



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD MICHOACÁN**



**“INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A *Fusarium oxysporum* Y
ESTIMULACIÓN DEL DESARROLLO VEGETAL EN JITOMATE (*Solanum
lycopersicum*) EMPLEANDO *Methylobacterium* spp.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN:
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE**

PRESENTA:

MELISSA MEDINA RÍOS

DIRECTORES DE TESIS

DR. LUIS FERNANDO CEJA TORRES

DR. SIGIFREDO LÓPEZ DÍAZ

Jiquilpan, Michoacán, México. Noviembre de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Mich; siendo las 13:00 horas del día 22 del mes de Noviembre 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 – MICH. para examinar la tesis titulada:

"Inducción de resistencia a *Fusarium oxysporum* y estimulación del desarrollo vegetal en jitomate *Solanum lycopersicum* empleando *Methylobacterium* spp.

Presentada por el alumno:

MEDINA

Apellido paterno

RÍOS

Apellido materno

MELISSA

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	3	2	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

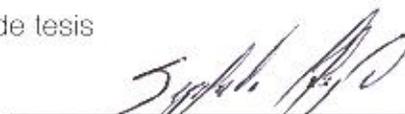
Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

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. LUIS FERNANDO CEJA TORRES


DR. SIGIFREDO LOPEZ DIAZ


DRA. HORTENCIA GABRIELA MENA
VIOLANTE


DRA. MARIA VALENTINA ANGOA PÉREZ


DR. JOSÉ VENEGAS GONZÁLEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES




DR. GUILLERMO HERRERA ARREOLA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán, el día 22 del mes de Noviembre del año 2011, el (la) que suscribe IIA Melissa Medina Ríos alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B091323, adscrito a CIIDIR IPN MICHOACAN, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Luis Fernando Ceja Torres y cede los derechos del trabajo intitulado “Inducción de resistencia a *Fusarium oxysporum* y estimulación del desarrollo vegetal en jitomate (*Solanum lycopersicum*) empleando *Methylobacterium* spp.”, 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 melyssha_kfesito@hotmail.com o lfeceja@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

IIA Melissa Medina Ríos.
Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por el otorgamiento de la beca para la realización de mis estudios y la oportunidad de realizar la movilidad en otra institución.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, unidad Michoacán, por brindarme la oportunidad de superación personal y académica.

A la Universidad de Guadalajara unidad CUCBA por las facilidades para realizar mi movilidad.

Al Dr. Luis Fernando Ceja Torres por su apoyo, disponibilidad, confianza, entusiasmo, sencillez y sobre todo por las múltiples enseñanzas que dio a mi persona como profesor, ser humano y director de tesis.

Al Dr. Sigifredo López Díaz por su apoyo y por mostrarme que no siempre el camino más fácil es el mejor, haciendo de mi trabajo de tesis una investigación propia.

A la Dra. Valentina Angoa Pérez, por su apoyo durante la maestría, por su objetividad, por su gusto por el aprendizaje y enseñarme que no hay reto que no pueda lograr. Y por ser el perfecto ejemplo a seguir.

A la Dra. Hortencia Mena Violante, por su apoyo, motivación y profesionalismo con sus comentarios siempre acertados.

Al Dr. José Venegas González, por sus ganas de mostrar el camino de la investigación, por su entusiasmo y amistad.

A la Dra. Carla Vanesa Sánchez Hernández, por darme la oportunidad de trabajar con ella, conocerla, enseñarme y sobre todo por su disponibilidad sin interés alguno.

A Fabián Heriberto Rivera Chávez por su apoyo, comprensión, amor y cuidado.

A mis amigas de la maestría Rosy, Dany, Lupita por recordarme cada día que la amistad si existe y que cuando la encuentras vale la pena conservarla gracias por los buenos, malos y estresantes momentos que pasamos juntas.

A mis compañeros y amigos de casa Claudia y Adrián por hacerme reír a carcajadas y recordar que hasta del estrés te puedes reír.

A la M.C. Guadalupe Oyoque Salcedo, por su valiosa amistad, por el apoyo y disponibilidad en la realización de mis actividades en el laboratorio.

A la Téc. Eréndira Yazmín Medellín Novoa, por su amistad y valioso apoyo en el laboratorio.

¡GRACIAS!

DEDICATORIA

Este pequeño espacio quiero dedicarlo a mi familia, especialmente a mis padres **Francisco Medina Reyes y Eva Ríos Andrade** por darme y ayudarme a construir mi vida con su amor, esfuerzo, dedicación, fuerza y talento para salir adelante. Por sembrar en mi la semilla del conocimiento e incluso por imponer reglas en casa. Tengo tanto que agradecerles que no terminaría, sin embargo creo que es suficiente decirles que son los mejores padres y que les agradezco infinitamente no mucho sino todo lo que soy; y que si hoy he culminado un paso más en mi educación se los debo a ellos.

A Bianca, Víctor, Mera y Jesús por haber confiado en mí y nunca dejarme sola; y a mis hermosos sobrinos Camila y Chusito que hicieron este espacio de mi vida más fácil.

ÍNDICE GENERAL

Página.

ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Orígenes del jitomate y particularidades del cultivo.	4
2.2 Importancia económica del jitomate.	6
2.2.1 Importancia Internacional.	6
2.2.2 Importancia Nacional.	6
2.3 Principales estados productores.	7
2.4 Propiedades del jitomate.	8
2.6 Generalidades de <i>Fusarium oxysporum</i> .	10
2.6.1 Daños e importancia de <i>Fusarium oxysporum</i> .	12
2.6.2 Tratamientos convencionales y alternativos contra <i>Fusarium oxysporum</i> .	14
2.7 Bacterias promotoras de crecimiento.	15
2.8 Hormonas vegetales de crecimiento.	16
2.9 Fitohormonas y <i>Methylobacterium spp.</i>	18
2.9.1 Fitohormonas.	18
2.9.2 Fitohormonas relacionadas con <i>Methylobacterium spp.</i>	19
2.9.3 Mecanismos de defensa Planta-Patógeno.	20
3. MATERIALES Y METODOS	23
3.1 Zona de estudio.	23
3.2 Aislamiento y desarrollo de <i>Methylobacterium sp.</i>	23
3.3 Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> .	23
3.4 Pruebas antagónicas	24
3.5 Imbibición de semillas de jitomate	24

3.6 Evaluación de la germinación de semilla y longitud de raíz en plántulas de jitomate inoculadas con <i>Methylobacterium</i> sp.	24
3.7 Evaluación del desarrollo vegetal en plantas tratadas con <i>Methylobacterium</i> spp.	25
3.8 Desarrollo experimental y tratamientos para la evaluación de biocontrol.	25
3.8.1 Diseño experimental y distribución de tratamientos.	27
3.9 Evaluación del desarrollo vegetal de la planta y severidad del daño ocasionado por el patógeno.	27
3.10 Densidad de inóculo	28
3.11 Ensayo de expresión de genes relacionados con la vía del salicílico y etileno en plantas tratadas de jitomate con <i>Methylobacterium</i> sp.	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1 Evaluación de la germinación de semillas y longitud de la raíz de plántulas de jitomate inoculadas con <i>Methylobacterium</i> sp.	32
4.2 Evaluación del desarrollo vegetal en plantas de jitomate inoculadas con <i>Methylobacterium</i> spp. y el tratamiento control.	34
4.3.1 Desarrollo vegetal	41
4.3.2 Biocontrol de la densidad de inóculo de <i>Fusarium oxysporum</i> en el sustrato	47
4.4 Expresión de genes relacionados con la defensa en plántulas con <i>Methylobacterium</i> spp., y plantas control.	48
5. CONCLUSIONES	52
6. LITERATURA CITADA	53

ÍNDICE DE CUADROS

CUADROS

	Página
Cuadro 1. Protocolo para la amplificación del RT-PCR.	29
Cuadro 2. Condiciones de corrida de la RT-PCR.	30
Cuadro 3. Longitud de raíz en plántulas con <i>Methylobacterium</i> spp. y plántulas control.	33
Cuadro 4. Altura de plantas con <i>Methylobacterium</i> spp. y plantas control.	35
Cuadro 5. Número de hojas y longitud de las mismas, en plantas con <i>Methylobacterium</i> spp. y plantas control.	35
Cuadro 6. Producción, peso del fruto y peso seco de plantas con <i>Methylobacterium</i> spp. y plantas control.	38
Cuadro 7. Altura y Amplitud de las plantas de jitomate en diversos tratamientos periodo 1.	42
Cuadro 8. Altura y Amplitud de las plantas de jitomate en diversos tratamientos periodo 2.	43
Cuadro 9. Producción y peso seco de las plantas de jitomate en diversos tratamientos periodo 1.	45
Cuadro 10. Producción y peso seco de las plantas de jitomate en diversos tratamientos periodo 1.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Longitud de Raíz.	34
Figura 2.	Desarrollo vegetal.	36
Figura 3.	Precocidad del fruto.	37
Figura 4.	Desarrollo de Raíz.	39
Figura 5.	Gráfico de incidencia de enfermedad ocasionada por <i>Fusarium oxysporum</i> .	40
Figura 6.	Incidencia de enfermedad.	41
Figura 7.	Gráfico de Altura de plantas periodo 1 y 2	44
Figura 8.	Gráfico de la Densidad de inóculo	47
Figura 9.	Gráfico de la intensidad del gen Pal en plántulas con <i>Methylobacterium</i> spp.	49
Figura 10.	Gráfico de la intensidad del gen PR-6 en plántulas con <i>Methylobacterium</i> spp.	50
Figura 11.	Gráfico de la intensidad del gen SOD en plántulas con <i>Methylobacterium</i> spp.	50

RESUMEN

El jitomate se ha convertido en uno de los cultivos de mayor importancia económica a nivel nacional e internacional. Sin embargo, los problemas fitosanitarios a los que se enfrenta, como la incidencia de plagas y enfermedades radicales han ocasionado el uso desmedido de diversos fungicidas sintéticos lo que no es económica ni ambientalmente viable. Por lo anterior actualmente se buscan alternativas como el uso de bacterias promotoras de crecimiento que aporten a la planta diversos factores para su desarrollo y producción sin verse afectadas de manera significativa por la presencia de patógenos. En el presente trabajo se realizaron pruebas en el cultivo de jitomate a nivel laboratorio e invernadero empleando la bacteria metilotrófica *Methylobacterium* sp., como factor para inducir el desarrollo vegetal del cultivo y la resistencia del mismo contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Para lo cual se emplearon tratamientos en los que la bacteria fue colocada en contacto directo con las semillas de jitomate y posteriormente asperjada a las plantas. Durante los diferentes experimentos realizados se evaluó la germinación de semilla a nivel *in vitro*, y en plántula, la longitud de la raíz. En la planta se evaluó el desarrollo determinando parámetros como altura, número de hojas, amplitud de la planta, producción y peso seco a nivel invernadero. De igual manera se usaron plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* para evaluar el grado de biocontrol. Los tratamientos en los parámetros evaluados para el desarrollo de la planta y grado de enfermedad indicaron que existen diferencias positivamente significativas entre las plantas tratadas con *Methylobacterium* sp. y el grupo control. Adicionalmente se realizaron experimentos para evaluar la expresión de genes relacionados con la inducción de resistencia en plantas inoculadas con *Methylobacterium* spp. En este último caso, la expresión de dichos genes no fue diferencial entre los distintos tratamientos evaluados.

