocampo por sus sabios consejos para mejorar este trabajo.

A mis compañeros de generación (2009-2011) con quienes compartí momentos inolvidables.

Al equipo de Softball del Instituto, por haberme dado la oportunidad de participar en él.

A mis compañeros y amigos que me ayudaron en todo momento cuando mi proyecto lo solicitaba: Luky, Raquel, Alicia Fierro, Damián, Juan Carlos Martínez, Alejandro, Diego, Isaac, Glenda, Dra. María Elena, Karla y Odet.

Una mención y dedicatoria especial a una persona que a pesar de las circunstancias, nunca se quito de apoyo durante mi maestría, a mi chica “Toderosa”, Wendy Lizbeth.

Familia, a ustedes que un día depositaron en mí su confianza, gracias por haberme dado las herramientas para construir este sueño, que representa para mí la mejor de las herencias. A ustedes que me hicieron sentir todo su apoyo, siendo testigos de mis días y desvelos, triunfos y fracasos, alegrías y enojos, diversiones, responsabilidades y preocupaciones, aceptando mis errores. Ha sido un largo camino, pero finalmente he alcanzado la meta tan anhelada que hace dos años me fijé. Gracias por acompañarme de la mano, les agradezco su ayuda por animarme a lograr lo que hoy se ha realizado. Por todo el ayer les dedico todo mi mañana.

Martín Gerardo Lugo Martínez

**“La agricultura es la profesión propia del sabio, la más adecuada al sencillo y
la más digna para todo hombre libre”
Cicerón.**

ÍNDICE

GLOSARIO	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Importancia del cultivo de tomate	3
2.2 Hongos fitopatógenos	4
2.3 Clasificación de <i>Fusarium</i>	5
2.4 Importancia de <i>Fusarium</i> en tomate	8
2.5 <i>F. oxysporum</i> f. spp. <i>radicis-lycopersici</i> (Forl) y <i>lycopersici</i> (Fol)	9
2.5.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	10
2.5.2 <i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend. f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	12
2.6 Sintomatología causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en tomate	15
2.7 Mecanismos de acción de microorganismos antagonistas	19
2.7.1 Antibiosis	19
2.8 Uso de <i>Bacillus</i> spp. como agente de biocontrol	21
2.9 Trabajo previo del grupo de Ecología Molecular de la Rizosfera del CIIDIR-Sinaloa	23
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo general	26
4.2 Objetivos específicos	26
V. HIPÓTESIS	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	28

6.1 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en semillero	28
6.1.1 Reactivación de bacterias antagonistas en medio líquido LB para la prueba en semillero	28
6.1.2 Obtención y siembra del inóculo Forl	30
6.1.3 Eficacia bioprotectora de los antagonistas contra Forl en semilleros	34
6.2 Cinética de crecimiento de los aislados	35
6.3 Pruebas de antagonismo en rizoconos	36
6.4 Prueba de compatibilidad entre aislados	41
VII. RESULTADOS	42
7.1 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en semillero	42
7.1.1 Bioensayo 1	42
7.1.2 Bioensayo 2	44
7.1.3 Bioensayo 3	46
7.2 Cinética de crecimiento de los aislados	48
7.3 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en rizocono	49
7.3.1 Bioensayo 1	49
7.3.2 Bioensayo 2	51
7.3.3 Bioensayo 3	53
7.4 Prueba de compatibilidad entre aislados	55
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	56
8.1 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en semillero	56
8.2 Cinética de crecimiento de los aislados	57
8.3 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en rizocono	58
8.4 Prueba de compatibilidad de aislados	61
IX. CONCLUSIONES	62
X. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	63
XI. BIBLIOGRAFÍA	64

GLOSARIO

Anastomosis. Unión de una hifa o vaso con otros, que da como resultado la intercomunicación de sus contenidos.

Antagonismo. Interacción de efecto negativo entre dos o más especies de organismos. Si una de estas especies, corresponde al de un patógeno y está siendo desplazada o inhibida en su crecimiento por otra u otras especies, podemos decir que estamos frente la acción de antagonistas.

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV). Bacterias habitantes de la raíz que estimulan significativamente el crecimiento de plantas.

Bancos de germoplasma. Consiste en una colección de organismos preservada de manera viable o curatorial. Su misión consiste en ubicar, recolectar, conservar y caracterizar el plasma germinal de organismos que, por sus atributos son consideradas de interés prioritario para beneficio de la humanidad, además de aportar conocimiento científico orientado a la optimización de la conservación y uso de los recursos fito-zoogenéticos y/o microbiológicos.

Clamidospora. Espora de multiplicación vegetativa, rodeada de una pared gruesa y cargada de sustancias nutritivas, que aseguran la conservación del patógeno.

Epinastia. Es la curvatura hacia abajo que se produce en algunas hojas cuando el lado adaxial (haz) crece más que el lado abaxial (envés).

Fanerógamas. Subreino de plantas con los órganos sexuales, es decir, las flores, perceptibles a simple vista.

Fitopatígeno. Microorganismo, que causa enfermedades en las plantas por medio de disturbios en el metabolismo celular causado por la secreción de enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias.

Grupo monofilético. Es un grupo donde todos los organismos incluidos en él han evolucionado a partir de una población ancestral común, y todos los descendientes de este ancestro están incluidos en el grupo.

Microbiota del suelo. Está formada por una mezcla microscópica de millones de microorganismos por cada gramo de suelo, que cumplen con un rol esencial en los procesos biogeoquímicos.

***Fusarium oxysporum*.** Es una de las especies más importantes del género *Fusarium*, debido a las pérdidas económicas que causa en los cultivos comerciales. Está entre las especies más abundantes, cosmopolitas y complejas pues tiene más de 100 formas especiales caracterizadas por su alta especificidad en las plantas hospedantes que afecta.

Heterocariosis. Característica genética propia de los hongos, consistente en que los núcleos hallados en un citoplasma común son genéticamente distintos, ya sea como consecuencia de una mutación o por fusión de hifas genéticamente diferentes.

Hifas. Elementos filamentosos característicos de la mayoría de los hongos. Están constituidos por una fila de células alargadas envueltas por la pared celular que, reunidas, forman el micelio.

Hongos micorrízicos arbusculares. Microorganismos del suelo del *Phylum Glomeromycota*, colonizan las raíces de las plantas superiores y forman relaciones simbióticas.

Micelio. Es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

Necrosis. Muerte de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo, o por un programa celular determinado que causa una lesión tan grave que no se puede reparar o curar.

Parasexualidad. Es el proceso mediante el cual pueden producirse recombinaciones genéticas dentro de los heterocariones de los hongos. Esto sucede debido a la fusión ocasional de los dos núcleos y la formación de un núcleo diploide.

Patogenicidad. Alteración que ocasiona un parásito sobre una o varias funciones esenciales de la planta.

Plagas agrícolas. Animales, plantas y microorganismos que tienen un efecto negativo sobre la población de otro organismo causando enfermedad o devastación.

Plantas dicotiledóneas. Clase de plantas fanerógamas angiospermas, cuyos embriones de las semillas presentan dos cotiledones u hojitas iniciales, opuestos por lo común.

Rizosfera. Es una zona del suelo de interacción única y dinámica entre las raíces de las plantas y microorganismos del suelo. Esta región especializada, está caracterizada por el aumento de la biomasa microbiana y de su actividad.

Transposon. Elemento genético móvil que puede moverse de una localización genómica a otra, gracias a la presencia de secuencias repetidas cortas que lo flanquean y que es capaz de replicar e insertar una copia en un lugar nuevo en el genoma

RESUMEN

En Sinaloa, México, la pudrición de la corona y raíz del tomate (PCRT) es una de las enfermedades más destructivas, cuyo manejo se complica por la escasa cantidad de híbridos resistentes y por la ineficacia de otros métodos de manejo. La utilización de microorganismos antagónicos es una estrategia de manejo promisorio, pero se requiere de aislados eficaces contra el patógeno, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl), adaptados a la región.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar, a (los) aislado (s) más eficaces contra Forl, a partir de una batería de nueve bacterias del género *Bacillus*, previamente identificadas molecularmente y analizadas *in vitro* e *in planta*, por su capacidad antagónica contra Forl (Cordero-Ramírez, 2008). En una primera etapa se realizaron tres bioensayos en semilleros con plántulas de tomate cv. Missouri en cámaras de crecimiento con 12 horas luz a 25°C y 12 horas oscuridad a 22°C. Plántulas de cinco días post-siembra, se inocularon por separado con 1.5×10^6 UFC/ml de cada uno de los nueve aislados. Diez días después, las mismas plántulas se inocularon 1×10^6 microconidios/ml de Forl/plántula. Las variables analizadas fueron altura de la planta, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y severidad de los síntomas. Los valores de esta última variable se sometieron a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

En una segunda etapa se realizaron tres bioensayos en rizocono con los aislados seleccionados del trabajo en semillero los cuales fueron 144, 145 y 537 identificados los primeros dos como *Bacillus subtilis* y el último como *B. thuringiensis*. La producción de plántulas fue de manera similar a los experimentos en semillero, con la diferencia de que en este caso se inoculó el patógeno al momento de trasplante a los rizoconos.

Para el bioensayo 1 en semillero, se encontró que el aislado *B. subtilis* (144), es potencialmente antagonista contra Forl, obteniendo un 87% de protección. En los

bioensayos 1 y 2, los aislados *B. subtilis* (145) y *B. thuringiensis* (537) mostraron un potencial antagonismo contra Forl ejerciendo un 40 y 52% de protección al daño causado por Forl, respectivamente.

En la segunda etapa (rizoconos) no se detectó antagonismo de ninguno de los aislados hacia Forl, pero si un desarrollo significativo con respecto al control absoluto, destacando *B. thuringiensis* (537), el cual aumentó significativamente la altura y peso seco de la planta.

ABSTRACT

In Sinaloa, Mexico, the tomato crown and root rot (TFRR) represents one of the most destructive diseases, whose management is complicated by the small number of resistant hybrids and the ineffectiveness of other management methods. The use of microorganism as antagonists is a promising management strategy but it requires regional isolates against the pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl). The goal of the present work was to select the isolate(s) that are more effective against TFRR from a set of nine bacteria from the genus *Bacillus* previously identified molecularly and analyzed *in vitro* and *in planta* (Cordero-Ramírez, 2008).

In a first stage three bioassay with tomato cv. Missouri seedlings were evaluated in growth chambers set up at 12 hours light (25°C)/12 hours darkness (22°C). Five days old seedlings were inoculated with 1.5×10^6 CFU/ml. Ten days later the same seedlings were inoculated with 1×10^6 Forl microconidia/ml/seedling. The variables studied were plant height, dry weight of aerial and root part and severity of symptoms. The values of these variables were subjected to analysis of variance and Tukey statistical tests ($p \leq 0.05$).

In a second stage three rhizocone bioassays were mounted with the best potential antagonists selected from the previous seedling bioassays. These isolates were 144, 145 and 537 the first tow identified as *Bacillus subtilis* and the last one as *B. thuringiensis*. Plant production was similar to the experiments made in the growth chamber with the difference that in this case the pathogen was inoculated at the time of transplantation to rhizocones.

We found in the first stage bioassays that the isolate *B. subtilis* (144) is potentially antagonistic to TFRR, getting up to 87% of protection. In the second and third bioassays from the first stage experiments the isolates *B. subtilis* (145) and *B. thuringiensis* (537) showed potential antagonism against TFRR getting 40 and 52% protection to damage respectively.

In the second stage assays (rhizocones) antagonism wasn't detected in any of the isolates against TFRR. However, *B. thuringiensis* (537) showed significant development with respect to the absolute control, which significantly increased the height and plant dry weight.

I. Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas con mayor producción en el mundo, debido a su gran aportación gastronómica y al alto grado de aceptación que tiene en las diferentes culturas, lo cual se evidencia por el hecho de que es el segundo producto hortícola en el consumo mundial. En el 2009 la producción mundial de tomate fue 135.59 millones de toneladas y los diez países con mayor participación fueron, en orden de importancia, China, Estados Unidos de América, Turquía, India, Egipto, Irán, España, Brasil, México y Rusia (Euromonitors, 2009).

En el ciclo 2009-2010 en México (Figura 1) se cosecharon aproximadamente 52 mil hectáreas de tomate con una producción de 2.04 millones de Ton (SAGARPA 2010), lo que nuevamente posicionó al tomate rojo, como la hortaliza más cultivada en nuestro país, con respecto al ciclo anterior. De igual modo que en el ciclo 2008-2009, los mismos seis principales Estados se mantuvieron como líderes en la producción de dicha hortaliza.

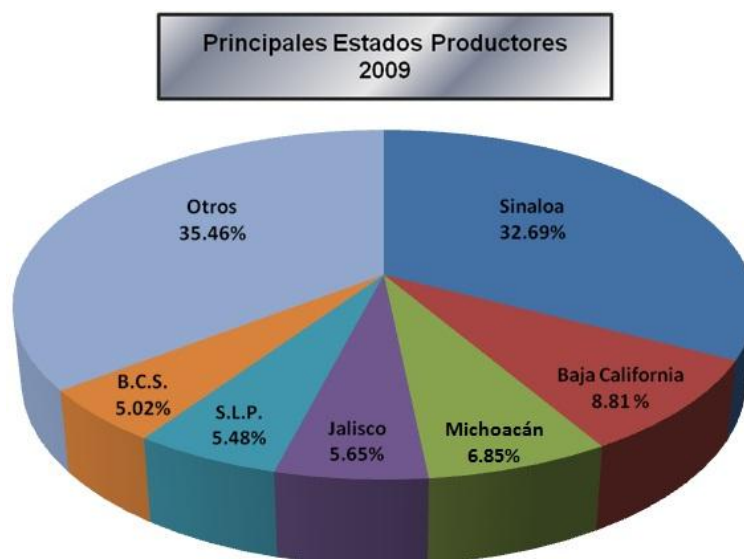


Figura 1. Principales estados productores de tomate en México, en el ciclo 2009-2010.

Lo anterior demuestra el impacto que tiene el tomate en la economía del país, ya que su producción implica una gran aportación de divisas y generación de empleos, en todas las fases de la cadena agroalimentaria. Sin embargo, los productores corren un alto riesgo al invertir su capital en la producción de esta hortaliza, ya que tiene la desventaja de ser altamente susceptible al ataque de enfermedades, de las cuales se conocen aproximadamente 200 (Benton, 2001). En 2010 en México se sembraron 53,572 hectáreas de tomate, sin embargo se cosecharon solo 52,383, ya que, alrededor de 1,000 hectáreas se perdieron debido a plagas, enfermedades o a la falta de los cuidados durante el cultivo (Euromonitors, 2009).

Entre las enfermedades que afectan la producción de tomate se encuentran las causadas por microorganismos fitopatógenos, como lo son los hongos del suelo *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *lycopersici* (Fol) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl). El primero provoca la marchitez vascular del tomate (MVT), mientras que el segundo causa la pudrición de la corona y raíz del tomate (PCRT).

En el Estado de Sinaloa, se reportó la incidencia de Forl en 34 de 40 campos inspeccionados (Apodaca-Sánchez, 2002).

Los métodos utilizados para controlar los efectos de Fol y Forl no han sido lo suficientemente eficientes, a pesar de que existen híbridos resistentes a estos fitopatógenos, estos no siempre se utilizan porque no satisfacen los requerimientos necesarios para su mercado. Uno de los problemas de las enfermedades en suelo causadas por hongos es la ineficiencia del control químico. La práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos en la agricultura, han reducido la biodiversidad (microorganismos) del agro ecosistema, ocasionando la inestabilidad de los mismos, reflejándose en una mayor incidencia y severidad de las enfermedades de las plantas (Báez-Valdez *et al.* 2010). El presente trabajo tiene como objetivo, buscar microorganismos antagonistas como agentes de biocontrol contra *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

II. Antecedentes

2.1 Importancia del cultivo de tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia Solanaceae. Dentro de ésta, el género *Solanum* posee nueve especies. El nombre genérico y específico del tomate fue dado por Linneus en 1753 (Species, 2000).

La palabra jitomate, empleada en la región central de nuestro país, procede del náhuatl *xictli*, ombligo y *tomatl*, *tomate*, que significa *tomate de ombligo* (FAO 2009). En otras regiones en México, como en el Noroeste se emplea de manera común la palabra tomate.

El fruto de tomate es de tamaño y forma variable, generalmente elíptico o globoso (Figura 2). Presenta numerosas semillas, pequeñas, aplanadas, amarillentas-grisáceas, velludas o embebidas en una masa gelatinosa que se encuentra en el fruto, una vez maduro (placenta). El color del tomate es verde en un principio y rojo cuando madura, debido a la sustitución de la clorofila en los cromoplastos de las células del fruto por carotenos (Vigliola, 2003).



Figura 2. Tomate indeterminado, variedad Ruby bajo invernadero, Pénjamo, Guanajuato, México.