Palabras clave: Jitomate, desarrollo, enfermedad, genes.

ABSTRACT

The tomato has become one of the most economically important crops worldwide and national. However, the plant health problems it faces, as the incidence of pests and root diseases has led to the excessive use of various synthetic fungicides which is not economically or environmentally viable. It is currently looking for alternatives as the use of growth-promoting bacteria that contribute to the various factors in plant development, production and reducing damage by pathogens. This study evaluated the tomato crop at laboratory and greenhouse using the bacterium *Methylobacterium* sp., as a factor to induce the development of the crop plant and the effect of resistance to *Fusarium oxysporum*. In the treatments used the bacteria was placed in direct contact with the seeds and then sprayed tomato plants. The experiments were performed in two stages: seed germination and root length in vitro and in seedling and second, plants development was evaluated with parameters such as height, leaf number, amplitude, and dry weight production at greenhouse. Just as the use of Plants inoculated with *Fusarium oxysporum* to were used to assess the biocontrol degree. The treatments in parameters evaluated for plant development and degree of illness indicated that significant differences exist between plants positively treated with *Methylobacterium* sp. and the control group. Further experiments were conducted to evaluate the expression of genes related to the induction of resistance in plants inoculated with *Methylobacterium* spp. In the latter case, the expression of these genes was not differential between the different treatments.

Keywords: Tomato, development, disease genes

1. INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum*), es un fruto de tamaño y forma variable, generalmente globoso u oblongo; perteneciente a la familia de las Solanáceas. Es originario de América del Sur, aunque se considera a México como centro de su domesticación; crece en casi todos los terrenos y climas, a pesar de que prefiere suelos sueltos de textura silíceo-arcillosa y ricos en materia orgánica, las temperaturas óptimas a las que se desarrolla oscilan entre 20 y 30 °C (SAGARPA, 2009).

El jitomate es una de las principales hortalizas cultivadas en el mundo, además de ser una de las de mayor valor económico; su demanda crece constantemente y con ella la producción del mismo, así como su comercio (FAO, 2007).

La producción anual mundial del jitomate creció en un 9.5% en los últimos cuarenta años, siendo la hortaliza más cultivada (Ascencio-Álvarez *et al*, 2008). Para el 2007 la producción mundial de jitomate rojo fue de 126.2 millones de toneladas, con una tendencia a incrementarse en los años subsecuentes de acuerdo a datos establecidos por la FAO. A nivel nacional, el jitomate ocupa el segundo lugar dentro de las hortalizas cultivadas por la superficie explotada y por la generación de empleos y divisas (Carrillo-Fasio *et al*, 2003), sembrándose alrededor de 81,000 ha, de donde se obtienen cerca de 2 millones de toneladas del fruto (Ascencio-Álvarez *et al*, 2008).

Sin embargo, aun cuando los datos reflejan una alta producción de la hortalizas, en los últimos años, la superficie dedicada al cultivo de jitomate ha disminuido gradualmente, debido a diversos factores, entre ellos la incidencia creciente de plagas y enfermedades radiculares (Carrillo-Fasio *et al*, 2003). En México por ejemplo, los problemas fitosanitarios constituyen el principal limitante del cultivo del jitomate en las zonas productoras (Michel-Aceves *et al*, 2008).

Aun cuando se conocen varias enfermedades radiculares-vasculares del jitomate, la más

importante en la actualidad por su impacto y distribución, es el marchitamiento vascular o fusariosis, producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* que causa problemas en el cultivo disminuyendo en un 60% el redimiendo y afectando la calidad del producto (Carrillo-Fasio, *et al* 2003).

Tradicionalmente, la protección del cultivo de jitomate contra el ataque de hongos patógenos se ha realizado mediante el control químico; sin embargo, aun cuando los agroquímicos han permitido obtener incrementos substanciales en la producción, su uso indiscriminado ha ocasionado problemas de contaminación ambiental impactando negativamente la biodiversidad de los agroecosistemas, causando inestabilidad en los mismos como la mayor incidencia de enfermedades en los cultivos (Fernández, 2007) provocada por la inducción de resistencia en los patógenos y reducción de la carga microbiana benéfica, dando como resultado el desarrollo de generaciones resistentes (Michel-Aceves *et al* 2008). Actualmente se han desarrollado diversas técnicas biológicas muy prometedoras que incluyen la aplicación de sustancias como aceites esenciales y microorganismos antagonistas que se perfilan como alternativas a los fungicidas (Wang y col. 2008). Tal es caso del biológico como resultado del uso de bacterias inductoras de resistencia a patógenos, a través de la síntesis de elicitores (Pal, 2006).

Algunas bacterias como las metilotróficas o *Methylobacterium* sp. son de importancia por su propiedad de regeneración de tejido, síntesis de fitohormonas y vitaminas, así como el estímulo de germinación de semillas y más recientemente se ha reportado su capacidad para inducir proporcionar efectos de respuestas defensivas en plantas contra fitopatógenos (Madhaiyan *et al*, 2004). Sin embargo, en México no se tienen reportes sobre trabajos de búsqueda de fuentes de resistencia a la marchites vascular en jitomate; por lo que con la finalidad de reducir las pérdidas económicas, debidas a esta enfermedad los agricultores aplican un gran número de productos químicos irresponsablemente lo que ocasiona mayores costos de producción y contaminación ambiental (Ascencio-Álvarez *et al*, 2008).

1.1 Objetivos

Determinar el efecto de *Methylobacterium sp.* sobre el desarrollo vegetal y la resistencia inducida contra *Fusarium oxysporum* en plantas de jitomate.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Evaluar el efecto de *Methylobacterium sp.* en la germinación de semillas de jitomate.
- ✓ Determinar el desarrollo vegetal inducido por *Methylobacterium sp.* en la planta de jitomate.
- ✓ Determinar el grado de biocontrol de *Fusarium oxysporum* empleando *Methylobacterium sp.*

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Orígenes del jitomate y particularidades del cultivo.

El jitomate es originario de la América del Sur, de la región andina, particularmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. Sin embargo, su domesticación fue llevada a cabo en México. El nombre de jitomate procede del náhuatl xictli, ombligo y tomatl, jitomate, que significa jitomate de ombligo (SAGARPA, 2010).

La planta de jitomate pertenece a la familia de las solanáceas, la especie (*Solanum lycopersicum*) es perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas), cuenta con una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. El grosor del eje en el tallo principal oscila entre 2-4 cm en su base, sobre el que se van desarrollando hojas, tallos secundarios (ramificación simpoidal) e inflorescencias, su hoja está compuesta e imparipinnada, con folíolos peciolados, lobulados y con borde dentado, en número de 7 a 9 y recubiertos de pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alternativa sobre el tallo. El mesófilo o tejido parenquimático está recubierto por una epidermis superior e inferior, ambas sin cloroplastos. La epidermis inferior presenta un alto número de estomas. Dentro del parénquima, la zona superior o zona en empalizada, es rica en cloroplastos. Los haces vasculares son prominentes, sobre todo en el envés, y constan de un nervio principal. Su flor es perfecta, regular e hipógina y consta de 5 o más sépalos, de igual número de pétalos de color amarillo, y dispuestos de forma helicoidal a intervalos de 135°, de igual número de estambres soldados que se alternan con los pétalos y forman un cono estaminal que envuelve al gineceo, y de un ovario plurilocular (SAGARPA, 2010).

El jitomate es un fruto que puede alcanzar un peso entre unos pocos miligramos y 600 gramos. La temperatura óptima de desarrollo oscila entre 20 y 30 °C durante el día y entre 1 y 17 °C durante la noche; temperaturas superiores a los 30-35 °C afectan la fructificación, por mal desarrollo de óvulos y al desarrollo de la planta en general y del sistema radicular

en particular (SAGARPA,2010). Temperaturas inferiores entre 12-15 °C también originan problemas en el desarrollo de la planta. A temperaturas superiores a 25 °C e inferiores a 12 °C la fecundación es defectuosa o nula. La maduración del fruto está muy influida por la temperatura en lo referente tanto a la precocidad como a la coloración, de forma que valores cercanos a los 10° C así como superiores a los 30 °C originan tonalidades amarillentas (Corpeño, 2004).

La humedad relativa óptima se encuentra entre un 60 % y un 80 %. Humedades relativas muy elevadas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas y el agrietamiento del fruto y dificultan la fecundación, debido a que el polen se compacta, abortando parte de las flores. El rajado del fruto igualmente puede tener su origen en un exceso de humedad edáfica o riego abundante tras un período de estrés hídrico. También una humedad relativa baja dificulta la fijación del polen al estigma de la flor (Everhart, 2002).

En cuanto a requerimientos de luz los valores reducidos de luminosidad pueden incidir de forma negativa sobre los procesos de la floración, fecundación así como el desarrollo vegetativo de la planta. En los momentos críticos durante el período vegetativo resulta crucial la interrelación existente entre la temperatura diurna y nocturna y la luminosidad (Corpeño, 2004).

En cuanto a suelos la planta del jitomate no es muy exigente, excepto en lo que se refiere al drenaje, aunque se desarrolla mejor en suelos sueltos de textura silíceo-arcillosa y ricos en materia orgánica. No obstante se desarrolla también en suelos arcillosos enarenados. En cuanto al pH, los suelos pueden ser desde ligeramente ácidos hasta ligeramente alcalinos cuando están enarenados. Las especies cultivadas en invernadero son las que mejor toleran las condiciones de salinidad tanto del suelo como del agua de riego (Everhart, 2002).

2.2 Importancia económica del jitomate.

2.2.1 Importancia Internacional.

El jitomate es una de las principales hortalizas cultivadas en el mundo, además de ser una de las de mayor valor económico; su demanda crece constantemente y con ella la producción del mismo, así como su comercio (FAO,2007).

La producción anual mundial del jitomate creció en un 9.5% en los últimos cuarenta años, siendo la hortaliza más cultivada (Ascencio-Álvarez *et al* 2008). Para el 2007 la producción mundial de jitomate rojo fue de 126.2 millones de toneladas, con una tendencia a incrementarse en los próximos años de acuerdo a datos establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO.

El jitomate rojo es considerado de importancia mundial por cultivarse en diversos países, sin embargo más del 50% de la producción se concentra en cinco países: China (26.7%), Estados Unidos (9.1%), Turquía (7.9%), India (6.8%) y Egipto (6.0%). Este desarrollo también se ha visto reflejado dentro de las exportaciones a nivel mundial, donde México, Siria y España representan el 50% de las exportaciones en el mundo, según datos obtenidos por la FAO (2006).

2.2.2 Importancia Nacional.

En lo a que a nivel nacional se refiere, el jitomate (*Solanum lycopersicum*) ocupa el segundo lugar dentro de las hortalizas cultivadas por la superficie explotada y por la generación de empleos y divisas (Carrillo-Fasio *et al* 2003); sembrándose alrededor de 81,000 ha, de donde se obtienen cerca de 2 millones de toneladas del fruto (Ascencio-Álvarez *et al*, 2008).

A nivel nacional, es el principal producto hortícola de exportación, ya que representa el 37 % del valor total de las exportaciones de legumbres y hortalizas y el 16 % del valor total de las exportaciones agropecuarias, sólo superada por el ganado vacuno. Para el 2008, según datos preliminares, la producción nacional de jitomate fue de 2.3 millones de

toneladas, lo que representó un decremento del 4.1 % respecto al año anterior, y un 11.2 % con respecto a 2006. En el periodo comprendido entre 2002 y 2008, la producción presentó una Tasa Media Anual de Crecimiento (TMAC) del 2.6%. Para 2009 se estimó un crecimiento de 2.7% en la producción, ubicándola en 2.4 millones de toneladas. Si bien existe producción de jitomate rojo en todas las entidades del país, seis son las que concentran más del 69% de la producción nacional (Sectorial, 2009).

2.3 Principales estados productores.

Sinaloa es el principal productor a nivel nacional, para el 2008 se estima que produjo 852.7 mil toneladas, lo que representa el 36.6% de la producción nacional. Durante el periodo 2000-2008 la producción presentó una tendencia creciente ubicando así la TMAC en 4.5% (Sectorial, 2009).

Baja California como segundo estado productor de jitomate rojo, entre el año 2002 y 2008 registró una TMAC de 0.9%. Al cierre de 2008, se estima que la producción total fue de 206.2 mil toneladas, 5.0% superior a la producción registrada en 2007 (Sectorial, 2009).

En lo que a Michoacán se refiere para el 2008 se estima que se produjo 175.7 mil toneladas, lo que representa una caída del 21.9% respecto al año anterior. La TMAC en el periodo 2002-2009 se ubicó en 5.5% reflejando una tendencia a la baja en la producción. Sin embargo, su consolidación en las superficies destinadas al jitomate en ambos ciclos agrícolas, le permite surtir el mercado nacional durante los meses de enero a mayo y de noviembre a diciembre, con variedades de saladette, mientras que algunas cantidades de bola seleccionada tiene cabida dentro del global de exportaciones a los Estados Unidos (SAGARPA, 2009).

En el periodo 2002-2007, el precio al medio rural (PMR) ha mostrado un comportamiento mixto. Tan sólo entre 2006 y 2007 se registró un decremento de 19.2 %. La TMAC nacional del PMR presenta un crecimiento de 8.8%. Por su parte, en 2007 los principales estados productores presentaron decrementos importantes: Baja California Norte 36.9 %, Baja California Sur 45.7 %, Jalisco 35.2 %, Michoacán 37.8 %, San Luis

Potosí 22.8 % y Sinaloa 0.3 %.

De acuerdo con la FAO, México es el principal exportador de jitomate rojo fresco en el mundo. En el periodo 2002-2006, la TMAC de las exportaciones se ubicó en 5.0%. En el periodo 2002-2008, el rendimiento promedio del jitomate rojo en México fue de 33.9 toneladas por hectárea, con una TMAC del 5.9%. A pesar de la fuerte caída registrada en la superficie sembrada, la producción no se ha visto afectada, debido al incremento en el rendimiento (SAGARPA, 2009).

De los principales estados productores, el que registra la más alta productividad por hectárea es el estado de Baja California, con un rendimiento de 56.7 ton/ha.

2.4 Propiedades del jitomate.

Es un alimento poco energético, dos jitomates medianos tan sólo aportan 22 calorías. Aproximadamente el 95% de su peso es agua, cerca de un 4% son hidratos de carbono. Se le considera una fruta-hortaliza ya que contiene mayor cantidad de azúcares simples que otras verduras, lo que le confiere un ligero sabor dulce. También es fuente importante de ciertas sales minerales (potasio y magnesio, principalmente). De su contenido en vitaminas destacan la B1, B2, B5, vitamina C siendo durante los meses de verano una de sus principales fuentes. Así mismo su contenido de carotenoides como el licopeno (pigmento que da el color rojo característico al jitomate); sustancias que tienen carácter antioxidante con función protectora de nuestro organismo (Guerrero-Guil *et al*, 2009).

Entre su mayor importancia nutricional se encuentra el contenido de licopeno por ser considerado como un excelente antioxidante.

El licopeno es un pigmento vegetal, soluble en grasas, que aporta el color rojo característico a los jitomates, sandías y en menor cantidad a otras frutas y verduras. Pertenece a la familia de los carotenoides como el β -caroteno, sustancias que no sintetiza el cuerpo humano, sino los vegetales y algunos microorganismos, debiéndolo tomar en la alimentación como micronutriente (Candelas, 2006).

En nuestra dieta obtenemos licopeno a partir de alimentos muy definidos, fundamentalmente a través del consumo de jitomate y sus derivados (salsas, jitomate frito, jitomate triturado, cátsup, pizzas, zumos), así como de la sandía. En el jitomate maduro, el carotenoide mayoritario es el licopeno del cual contiene un 83% y en porcentaje también importante, se encuentra el β -caroteno, entre un 3-7%, y otros como son el γ -caroteno, que al igual que el β -caroteno tienen actividad provitáminica A, fitoeno, fitoflueno, etc. El contenido en licopeno aumenta con la maduración de los jitomates y puede presentar grandes variaciones según el cultivar, condiciones del cultivo como el tipo de suelo y clima, tipo de almacenamiento, etc. La cantidad de licopeno en los jitomates de ensalada está alrededor de 3000 $\mu\text{g}/100\text{g}$ y en los de "tipo pera" es más de diez veces esa cifra. De forma general, el contenido de licopeno es menor en los jitomates cultivados en invernadero, en cualquier estación, que en los jitomates producidos al aire libre durante el verano, así como también el contenido de licopeno es menor en frutos que se recolectan verdes y maduran en almacén en comparación con los frutos madurados en la tomatera (Zapata, 2007).

El licopeno posee propiedades antioxidantes, y actúa protegiendo a las células humanas del estrés oxidativo, producido por la acción de los radicales libres, que son uno de los principales responsables de las enfermedades cardiovasculares, del cáncer y del envejecimiento. Además, actúa modulando las moléculas responsables de la regulación del ciclo celular y produciendo una regresión de ciertas lesiones cancerosas. No se conocen exactamente las bases biológicas ni fisicoquímicas de estas propiedades, pero parecen directamente relacionadas con el elevado poder antioxidante del licopeno, mucho más que otros antioxidantes como la vitamina E o el β -caroteno. Un gran número de procesos cancerígenos y degenerativos están asociados a daños oxidativos sobre el genoma y los mecanismos genéticos de control de la proliferación y diferenciación celular. El licopeno actúa como un potente neutralizador de radicales libres (óxido y peróxido) atenuando los daños oxidativos sobre los tejidos (Candelas, 2006).

2.5 Enfermedades del jitomate.

La importancia del jitomate a nivel mundial y nacional hace de esta hortaliza una de las de preocupación general, al ser atacada por diversas enfermedades y múltiples plagas lo que causa grandes pérdidas económicas y disminución de empleos.

Entre las enfermedades más conocidas que atacan al cultivo se encuentra el virus mosaico de jitomate, virus mosaico de pepino, virus bronceado de jitomate, cenicilla, moho gris, moho blanco, tizón tardío, tizón temprano, mancha bacteriana y pudriciones radiculares y ahogamiento causadas por *Rhizoctonia solani*, *Phythium spp.* y el patógeno utilizado en este estudio, *Fusarium spp.* las cuales presentan dos tipos de síntomas: 1) En la germinación, a causa de la pudrición de la semilla, donde es común encontrar a *Phythium sp* y *Rhizoctonia solani*. Pueden encontrarse semillas que germinen pero las plantas no emergen del suelo (ahogamiento preemergente). 2) Ocurre cuando las plántulas se marchitan rápido debido a la pudrición de los tejidos del cuello de la raíz y presentan un estrangulamiento en esa zona (*Rhizoctonia solani*) y en ocasiones se observa coloración negruzca arriba del cuello. En este caso, se ha encontrado *P. aphamidermatum*, *P. ultimum*, *P. debaryanum* y *Fusarium sp.* Este complejo se presenta, con frecuencia, en almácigos, pero también puede presentarse en campo (Gaber y Wiebe, 1997).