El tomate crece en casi todos los terrenos y climas debido a su adaptabilidad, sin embargo, las bajas temperaturas y los vientos fuertes suelen afectar negativamente su sano cultivo. Los principales tipos de tomate son saladette, bola y cherry. La industria alimenticia procesa todos estos tipos de tomate y da origen a infinidad de productos tales como jugos, purés, conservas, salsa catsup, saborizantes, mermeladas, deshidratados y muchos otros (Vigliola, 2003).

Como se mencionó anteriormente, la producción de tomate en México es de vital importancia para la sociedad desde un punto de vista económico, debido a su aportación en cuanto al número de empleos. Genera anualmente alrededor de 180 mil empleos directos e indirectos en el Estado de Sinaloa, de los cuales, 83% son ocupados por jornaleros agrícolas de Guerrero, Oaxaca y Veracruz, principalmente. Los jornaleros vienen a trabajar en la siembra, cosecha, recolección y empaque (Elizalde, 2008).

La producción de tomate es constantemente amenazada, debido a la gran cantidad de insectos plaga y microorganismos patógenos que afectan dicho cultivo. Estas enfermedades pueden ser causadas por insectos, bacterias, nemátodos, fitoplasmas, virus u hongos, estos últimos de interés en este trabajo.

2.2 Hongos fitopatógenos

Los hongos son organismos pequeños que producen esporas microscópicas. Son filamentosos, carecen de clorofila y tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambas, existiendo más de 8,000 especies de hongos producen enfermedades en las plantas (Agrios, 2007).

El cuerpo vegetativo de los hongos está constituido por una serie de filamentos entrelazados llamados micelio, cuyo conjunto se denomina hifa. Los hongos se dividen en ocho phyla: Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microspora, Neocallimastigomycota, Zygomycota y

Ascomycota. Ascomycota contiene numerosos géneros de hongos fitopatógenos importantes, como *Fusarium* (Species, 2000, <http://www.catalogueoflife.org/>).

2.3 Clasificación de *Fusarium*

La especie *Fusarium* pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales y a la Familia Nectriaceae. Entre los hongos filamentosos, el género *Fusarium* es uno de los más importantes. Fue descrito por primera vez por Link en 1809, aunque existían datos desde el siglo XVI, basados en las descripciones de los Aztecas, de la podredumbre que produce en el maíz, una de las especies de este género. Los primeros estudios sobre los problemas producidos por *Fusarium*, comenzaron con una investigación llevada a cabo por Martius a mediados del XIX, en la cual un hongo de este género, fue establecido como el agente causal de la podredumbre en papas almacenadas. Sin embargo, fue hasta finales del siglo XIX cuando se descubrió su importancia como causante de enfermedades en plantas y productor de toxinas. Los primeros estudios que demostraron la patogenicidad de *Fusarium* en plantas vivas, se publicaron entre 1892 y 1899 (Booth, 1984).

Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, se ha comprobado que existe una gran heterogeneidad entre especies del género (Seifert y Gams, 2001). Usualmente, para la identificación de las distintas especies, se habían empleado tanto las diferencias en la forma de los macroconidios como otros caracteres morfológicos. Desgraciadamente tanto en el caso de *Fusarium* como en otras especies de hongos filamentosos, el número de caracteres morfológicos con valor taxonómico son pocos, fácilmente mal interpretables y además están sujetos a cambios en función de condiciones ambientales (Leslie *et al.*, 2001).

Otro factor importante en la clasificación de estos hongos, es la reproducción. Los hongos con formas anamórficas, se clasifican en base a su morfología asexual aunque se conozca su forma teleomórfica (sexual) (Carlile *et al.*, 2001), hecho que sólo ocurre para el 5 % de las especies anamórficas descritas (Seifert y Gams,

2001). Dentro del género *Fusarium* existen especies que presentan formas con reproducción sexual como *F. solani*, y otras como *F. oxysporum*, en las que no se conoce dicha etapa. Este hecho complica la clasificación, ya que, tradicionalmente las formas sexuales de una especie se han incluido en un grupo diferente y con un nombre distinto de las que presentan las formas sin reproducción sexual. Especies del género *Fusarium*, situado dentro de los hongos anamórficos, se corresponden a las formas sexuales del orden *Hipocreales* (Samuels y Blackwell, 2001).

A pesar de la ausencia de reproducción sexual en algunas de las especies del género *Fusarium*, en algunas especies asexuales como *F. oxysporum* se han descrito fenómenos de intercambio genético como la heterocariosis y la parasexualidad (Burnett, 1984). La heterocariosis es la condición en la cual, como resultado de la fertilización o anastomosis, las células de las hifas de los hongos o partes de éstas contienen núcleos que son genéticamente diferentes (Agrios, 2007).

Dos cepas capaces de formar un heterocarionte vegetativo, pertenecen a un mismo grupo de compatibilidad vegetativa (VCG). En *Fusarium*, la compatibilidad vegetativa está gobernada por al menos diez *loci* denominados *vic*. La presencia de los mismos alelos en cada uno de estos *loci* permite la formación de heterocariontes estables, en el caso de una fusión incompatible, se produciría la muerte de la célula (Leslie, 1993). No habría que descartar, que en los heterocariontes vegetativos se produzcan fenómenos de intercambio genético. Se ha observado que mediante la fusión de protoplastos de dos cepas del anamorfo *F. oxysporum*, se producen reorganizaciones cromosómicas y recombinación entre el material genético de las líneas parentales (Teunissen *et al.*, 2002). Parasexualismo es el proceso mediante el cual pueden producirse recombinaciones genéticas dentro de los heterocariontes de los hongos. Esto sucede debido a la fusión ocasional de los núcleos y la formación de un núcleo diploide (plasmogamia). Durante la multiplicación se produce entrecruzamiento en algunas divisiones mitóticas y, como consecuencia, aparecen

recombinantes genéticos por la separación fortuita del núcleo diploide en sus componentes haploides (haploidización) (Agrios, 2007).

Un problema importante a la hora de estudiar la biología de un patógeno como *F. oxysporum*, es la dificultad para definir cuáles son los caracteres diferenciales de cada población al no existir criterios morfológicos que permitan la separación a nivel intra específico. Para intentar ordenar y explicar toda esta variabilidad se utilizan los conceptos de formas especiales, razas patogénicas y grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) (Kistler, 2001).

Otro fenómeno que ha sido descrito en *Fusarium* gracias al avance de las técnicas de biología molecular y que, tal vez, tenga una gran importancia en la evolución del género, es la presencia de transposones. Éstos se encuentran en casi todos los organismos, pero su presencia en hongos filamentosos había sido considerada como extraña, a pesar de que se había observado su abundancia en otros patógenos de plantas. En *F. oxysporum* se ha detectado la existencia de transposones pertenecientes a ocho familias de elementos móviles (Hua-Van *et al.*, 2000). En cepas de *Fusarium* en las que habían ocurrido fenómenos de transposición se observó una gran variabilidad en los patrones de cariotipos, así como una correlación entre el elevado polimorfismo de los cromosomas y la concentración de elementos móviles (Davies *et al.*, 2001).

Las formas especiales (f. sp.), son cepas morfológicamente indistinguibles que se caracterizan por su adaptación a diferentes hospedantes (Deighton *et al.*, 1962). Se pueden definir como un conjunto de cepas que atacan a una especie vegetal, ó a lo sumo a unas cuantas especies de un mismo género. Este concepto se utiliza también para definir cepas que producen una patología diferente aunque parasiten a la misma especie vegetal. Esta definición se refiere fundamentalmente a capacidades fisiológicas del hongo y no tiene un valor taxonómico, pero tradicionalmente ha sido un concepto útil para los fitopatólogos (Gordon y Martyn, 1997).

La nomenclatura utilizada para designar a las formas especiales, un trinomio en latín, con el nombre de las especies seguido de una referencia al huésped al que parasitan, ha llevado a muchos investigadores a pensar que representan un grupo monofilético natural. Datos recientes demuestran que dentro de algunas formas especiales de *Fusarium oxysporum* (f. sp. *melonis*, f. sp. *lycopersici* y f. sp. *radicis-lycopersici*) existen aislamientos de orígenes independientes (Kistler, 2001). Por lo tanto, la asociación de determinadas cepas con un hospedante no implica necesariamente una divergencia de carácter monofilético. Dentro de *F. oxysporum* han sido descritas más de 70 formas especiales (Armstrong y Armstrong, 1981) cada una de las cuales, la mayoría de las veces, presentan un rango de hospedantes restringido a unas pocas especies de un mismo género. Pero algunas de las formas especiales como *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* pueden causar enfermedades en otras especies de plantas además de tomate, como leguminosas, brasicáceas, cucurbitáceas, etc., al menos en inoculaciones artificiales (Menzies *et al.*, 1990).

2.4 Importancia de *Fusarium* en tomate

Numerosos trabajos abordan el estudio del género *Fusarium* desde un punto de vista genético. Este interés por las especies de este género se debe a su distribución internacional y la capacidad de muchas de ellas de producir enfermedades en especies vegetales. Representantes del género se han encontrado en la mayoría de las regiones geográficas, incluso en el desierto (Katan, 1971). Aunque existen especies que pueden tener una distribución cosmopolita, también existen otras cuya distribución está limitada a uno o pocos cultivos, climas o zonas ecológicas (Leslie *et al.*, 2001).

Fusarium spp. es un hongo que habita en el suelo e infecta a las plantas a través de sus raíces, en las que penetra directamente o a través de heridas. Muchos nemátodos parásitos que viven en el suelo habitualmente incrementan la incidencia de los marchitamientos por *Fusarium*, posiblemente debido a que proporcionan un mayor número de puntos efectivos de penetración (Jarvis y Thorpe, 1976).

El micelio del hongo, en cuanto entra en contacto con la raíz, penetra y se extiende hasta el sistema vascular de la planta (xilema), en donde forma microconidios. Subsecuentemente, el micelio y las esporas del hongo ascienden por la corriente de transpiración en la planta a través del xilema. Una vez completado su ciclo, con el propósito de perpetuarse en el ambiente, el hongo sobrevive en el suelo o en restos de plantas, en forma de esporas asexuales de pared gruesa denominadas clamidosporas; o bien en forma de micelio o conidios en los restos vegetales infestados (Agrios, 2007).

2.5 *F. oxysporum* f. spp. *radicis-lycopersici* (Forl) y *lycopersici* (Fol)

Existen dos tipos de enfermedades causadas por dos formas especiales de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de tomate: Fol y Forl. Estas enfermedades se encuentran distribuidas por todo el mundo, y se reportan en México, Canadá, Israel, Inglaterra, EE.UU. y Japón, entre otros. En nuestro país, los dos patógenos se han reportado en Sinaloa, San Luis Potosí, Baja California y Michoacán, los cuales son los Estados productores de tomate más importantes (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2004).

La persistencia de *F. oxysporum* se debe a que éste forma clamidosporas (esporas de conservación del hongo) en numerosos sustratos, suelo y en restos vegetales. Su propagación se facilita por medio de los conidios, producidos en abundancia sobre el cuello de las plantas infectadas, así como por el polvo de suelo contaminado. Estos propágulos pueden ser conducidos por el agua (red de riego, salpicaduras), el viento y las corrientes de aire. Estos hongos parásitos han sido introducidos en algunas plantaciones de tomate, por medio de sustratos orgánicos o plantas contaminadas (Blancard, 2005).

Debido a la similitud entre Fol y Forl, en el siguiente apartado se describen las características específicas de Forl (Apodaca-Sánchez, 2006) y Fol (Agrios, 2007),

con el fin de puntualizar las diferencias fisiológicas en cuanto a la enfermedad y síntomas que cada forma especial confiere.

2.5.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (Fol) produce marchitamiento vascular en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Esta forma especial fue descrita por Massee (1895) y se ha reportado en al menos 32 países. La enfermedad continúa apareciendo como consecuencia del cultivo intensivo de tomate, y es una de las más destructivas.

Este patógeno entra a la planta a través de las raíces, ya sea por penetración en la punta de la raíz o por las de heridas naturales, por ejemplo a través de los tejidos de la corteza de la raíz por la formación de raíces laterales (Mes *et al.*, 2000), donde el micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de ésta (Agrios, 2007). Cuando se encuentra en los vasos, el micelio se ramifica y produce microconidios en su interior, que son desprendidos y llevados hacia la parte superior de la planta por el flujo ascendente del agua del xilema. Los microconidios germinan en el punto donde cesa su movimiento ascendente y el micelio penetra la pared superior del vaso, y ahí, el hongo produce más microconidios. El hongo también avanza a los vasos adyacentes de la misma manera. El hongo invade entonces en gran escala a los tejidos parenquimatosos de la planta, llega a la superficie de los tejidos muertos y ahí esporula profusamente. En ocasiones el hongo llega hasta los frutos de las plantas donde penetra y contamina las semillas, al igual que Forl. Esto sucede principalmente cuando la humedad del suelo es alta y la temperatura relativamente baja, condiciones que permiten a las plantas producir buenas cosechas, aunque sean infectadas por el hongo. Sin embargo, es frecuente que estos frutos infectados se pudran y desprendan (Agrios, 2007).

El micelio de Fol es incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones se torna de una tonalidad

rosa pálido o púrpura. Este hongo produce tres tipos de esporas asexuales al igual que Forl (Agrios, 2007).

1. **Microconidios.** Consisten de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las condiciones. Su forma es oval y lisa, mide de 5-12 micras de largo por 2.5-3.5 micras de ancho. Son frecuentes en el interior de los vasos de las plantas hospedantes que ha infectado.
2. **Macroconidios.** Son las esporas típicas de "*Fusarium*", están constituidos de tres a cinco células, se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos. Son de forma alargadas, moderadamente curva en forma de hoz. Tienen un tamaño de 27-46 micras de largo por 3.0-4.5 micras de ancho. Aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas que han sido destruidas por el patógeno y por lo común se forman en grupos similares a los esporodocios, los cuales son estructuras fructíferas que consta de un racimo de conidióforos entrelazados en una masa de hifas.
3. **Clamidosporas.** Están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y forma redonda, tienen un tamaño de 5-15 micras de diámetro. Se forman terminal o intercaladamente en el micelio más viejo, ó en los macroconidios del hongo.

Estos tres tipos de esporas se forman en los cultivos del hongo en medio artificial y quizá también en el suelo, sobresaliendo las clamidosporas como las que perduran durante más tiempo en este sustrato (Apodaca-Sánchez, 2006).

Fol es un patógeno que habita en el suelo y que sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectadas que yacen en este sustrato en forma de micelio y en

cualquiera de sus formas de esporas, y con mayor frecuencia en forma de clamidospora (Agrios, 2007).

Fol se caracteriza por tener tres razas fisiológicas numeradas del uno al tres (R1, R2 y R3), de acuerdo al orden cronológico en que fueron descubiertas (revisado en González, 2006). En Sinaloa se han reportado las tres razas mencionadas (Valenzuela *et al.*, 1996).

2.5.2 *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici*

Las plantas se infectan cuando se siembran o se trasplantan en el suelo, ó sustrato infestado con clamidosporas. Otra posibilidad es que la semilla se encuentre contaminada con Forl, de tal forma que la plántula se infecta desde muy temprano (Figura 3). Las raíces jóvenes y los pelos radicales de una plántula recién germinada, liberan sustancias que estimulan la germinación de las clamidosporas que se encuentran en el suelo. Una vez que germina la clamidospora, el tubo germinativo se orienta hacia las raíces emisoras de los exudados, haciendo contacto para penetrar principalmente por las heridas, provocadas por la emergencia de las raíces secundarias (Apodaca-Sanchez, 2006). El ciclo de infección es muy similar al descrito anteriormente para Fol.

Sin embargo, la sintomatología es diferente. Los síntomas, se deben al daño a la estructura y al taponamiento de los vasos por el desarrollo del hongo, al efecto de las sustancias tóxicas producidas por éste y los restos de tejidos descompuestos que se acumulan en los vasos. Al bloquearse el paso de agua y nutrientes en las raíces y en la base del tallo, las plantas enfermas terminan por marchitarse y morir pocos días después (Apodaca-Sánchez, 2006).

Cuando la humedad ambiental es alta y la enfermedad está avanzada, Forl forma altas cantidades de conidios sobre las lesiones en los tallos infectados. Estas se manifiestan a simple vista en forma de manchas o puntos algodonosos de color

crema y a veces de color naranja, sobre los tejidos necróticos. Por otra parte, el micelio que invadió los tejidos, termina por formar también clamidosporas. Cuando la planta presenta sintomatología, la diseminación de Forl de plantas enfermas a plantas sanas no es muy alta bajo sistema de riego por gravedad, y el número de plantas enfermas depende, principalmente, de la cantidad de plantas que se infecten con el inóculo ya presente en el suelo al momento del trasplante. En cambio, cuando el tomate se cultiva bajo sistema de goteo, la humedad constante favorece la esporulación en las plantas. Existen evidencias de que puede haber diseminación secundaria de estas plantas enfermas a las plantas sanas vecinas (Apodaca-Sánchez, 2006).

En cada gramo de tejido infectado de las plantas senescentes o muertas, se forman millones de clamidosporas y pueden estar constituidas por una o dos células al igual que Fol. La incorporación de los residuos de cultivo después de la cosecha, propicia que altas cantidades de inóculo albergado en la materia orgánica, asegure su supervivencia. Las clamidosporas pueden sobrevivir en reposo por varios años en la ausencia de algún cultivo susceptible. Además, estas clamidosporas pueden germinar e invadir raíces de plantas no hospedantes, cultivadas y de malezas, en las que no causan síntomas; pero en donde el hongo se reproduce formando clamidosporas secundarias; o bien germina y coloniza residuos frescos de otros cultivos incorporados en los que también pueden formar nuevas generaciones. El patógeno invade o al menos sobrevive durante períodos prolongados, en la semilla colectada de plantas infectadas; puede provenir de simple contaminación externa o bien invadir la semilla internamente (Apodaca-Sánchez, 2006).

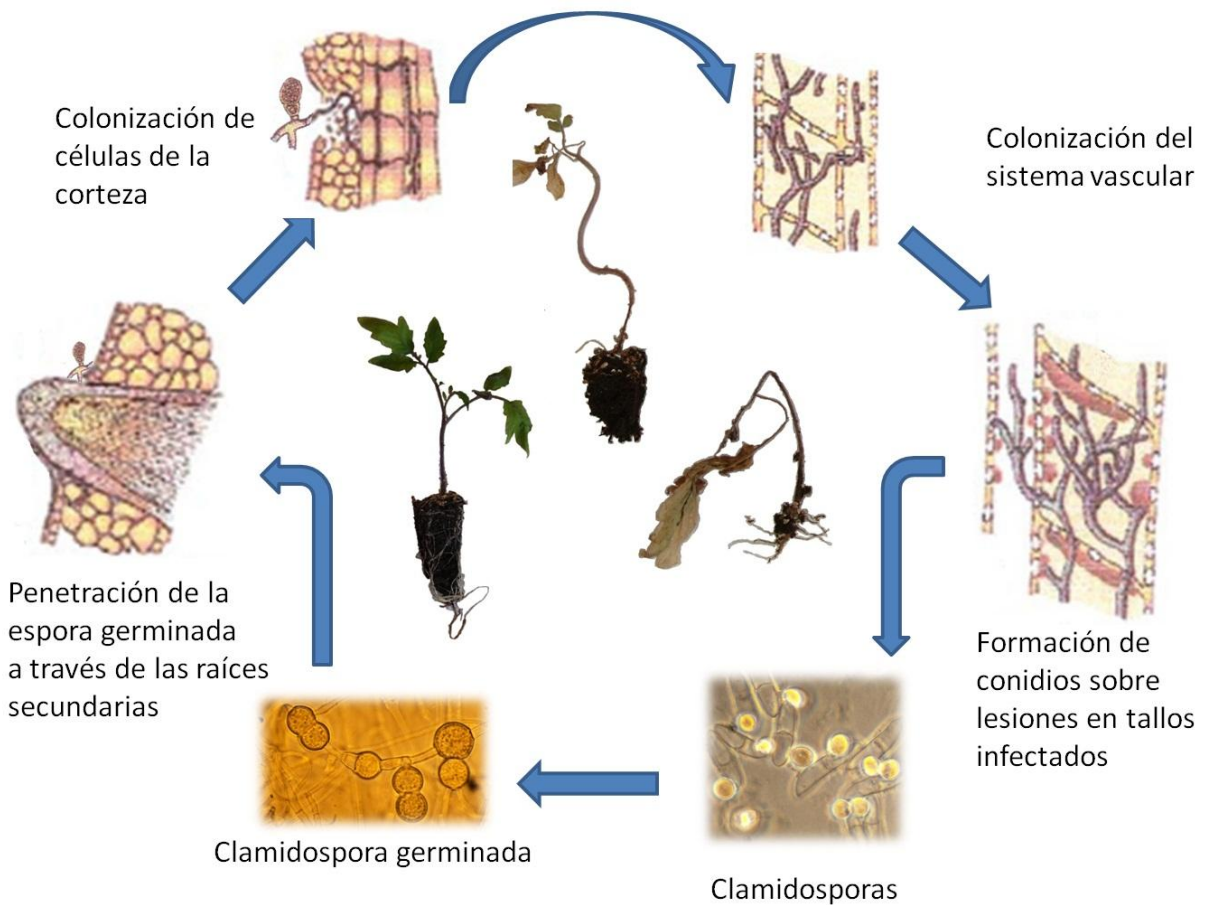


Figura 3. Ciclo biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicle-lycopersici* (Forl). (Modificado de Agrios 2006).

La principal diferencia entre Fol y Forl, en su mecanismo de ataque al hospedante, es que Fol se comporta como un típico patógeno vascular y sistémico, mientras que Forl puede colonizar la corteza ampliamente desde etapas tempranas de la enfermedad (Agrios, 2007).

2.6 Sintomatología causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate

En las plantas de tomate, los síntomas producidos por Forl son distintos a los producidos por los aislamientos de Fol. Un signo característico de la enfermedad, causada por Forl, es la podredumbre que se observa en el sistema radicular, que en el caso más grave afecta en su totalidad a las raíces principal y secundaria. En ocasiones, la médula presenta una podredumbre húmeda de color marrón intenso, que se extiende sobre la zona de transición raíz-cuello. En el tallo también puede aparecer una necrosis que puede llegar hasta la copa (Tello, 1988). El hongo es capaz de infectar a las semillas (Jarvis y Thorpe, 1976), pero la planta infectada experimentalmente, no se marchita normalmente hasta que se producen las condiciones adecuadas para el nacimiento del fruto (Yamamoto *et al.*, 1974). Produce una desintegración extensiva de la pared celular, provocando alteraciones similares a las producidas por otros patógenos vasculares. La podredumbre de la raíz y cuello de la planta es el síntoma principal por Forl, aunque también se puede producir marchitamiento de la planta (Charest *et al.*, 1983).

Forl es capaz de crecer en las paredes celulares del hospedante produciendo su degradación (Charest *et al.*, 1983). Debido a su importancia como patógeno y al tipo de síntomas que provoca en su hospedante, Forl, podría ser un buen modelo para estudiar el papel de las enzimas en el proceso de patogénesis y en la interacción hospedante patógeno.

Los síntomas más notables de Fol ocurren al inicio de la floración, poco después de la formación de los primeros frutos (Beckman, 1987; Mendoza, 1993; Ramírez, 1998). Los síntomas inician con un amarillamiento en las hojas más viejas, extendiéndose a toda la planta y ocasionando una clorosis que a veces se presenta en las hojas de un solo lado de la planta, y en ocasiones solo en la mitad de éstas (Cárdenas, 2000) (Figura 4).



Figura 4. Síntoma de marchitamiento unilateral de los folíolos de una hoja de una planta de tomate invadida por Fol. Foto Apodaca-Sánchez.

Las hojas afectadas se marchitan y mueren, aunque pueden permanecer adheridas al tallo. Si se realiza un corte transversal del tallo, se observa una necrosis vascular de color café en forma de anillo, la cual se extiende hacia la parte apical de la planta de acuerdo con la severidad de la enfermedad, marchitando y matando a las plántulas o plantas adultas (Sánchez, 1998) (Figura 5).



Figura 5. Tallo de tomate cortado longitudinalmente donde se aprecia el daño en el sistema vascular causado por Fol. Foto Apodaca-Sánchez.

Las plantas más viejas pueden marchitarse y morir repentinamente. Sin embargo, comúnmente muestran achaparramiento, epinastia, amarillamiento de las hojas inferiores, marchitez de las hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis marginal de hojas y finalmente la muerte de la planta (Sánchez, 1998).

Los síntomas de la pudrición de la corona y raíz del tomate (PCRT), producida por *Forl* consisten de una pudrición radical caracterizada en algunos casos por coloración púrpura en el sistema radical de la planta (Figura 6) y lesiones necróticas extensivas en el cuello y base del tallo (Figura 7), marchitez y muerte de la planta; también puede provocar secadera de plántulas en invernadero (Jarvis, 1988). Las lesiones necróticas con frecuencia ascienden hasta 30 cm a partir del cuello de la planta y estas mueren generalmente al inicio de la maduración de los frutos (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2001).



Figura 6. Raíz de tomate dañada por *Forl*. Se aprecia coloración púrpura, frecuente en los tejidos invadidos. Foto Apodaca-Sánchez.

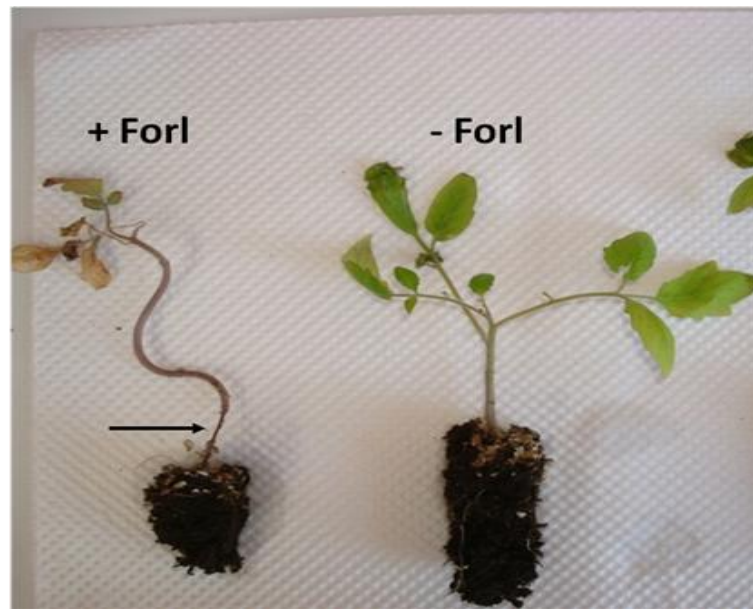


Figura 7. Plántula de tomate cv. Missouri dañada por Forl (izquierda) y sana (derecha).

Parece que estos hongos pudieran atacar a cualquier temperatura del suelo. Hasta hace poco se consideraban estos hongos como parásitos de los suelos ó de los substratos relativamente “fríos” (las temperaturas óptimas reportadas eran de 18 a 20°C) que afectan especialmente a las plantas de cultivo precoz y a las zonas de los cultivos bajo cubierta. En ciertos países, y recientemente en Francia, estas enfermedades han ocurrido con frecuencia en los períodos calurosos en los cuales las temperaturas fueron superiores a 26 °C. La gravedad de la enfermedad también depende de la agresividad de las cepas y parece más importante cuando las raíces han sufrido estrés hídrico durante el cultivo (exceso de agua) o térmico (temperaturas demasiado altas) (Blancard, 2005). En México, se ha reportado que éste hongo presenta una temperatura óptima de desarrollo de 28°C. Las plantas parecen ser particularmente sensibles a la enfermedad cuando necesitan nitrógeno, fósforo y calcio, y cuando están sometidas a días cortos y poco luminosos. Algunas variedades de tomate resistentes a la fusariosis manifiestan a veces síntomas de esta enfermedad, especialmente durante el ataque de nemátodos o cuando las plantas han sufrido asfixias radicales (Blancard, 2000).

Fol y Forl son capaces de afectar el rendimiento en campo del cultivo del tomate hasta en un 50% (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2004).

Se han utilizado un gran número de microorganismos para el biocontrol de Forl, como cepas bacterianas y hongos antagonistas que generalmente pertenecen a los géneros: *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* así como cepas no patogénicas de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. (Bolwerk, 2005).

2.7 Mecanismos de acción de microorganismos antagonistas

Los mecanismos de acción, mediante los cuales los microorganismos antagonistas afectan a las enfermedades causadas por fitopatógenos, son: competencia, mico parasitismo, inducción de mecanismos de resistencia y antibiosis, (Goldman *et al.*, 1994; Benhamou *et al.*, 1997; Michel, 2006; Punja, 1997). Estos mecanismos no son recíprocamente excluyentes, y aunque alguno de ellos puede actuar como mecanismo principal, también pueden funcionar en conjunto (Michel, 2006).

2.7.1 Antibiosis

Antibiosis se refiere a la producción, por parte de un microorganismo, de sustancias tóxicas que inhiben o destruyen estructuras de la pared celular o atacan diferentes mecanismos celulares importantes en los organismos sensibles. En el caso de las bacterias antagonistas que producen antibióticos como las iturinas, bacilomicinas y micosubtilinas (Stein, 2005), estas disuelven o dañan polímeros estructurales de pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos; tales como quitina y β -1-3-glucanos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman *et al.*, 1994; Michel, 2006).

Para el caso de bacterias antagonistas del género *Bacillus*, se ha encontrado que existe la producción de una amplia variedad de sustancias tóxicas, que sustentan el uso de este género como un poderoso agente de control biológico. De

acuerdo con el estado actual de conocimiento, se sabe que hay varios mecanismos que pueden explicar el desarrollo de las plantas por bacterias que existen en la rizosfera. Uno de los aspectos principales de esta estimulación es sin duda, la supresión de las enfermedades causadas por fitopatógenos (Toure *et al.*, 2004). La producción de agentes anti microbiales por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV o PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) tiene un importante papel (Leclere *et al.*, 2005). Se ha detectado que *Bacillus subtilis*, el representante más común de este género, tiene amplias propiedades de supresión *in vitro* de más de 23 tipos de fitopatógenos, debido a su capacidad para producir una gran abundancia de antibióticos (Stein, 2005).

Una fracción importante de los antibióticos producidos por *B. subtilis* son lipopéptidos de la familia de la iturina (Figura 8), que muestran una potente actividad antifúngica y suprime el crecimiento de una amplia gama de fitopatógenos (Toure *et al.*, 2004). Las iturinas son producidas por *B. subtilis* y generalmente por otras especies del mismo género como *B. amyloliquefaciens* (Suoto *et al.*, 2004). El grupo de las iturinas comprende las bacilomicinas D, F y L, iturinas A-E y las micosubtilinas (Stein, 2005). Todas estas moléculas interrumpen la formación de la membrana plasmática, por la formación de pequeñas vesículas y por la liberación de electrolitos de alto peso molecular que degradan fosfolípidos (Maget-Dana & Peypoux, 1994). La sobreproducción de micosubtilina, uno de los miembros más conocidos de la familia de las iturinas, por el género *Bacillus*, tiene importantes propiedades antagónicas frente a hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *F. oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* (Leclere *et al.*, 2005). El momento óptimo de crecimiento para la obtención de micosubtilina, ocurre durante la transición entre el crecimiento exponencial y el inicio de la fase estacionaria, que es cuando se observa una producción máxima de esta molécula (Toure *et al.*, 2004)

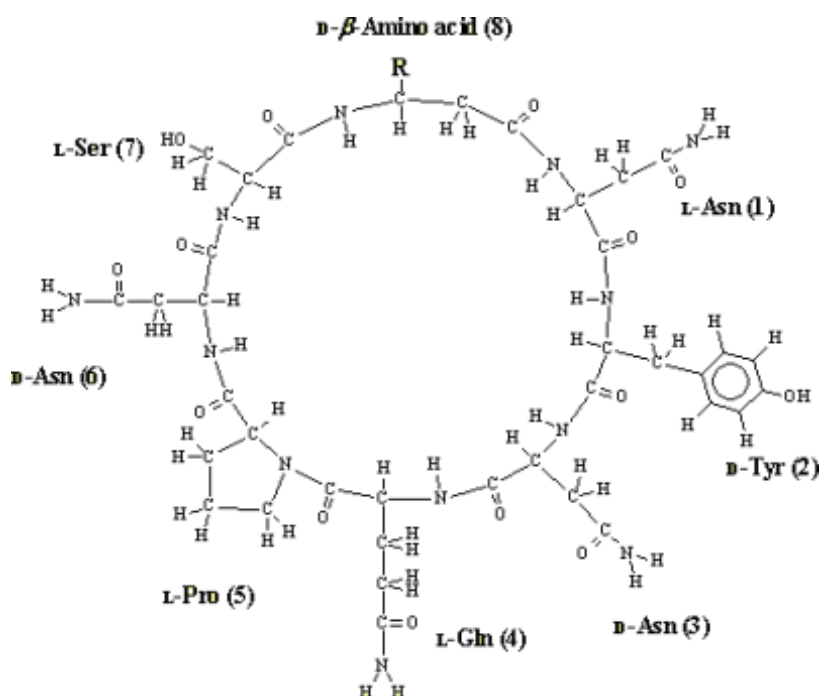


Figura 8. Estructura química de la iturina (Le Gall, 2005).