2.6 Generalidades de *Fusarium oxysporum*.

Los hongos del género *Fusarium* son prolíferos y muy abundantes en las zonas tropicales y templadas del mundo. Además, este género es uno de los fitopatógenos que causa daño a diversas plantas cultivadas, ocasionando distintos tipos de enfermedades, tales como manchas en las hojas, pudrición de raíces y en la base del tallo, cánceres de las plantas, muerte descendente, pudrición de frutos y marchitamientos vasculares (Gonsalves, 2000).

Este hongo se caracteriza por producir tres tipos de esporas: las microconidias, macronidias y clamidosporas, estas últimas tienen paredes muy gruesas, lo cual las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables y a la ausencia de hospedantes.

Distintas formas especiales de *F. oxysporum* pueden sobrevivir en un estado de reposo en el suelo durante muchos años (son viables después de 40 años).

La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento de los *Fusarios*. Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodoquios o masas limosas (pionotos). Los macroconidios son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre son producidos ambos tipos de esporas. Los conidióforos del micelio aéreo en algunos casos sólo constan de una célula conidiógena, en otros están ramificados, a veces en verticilos. Las monofiálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula (Miller, 2008) (Carrillo-Fasio, 2003).

Las colonias de los distintos fusarios que crecen moderada a profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia, excepto pardo oscuro o negro. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, como un fieltro o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es limoso. Hay fusarios con pionotos de color anaranjado. Los pigmentos que difunden en el agar suelen variar de color o tono con el pH. Algunas especies presentan zonas concéntricas de distinta morfología macroscópica debido a la secuencia luz – oscuridad (Carrillo, 2003).

Los conceptos de especies fúngicas están basados sobre la morfología, los experimentos de entrecruzamiento o los datos moleculares, o en la integración de dos o tres de estos juicios. Aunque los macroconidios son considerados típicos de *Fusarium*, hay otros géneros que forman esporas parecidas, con célula pie o sin ella. Pero la mayoría de estos hongos producen conidiomas de tipo acervular, estromático o picnidial y los *Fusarium* presentan esporodoquios. Por otra parte si los fusarios no producen macroconidios pueden ser

confundidos con otros géneros (Flores, 2005).

Algunos *Fusarium* pueden crecer en el refrigerador y aquéllos con capacidad competitiva contribuir a la podredumbre de frutas y hortalizas almacenadas. La persistencia de los Fusarios en el suelo durante uno a varios años se debe, principalmente, a la presencia de los clamidosporas. Estos requieren para germinar fuentes exógenas de nutrimentos por lo que son muy sensibles al antagonismo, pero su distribución casi universal indica la omnipresencia de los microambientes específicos. La tolerancia de algunos *Fusarium*, tales como *F. oxysporum* y *F. solani*, a una alta presión parcial de CO₂ permite el aislamiento selectivo de los mismos a partir de algunos substratos muy poblados (Randhawa, 2009).

La decoloración vascular a menudo se extiende a la parte superior del tallo. Agricultores frecuentemente cortan el tallo para ver la decoloración vascular y confirmar el diagnóstico del campo. *Fusarium* puede ser fácilmente aislado del tejido del tallo. Sin embargo, si el *Fusarium* es aislado del suelo o de plantas asintomáticas, existe la posibilidad que sea no-patogénico. Dichos aislamientos deben ser analizados para un diagnóstico de patógenos más certero (Randhawa, 2009).

2.6.1 Daños e importancia de *Fusarium oxysporum*.

En los últimos años, la superficie dedicada al cultivo de jitomate ha disminuido gradualmente, debido a diversos factores, entre ellos la incidencia creciente de plagas y enfermedades radiculares (Carrillo-Fasio, 2003). En México por ejemplo, los problemas fitosanitarios constituyen la principal limitante del cultivo del jitomate (*Solanum lycopersicum*) en las zonas productoras (Michel-Aceves, 2001). Por su importancia destacan las enfermedades fungosas provocadas por *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, este último provoca pudriciones de raíces y caída de plántulas en muchas hortalizas anuales (González, 2004).

Sin embargo, aun cuando se conocen varias enfermedades radiculares-vasculares del jitomate, la más importante en la actualidad por su impacto y distribución, es el marchitamiento vascular o fusariosis *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Carrillo-

Fasio, 2003) que causa problemas en el cultivo disminuyendo en un 60 % el rendimiento y afectando la calidad del producto. Esta enfermedad, la cual se ha reportado por lo menos en 32 países, prospera en una diversidad de condiciones ambientales desde trópicos secos hasta climas templados (Ascencio-Álvarez *et al*, 2008) siendo más agresiva en climas cálidos y suelos con textura arenosa; aunque se han reportado fuertes infecciones bajo condiciones de invernadero, principalmente cuando la planta es sometida a estrés hídrico, en la etapa de floración y fructificación (Carrillo-Fasio, 2003).

Los síntomas comienzan con el amarillamiento de las hojas, marchitándolas y provocando su muerte aun cuando permanezcan adheridas al tallo; extendiéndose después al resto de la planta. Se observa además en el tallo una necrosis vascular color café en forma de anillo, la cual se extiende a la parte apical de la planta marchitando y matando a las plántulas o plantas adultas. Cuando las raíces y los tallos son colonizados, los síntomas se muestran como una pudrición necrótica, particularmente sobre las raíces laterales más pequeñas; lo cual acelera el marchitamiento del follaje (Carrillo-Fasio, 2003).

Los *Fusarium* causantes de marchites siguen un patrón similar de infección; penetrando por la raíz y colonizándose en el tallo de las plantas el sistema vascular (Rodríguez *et al* 2002); por lo que resulta de importancia el conocimiento de *Fusarium oxysporum* y de sus razas como un aspecto para el manejo de la enfermedad o para entender el comportamiento de las variedades cultivadas. Este hongo además, suele ser muy variable por su especificidad y virulencia (Lugo, 2000).

Aparte de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, detectados a nivel mundial causando enfermedades de jitomate, también se ha descrito a *Fusarium solani* como un importante patógeno de este cultivo en distintos lugares del mundo (Monrealegre, 2003).

2.6.2 Tratamientos convencionales y alternativos contra *Fusarium oxysporum*.

El uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos substanciales en la producción; no obstante, sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sustentabilidad de la agricultura (Osorio, 2008).

El uso desmedido de agroquímicos se ve reflejado principalmente en los cultivos de importancia como es el caso del jitomate, relacionado con esto el ataque a enfermedades fúngicas como en el caso de *Fusarium* muestra una lista larga de agroquímicos en uso. Aun así, entre los fungicidas más utilizados se encuentra el bromuro de metilo considerado como uno de los mejores fumigantes. MAPAM (metam de sodio o metam de potasio) (Randhawa, 2009).

Sin embargo el control de patógenos mediante el uso de agroquímicos traen consecuencias nocivas sobre el medio ambiente; además generan resistencia por parte de los fitopatógenos, sin olvidar el detrimento que causa en la salud humana. Lo anterior ha justificado la búsqueda de agentes de control biológico como una alternativa viable al uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura (Michel-Aceves, 2001).

Una de estas alternativas es la solarización del suelo, basada en un proceso hidrotermal; y otra es el control biológico de enfermedades por acción de bioantagonistas (González *et al*, 2004). Tanto los hongos como las bacterias son reconocidos por ser partícipes comunes para suprimir naturalmente fitopatógenos en los cultivos, los cuales limitan la severidad de las enfermedades (Michel-Aceves, 2001).

Los hongos más utilizados y conocidos en control biológico pertenecen a los Hyphomycetes; entre ellos, los géneros *Trichoderma*, *Penicilium* y *Gliocladium*. El género *Trichoderma* produce una actividad antibiótica, el micoparasitismo y habilidad de incrementar el desarrollo y crecimiento de las plantas. Además se utiliza como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia spp.*, *Pythium spp.* *Botrytis*

cinerea y *Fusarium spp* (Michel-Aceves, 2001).

Dentro de los microorganismos antagonistas se encuentran los que ejercen un efecto en el desarrollo de las plantas. Un caso de estos es el de las bacterias promotoras de crecimiento; organismos que habitan de manera natural el suelo y que pueden ayudar en el crecimiento del tejido de las plantas de manera directa o indirecta.

La estimulación indirecta incluye una serie de mecanismos por medio de los cuales la bacteria inhibe el desarrollo de fitopatógenos que podrían limitar el desarrollo de la planta. La estimulación directa incluye el proveer a la planta con fitohormonas y ayudando a la fijación del nitrógeno y el fósforo por mencionar algunos (Mayak, 2004). Otro mecanismo de control directo es la defensa de las plantas mediante la inducción de resistencia, la cual es el incremento de la capacidad de defensa en la planta por estimulación apropiada. La inducción de resistencia no es la creación de resistencia donde no la hay, es la activación de mecanismos de defensa que se expresa cuando la planta es desafiada por algún patógeno. El estímulo de resistencia puede ser desencadenado por ciertos químicos y patógenos avirulentos o virulentos. Generalmente, la inducción de resistencia es sistémica, debido a que la capacidad defensiva se incrementa, no solo donde ocurre el contacto con el agente inductor, sino que se extiende a áreas distales (Oyoque, 2008).

Sin embargo, estos hongos siguen atacando a cultivos susceptibles como resistentes, no obstante a que la generación de estos últimos constituyen el avance más importante en el control de esta enfermedad (Apodaca, 2004).