2.8 Uso de *Bacillus* spp. como agente de biocontrol

El género *Bacillus* posee características especiales, entre las que destaca la formación de endosporas resistentes a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos grasos y los desinfectantes químicos. Estas estructuras le conceden la posibilidad de ocupar un lugar importante, como agentes de control biológico. Habitualmente, se localizan en el suelo y constituyen parte de la rizosfera de las plantas. Se comportan como colonizadores eficaces, debido a que son productoras de sustancias como hormonas, antibióticos y otros metabolitos, que le proporcionan la capacidad de conquistar determinados ambientes agrícolas y, por ende, impiden el establecimiento de microorganismos patógenos (Todar, 2003). En relación con el biocontrol, específicamente de *F. oxysporum*, se han realizado trabajos donde se ha demostrado su eficacia. Dentro de estas investigaciones se pueden mencionar los siguientes trabajos:

1. Mojica-Marín *et al.* (2009). Determinaron la capacidad antagónica de 64 cepas de *Bacillus thuringiensis* sobre *Rhizoctonia solani* Kühn, *Phytophthora capsici* y *F. oxysporum* mediante cultivos duales en placas Petri. Las cepas de *B. thuringiensis* provinieron de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Dieciséis cepas de *B. thuringiensis* redujeron significativamente el crecimiento micelial de *R. solani*, 19 de *P. capsici* y ocho de *F. oxysporum*; de éstas últimas las cepas GM-23 (43.02%) y HD-121 (42.04%) fueron las mejores. Por otra parte, las mejores cepas bacterianas se evaluaron en semillas de chile variedad Anaheim mediante pruebas de germinación bajo condiciones *in vivo*. Se observó un incremento en el porcentaje de germinación en el caso del tratamiento de inoculación con *B. thuringiensis* sobre *R. solani*.
2. Guillén-Cruz *et al.* (2006). Probaron a *Bacillus* spp. como agente de biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *R. solani* y *P. capsici*, y su efecto en el desarrollo y el rendimiento del cultivo de chile. Los objetivos de esta investigación fueron conocer el potencial de biocontrol en campo de cuatro aislados de *Bacillus* y la mezcla de éstos (B1, B3, B9 y B13) sobre los patógenos causantes de pudrición de raíz, así como su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile. Las bacterias inoculadas incrementaron la altura de la planta un 20% y el rendimiento al final del cultivo en 270%. También, se redujo la incidencia en 80% y la severidad en 39% de la pudrición de raíz, respecto al testigo. El aislado de *Bacillus* B1 se identificó como *Bacillus amyloliquefaciens*, B3 como *B. licheniformis* y B9 y B13 como *B. subtilis*. Las plantas tratadas con el aislado B13 presentaron mayor altura con un 20% más respecto al testigo y 14% respecto al tratamiento tradicional, lo cual sugiere también un efecto promotor de crecimiento vegetal para estos aislados.

2.9 Trabajo previo del grupo de Ecología Molecular de la Rizosfera del CIIDIR-Sinaloa

Anteriormente se obtuvo un banco de microorganismos de suelo asociados a la rizosfera de tomate con 705 aislados, los cuales fueron criopreservados a -70 °C (Cordero-Ramírez *et al.*, 2011).

En la segunda etapa, se descongelaron un total de 254 especímenes del banco de germoplasma y se utilizaron 231 muestras que resultaron viables *in vitro* e *in planta* a nivel laboratorio, seleccionándose potenciales antagonistas del patógeno (Forl). De la prueba *in vitro* los tratamientos que mostraron un nivel alto de inhibición fueron los aislados 144, 145, 160, 162, 163, 164, 168, y 758. Posteriormente se realizó una prueba *in planta*, determinando que los mejores aislados fueron el 144, 145, 151, y 171 (Cordero-Ramírez, 2008; artículo en preparación).

Durante el presente trabajo de tesis se propuso realizar las pruebas en invernadero a nivel semillero y rizoconos para probar los antagonistas seleccionados 144, 145, 151 y 171. Además se probaron los aislados 162 y 163 cuyos niveles de protección contra Forl *in vitro* fueron intermedios, y los aislados 167, 537 y 758 los cuales no presentaron protección alguna contra Forl (*in planta*) pero si hubo un efecto significativo a nivel *in vitro*.

En la Tabla 1 se describe el género y especie de las bacterias utilizadas en este trabajo además de su nivel de protección a Forl en estudio previo (Cordero-Ramírez, 2008; en preparación, 2011).

Tabla 1. Bacterias seleccionadas como potenciales antagonistas a Forl en pruebas *in vitro* e *in planta* en placa Petri. Tomado de Cordero-Ramírez, 2008.

Aislado	Nombre científico	Severidad (%)	Nivel de inhibición <i>in vitro</i>
144	<i>Bacillus subtilis</i>	6.68	Alto
145	<i>B. subtilis</i>	6.45	Alto
151	<i>B. subtilis</i>	7.33	Alto
171	<i>B. cereus</i>	5.66	Alto
162	<i>B. subtilis</i>	15.75	Intermedio
163	<i>B. subtilis</i>	16.58	Intermedio
167	<i>B. subtilis</i>	27.74	Bajo
537	<i>B. thuringiensis</i>	21.6	Bajo
758	<i>B. megaterium</i>	35.07	Bajo

Los microorganismos que muestran niveles bajos de inhibición del patógeno en la prueba *in vitro* Forl, pudieran tener una respuesta diferencial en los bioensayos *in planta*. En condiciones de crecimiento en una placa Petri con los organismos aislados no siempre se tienen todos los elementos que los microorganismos necesitan para su buen funcionamiento. Las plantas proveen a los microorganismos de metabolitos presentes en los exudados radicales que pueden ayudar a los mismos a establecer un mecanismo efectivo de combate, contra ciertos patógenos para la planta (Marilley *et al.*, 1999). Esta interacción no está presente y no puede ser evaluada en el ensayo microorganismo vs. microorganismo, por lo que el ensayo con plántulas de tomate es indispensable pues es en este sistema donde se pueden evaluar este tipo de interacciones.

III. Justificación

El tomate es una de las hortalizas más importantes en México, por su alta aportación al sector socioeconómico, ya que es generador de empleos, y de riqueza para México. No obstante, uno de los problemas más graves que afecta a este cultivo son las enfermedades causadas por los hongos Forl y Fol, las cuales limitan el desarrollo y producción de este cultivo, ocasionando pérdidas significativas para los productores.

El uso de híbridos resistentes para la producción de tomate no siempre es la mejor opción para satisfacer las demandas del consumidor y del mercado. El empleo de agroquímicos para el control de Forl, ha sido una opción utilizada por los agricultores sin éxito. Sin embargo, se ha demostrado que el uso irracional de estos productos tiene un efecto negativo a la salud de los consumidores por su residualidad en algunos casos, además de afectar la homeostasis ecológica que existe en la rizosfera del cultivo.

Para reducir el efecto negativo al medio ambiente por el uso de estos químicos, se ha intentado utilizar productos comerciales para el control biológico, los cuales no han sido efectivos, ya que son elaborados con cepas provenientes de otras regiones edafo-geográficas. Todo esto nos indica que existe la necesidad de encontrar una alternativa de control biológico que sea particular a nuestra región.

En la actualidad se está recurriendo al manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE), el cual se asocia con las prácticas de control biológico en cultivos de significancia económica. El uso de bacterias antagonistas para el tratamiento de Forl en Sinaloa, se ha estudiado y documentado poco.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar aislados de la rizosfera de tomate (*Bacillus* spp.) seleccionados anteriormente en trabajo *in vitro* e *in planta* como potenciales antagonistas contra *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* bajo condiciones de cámaras de crecimiento e invernadero.

4.2 Objetivos específicos

1. Probar el efecto antagonista de nueve bacterias seleccionadas *in vitro* e *in planta*, sobre la PCRT causada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en semillero.
2. Conocer la cinética de crecimiento de los aislados 144, 145 y 537 para determinar el tiempo adecuado para su inoculación.
3. Probar el efecto antagonista de las bacterias seleccionadas a nivel semillero sobre la PCRT causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en rizoconos.
4. Determinar la compatibilidad entre aislados 145 y 537 para conocer si pueden aplicarse en conjunto como tratamiento.

V. Hipótesis

El comportamiento de *Bacillus* spp. evaluado *in vitro* e *in planta* previamente analizado contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* presentará un comportamiento diferente en su severidad en condiciones de cámara de crecimiento e invernadero.

VI. Materiales y métodos

6.1 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en semillero

Para realizar estas pruebas, se utilizaron semillas de tomate var. Missouri (Seminis ®), susceptible a éste patógeno que se esterilizaron superficialmente lavándolas con etanol al 70% por 2 minutos. Luego se lavaron con hipoclorito al 0.05% durante 10 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril cinco veces durante 1 minuto.

Las charolas se lavaron por inmersión con una solución 1:10 de hipoclorito de sodio (Cloralex ® 5.25%) por 12 hrs. Luego se enjuagaron cinco veces con abundante agua potable. Para eliminar posibles contaminantes, las charolas se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 30 minutos con una presión 1.5 kg/cm². Se utilizó como sustrato “peat most” (turba) Kekkila ®, y para cubrir la semilla sembrada se utilizó vermiculita. Los tratamientos por triplicado (Tabla 2) que se utilizaron en los bioensayos uno y dos *in planta* de Forl, se asignaron de acuerdo a la figura 9. Se utilizaron semilleros de plástico, fraccionados en unidades experimentales para cuatro plántulas.

6.1.1 Reactivación de bacterias antagonistas en medio líquido LB para la prueba en semillero

Se utilizaron nueve bacterias previamente seleccionadas (Cordero-Ramírez, 2008) como potenciales antagonistas, en base a diferentes niveles de inhibición en pruebas *in vitro* e *in planta* (Tabla 1) en placa Petri (Cordero-Ramírez, 2008), para realizar dos bioensayos de selección y efectuar un tercer bioensayo con los tres mejores aislados. Para el bioensayo uno y dos, a partir del banco de germoplasma, preservado en el ultra congelador a -70°C estas bacterias se tomaron, realizando un raspado con un asa bacteriológica de un criovial de 0.6 ml, para obtener un

fragmento de hielo, mismo que se sembró en cajas Petri con medio sólido LB. Las placas Petri se incubaron durante 24 hrs a 25°C.

Posteriormente, a partir de los cultivos de 24 h, se tomó una colonia con un pica-dientes estéril y se colocó en matraces de 125 ml con 50 ml de medio líquido LB; se incubaron a 25°C en agitación orbital constante (200 rpm) durante 17 horas para los bioensayos uno y dos. Una vez obtenido crecimiento de las bacterias, éstas se centrifugaron a 5000 g por 10 minutos (Beckman, Microfuge 8) para empastillar la suspensión de bacterias. Posteriormente, se re-suspendió la pastilla en H₂O destilada estéril para la inoculación de plántulas al día de emergencia.

Para realizar el bioensayo tres, antes se realizó una curva de crecimiento (cinética) para cosechar durante su fase exponencial-estacionaria (descrita en la sección 6.2). El proceso de inoculación fue similar al utilizado en los bioensayos uno y dos.

Tabla 2. Aislados bacterianos probados contra *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en los experimentos uno y dos, realizados en plántulas de tomate cv. Missouri en semillero.

Controles	Tratamientos (+Forl)
Control absoluto (-Forl)	Control de patogenicidad (+Forl)
Control de efecto del aislado	
144	144
145	145
151	151
162	162
163	163
167	167
171	171
537	537
758	758

6.1.2 Obtención y siembra del inóculo Forl.

Se utilizó el aislado 1045 de Forl, proporcionado por el Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez, que se mantenía en un ultra congelador a -70°C. A partir de un tubo congelado, se raspó con un asa bacteriológica fragmentos del material fúngico, que se sembraron en 40 placas Petri con medio PDA. Las placas se incubaron a 25°C durante cuatro semanas, para obtener esporulación de Forl (microconidios) en cantidad suficiente para la prueba de patogenicidad.

Los tratamientos (Tabla 3) que se utilizaron en el bioensayo tres *in planta* de Forl en semillero, se asignó de acuerdo a la figura 10.

Tabla 3. Aislados bacterianos probados contra *F. o. f. sp. radicis-lycopersici* en el experimento tres, realizado en plántulas de tomate cv. Missouri en semillero.

Controles	Tratamientos (+ Forl)
Control absoluto (- Forl)	Control de patogenicidad (+ Forl)
Control de efecto del aislado	
144	144
145	145
537	537

En los tres bioensayos, una vez realizada la siembra, se colocaron las charolas en una cámara de crecimiento (Binder®) con 12 horas luz a 25°C y 12 horas oscuridad a 22°C. La intensidad lumínica se mantuvo a 450 lúmenes de acuerdo a lo sugerido (400-650 lúmenes) por Mojarro, (2008). Al emerger la plántula (5 días después de la siembra) se inocularon con los aislados 144 y 145 con una concentración de 6.6×10^6 UFC/ml (0.6074 O.D.) y 537 con una concentración de 1.3×10^8 UFC/ml (0.8914 O.D.). La inoculación se realizó de acuerdo a la distribución que se le asignó al diseño experimental completamente al azar. A los 10 días después de inocular con las bacterias, se realizó la inoculación con Forl.

Para obtener el inóculo fúngico, se tomaron las placas Petri previamente sembradas con Forl y se suspendieron las esporas en agua destilada estéril, frotando suavemente la superficie de la colonia con la ayuda de un triángulo de acero inoxidable. Se preparó una dilución conidial 1:10 y se estimó su concentración mediante una cámara de Neubauer. Cada plántula se inoculó con 1 ml de 1×10^6 microconidios. Las plántulas se regaron dos veces al día, una por la mañana y otra por la tarde. Las plántulas se fertilizaron con la solución de Steiner modificada (Tabla 4). Todas las soluciones Stock se prepararon a 1X.

Tabla 4. Solución Steiner modificada, de acuerdo con Snyder (2006).

Compuesto	mg/L	Solución stock (ml/L)
Fosfato de Potasio (KH_2PO_4)	136	1
Sulfato de Potasio (K_2SO_4)	87	3
Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)	91	9
Sulfato de Magnesio ($\text{Mg}(\text{SO}_4)$)	123	4
Nitrato de Potasio (KNO_3)	101	3

CONTROLES (-Forl)									
162	162	151	151	171	171	145	145	163	163
162	162	151	151	171	171	145	145	163	163
167	167	144	144	CTL	CTL	167	167	537	537
167	167	144	144	CTL	CTL	167	167	537	537
163	163	537	537	145	145	758	758	151	151
163	163	537	537	145	145	758	758	151	151
171	171	162	162	163	163	151	151	758	758
171	171	162	162	163	163	151	151	758	758
144	144	758	758	CTL	CTL	145	145	144	144
144	144	758	758	CTL	CTL	145	145	144	144
CONTROLES (-Forl)					TRATAMIENTOS (+Forl)				
537	537				537	537			
537	537				537	537			
167	167				167	167			
167	167				167	167			
162	162				162	162			
162	162				162	162			
CTL	CTL				CTL	CTL			
CTL	CTL				CTL	CTL			
171	171				171	171			
171	171				171	171			
TRATAMIENTOS (+Forl)									
162	162	151	151	171	171	145	145	163	163
162	162	151	151	171	171	145	145	163	163
167	167	144	144	CTL	CTL	167	167	537	537
167	167	144	144	CTL	CTL	167	167	537	537
163	163	537	537	145	145	758	758	151	151
163	163	537	537	145	145	758	758	151	151
171	171	162	162	163	163	151	151	758	758
171	171	162	162	163	163	151	151	758	758
144	144	758	758	CTL	CTL	145	145	144	144
144	144	758	758	CTL	CTL	145	145	144	144

Figura 9. Distribución aleatoria de las unidades experimentales correspondientes a los diferentes tratamientos, arreglados bajo un diseño completamente al azar en los Bioensayos 1 y 2 en cámara de crecimiento. Controles indica - Forl; Tratamientos indica + Forl. CTL indica control absoluto en el caso donde no se adiciona Forl y en donde se indica adición de Forl se refiere a control de patogenicidad.

CONTROLES

144	144	537	537	144	144	145	145
144	144	537	537	144	144	145	145
CTL	CTL	145	145	CTL	CTL	537	537
CTL	CTL	145	145	CTL	CTL	537	537
537	537	144	144	145	145	144	144
537	537	144	144	145	145	144	144
CTL	CTL	145	145	537	537	CTL	CTL
CTL	CTL	145	145	537	537	CTL	CTL

TRATAMIENTOS

144	144	537	537	144	144	145	145
144	144	537	537	144	144	145	145
CTL	CTL	145	145	CTL	CTL	537	537
CTL	CTL	145	145	CTL	CTL	537	537
537	537	144	144	145	145	144	144
537	537	144	144	145	145	144	144
CTL	CTL	145	145	537	537	CTL	CTL
CTL	CTL	145	145	537	537	CTL	CTL

Figura 10. Distribución aleatoria de las unidades experimentales correspondientes a los diferentes tratamientos arreglados bajo un diseño completamente al azar en el Bioensayo 3 en cámara de crecimiento. Controles indica – Forl; Tratamientos indica + Forl. CTL indica control absoluto en el caso donde no se adiciona Forl y en donde se indica adición de Forl se refiere a control de patogenicidad.

6.1.3 Eficacia bioprotectora de los antagonistas contra Forl en semilleros

La eficacia bioprotectora contra Forl, se estimó en función de las variables: altura de la planta, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz y severidad de los síntomas. La severidad se estimó mediante la escala reportada por Wang *et al.* (2000) (Tabla 5).

Los datos originales de nivel de daño, se transformaron en base logarítmica para su posterior análisis de varianza (ANOVA); con una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). En base a los resultados obtenidos en los ensayos uno y dos, se escogieron las tres bacterias que sobresalieron con una mayor inhibición del desarrollo de Forl.

Tabla 5. Escala de severidad de la PCRT causada por Forl en plántulas de tomate utilizada en este trabajo para evaluar los tratamientos (Wang y Jeffers, 2000).

Nivel de Severidad	Síntomas observables
0	Ningún efecto sobre coloración en la raíz
1	Ligera decoloración del tejido vascular en la raíz
2	Decoloración extensiva del tejido vascular de la raíz
3	Ligera decoloración del tejido vascular y córtex en la corona del tallo
4	Decoloración extensiva del tejido vascular y córtex en la corona del tallo
5	Necrosamiento completo de la corona

El porcentaje de severidad por tratamiento se obtuvo con la fórmula de Townsend and Heuberger, (1943), la cual se describe a continuación:

$$\text{SEVERIDAD (\%)} = \left[\frac{\sum(n * t)}{5 * N} \right] * 100$$

n = número de plántulas de cada categoría.

t = valor numérico de acuerdo a la escala asignada por categoría.

5 = valor máximo de la escala de severidad.

N = número total de plántulas por unidad experimental.

6.2 Cinética de crecimiento de los aislados

Se realizó una cinética de crecimiento bacteriano midiendo cada dos horas la densidad óptica (O.D. por sus siglas en inglés) a 595 nm en un lector multimodal (Beckman dtx880). Se utilizaron los tres aislados (144, 145 y 537), que mostraron ser más promisorios en los ensayos 1 y 2. Para iniciar, se tomaron las bacterias del ultra congelador a -70°C. Posteriormente se raspó con un asa bacteriológica para obtener un fragmento de hielo y se sembró en cajas Petri con medio sólido LB, donde se colocaron a crecer durante 24 hrs en incubadora a 25°C. Consecutivamente, estas bacterias se sembraron en 5 ml de medio líquido LB contenidos en tubos de 15 ml y se incubaron a 25°C en agitación orbital constante (200 rpm). Posteriormente se tomó 1 ml y se inocularon matraces de 125 ml con 50 ml de medio líquido LB y se incubaron a 25°C en agitación orbital constante (200 rpm), siendo este momento el tiempo cero. Posteriormente cada dos horas se realizaron muestras, concluyendo a las 26 horas.

6.3 Pruebas de antagonismo en rizocono

Se utilizaron los dos aislados antagonistas 145 y 537 (A y B correspondientemente) para la prueba en rizoconos. El método de reactivación de las bacterias fue el mismo que se mencionó en los bioensayos de semillero. Es pertinente señalar que antes de realizar el tercer bioensayo, se realizó una prueba de compatibilidad *in vitro* entre estos dos aislados (sección 6.4). El inóculo de Forl se obtuvo empleando la misma metodología del experimento de semillero.

En los tres bioensayos se probaron las dos bacterias seleccionadas de los bioensayos anteriores contra Forl para analizar el efecto antagonista de los aislados en la siguiente etapa de producción de plantas de tomate.

Para realizar esta prueba, las plántulas de tomate se trasplantaron en recipientes llamados rizoconos, que puede contener 125 gr de suelo, colocados en una estructura cubierta con malla antiáfido. La preparación de semilla, su esterilización superficial, así como la preparación de sustrato, se realizó de manera similar a los bioensayos en semillero.

La inoculación de los antagonistas para estos bioensayos fue en su medio de cultivo donde fueron crecidos (LB). Se empleó un diseño completamente al azar para los tratamientos (Tablas 6 y 7) que se utilizaron en los tres bioensayos en rizoconos.

Para el bioensayo uno, se montaron en las charolas tres repeticiones con cuatro plantas cada una (Figura 11).

Para los bioensayos dos y tres, se montaron en cada charola, dos repeticiones con seis plantas cada una (Figura 12).

Tabla 6. Tratamientos utilizados en los experimentos uno y dos de rizoconos.

Controles	Tratamientos (+Forl)
Control absoluto (-Forl)	Control de patogenicidad (+Forl)
Control del efecto del aislado	
145	145
537	537
145 + 537	145 + 537

Tabla 7. Tratamientos utilizados en el experimento tres de rizocono.

Controles	Tratamientos (+Forl)
Control absoluto (-Forl)	Control de patogenicidad (+Forl)
Control del efecto del aislado	
145	145
537	537
Control medio LB	
(- Forl y + Forl)	

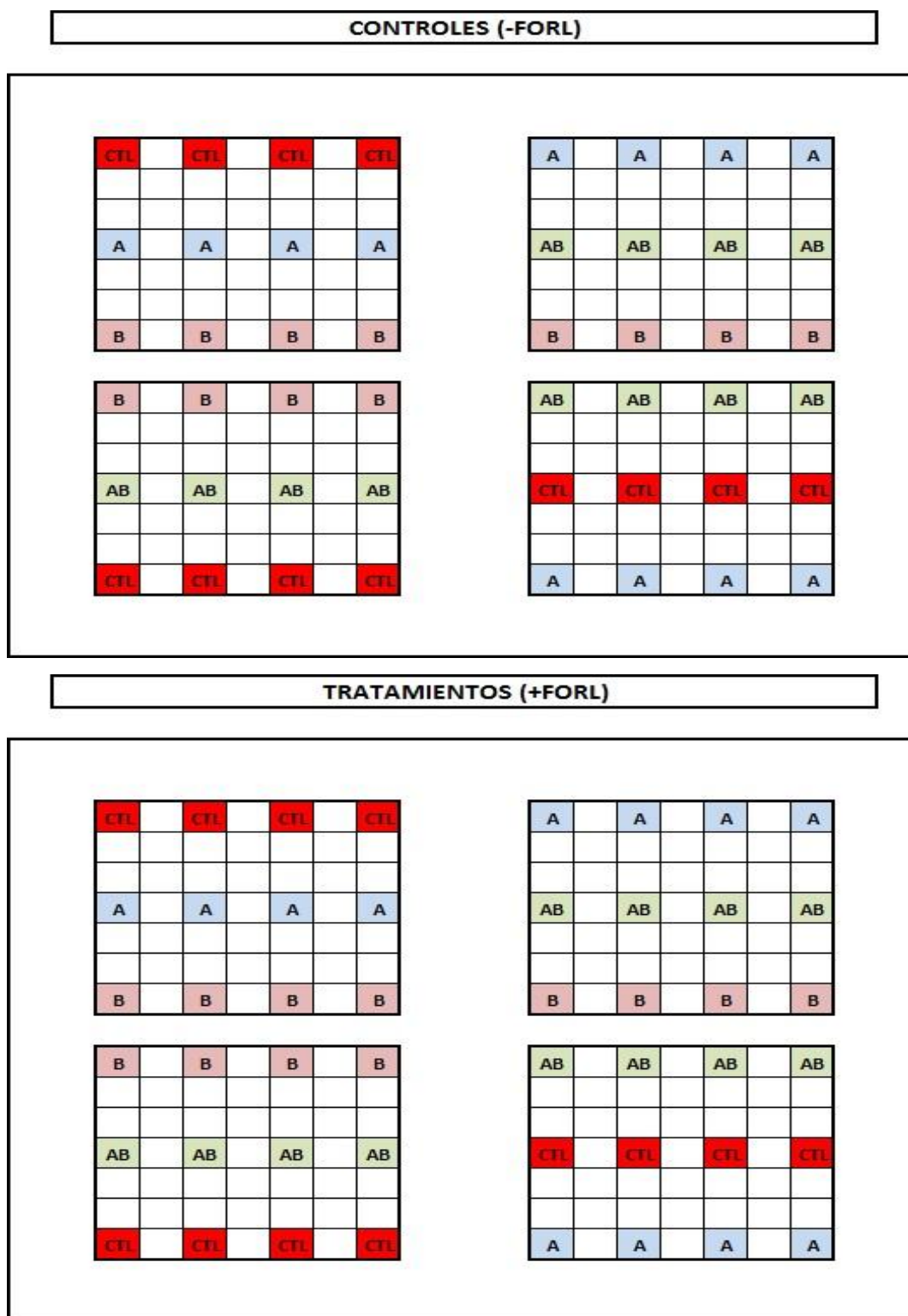


Figura 11. Distribución aleatoria de las unidades experimentales correspondientes a los diferentes tratamientos, arreglados bajo un diseño completamente al azar en el bioensayo uno de rizoconos en condiciones de invernadero.

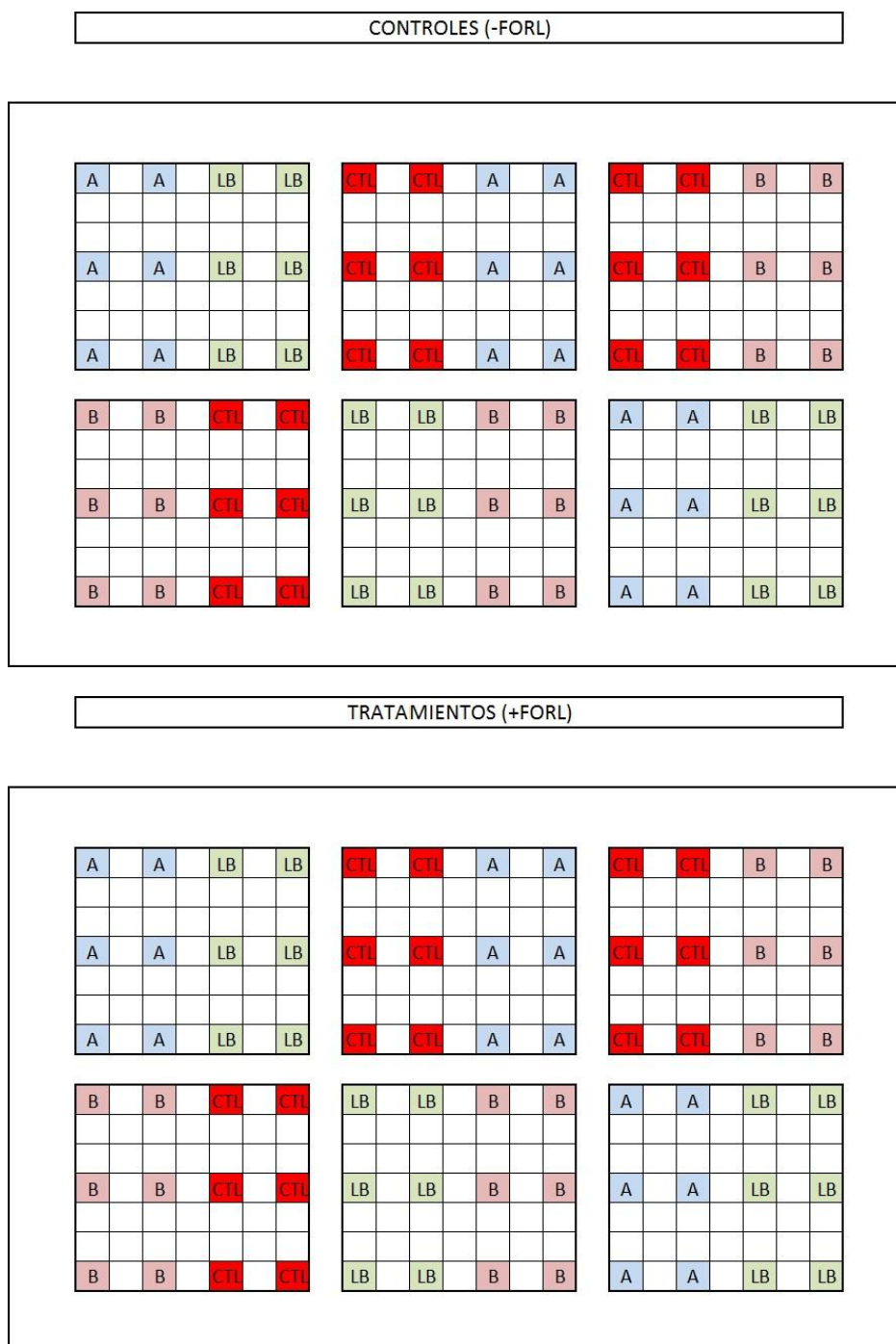


Figura 12. Distribución aleatoria de las unidades experimentales correspondientes a los diferentes tratamientos arreglados bajo un diseño completamente al azar en los bioensayos dos y tres de rizocono en condiciones de invernadero.

La siembra se realizó en charolas de germinación (semilleros) (Tabla 8) y la inoculación con los aislados bacterianos se realizó al día de la emergencia de las plántulas, esto es aproximadamente cinco días después de siembra (dds). A los 35 dds se trasplantaron a los rizoconos, y estos se colocaron en el invernadero. Un día después del trasplante, se inocularon 1×10^6 microconidios de Forl en la base del tallo de cada planta. Las plantas se regaron una vez por día, alternando los riegos con solución nutritiva Superfos® de GBM® (10 ml/día) y solo con agua.

Tabla 8. Fechas de siembra y temperaturas promedio de los bioensayos en rizocono

Bioensayos	Fecha		Temperatura	
	Inicio	Fin	Máxima	Mínima
1	13 noviembre 2010	12 enero 2011	30°C	2°C
2	24 noviembre 2010	20 enero 2011	30°C	2°C
3	01 marzo 2011	29 abril 2011	39°C	15°C

Las variables estimadas que se emplearon para determinar el mejor tratamiento fueron: altura de la planta, peso seco de parte aérea y raíz y la severidad de la PCRT, esta última de acuerdo a la escala reportada por Validov *et al.*, 2009 (Tabla 9). El tratamiento estadístico fue idéntico al análisis de los experimentos en semillero.

Tabla 9. Escala de severidad de la PCRT causada por Forl en plántulas de tomate utilizada en este trabajo para evaluar los tratamientos en los experimentos en rizocono

(Validov *et al.*, 2009)

Nivel de Severidad	Síntomas observables
0	Planta sana
1	Plantas con pequeñas lesiones
2	Plantas con lesiones desarrolladas
3	Plantas muertas

6.4 Prueba de compatibilidad entre aislados

Se realizó una prueba de compatibilidad entre los aislados 145 y 537 para determinar si pueden mezclarse como un posible tratamiento potencial. Se realizó el crecimiento de los aislados hasta el punto determinado para inoculación de plántulas del mismo modo descrito anteriormente (Sección 6.2). Del matraz se tomaron 100 µl de cada aislado y se colocaron en una placa Petri en cada extremo. La medición se realizó a los 7 días de la siembra de los aislados en placa Petri. El criterio usado para compatibilidad es si estos dos aislados pudieran crecer y entrar en contacto uno con el otro.

VII. Resultados

7.1 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en semillero

7.1.1 Bioensayo 1

En el bioensayo 1 a los dos días post inoculación (dpi) de Forl, las plantas inoculadas sólo con Forl (control de patogenicidad), empezaron a mostrar una pudrición de la corona, síntoma característico de Forl (Figura 13).

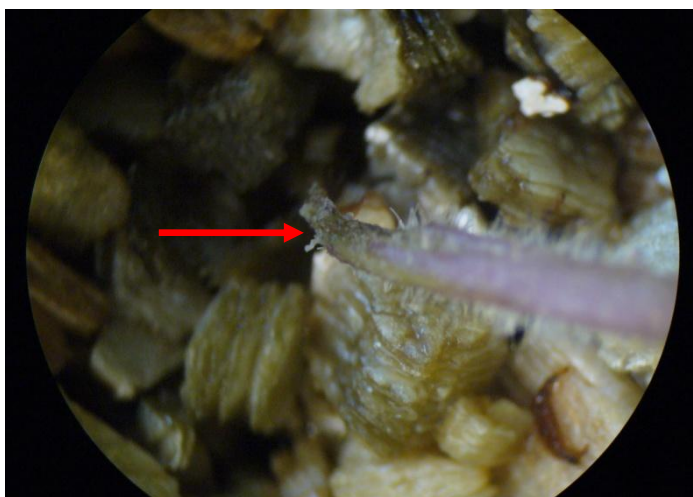


Figura 13. Pudrición de la corona en plántula de tomate 2 dpi. La flecha indica el síntoma característico de pudrición causado por Forl en la base del tallo de la plántula. Foto Lugo-Martínez, 2010.

En el bioensayo 1 (Figura 14) el análisis de varianza indicó que el aislado *Bacillus subtilis* (144), es significativamente antagonista contra Forl pues las plantas inoculadas con este aislado presentaron una severidad del 13%, lo que significó una protección contra PCRT del 87% a los 30 dpi con Forl. También, las plantas inoculadas con los aislados 145, 163, 167 y 171 presentaron una severidad del 56, 45, 42 y 54%, lo que significó un efecto inhibitorio intermedio contra Forl, con un nivel de protección de 44, 55, 58 y 46% respectivamente. Los aislados 145, 163 y 167 fueron identificados como *B. subtilis*, y el 171 como *B. cereus* (Cordero-Ramírez,

2008). Los aislados 151, 162, 537 y 758 no fueron diferentes estadísticamente al control con Forl. Los controles bacterianos y el control absoluto no presentaron efectos de severidad de la PCRT (Figura 16).