2.7 Bacterias promotoras de crecimiento.

Aun cuando el descubrimiento de los microorganismos fue establecido hasta 1683; el uso de microorganismos en la agricultura ha sido aprovechado desde la antigüedad debido a que las asociaciones que se producen entre las plantas y los microorganismos del suelo han sido reconocidas como benéficas (Dardanelli, 2010). Actualmente el uso de biopreparados, a partir de microorganismos constituye una de las alternativas más prometedoras dentro del contexto agrícola mundial. La rizosfera de las plantas es una zona de intensa actividad

microbiana donde la biomasa microbiana lleva a cabo intensos intercambios complejos mutuamente beneficiosos y perjudiciales e incluso neutrales; donde cada uno de estos organismos juega un papel importante (Dardanelli, 2010). Entre ellos, las bacterias asociativas consideradas como promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) se destacan por sus efectos beneficiosos tanto para las plantas como para los ecosistemas (Hernández, 2006), estimulando directa o indirectamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, solubilización de minerales y nutrimentos, incremento en el volumen de la raíz, inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos antagónicos e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Loredo-Osti, 2004).

La conjunción de estos mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas; se ha observado un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento hasta de 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábano, jitomate, trigo y soya (Jiménez, 2001). Por lo cual los microorganismos obtienen a cambio diferentes compuestos orgánicos, tales como aminoácidos, azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos, auxinas, y los flavonoides, a los que se les han identificado como posibles exudados de las raíces de las plantas (do Vale Barreto, 2010).

Sin embargo es necesario tener en cuenta que aun cuando las BPCV pueden ser de vida libre o asociativas, su relación con el desarrollo depende de su establecimiento y persistencia a lo largo de la estación de crecimiento (Loredo-Osti, 2004).

2.8 Hormonas vegetales de crecimiento.

Las hormonas vegetales son un grupo de sustancias de origen natural que participan en procesos fisiológicos de las plantas que consisten principalmente en el crecimiento, diferenciación y desarrollo; además de otros procesos como el movimiento estomático (Davies, 2004).

La acción fisiológica desencadenada por una determinada fitohormona depende de la combinación de tres factores básicos: concentración de la hormona en el sitio de actuación, sensibilidad de las células o tejidos en la presencia de otras hormonas vegetales. Cabe mencionar que además, las respuestas de hormonas vegetales son específicas del tejido y del tiempo, cada respuesta se produce en un momento determinado de la planta (Cohen, 2006; Davies, 2004). La concentración de una fitohormona en una determinada célula o tejido tiene un papel importante en la regulación hormonal y depende de su biosíntesis, de los mecanismos de degradación, transporte y de procesos de inactivación reversible (Davies, 2004).

Actualmente existen cinco grupos de hormonas vegetales reconocidas entre las que se encuentran las auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno. Cada una de las principales clases de hormonas provoca una variedad de respuestas de crecimiento y morfogénesis. Por ejemplo, las auxinas están implicadas en la regulación de la división celular, el crecimiento celular, dominancia apical, respuestas a estímulos direccionales. También algunos compuestos que sirven como precursores del IAA (ácido indolacético) pueden tener actividad de auxina participando en procesos como la ampliación de la célula, crecimiento del tallo, iniciación de las raíces en estacas, en ramas y en cultivo de tejidos. Sin embargo cabe destacar que las auxinas pueden participar con otras hormonas que pueden inhibir o promover procesos como en el caso de la caída de las hojas y frutos en conjunto con el etileno o la división celular de tejidos en la que participa en combinación con las citosinas (Cohen,2006).

Por otra parte las citosinas participan en la expansión foliar probablemente como un mecanismo de ajuste debido al crecimiento que ejercen en las raíces de las plantas, también pueden aumentar la apertura de las estomas en algunas especies y su aplicación conduce a la acumulación de clorofila. En el caso de las giberelinas inducen la germinación de las semillas, la floración temprana en algunas especies y por lo tanto el crecimiento del fruto.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las hormonas vegetales son activos que trabajan en pequeñas concentraciones por lo que un exceso puede ocasionar efectos

inhibitorios (Cohen, 2006).

2.9 Fitohormonas y *Methylobacterium* spp.

2.9.1 Fitohormonas.

En décadas recientes ha aumentado la evidencia de que además de la fijación del nitrógeno y el incremento de la toma de nutrientes, la síntesis y fijación de fitohormonas por la asociación de microorganismos con la planta pueden estar jugando un importante papel en el desarrollo de la planta. Se cree que las fitohormonas participan en diferentes patrones de crecimiento en la raíz y la planta, también llamados reguladores vegetales de crecimiento por su rol en dicho efecto, existe también evidencia que las hormonas de crecimiento producidas por algunas bacterias también pueden intervenir en el crecimiento de la planta anfitriona; además está establecido que la relación del suelo con la asociación planta-bacteria incluye grupos Gram – y Gram + simbióticos y bacterias fijadoras de nitrógeno todas estas pueden sintetizar fitohormonas (Madhaiyan, 2006).

Muchas de estas bacterias pueden producir más de una fitohormona. Se cree que las auxinas son fitohormonas esenciales para la vida de la planta ya que no se ha encontrado una sola planta que no sea capaz de sintetizarlas, el ácido indol acético es la auxina más importante en las plantas y controla muchos procesos fisiológicos importantes como lo es el alargamiento, la división y la especialización de las células, diferenciación de tejidos y la respuesta de la planta a la luz y a la gravedad. La cantidad de indol acético producida y la sensibilidad del tejido también juegan un papel importante en varias funciones de la raíz como la elongación de esta y la producción de raíces adventicias (Jeounghyun, 2006).

Las citoquininas son derivadas del adenosin que tiene un efecto importante en las funciones fisiológicas de la planta y cuyos niveles pueden alterar las funciones de la raíz (Jeounghyun, 2006).

2.9.2 Fitohormonas relacionadas con *Methylobacterium spp.*

En la última década han llamado la atención de los investigadores las bacterias metilotróficas aerobias por sus propiedades fitosimbióticas, se cree que la activación de la habilidad de regeneración de tejido está relacionada con la propiedad de la *Methylobacterium* de sintetizar fitohormonas y vitaminas (Shirokikh, 2007).

Las *Methylobacterium spp.* Es un grupo de bacterias conocidas como metilótrofos facultativos de pigmentos rosas o PPFMs por sus siglas en inglés (Madhaiyan, 2004). Consideradas por algunos autores como bacterias promotoras de crecimiento de tejidos, ya que se ha encontrado la estimulación de crecimiento de los ápices y el estímulo de la germinación de semillas. Son clasificadas como alfa protobacterias y son capaces de desarrollarse degradando sustancias como el formaldehído y el metanol, pueden ser aisladas fácilmente de tejido vegetal usando medios selectivos que contengan metanol una fuente de carbono y se identifican por su color rosa característico. Son muy abundantes y no son patógenas. Se distribuyen de manera equitativa en toda la filósfera y se ha aislado de más de 100 plantas (Madhaiyan, 2004). Se han encontrado de 10^4 - 10^7 UFC g⁻¹ de tejido vegetal, el número más alto de organismos detectados en tejido meristemático y de crecimiento. La naturaleza de su crecimiento lento y su distribución en toda la planta sugiere que su número es regulado simplemente por dilución al expandirse el tejido vegetal. Se ha reportado su desarrollo en la rizosfera de la planta. Sin embargo no se ha descubierto su función biológica (Madhaiyan, 2004).

El significado práctico de esta bacteria como lo es la biosíntesis de aminoácidos, proteínas simples y la bioconversión de algunos sustratos no útiles para otros organismos como lo es el metanol emitido por las estomas de las plantas, en productos de un valor económico las ha vuelto de interés, así como su importancia fisiológica por su capacidad de desarrollarse en metanol y metilaminas así como en compuestos basados en C₂, C₃ y C₄ (Indiragandhi, 2007), además de otros aspectos benéficos tales como la estimulación de la germinación de semillas y la promoción de crecimiento vegetal, producción de fitohormonas; también se tiene conocimiento de inducción de respuestas defensivas en

plantas de arroz, contra *Rhizoctonia solani* y *Aspergillus niger* (Indiragandhi, 2007).

Hasta el momento se sabe que la promoción del crecimiento de tejido que provoca la *Methylobacterium* se debe a su producción de fitohormonas y el estímulo en la germinación. Algunas variedades contribuyen al sabor en las fresas y se han encontrado como endosimbióticos en las células; algunas variedades no pigmentadas forman nódulos en las raíces de algunas leguminosas ayudando a la fijación del nitrógeno (Mayak, 2004).

2.9.3 Mecanismos de defensa Planta-Patógeno.

Para combatir las invasiones de microorganismos, las plantas han desarrollado varias líneas de defensa. Estas pueden ser preexistentes, barreras físicas y químicas y/o mecanismos de resistencia inducible que puede activarse a la infección por patógenos (Wees, 1999). Estas interacciones entre patógenos y plantas pueden llevar ya sea a una infección exitosa (respuesta compatible) o a resistencia (respuesta incompatible); en las interacciones de incompatibilidad infecciones de virus, bacterias u hongos desencadenan una serie de respuestas localizadas dentro y alrededor de las células infectadas. Esta respuesta incluye un brote de agentes oxidantes que puede llevar a la muerte celular. Debido a esto el patógeno puede ser atrapado en células muertas aparentemente para prevenir su dispersión del sitio inicial de infección. Respuestas locales futuras en las células circundantes incluyen cambios de composición en la pared celular que inhiben la penetración por parte del patógeno, y la síntesis de compuestos antimicrobianos de *novo* como las fitoalexinas y proteínas relacionadas a la patogenicidad (Heil, 2002) a esta respuesta comúnmente se le conoce como respuesta de hipersensibilidad (HR), sin embargo es ampliamente conocido que las plantas pueden defenderse contra la infección de patógenos a través de una variedad de mecanismos que pueden ser locales, constitutivas o inducibles (Percival, 2001).