Figura 14. Efecto protector de aislados bacterianos en plántulas de tomate var. Missouri en semillero. Bioensayo 1. CTL indica control de patogenicidad, esto es, las plántulas inoculadas sólo con Forl. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey. $p \leq 0.05$.

7.1.2 Bioensayo 2

En el bioensayo 2 el control de patogenicidad (+ Forl), empezó a mostrar pudrición de la corona a los 2 dpi con Forl.

El análisis estadístico del ensayo 2 (Figura 15) indicó que el aislado 144, a diferencia del bioensayo 1 en el que mostró 87% de protección, solamente protegió a las plantas de tomate en 29%, aunque no fue significativamente diferente al control (Figura 16). Así también, contrario a los resultados del bioensayo 1, en el ensayo 2 dos aislados (145 y 537) fueron los únicos que mostraron diferencias significativas con el control, ejercieron 50% de protección en la severidad de PCRT. El aislado 537 (Figura 17) previamente había mostrado solamente un 30% de protección al daño y no mostró diferencia significativa con el control de patogenicidad.

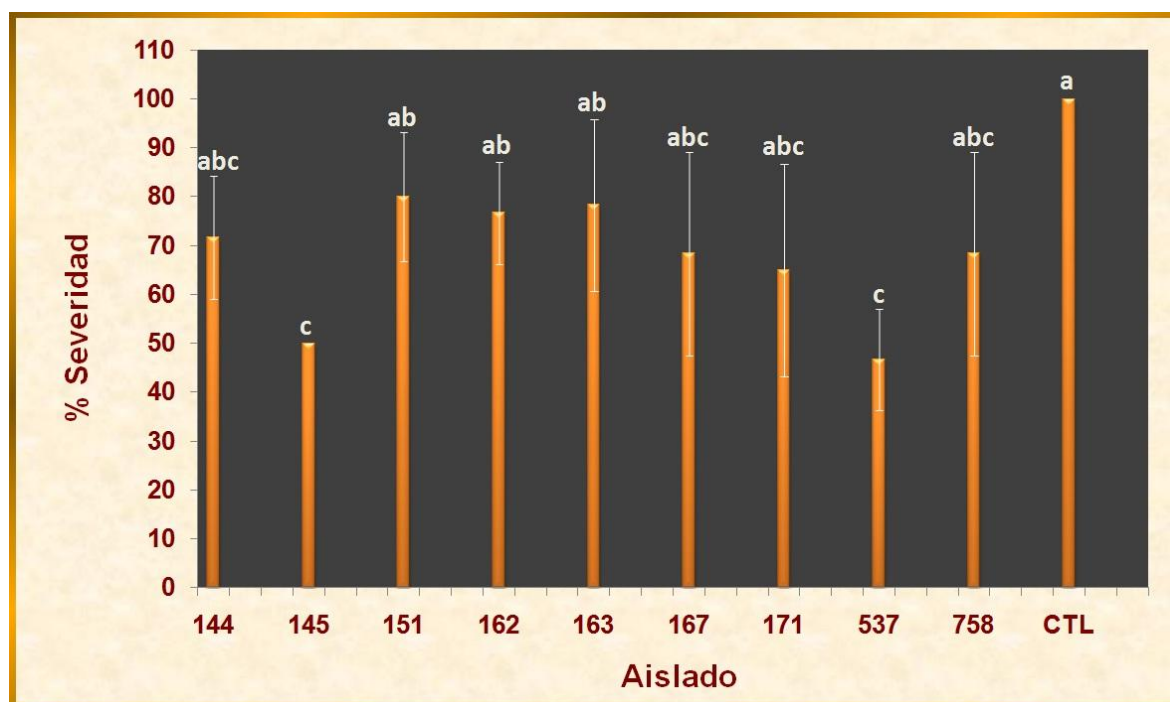


Figura 15. Efecto protector de aislados bacterianos en plántulas de tomate var. Missouri en semillero. Bioensayo 2. CTL indica control de patogenicidad, esto es, las plántulas inoculadas con Forl. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos (Tukey. $p \leq 0.05$).

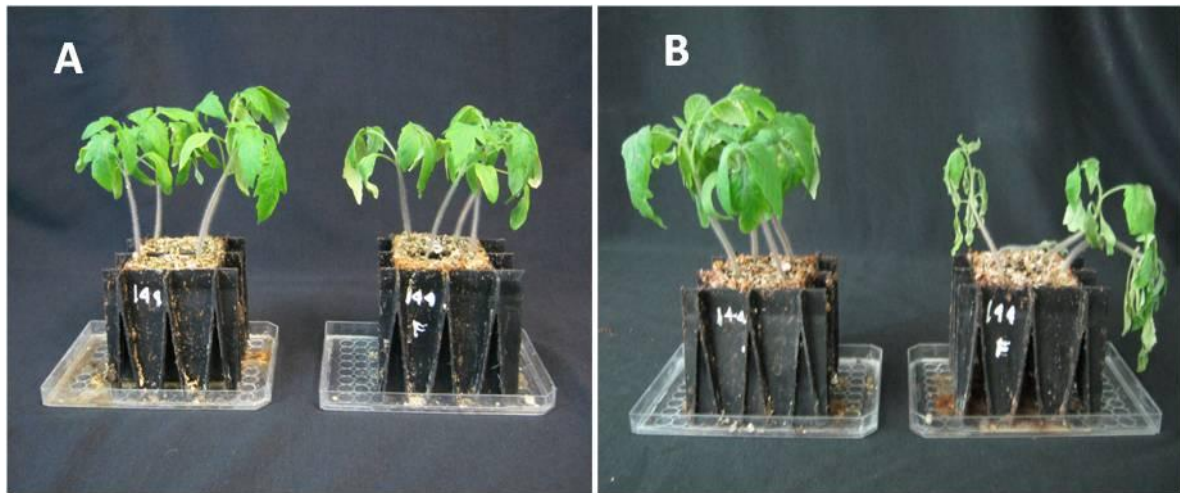


Figura 16. Comparación de tratamientos en los bioensayos 1 y 2 en planta de tomate cv. Missouri a 30 dpi con Forl con el aislado 144. A) Representa una repetición del bioensayo 1, izquierda: - Forl; derecha: + Forl. B) representa una repetición del bioensayo 2, izquierda: - Forl; derecha: + Forl.

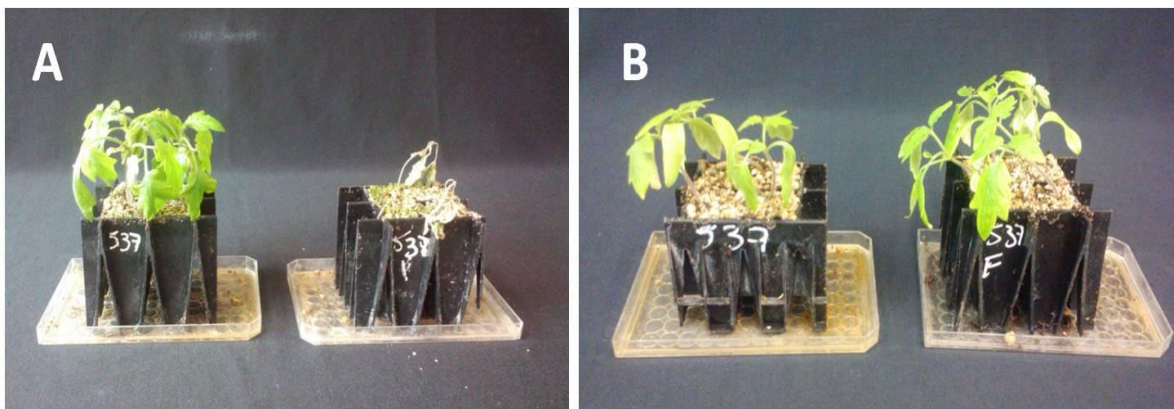


Figura 17. Comparación de tratamientos en los bioensayos 1 y 2 en planta de tomate cv. Missouri a 30 dpi con Forl con el aislado 537. A) Representa a una repetición del bioensayo 1, izquierda: - Forl; derecha: + Forl. B) Representa a una repetición del bioensayo 2, izquierda: - Forl; derecha: + Forl.

7.1.3 Bioensayo 3

Antes de llevar a cabo el bioensayo 3, se realizaron curvas de crecimiento para determinar la cinética de crecimiento de cada uno de los aislados a probar (Figura 20). En particular se requería determinar el momento del fin de la fase exponencial e inicio de la estacionaria, la cual es la fase en la cual se obtiene una mayor producción de los antibióticos y metabolitos secundarios responsables del antagonismo (Toure *et al.*, 2004). Esto nos permitió planear la obtención de los cultivos en esta fase y así aumentar las posibilidades de éxito en cuanto a su potencial antagónico.

En este bioensayo en el que se evaluaron los aislados que mostraron mayor protección a las plántulas en los bioensayos 1 y 2, los cuales fueron: 144, 145 y 537 hubo una tendencia similar que en el bioensayo 2. A partir de los 3 dpi, el control de patogenicidad mostró síntomas de pudrición de la corona. A los 30 dpi, los aislados 145 y 537, disminuyeron la severidad de la PCRT en 40 y 52% respectivamente (Figuras 18 y 19).



Figura 18. Efecto protector de tres aislados bacterianos en plántulas de tomate var. Missouri en semillero contra Forl (Bioensayo 3). CTL indica control de patogenicidad, esto es, las plántulas inoculadas con Forl. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

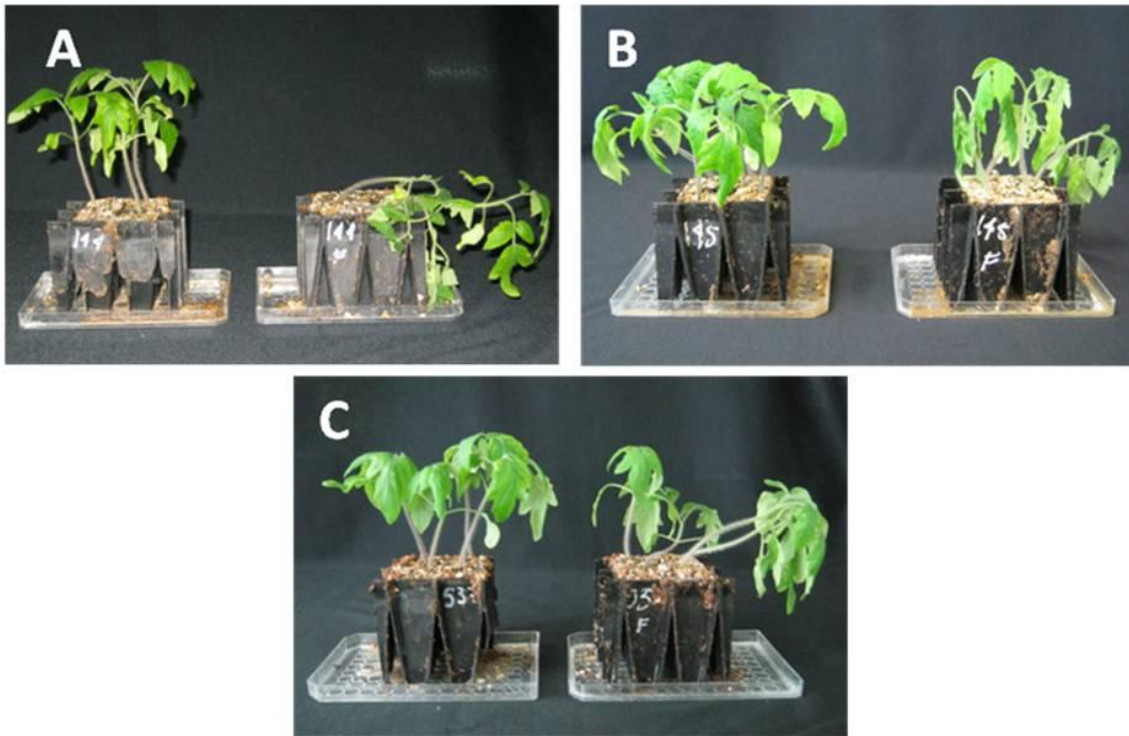


Figura 19. Bioensayo 3 en planta de tomate cv. Missouri a 30 dpi con Forl y aislados de *Bacillus*. A) Tratamiento 144, izquierda: - Forl; derecha: + Forl; B) tratamiento 145, izquierda: - Forl; derecha: + Forl; C) tratamiento 537, izquierda: - Forl; derecha: + Forl.

7.2 Cinética de crecimiento de los aislados

Antes de iniciar el ensayo 3 en semillero, se realizó una cinética de crecimiento (Figura 20) de los aislados 144, 145 y 537, con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de incubación de las bacterias en el medio de cultivo; todo esto con el fin de estandarizar la cantidad y calidad (edad) del inóculo. De acuerdo a las curvas de crecimiento (Figura 20), se seleccionó un tiempo de crecimiento de 12 horas para los aislados 144 y 145 y se determinó una concentración de 5.1×10^6 Unidades Formadoras de Colonia (UFC) y 6.6×10^6 UFC, respectivamente, y una O.D. de 0.6 (densidad óptica por sus siglas en inglés); y un tiempo de 24 horas para el aislado 537, con una concentración de 1.3×10^8 UFC, a una O.D. de 0.9

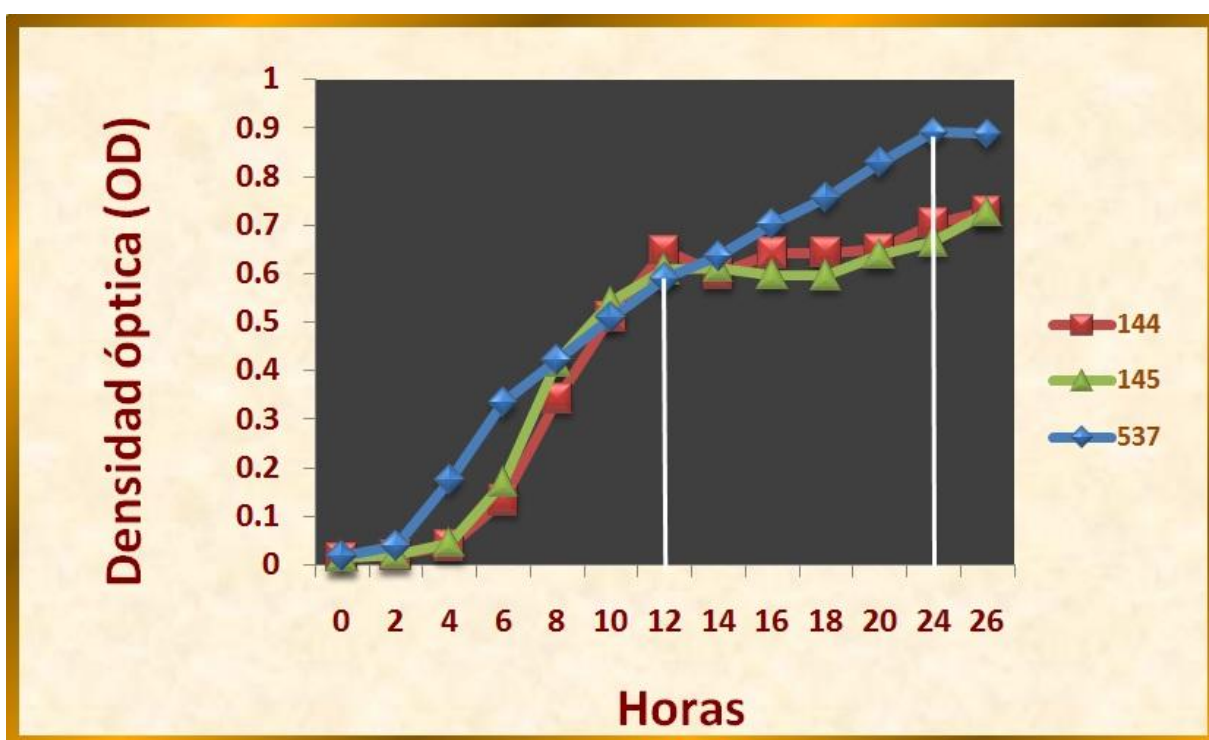


Figura 20. Cinética de crecimiento de los aislados bacterianos *B. subtilis* 144, *B. subtilis* 145 y *B. thuringiensis* 537, para establecer su fase exponencial-estacionaria, y a su vez determinar la oportuna inoculación, de acuerdo a la entrada a la etapa estacionaria, con la consecuente producción de antibióticos.

7.3 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en rizocono

7.3.1 Bioensayo 1

En el bioensayo 1, el control de patogenicidad (Figura 21A) y algunas plantas inoculadas con el aislado 145, empezaron a mostrar pudrición de la corona, a los 11 dpi. Las plantas inoculadas con la mezcla de los aislados 145 + 537, mostraron síntomas hasta los 13 dpi, mientras que aquellas sometidas al aislado 537, exhibieron síntomas de la PCRT hasta los 15 dpi (Figura 21C).

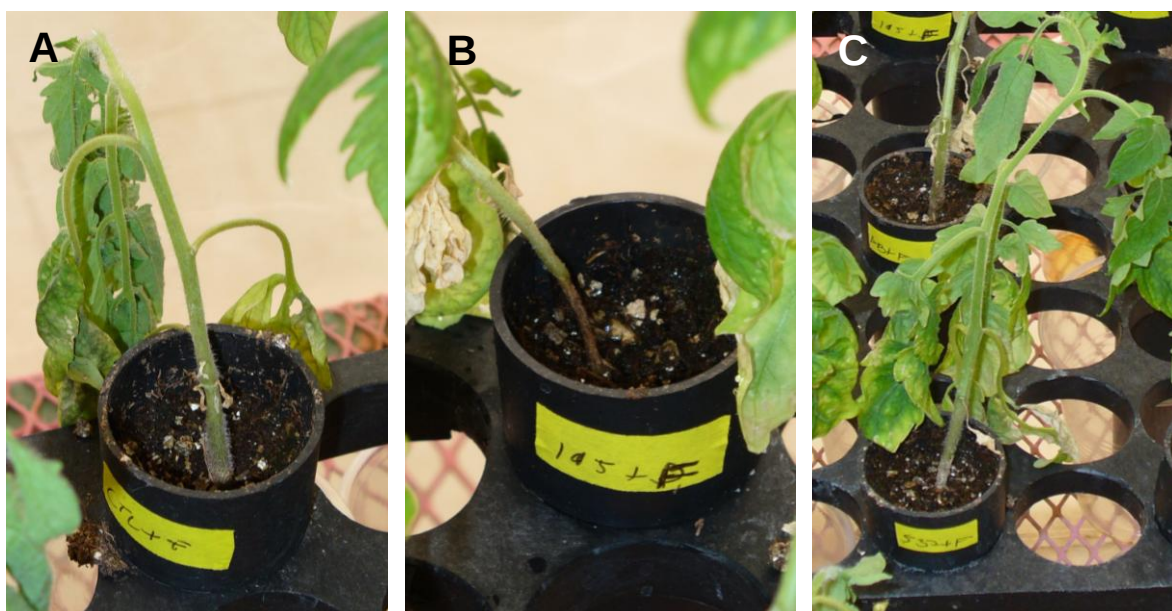


Figura 21. Síntomas característicos de PCRT observados en el bioensayo 1 en rizoconos en planta de tomate cv. Missouri. A) Control de patogenicidad a los 11 dpi con Forl; B) Aislado 145 a los 19 dpi con Forl; C) Aislado 537 a los 15 dpi con Forl.

Para el bioensayo 1 el análisis de varianza indicó que ninguno de los aislados ejerció antagonismo a Forl, puesto que la severidad de la PCRT fue similar entre ellos y con el control (Figura 22). Sin embargo, las plantas inoculadas solo con los aislados (controles), nos indicó que existía diferencia significativa en cuanto a la altura de las plantas. El aislado 537 mostró una altura significativamente mayor en comparación con el control y el aislado 145 (Figura 23).



Figura 22. Efecto de aislados bacterianos en la severidad de PCRT a los 23 dpi con Forl, en plantas de tomate var. Missouri en rizocono, en el bioensayo 1. CTL indica control de patogenicidad (+ Forl). Medias con letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos. Tukey $p \leq 0.05$.



Figura 23. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomate var. Missouri en rizocono, al finalizar el bioensayo 1 (23 dpi). CTL indica control absoluto. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey $p \leq 0.05$.

7.3.2 Bioensayo 2

En el bioensayo 2, a los 10 dpi, el control de patogenicidad (Forl), así como algunas plantas inoculadas con el aislado 145 y la mezcla de los aislados, mostraron síntomas característicos de PCRT. A los 11 dpi las plantas inoculadas con el aislado 537, empezaron a mostrar síntomas característicos de la enfermedad (Figura 24).

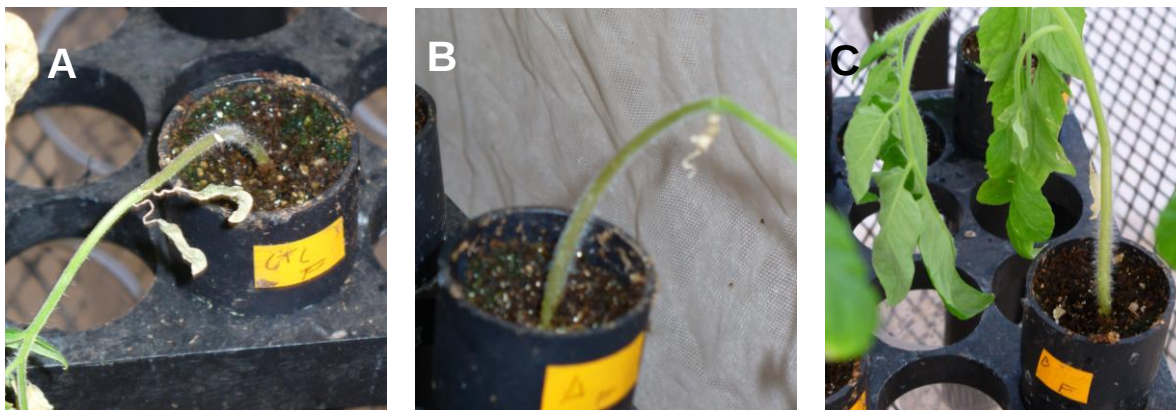


Figura 24. Síntomas característicos de PCRT observados en el experimento dos de rizocono. Se muestran algunos ejemplos en los que está presente el aislado antagonista retado con Forl. A) Control de patogenicidad a los 15 dpi con Forl; B) Aislado 145 a los 12 dpi de Forl; C) Aislado 537 a los 13 dpi con Forl.

Para el bioensayo 2 el análisis estadístico indicó, de manera similar al bioensayo uno que, ninguno de los aislados ofrece antagonismo a Forl (Figura 25). En este bioensayo, a diferencia del primero, no se encontró diferencia significativa en cuanto a la altura de plantas entre los diferentes aislados y el control (Figura 26).



Figura 25. Efecto de aislados bacterianos 145, 537 y 145 + 537 en plantas de tomate cv. Missouri en el bioensayo de rizocono dos. CTL indica control de patogenicidad. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.



Figura 26. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomate var. Missouri en el bioensayo de rizocono dos. CTL indica control absoluto. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.3.3 Bioensayo 3

Durante el bioensayo 3 no se mostraron síntomas característicos de la PCRT. Sin embargo, a los 15 dpi con Forl, el control de patogenicidad y algunas plantas inoculadas con los aislados 145 y 537 vs. Forl, empezaron a mostrar una disminución en el desarrollo de planta (altura) en comparación con las plantas en las que no se inoculó Forl (Figura 28).

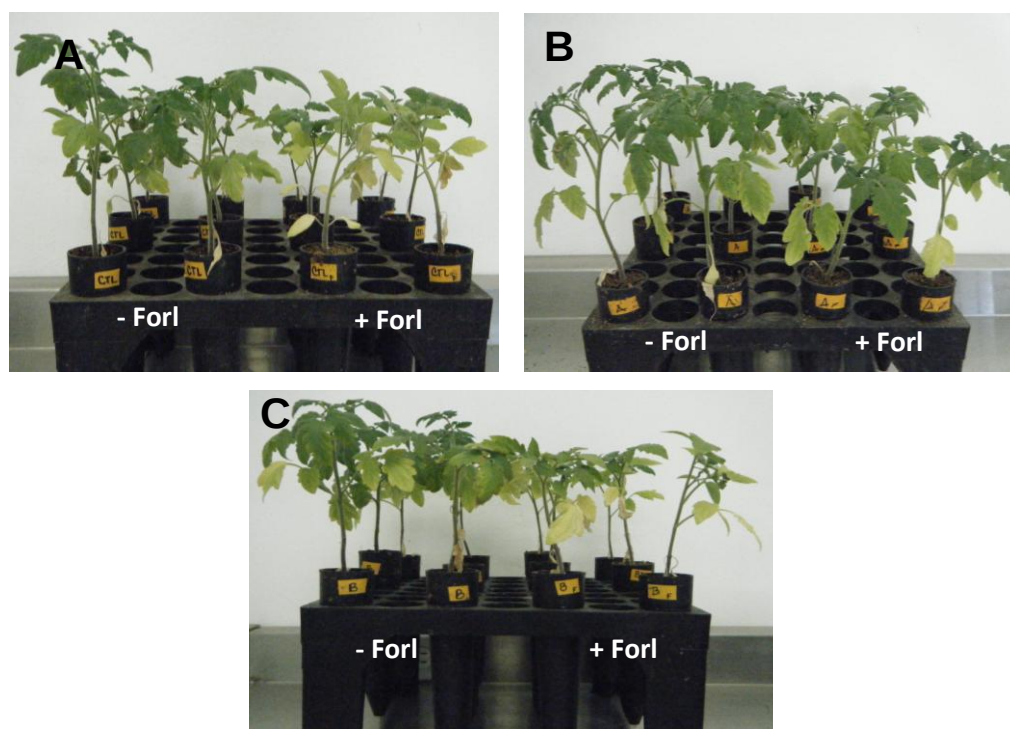


Figura 28. Bioensayo tres en rizocono, en el que se inocularon plántulas de tomate cv. Missouri con Forl. A los 13 dpi, se muestran las diferencias de altura en algunas plantas en los que está presente el aislado antagonista retado con Forl. A) Controles, izquierda superior; B) Aislado 145, derecha superior; C) Aislado 537, inferior.

Para el bioensayo 3 el análisis estadístico indicó (Figura 29), de manera similar a los bioensayos en rizocono uno y dos, que ninguno de los aislados ofrece antagonismo a Forl. En este bioensayo se observaron diferencias significativas en cuanto a la altura de las plantas inoculadas con los aislados *B. subtilis* (144) y *B. thuringiensis* (537) (Figura 30) con respecto al control absoluto.



Figura 29. Efecto de aislados bacterianos en la severidad de la PCRT en plantas de tomate cv. Missouri, en el bioensayo de rizocono tres. *B. subtilis* (144) y *B. thuringiensis* (537); CTL indica control de patogenicidad. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.



Figura 30. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomate var. Missouri en el bioensayo de rizocono tres. *B. subtilis* (144) y *B. thuringiensis* (537); CTL indica control absoluto. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.4 Prueba de compatibilidad entre aislados

Al llevar a cabo la prueba de compatibilidad entre las bacterias 145 y 537, ésta nos indicó que no son compatibles (Figura 27), lo cual se manifestó como una inhibición del crecimiento entre ellas y nunca alcanzan a sobrelaparse las colonias. Por lo anterior, en el bioensayo 3 de rizoconos, se omitió el tratamiento a base de la combinación de los aislados 145 + 537.



Figura 27. Resultados de la prueba de compatibilidad de *Bacillus subtilis* (144) vs. *B. thuringiensis* (537) a los 7 dpi en medio LB sólido. El hecho de que ambas bacterias se inhibirán entre sí, sugiere que también podrían ser incompatibles en la naturaleza.

VIII. Análisis de resultados

8.1 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en semillero

Se determinó por medio de bioensayos en semillero, el efecto de nueve bacterias, de las cuales, dos presentaron un potencial efecto antagónico contra Forl en tomate var. Missouri, las cuales fueron el aislado 145 que corresponde a *Bacillus subtilis* y el 537 identificado como *B. thuringiensis*.

En el bioensayo 1 el aislado *Bacillus thuringiensis* (537) no ejerció efecto sobre la severidad de la PCRT al ser inoculado junto con Forl en las plantas de tomate. En los bioensayos 2 y 3 se redujo el 53% y 51% la severidad de la PCRT en estos experimentos en semillero (Figuras 14 y 15). Cordero-Ramírez (2008) reportó que en ensayos con semilla de tomate cv. Missouri sembradas en placa Petri con agua-agar, éste presentó aproximadamente un 80% de inhibición de la enfermedad. En ensayos realizados *in vitro* antagonista vs. patógeno, este mismo aislado mostró un nivel de únicamente 5% de inhibición de la PCRT (Cordero-Ramírez, 2008). Esto sugiere que los microorganismos que muestran niveles bajos de inhibición del patógeno en pruebas *in vitro* antagonista vs. patógeno, pudieran tener una respuesta diferente en bioensayos *in planta*, lo cual concuerda con Marilley *et al.*, 1999, quienes indican que en condiciones de crecimiento en una placa Petri, no siempre se tienen todos los elementos que los microorganismos necesitan para su buen funcionamiento, ya que no consideran el efecto de la presencia de las plantas en estos ensayos. Las plantas producen metabolitos presentes en los exudados radicales que pueden ayudar a los microorganismos a establecer un mecanismo efectivo de combate a este patógeno. El trabajo reportado por Validov *et al.*, (2007), en cámara de crecimiento en semilleros con tomate var. Carmello, demostró que una cepa de *Pseudomonas putida* redujo la presión de PCRT de 46% a 83% en sus diferentes bioensayos, lo cual concuerda con éste bioensayo en semillero.

Bacillus subtilis (145) presentó diferencia significativa con respecto al control de patogenicidad reduciendo en un 43%, 50% y 43% la presión de la PCRT en los bioensayos en semillero 1, 2 y 3 respectivamente. Cordero-Ramírez en el 2008 reportó que, este mismo aislado mostró 60% de inhibición en los ensayos *in vitro*. En el ensayo que realizó *in planta* en placa Petri con semilla de tomate, este aislado presentó aproximadamente un 93% de inhibición del patógeno. Esto concuerda con Guillén-Cruz *et al.*, 2006, quienes encontraron que *B. subtilis* tiene un potencial efecto antagónico contra diferentes enfermedades fungosas, entre ellas las causadas por especies del género *Fusarium*.

El aislado 144 (*B. subtilis*) reportado por Cordero-Ramírez en el 2008 en experimento *in planta* en placa Petri como posible potencial antagonista en experimentos en maceta, en este trabajo, en los bioensayos 2 y 3 mostró baja protección a la planta con aproximadamente 30% de inhibición de la PCRT. Esto se debió posiblemente a que no hubo suficiente inóculo al momento de hacer la aplicación de dicho aislado en comparación al bioensayo 1 donde muestra un alto nivel de inhibición. En base a estos resultados se definió en el transcurso del trabajo realizar curvas de crecimiento para establecer un nivel de inóculo adecuado para las siguientes etapas de bioensayos.

8.2 Cinética de crecimiento de los aislados

Al realizar la estandarización de crecimiento de los aislados se seleccionó el momento oportuno de cosecha de éstos para realizar la inoculación de las plantas, ya que marcan el momento de transición entre el crecimiento exponencial y el estacionario, que es cuando se observa una producción máxima de metabolitos secundarios los cuales muestran una potente actividad antifúngica y suprime el crecimiento de una amplia gama de fitopatógenos (Toure *et al.*, 2004). *Bacillus* spp. produce moléculas con capacidad antibiótica llamadas iturinas, las cuales son lipopéptidos que interrumpen la formación de la membrana plasmática del hongo, estos compuestos forman un grupo que comprende las bacilomicinas D, F y L,

iturinas A-E y las micosubtilinas. El mecanismo de acción de estos compuestos para controlar el crecimiento del hongo fitopatógeno es a través de la formación de pequeñas vesículas y por la liberación de electrolitos de alto peso molecular (Stein, 2005).

Una vez analizadas las curvas de crecimiento de los aislados, se definió emplearlos a una determinada densidad de inóculo, ya que es posible que el usar los aislados a la misma densidad óptica (O.D.) no resultaba el procedimiento óptimo para calcular la cantidad de inóculo. Esto, probablemente haya contribuido a que en el bioensayo 1, al no saber la concentración del inóculo, se haya colocado una mayor cantidad del aislado 144 y no en los siguientes bioensayos, por lo que éste pudo haber mostrado un efecto menor en los posteriores bioensayos. De igual modo, es posible que para el aislado 537 en el bioensayo uno se haya colocado una menor concentración de células bacterianas y esto influyera para una menor eficiencia, en comparación con los bioensayos 2 y 3 en semillero.

8.3 Bioensayos de patogenicidad contra Forl en rizocono

En los bioensayos en rizocono, en plantas de aproximadamente 60 días, la aplicación de los aislados 537 y 145 (*B. thuringiensis* y *B. subtilis*) a los 35 dpi con Forl, no presentaron diferencias significativas en la protección a la planta con respecto al control de patogenicidad (Forl) (Figura 22, 25 y 28). Esto difiere con el trabajo reportado por Shanmugam *et al.*, (2011), donde ellos probaron diferentes especies de *Bacillus* vs. Fol en tomate var. Solan Vajr, a nivel maceta en invernadero, teniendo como resultado una reducción del índice de enfermedad entre 54.9% y 53.8%. Pudiéramos elucubrar que los aislados no mostraron un efecto antagónico hacia Forl, porque el volumen radical de los rizoconos es reducido, y por lo tanto, el espacio limitado ejerció presión contra el establecimiento de los aislados bacterianos en el trasplante, en comparación con el uso de maceta, como en los experimentos mencionados anteriormente, donde hay menor presión por espacio.