La resistencia inducida es una respuesta fisiológica “del aumento de la capacidad defensiva” provocada no solo por la infección de patógenos sino además por estímulos ambientales, lo que permite que las plantas desencadenen una protección contra posteriores desafíos bióticos y contra una amplia gama de agentes patógenos y parásitos (Choudhary, 2007). A causa de esta respuesta (o por lo menos regulada), una señal se disemina a través

de la planta e induce sutiles cambios en la expresión de genes en zonas no infectadas de la misma. La respuesta sistémica involucra la producción en algunos casos de *novo* de fitoalexinas y PR (proteínas relacionadas con la patogénesis). Mientras que las fitoalexinas son mayormente caracterizadas en la respuesta local, las proteínas relacionadas con la patogénesis se producen tanto local como sistémicamente (Heil, 2002).

Actualmente se conocen dos vías de defensa sistémica; la resistencia sistémica adquirida SAR (Systemic Acquired Resistance) y la resistencia sistémica inducida ISR (Induction of Systemic Resistance) que pueden diferenciarse en función de la naturaleza de la sustancia desencadenante y las vías de reglamentación involucrados. La SAR puede ser desencadenada por la exposición de la planta a microorganismos virulentos, no virulentos y no patógenos; dependiendo de la planta y los elicitores, esta vía requiere un tiempo de establecimiento para la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis y el ácido salicílico. La ISR es potenciada generalmente por rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR). A diferencia de la SAR, la ISR no implica la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis o ácido salicílico, sino utiliza las vías reguladas por jasmonato y etileno (Choudhary, 2007).

En la actualidad, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) mediada por la resistencia sistémica inducida (ISR) ha recibido considerable atención debido a los enfoques biológicos para controlar plagas y enfermedades (Madhaiyan, 2006).

La inoculación en la raíces de algunas plantas con *Metylobacterium* han reducido el efecto de *Rhizoctonia solani* en plantas de arroz, incrementado la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis y la producción de fenólicos en la planta. Un gran número de enzimas, incluyendo peroxidasa (PO), PAL, lipooxigenasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa se han asociado con la resistencia sistémica. Sin embargo, el aumento de las actividades y la acumulación de estas enzimas dependen principalmente del agente inductor, así como genotipo de la planta, el estado fisiológico y patógeno (Madhaiyan, 2004). Otro caso similar ha sido señalado en el estudio realizado en maní inoculado con *Methylobacterium sp.*, donde indujo protección contra *A. ninger* y además mejoró significativamente la

germinación y el vigor de las plántulas, también aumentaron las proteínas PR y fenoles en comparación con los controles, y por lo tanto la inducción de las barreras físicas y químicas causadas por el aumento de actividad de las enzimas asociadas (Madhaiyan, 2006).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Zona de estudio.

La investigación se desarrolló en las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN MICHOACÁN); el cual se ubica en la ciudad de Jiquilpan en el estado de Michoacán, entre las coordenadas 19°59' de latitud norte y 102°43' de longitud oeste, a una altura de 1,550 metros sobre el nivel del mar. La ciudad cuenta con clima templado con lluvias en verano. Tiene una precipitación pluvial anual de 826 milímetros y temperaturas que oscilan de 10.4° C a 25.4 ° C. Entre sus principales actividades destaca la agricultura, con cultivos importantes como el maíz, sorgo y alfalfa (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, 2009).

3.2 Aislamiento y desarrollo de *Methylobacterium* sp.

El aislamiento de la bacteria se realizó a partir de hojas de la planta de jitomate en medio de amonio y sales minerales AMS, de aquí se llevó a cabo el traspaso de *Methylobacterium spp.*, a medio AMS con agar al 0.8g/l¹ el cual contenía por litro de agua, 0.5g de NH₄CL, 0.7g de K₂HPO₄, 0.54g de KH₂PO₄, 1.0g de MgSO₄, 0.2g de CaCL₂, 4.0mg de FeSO₄, 10µg de ZnSO₄, 30µg de MnCl₂, 300µg de H₃BO₃, 200µg de CoCl₂, 10µg de CuCl₂, 20µg de NiCl₂, 60µg de NaMoO₄, se ajustó a un pH de 6.8 y se adicionaron 0.5 ml de metanol y 0.05g/L de PCNB. Las placas Petri se colocaron en la incubadora a 26 °C por un lapso de 72 hrs para el desarrollo de la bacteria de acuerdo con la metodología utilizada por Jeounghyun, (2006).

3.3 Aislamiento de *Fusarium oxysporum*.

El hongo se aisló de la raíz de la planta de jitomate enferma con síntomas característicos de *Fusarium oxysporum*. Se realizaron cortes de la raíz con necrosis, los cuales fueron colocados en una solución con hipoclorito de sodio al 3% durante 2 minutos y enjuagados en 3 ocasiones con agua estéril y secados en sanitas para retirar el excedente de humedad,

posteriormente se colocaron en medio PDA a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 5 días para el desarrollo del hongo. La identificación se hizo en el microscopio compuesto en base a sus características morfológicas citadas por Nelson, (1983). Una vez identificado, el hongo fue aislado nuevamente en tubos con PDA y aceite mineral. La patogenicidad de la cepa fue comprobada de acuerdo a los postulados de Koch.

3.4 Pruebas antagónicas

Las pruebas de antagonismo entre *Methylobacterium sp.*, y *Fusarium oxysporum* se realizaron en el laboratorio de microbiología, utilizando 4 placas petri con medio AMS en donde se sembró por estría la bacteria en un extremo y el hongo en el otro. En un ensayo previo se puso a crecer a *Fusarium oxysporum* en AMS para confirmar su desarrollo en ese medio.

3.5 Imbibición de semillas de jitomate

Las semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) variedad SUN 7705 fueron aseptizadas con una solución de etanol al 95%, se utilizó además una solución de hipoclorito de sodio al 50 v/v y 10 μl de tween 20 %, en ambos casos las semillas fueron enjuagadas en repetidas ocasiones con agua estéril y secadas en toallas de papel estériles para evitar el excedente de agua. Para la imbibición, las semillas se colocaron en un matraz que contenía 100 ml de una solución de MgSO_4 al 0.03 M el cual fue previamente inoculado con un cultivo puro de *Methylobacterium sp.*, mediante un asa bacteriológica a una concentración de 10^9 UFC ml^{-1} cuantificadas utilizando la cámara de Neubauer y se mantuvieron en agitación por 12 hrs. Las semillas control fueron tratadas bajo el mismo tratamiento sin la bacteria.

3.6 Evaluación de la germinación de semilla y longitud de raíz en plántulas de jitomate inoculadas con *Methylobacterium sp.*

Para cuantificar el porcentaje de germinación de semilla de jitomate, se tomaron 15 semillas embebidas con *Metylobacterium sp.*, y 15 semillas control, cada una fue colocada en charolas con peat moss y vermiculita 2:1. Al término de tres semanas se cuantificaron

las plántulas obtenidas y se sustrajeron del sustrato para realizar la medición en la longitud de la raíz. La unidad experimental constó de cinco semillas y se establecieron tres repeticiones

3.7 Evaluación del desarrollo vegetal en plantas tratadas con *Methylobacterium* spp.

Se utilizó un total de 40 plantas a los 30 días de germinación de las cuales 20 fueron obtenidas de imbibición con 100 ml de MgSO₄ inoculado con un cultivo puro de *Methylobacterium* sp., a una concentración de 10⁹ UFC ml⁻¹ mediante la técnica del asa y cuantificadas en la cámara de Neubauer donde se colocaron las semillas durante 12 h. en agitación. Las 20 restantes se embebieron con la misma solución libre de *Methylobacterium* spp. Las semillas de ambos tratamientos fueron germinadas en peat moos y vermiculita 2:1, a los 15 días fueron trasplantadas en bolsas de plástico con vermicomposta mas arena en proporción 50 % y 50 % v/v La evaluación de desarrollo vegetal en los parámetros altura, número de hojas y longitud de las mismas se realizó a los 30, 60 y 90 días. La producción de fruto fue evaluada durante los últimos 30 días y el peso seco total de la planta se realizó al término de la producción desprendiendo el sustrato de la raíz para pesarlas en una balanza electrónica Marca OHAUS CS 2000. Posterior a esto se colocaron en un horno marca FELISA a 70° C hasta obtener un peso constante.

3.8 Desarrollo experimental y tratamientos para la evaluación de biocontrol.

Para el cultivo de las plantas se utilizó sustrato esterilizado bajo solarización, utilizando plástico negro durante 30 días. Tanto las semillas embebidas con *Methylobacterium* spp., como las semillas que no estuvieron en contacto con la bacteria tomadas como control, se colocaron directamente en macetas con peat moss y vermiculita 2:1 bajo condiciones de invernadero. Los tratamientos: *Fusarium oxysporum* (F), *Methylobacterium* spp. en la semilla más *Fusarium oxysporum* (MF) y *Methylobacterium* spp. en semilla más *Fusarium*

oxysporum y aspersión de la bacteria (MFA) fueron inoculados en el tallo de la planta a los 41 días de desarrollo, después de realizar un pequeña herida con bisturí se adicionaron 12 ml de una suspensión de *Fusarium oxysporum* a una concentración de 10^2 conidios para obtener el equivalente al volumen del sustrato.

De un total de 48 plantas, 24 de ellas obtenidas de semillas previamente embebidas con *Methylobacterium sp.* y 24 sin la bacteria, se obtuvieron los tratamientos siguientes:

Tratamiento Control C: 8 plantas fueron consideradas como control, es decir no fueron sometidas a ningún tratamiento previo.

Tratamiento F: 8 plantas fueron inoculadas en la raíz con infusión papa dextrosa con *Fusarium oxysporum*.

Tratamiento M: 8 plantas fueron obtenidas de semillas embebidas con *Methylobacterium spp.*

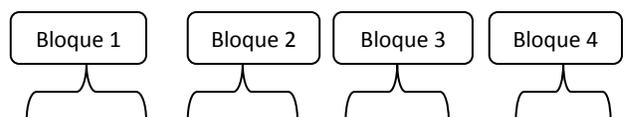
Tratamiento MF: 8 plantas también de semillas embebidas con *Methylobacterium spp.*, fueron inoculadas en las raíces con *Fusarium oxysporum*.