La aplicación del aislado 537 (*B. thuringiensis*) presentó diferencia significativa con respecto al control absoluto, en cuanto a la altura en los bioensayos 1 y 3 en rizocono (Figura 23 y 29), incrementando la altura de la plántula un 25% y 10% respectivamente con respecto al control absoluto. El aislado 145 (*B. subtilis*) presentó diferencia significativa con respecto al control absoluto, en cuanto a la altura de las plantas en el bioensayo 3 (Figura 30), obteniendo un incremento de altura del 13%. Mojica-Marín *et al.*, (2009) reportan que tratar semillas de chile (*Capsicum annuum* L.) con *B. thuringiensis* es favorable, ya que aumenta el vigor de las semillas significativamente. Comparándolo con este trabajo, es similar en el sentido que las plantas tratadas con *B. thuringiensis* mostraron el aumento en altura de la planta. Airola-Gallegos (2010), reportó que la inoculación de aislados de *Bacillus subtilis* aumentó el peso seco de las plántulas, altura de plántulas, volumen de raíz y grosor de tallo en tomate cv. Missouri. Hernández y Chailloux (2004) obtuvieron un efecto promotor de crecimiento en plántulas de tomate para altura de plántula y grosor de tallo, solo que utilizando otros microorganismos tales como *Glomus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Burkholderia*

En el bioensayo 1 en rizoconos, la mezcla de los aislados 145 y 537, mostró un incremento del 13% con respecto al control absoluto. Sin embargo, en el bioensayo 2 no se observaron diferencias significativas estadísticamente entre tratamientos. Shanmugam *et al.*, 2011, y Airola-Gallegos, 2010, demostraron que empleando mezclas de bacterias promotoras de crecimiento vegetal se puede obtener un incremento de vigor, altura y peso fresco en la planta. El hecho de que en los dos bioensayos presentaran resultados distintos, pudiera deberse a la incompatibilidad entre los aislados. Otro factor que pudiéramos elucubrar es que durante la etapa de plántula en el bioensayo 1, estas sufrieron estrés por baja de temperatura, lo cual pudo afectar el desarrollo de la planta y a su vez el establecimiento de los aislados durante el ensayo.

La falta de respuesta patogénica de Forl en el tercer bioensayo en rizocono pudo deberse a diferentes factores que evitaron que se estableciera, por ejemplo a la

permeabilidad del sustrato utilizado, el cual permitió un buen drenaje del agua y pudo haber influenciado para que el inóculo inicial, no tuviera las condiciones exactas de humedad que se requieren para que se desarrolle efectivamente el hongo (Cordero-Ramírez, 2008). En cuanto a la humedad del sustrato se reporta que la gravedad de la enfermedad también depende que las raíces hayan sufrido estrés por exceso de agua durante el cultivo (Blancard, 2005). En los bioensayos en rizocono, no se provocó dicha condición, lo que pudo haber influido en la no manifestación de la PCRT.

Por otra parte, la variación en las condiciones del cultivo tales como humedad y temperatura, probablemente no fueron las óptimas que requiere el hongo para desarrollarse durante los bioensayos. Por ejemplo, en cuanto a temperatura, se reportan 28°C (Blancard, 2000) como la temperatura óptima de crecimiento, y durante el tercer bioensayo se registraron temperaturas máximas de 36°C (datos no mostrados). Estas son variables que deben ser mejoradas para llevar a cabo un buen bioensayo de antagonismo. Por razones de tiempo, estos parámetros no fueron optimizados en este trabajo, pero pudieran ser factores que favorecieran a que las plantas inoculadas con *Forl*, no mostraran efectos de enfermedad, ya que los ensayos 1 y 2 en rizocono fueron establecidos en los meses de noviembre a enero en relación al tercer ensayo iniciado en los meses de marzo a abril. Existen reportes en donde se muestra que un organismo patógeno es capaz de causar una infección efectiva cuando alcanza un límite de concentración en la rizosfera de una planta, o bien cuando el patógeno afecta a la planta en cierta etapa de su desarrollo de tal manera que sea capaz de invadir el sistema radical y causar enfermedad (Bolwerk *et al.*, 2003). Es posible imaginarse que las diferencias en las condiciones climáticas (temperatura, luz, fotoperíodo) en los bioensayos realizados en diferentes períodos del año pudieran afectar el desarrollo de las plantas de tomate y esto contribuir a las diferencias observadas en cada bioensayo en relación a la severidad del ataque del patógeno.

8.4 Prueba de compatibilidad entre aislados

En la prueba de compatibilidad de los aislados (Figura 30), se demostró que los aislados 145 y 537 no son compatibles entre sí. Por lo anterior, esta combinación, se descartó para ser evaluada en el bioensayo 3 de rizoconos. A diferencia con lo reportado por Shanmugam *et al.*, (2011), Airola-Gallegos, 2010, Cavaglieri *et al.*, 2005, quienes reportan que la mezcla de aislados bacterianos pueden ser efectivos para contrarrestar diferentes enfermedades, además de brindarle a la planta un efecto promotor, en nuestro caso esto no fue observado, posiblemente porque las bacterias no fueron compatibles entre sí de acuerdo a nuestro ensayo *in vitro*.

IX. Conclusiones

- Los aislados 145 (*Bacillus subtilis*) y 537 (*B. thuringiensis*) mostraron capacidad antagonista a la PCRT causada por Forl en los bioensayos en semilleros.
- Se determinó a partir de las curvas de crecimiento el tiempo de cultivo para alcanzar el momento de transición de la fase exponencial a la fase estacionaria y colocar como inóculo a los aislados *B. subtilis* (144 y 145) y *B. thuringiensis* (537) después de 12 y 24 horas respectivamente.
- En los bioensayos en rizocono se observó el efecto promotor de crecimiento del aislado 537 (*B. thuringiensis*) en dos de tres ensayos, aún cuando no se mostró un efecto antagónico contra la PCRT causada por Forl.
- La incompatibilidad mostrada *in vitro* entre las bacterias *B. subtilis* (145) y *B. thuringiensis* (537), descarta su utilización combinada a nivel de bioensayos en planta.
- El comportamiento de las cepas de *Bacillus*, respecto al efecto protector contra la PCRT, varió dependiendo de las condiciones realizadas en los diferentes bioensayos.

X. Recomendaciones y perspectivas

- La selección de los nueve aislados utilizados en este trabajo proviene de un análisis, realizado por Cordero-Ramírez en el 2008, en el cual se probaron 254 especímenes del banco de germoplasma CIIDIR-001. Sin embargo, se recomienda para futuros trabajos realizar un escrutinio del resto de esta colección que consta con 705 microorganismos criopreservados, para identificar otros posibles potenciales antagonistas a Forl, así como de analizar su posible actividad como bacterias promotoras de crecimiento vegetal.
- En futuros bioensayos en invernadero, se recomienda utilizar macetas en lugar de rizoconos, para poder observar de una forma más natural, la interacción de los aislados antagonistas y del patógeno a estudiar con las plantas de tomate.
- A pesar de no haber visto efecto antagonista en los ensayos en rizoconos con las mejores bacterias seleccionadas del trabajo en semillero, sugerimos que se vuelvan a realizar estos ensayos en otro tipo de contenedores con mayor espacio, con el fin de obtener un mayor volumen radical. Así mismo, se requiere de escoger la época adecuada del año para que las plantas se desarrollen en invernadero, sin estar sometidas al estrés térmico e hídrico.
- Las bacterias estudiadas en este trabajo no mostraron el efecto antagónico esperado, sin embargo, el estudio realizado, permitió observar el efecto promotor de crecimiento de estos microorganismos, parámetro que debe de ser estudiado de manera más completa en el futuro.

XI. Bibliografía

- Agrios, G. N. 2006. Fitopatología. Editorial Limusa. México, D.F. p. 123, 425-432, 510.
- Airola-Gallegos, V. M. 2010 Compostas líquidas con bacterias promotoras de crecimiento en la nutrición de tomate (*Solanum lycopersicum*). Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. p. 66.
- Apodaca-Sánchez. M. A. 2006. Enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum* en el tomate (*Lycopersicon esculentum*). En: Memorias de Enfermedades de hortalizas. Fundación Produce- Culiacán, Sinaloa, México.
- Apodaca, S. M. A., Zavaleta, M. E., García, E. R., Osada, K.S., y Valenzuela, U.J.G. 2004. Hospedantes Asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici*. W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:7-13.
- Apodaca, S. M. A., Zavaleta, M. E., Osada, K. S., García, E. R., y Valenzuela, U. J. G. 2001. Comparación de técnicas para evaluar *in vitro* la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y efecto de la temperatura. Revista Mexicana de Fitopatología 19:197-202.
- Apodaca, S. M. A., Zavaleta, M. E., García, E. R., Osada, K. S., y Valenzuela, U. J. G. 2002. Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en Sinaloa, México, y su control. Revista Mexicana de Fitopatología 20:1-7.

- Armstrong, G. M. and Armstrong, J. K. 1981. *Formae speciales* and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases. En *Fusarium: diseases, biology and taxonomy.*, pp. 391-399. Edited by Nelson, P. E., Tousson, T. A. and Cook, R. J.: The Pennsylvania State University Press.
- Ascencio, A. A., López, B. A., Borrego, E. F., Rodríguez, H. S. A., Flores, O. A., Jiménez, D. F., y Gámez, V. A. J. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:114-120.
- Ascencio, A. A., López, B. A., Borrego, E. F., Rodríguez, H. S. A., Flores, O. A., Jiménez, D. F., y Gámez, V. A. J. 2008. Marchitez vascular del tomate: II. Herencia a la resistencia a la raza 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en tres especies del género *Lycopersicon*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26:180-183.
- Báez-Valdez, E. P., Carrillo-Fasio, J. A., Báez-Sañudo, M. A., García-Estrada, R. S., Valdez-Torres, J. B., y Contreras-Martínez, R. 2010. Uso de portainjertos resistentes para el control de la Fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen raza 3) del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en condiciones de malla sombra. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:111-123.
- Benhamou, N., Rey, P., Chérif, M., Hockenhull, J. and Tirilly, Y. 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 87:108-122.
- Blancard, D. 2005. Enfermedades del tomate. Observar, identificar, luchar. Grupo Mundi-Prensa. España. p. 67, 173.

- Bolwerk, A. 2005. Visualization of interactions of microbial biocontrol agents and phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomato roots. Págs 217-231 in: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui, Z. A., (Ed.). Springer.318 p.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijffes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Chin-A-Woeng, T. F. C., Lugtenberg, B. J. J. and Bloemberg, G.V. 2003. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Molecular Plant Microbe Interactions 16:983–993.
- Booth, C. 1984. The *Fusarium* problem: historical, economic, and taxonomic aspects. The applied mycology of *Fusarium*, pp. 1-13. Moss, M. O. and Smith, J. E. (eds.). Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Burnett, J. H. 1984. Aspects of *Fusarium* genetics. *The Applied mycology of Fusarium*, pp. 39-70. Moss, M. O. and Smith, J. E. (eds.): Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C. and Gooday, G. 2001. The Fungi. Academic Press, London. p. 46.
- Cavaglieri, L., Orlando, J. and Etcheverry, M. 2005. *In vitro* influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production: effect of seeds treatment on maize root colonization. Journal of Applied Microbiology 41:390–396.
- Cordero-Ramírez, J. D. 2008. Microorganismos de la rizósfera de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) como antagonistas de *Fusarium oxysporum*

f. sp. *radicis-lycopersici*. Tesis de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.

Daviere, J. M., Langin, T. and Daboussi, M. J. 2001. Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. Fungal Genetics and Biology 34:177-192.

Deighton, F. C., Stevenson, J. A. y Cummins, G. B. 1962. Formae speciales and the code. Taxon 11:70-71.

Financiera Rural. 2009. Monografía del tomate rojo (jitomate). Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. p. 2.

Goldman, G. H., Hayes, C. and Harman, G. E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Trends in Biotechnology 12:478-482.

González, P. 2006. Enfermedades del tomate. Facultad de Agronomía. Montevideo Uruguay. En línea Noviembre 2010:
http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html

Gordon, T. R. y Martyn, R. D. 1997. The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*. Annual Review of Phytopathology 35:111-128.

Guillén, C. R., Hernández, C. F. D., Gallegos, M. G., Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C. N., Padrón, C. E., y Reyes, V. M. H. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile. Revista Mexicana de Fitopatología 24:105-114.

- Hua-Van, A., Daviere, J. M., Kaper, F., Langin, T., and Daboussi, M. J. (2000). Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Current Genetics* 37:339-347.
- Jarvis, W. R. y Thorpe, H. 1976. Susceptibility of *Lycopersicon* species and hybrids to the foot and root rot pathogen *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease Reports* 60:1027-1031.
- Jarvis, W. R. 1988. *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 69: 49-64.
- Kamilova, K., Leveau, J.H.J., and Lugtenberg, B. 2007 *Collimonas fungivorans*, an unpredicted *in vitro* but efficient *in vivo* biocontrol agent for the suppression of tomato foot and root rot. *Environmental Microbiology* 9:1597–1603.
- Katan, J. 1971. Symptomless carriers of the tomato *Fusarium* wilt pathogen. *Phytopathology* 61:1213-1237.
- Kistler, H. C. 2001. Evolution of the host specificity in *Fusarium oxysporum*. *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium*, pp. 70-96. Summerell, A., Leslie, J. F., Badihouse, D., Bryden, W. L. and Burgess, L. W (eds.).
- López, B. A., López, B. S. R., Vázquez, B. M. E., Rodríguez, H. S. A., Mendoza, M., y Padrón, C. E. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:183-190.
- Leclere, V., Bechet M., Adam A, Guez J. S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert M., and Jacques, P. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organisms

- antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4577–4584.
- Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31:127-150.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., and Summerell, A. 2001. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:107-117.
- Marilley, L., and Arango, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology* 13:127-136.
- Menzies, J. G., Koch, C., and Seywerd, F. 1990. Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. *Plant Disease* 74:569-572.
- Mojica, M. V., Luna, O. H. A., Sandoval, C. C. F., Pereyra, A. B., Morales, R. L. H., González, A. N. A., Hernández, L. C. E., Alvarado, G. O. G. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 78:105-110.
- Punja, Z. K. 1997. Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19:315-323.
- Samuels, G. J., and Blackwell, M. 2001. Pyrenomycetes, fungi with perithecia. *The Mycota. Systematics and evolution Part A.* pp. 221-255. McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G. and Lemke, P. A. (eds). Springer-Verlag. Berlin.

- Sánchez-Castro, M. A. 1998. Manejo de Enfermedades del Tomate. Memoria del curso del INCAPA Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Tomate, Chile y Papa. p. 24. Santiago, Chile.
- Seifert, K. A., and Gams, W. 2001. The taxonomy of anamorphic fungi. In: The Mycota, systematics and evolution Part A. pp. 307-347. McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G. and Lemke, P. A. (eds): Springer-Verlag. Berlin.
- Shanmugam, V., Kanoujia, N. 2011. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycospersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. Biological Control, doi:10.1016/j.biocontrol.2011.02.001.
- Snyder, R. G. 2006. Guía del cultivo del tomate en invernaderos. Universidad Estatal de Mississipi. Publicación 2419. EUA.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology 56: 845–857.
- Souto GI, Correa OS, Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, Bachur M, and Garcia, A.F. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. Journal of Applied Microbiology 97:1247–1256.
- Teunissen, H. A., Verkooijen, J., Cornelissen, B. J., and Haring, M. A. 2002. Genetic exchange of avirulence determinants and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinants of *Fusarium oxysporum*. Molecular Genetics and Genomics 268:298-310.
- Todar, K. 2003. The genus *Bacillus*. Department of Bacteriology. University of Wisconsin Madison, 35 p.

Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guirio, A., Thonart, P. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology* 96:115–1160.

Vallejo, C. F. y Estrada, S. E. 2004. Producción de hortalizas de clima cálido. Universidad Nacional de Colombia (Sede Palmira). Colombia.

Validov, F., Kamilova, S., Qi, D. Stephan, J.J., Wang, N. Makarova, and Lugtenberg, B. 2007. Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. *Journal of Applied Microbiology* 102:461–471.

Validov, F., Kamilova, S. and Lugtenberg, B 2009. *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stone wool under industrial conditions in a certified greenhouse. *Biological Control* 48:6–11.

Wang, B. and Jeffers, S. N. 2000. *Fusarium* root and crown rot: a disease of container-grown hosts. *Plant Disease* 84:980-988.

Páginas electrónicas consultadas

<http://www.snitt.org.mx/pdfs/demanda/jitomate.pdf> COFUPRO. Programa estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología – San Luis Potosí cadena agroalimentaria del tomate. Colegio de postgraduados – campus SLP; fundación produce SLP.188pp. En línea. Noviembre 2010.

http://biblioteca.mty.itesm.mx/mty/bds/eval_bd.php?id=146

Euromonitors

International. Global Market Information Database. Biblioteca Digital del ITESM Campus Monterrey. En línea. Noviembre 2009.