Tratamiento MFA: 8 plantas obtenidas de semillas embebidas con la bacteria e inoculadas con *Fusarium oxysporum* y también asperjadas con 50 mL de una solución de $MgSO_4$ al 0.03 M inoculado con un cultivo puro de *Methylobacterium sp.*, mediante la técnica del asa a una concentración de 10^9 UFC ml^{-1} ; el cual fue aplicado a cada planta en el área foliar durante su desarrollo vegetativo previo y durante la primera floración en invernadero por un lapso de 3 días continuos.

Tratamiento CA: 8 plantas control más aspersión con $MgSO_4$ al 0.03M.

3.8.1 Diseño experimental y distribución de tratamientos.

Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con 6 tratamientos y 4 repeticiones por bloque. Cada unidad experimental constó de 2 plantas. La distribución de los tratamientos quedo de la manera siguiente:



CA	M	CA	C
MFA	F	MF	MFA
MF	MFA	MFA	M
F	CA	M	MF
C	MF	C	F
M	C	F	CA

3.9 Evaluación del desarrollo vegetal de la planta y severidad del daño ocasionado por el patógeno.

Las variables para evaluar el desarrollo de la planta fueron, altura de la planta, amplitud del follaje, numero de hojas, producción de fruto y peso seco de la planta. La severidad de la enfermedad se evaluó cada 15 días con la escala siguiente: planta sana (grado 0) 0% de daño, planta con síntomas iniciales (grado 1) 33% de daño, planta con síntomas severos (grado 2) de un 34-75% de daño y planta muerta (grado 3) de un 76-100%. Para evaluar el grado de marchitez se utilizó la fórmula propuesta por Rodriguez (2002).

$$\text{Índice de Marchitez (IM)} = \frac{\sum n_i S_i}{NS} \times 100$$

Dónde:

n= porcentaje de planta individual dañada

s= grado de severidad de marchitez

N= Número total de plantas por tratamiento

S= Valor máximo en porcentaje de severidad posible

3.10 Densidad de inóculo

Para realizar la densidad de inóculo se tomó una muestra de suelo de cada maceta, de la cual se utilizaron 10 g para la primera dilución 10^1 en 90 ml de agua peptonada, de cada uno de los frascos con muestra se colocó 1ml a un tubo con 9ml de agua peptonada para la dilución 10^2 y posteriormente se adiciono un 1ml a cada placa que contenía PDA adicionado con tetraciclina 0.05 g l^{-1} y streptomycin 0.1 g l^{-1} por duplicado.

3.11 Ensayo de expresión de genes relacionados con la vía del salicílico y etileno en plantas tratadas de jitomate con *Methylobacterium sp.*

Las semillas fueron aseptizadas al igual que en resto de los tratamientos, una parte de estas fueron colocadas en solución de MgSO_4 al 0.03 M inoculado con un cultivo puro de *Methylobacterium spp.*, mediante la técnica del asa a una concentración de 10^9 UFC ml^{-1} cuantificado con la cámara Neubauer y colocadas en agitación durante 12 h., el resto de las semillas se pusieron bajo las mismas condiciones a excepción de la bacteria. Las semillas fueron sembradas por repetición en charolas con peat moss y vermiculita 2:1 estéril, permanecieron en una cámara de crecimiento a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ con 18 h luz y 8 h de oscuridad. A los 22 d de crecimiento se realizó la colecta de hojas de plantas con *Methylobacterium sp.* (T1) y plantas control (T2) por duplicado; fueron congeladas y molidas con nitrógeno líquido. La extracción de RNA se realizó por medio del Kit de extracción de columnas.

Posteriormente se realizó una RT-PCR utilizando dos sondas: la P6 que codifica para el gen marcador de la ruta del ácido salicílico y la Pin2 relacionado con la ruta de ácido jasmónico. Se usó como control el 18S ribosomal. Se utilizaron protocolos estándar acordes a la taq utilizada (INVITROGEN), para el RT se utilizó la comercial de fermentas, los productos esperados son del tamaño P6=450pb, Pin2=302 y 18S=506pb. Se corrieron 28 ciclos para los marcadores de ambas vías de señalización (P6 y Pin2), mientras que para 18S se utilizaron solo 22 ciclos. Lo anterior se hizo para determinar la posible vía de señalización que *Methylobacterium* spp., pudiera inducir para la defensa de la planta de jitomate.

Cuadro 1. Protocolo para la amplificación del RT-PCR

Reactivo	Cantidad
Buffer de reacción para PCR 10X	2.5 μ
dNTPs (2 mM)	0.5 μ
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 μ
Primer Pin2	1.25 μ
Primer P6	1.25 μ
Taq Polimerasa	0.125 μ
H ₂ O	16.6 μ
DNA	2.0 μ
Volumen total por reacción	25 μ

Cuadro 2. Condiciones de corrida de la RT-PCR

Condición	Temperatura °C	Tiempo
1 Desnaturalización	94	3 minutos
2 Desnaturalización	94	45 segundos
3 Alineamiento	60	30 segundos
4 Extensión	72	1 minuto
Se mantuvieron las condiciones durante 28 ciclos		
5 Extensión final	72	10 minutos

Una vez realizado el primer ensayo se tomaron 3 muestras de plantas T1 y 3 muestras T2 ambos por duplicado para realizar el ensayo de aspersion con *Methylobacterium* sp. Las plantas de T2 fueron colectadas al tiempo 0(C1 y C2), las de T1 fueron asperjadas con 20 ml de la suspensión bacteriana a una concentración de 10^9 UFC ml⁻¹ y colectadas a los 24 hrs (B1 24 y B2 24) y 72 hrs (B1 72 y B2 72). Una vez obtenidas las muestras se extrajo el RNA mediante la técnica Plant RNA Reagent y el cDNA promega. Se realizó un primer PCR como control el 18S ribosomal y un segundo se utilizaron las sondas Pal y P6 para la vía del ácido salicílico, con un tamaño esperado de 687pb y 450pb respectivamente. También se utilizaron las sondas SOD y LOX para la vía del ácido jasmónico con los siguientes tamaños esperados SOD= 642 y LOX. En ambos casos se utilizó el protocolo estándar acorde a la taq utilizada (INVITROGEN). Las condiciones del RT-PCR fueron iguales a las del primer ensayo a diferencia del número de ciclos los cuales fueron para Pal=25 ciclos, P6=25 ciclos, SOD=22 ciclos y LOX=33 ciclos.

La intensidad se midió en el programa ImageJ 1.44 se utilizó el paquete estadístico statgraphics 4.0 con una Anova al 95% de confiabilidad.

3.12 Análisis estadístico.

La comparación de medias para a la longitud de raíz en plántulas se realizó mediante una prueba de T ($p= 0.05$). El análisis estadístico y la comparación de medias para los tratamientos en la evaluación de desarrollo vegetal y biocontrol se realizaron por medio de un análisis de varianza de un diseño en bloques completamente al azar y la prueba de Tukey con un grado de error del $P \leq 0.05$ con el programa Statistic Analisis System (SAS versión 9.0). Para determinar la diferencia estadística en la intensidad de expresión de genes se utilizó el programa ImageJ 1.44 y el paquete estadístico Stratgraphics 4.0 con un Anova al 95 % de confiabilidad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de la germinación de semillas y longitud de la raíz de plántulas de jitomate inoculadas con *Methylobacterium* sp.

Durante el experimento se observó que la imbibición de semillas de jitomate variedad SUN 7705 con *Methylobacterium* sp., a una concentración de 10^9 UFC ml⁻¹ en solución de MgSO₄ al 0.03 M durante 12 h en agitación, aceleró la germinación hasta por 24 h respecto al control, así mismo incrementó el porcentaje de plántulas obtenidas. En el caso de las semillas tratadas, la germinación fue de 97% mientras que en las semillas control se obtuvo un 92% por lo que se puede indicar que aun cuando los resultados no reflejan diferencias significativas, el uso de la bacteria en semillas de jitomate no perjudica la germinación de las mismas.

Resultados similares fueron obtenidos por Abanda-Nkpwatt, (2006), en semillas de trigo, cebada, maíz y zanahoria donde no se presentó diferencia significativa respecto al control, sin embargo, en semillas de fresa el porcentaje de germinación se redujo. No obstante a lo anterior, en otras investigaciones se ha encontrado que las bacterias metilotróficas facultativas de pigmentación rosa, PPFMs por sus siglas en inglés; tienen un efecto de mejora en el crecimiento de las plantas, relacionado con el incremento en la producción de vitamina B12 y de hormonas como las citocininas (zeatina, trans zeatina y ribósido trans-zeatina) y auxinas (ácido indol-3- acético, indol-3-pirúvico y ácido indol-3-butírico) las cuales estimulan la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas (Madhaiyan, 2004). Tal es el caso de resultados obtenidos en semillas de arroz tratadas con PPFMs (Madhaiyan, 2004) y en la planta de caña de azúcar (Madhaiyan, 2005) donde estimulo la germinación de semillas hasta en un 98% y

En la parte experimental se evaluó la longitud de raíz en plántulas con tres semanas de edad, dicha longitud fue significativamente mayor ($p=0.05$) en el tratamiento con *Methylobacterium* en comparación con el control (Cuadro 3).

Cuadro 3. Longitud de Raíz de plántulas inoculadas con *Methylobacterium* spp.

Tratamientos	Longitud de Raíz (mm)		
	1	2	3
Semillas con <i>Methylobacterium</i> spp.	60.0a	75.9a	90.8a
Semillas sin <i>Methylobacterium</i> spp.	23.5b	39.5b	50.0b

***Promedios estadísticamente significativos de acuerdo a la prueba de t Student con una n=20 y p=0.05**

Los resultados encontrados tienen relación con los publicados anteriormente por Madhaiyan (2004) en arroz y por Jeounghyun (2006) en chile y tomate donde además se ha comprobado un incremento en la producción de auxinas (ácido indol-3-acético) y citocininas en las plantas tratadas con cepas de *Methylobacterium*. Aun cuando dichas fitohormonas no fueron cuantificadas, se sabe que pueden controlar procesos fisiológicos como lo es el alargamiento, la división y la especialización de células; por lo que se encuentran naturalmente involucradas en el desarrollo de la raíz en cualquier planta y una mayor concentración puede explicar el incremento en la elongación de la raíz (Figura 1) en el estudio realizado.



Figura 1. Longitud de raíz en plántulas de jitomate.
A= Plantas Control B= Plantas con *Methylobacterium* spp.

4.2 Evaluación del desarrollo vegetal en plantas de jitomate inoculadas con *Methylobacterium* spp. y el tratamiento control.

La actividad biológica y microbiológica de los suelos tiene un papel preponderante en la alta producción de los cultivos. Recientemente se ha encontrado que tanto en la rizosfera como en la filosfera se desarrollan microorganismos que presentan características de promoción del crecimiento vegetal, las cuales están ampliamente relacionadas con alta productividad (Lynch, 2002). Muchas bacterias asociativas son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos (Loredo-Osti, 2004), entre los que destacan el aumento de en la toma de agua y nutrientes, control biológico de patógenos, antibiosis y más recientemente la producción de fitohormonas (Hernández, 2006). En la última década han sido de interés las bacterias metilotróficas aerobias por sus propiedades relacionadas con la síntesis de fitohormonas y vitaminas (Shirokikh, 2007).

Trabajos relacionados con el empleo de bacterias PPFMs han demostrado que pueden

ser utilizadas como inóculo de semillas o en forma de aspersión en plantas para mejorar la germinación, capacidad de almacenamiento y desarrollo vegetal en plantas (Madhaiyan, 2004). En este estudio las semillas inoculadas con *Methylobacterium* spp., a una concentración 10^9 UFC ml⁻¹ presentaron un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en el desarrollo vegetal de la planta en las variables de estudio; altura, numero de hojas y longitud de las mismas (Cuadro 4 y 5).

Cuadro 4. Altura de plantas con *Methylobacterium* spp., y plantas control 120 días después de la siembra.

Tratamientos	Altura cm.		
	30dds*	90dds	120dds
Plantas con <i>Methylobacterium</i> spp.	27.6a	92.8a	
Plantas Control	17.0b	78.2b	

*Medias estadísticamente significativas usando un Anova y Tukey con un $\alpha = 0.05$ y n= 20

Cuadro 5. Número de hojas y Longitud de las mismas, en plantas con *Methylobacterium* spp. y plantas control.

Tratamientos	Numero de hojas		Longitud de hojas cm.	
	30dds*	90 dds	30dds	90 dds
Plantas con <i>Methylobacterium</i> spp.	7.0a	15.0a	22.0a	27.2a
Plantas control	5.2b	10.4b	12.6b	20.6b

*Medias estadísticamente significativas usando un Anova y Tukey con un $\alpha = 0.05$ y n=20

Resultados similares en el desarrollo vegetal de plantas fueron encontrados por Madhaiyan en algodón (2003) y caña de azúcar (2005), aumentando el vigor de las plántulas en un 40%. El aumento en el crecimiento y desarrollo vegetal de las plántulas

inoculadas con *Methylobacterium* spp., se ha atribuido a la capacidad que tienen este grupo de bacterias para estimular el desarrollo de las raíces y/o a la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético, tal como lo describe Jeounghyun (2006) y Madhaiyan (2004) en sus trabajos. Resultados que también fueron evidentes en el cultivo del jitomate durante el desarrollo del experimento (Figura 2).

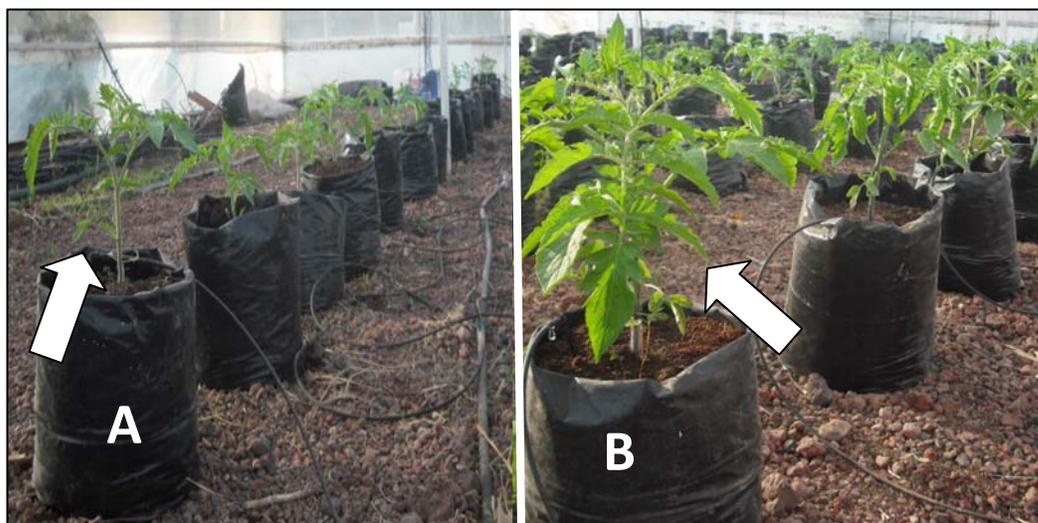


Figura 2. Desarrollo vegetal. Plantas control (A), Plantas con *Methylobacterium* spp. (B). En las flechas se observa como la diferencia del desarrollo vegetativo de las plantas es evidente mostrando como las plántulas tratadas con *Methylobacterium* lucen vigorosas.

Así mismo se obtuvo una ventaja de 14 días en la floración en las plantas inoculadas con *Methylobacterium* spp. (B) en comparación con las plantas control (A), y por ende la producción fue significativamente mayor ($p \geq 0.05$) comparada con el control (Cuadro 4), lo cual puede atribuirse a la concentración de tales hormonas como las giberelinas debido a que resultados similares han sido señalados por otros autores donde la acumulación de giberelinas ha sido evidente. Tal es el estudio realizado por Abanda-Nkpwat (2006) donde indica una acumulación de giberelinas por efecto de *Methylobacterium* spp, en plantas de papa y tabaco teniendo un efecto promotor del crecimiento de las plantas a través de la división y la elongación celular, tanto de las raíces como de la parte aérea, además de que puede estar proporcionando a la planta una ventaja en la absorción de nutrientes y en la precocidad del fruto (Figura 3).

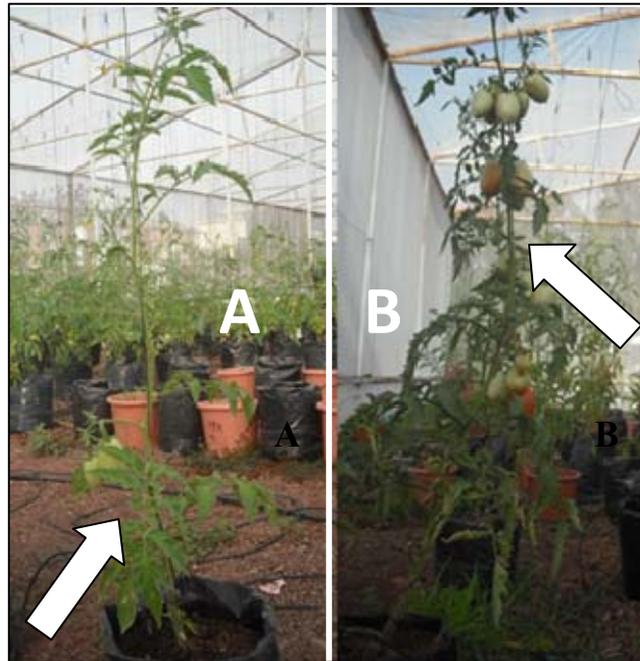


Figura 3. Precocidad del Fruto.
Plantas control (A), Plantas con *Methylobacterium* spp. (B). Respecto a lo señalado por las flechas en las imágenes se observa como la producción en las plantas tratadas con *Methylobacterium* es mayor a una misma edad con las plantas control.

Aun cuando la producción de las plantas de jitomate obtenidas de semillas con *Methylobacterium* spp. se vio incrementada respecto a las plantas control, dicho efecto no se reflejó en el peso del fruto ya que los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en el tratamiento control. Este efecto puede atribuirse a la acumulación de hormonas presentes en el crecimiento de la planta, ya que al ser demandadas en el área foliar la acumulación de hormonas para el crecimiento del fruto no se ven incrementadas.

Cuadro 6. Producción, peso del fruto y peso seco de plantas con *Methylobacterium* spp., y plantas control.

Tratamientos	Producción Mes mayo-junio (g)	Peso del Fruto (g)	Peso seco total (g)
Plantas con <i>Methylobacterium</i> spp.	2370.2a*	68.6a	50.8a
Plantas control	1063.0b	54.6a	24.4b

* Medias estadísticamente significativas con un análisis de varianza Anova y un Tukey con α del 0.05 y n=20

Además recientemente se ha comprobado que existen grupos de *Methylobacterium* no pigmentadas que logran formar una raíz nodulante en simbiosis con leguminosas (Madhaiyan, 2006), sin embargo en el presente trabajo los resultados indican que la producción y acumulación de hormonas vegetales como lo las auxinas en conjunto con las citocininas presentes en los ápices y raíz de la planta ejercen un papel determinante en el desarrollo vegetal en la planta de jitomate; ya que en este caso no se encontró presencia de nódulos en las raíces. Sin embargo durante el experimento realizado en este trabajo se encontraron diferencias significativas respecto al peso seco y tamaño de la raíz (Figura 4) en comparación con el control tal como se indica en el Cuadro 6.



Figura 4. Desarrollo de raíz
Plantas control (A), Plantas con *Methylobacterium* spp. (B)

Estudios recientes indican que la proporción de la materia seca en la planta es el resultado de un contenido de compuestos orgánicos, elementos minerales y sus óxidos (Díaz, 1999); así como en ocasiones suele representar la fijación de nitrógeno y la actividad fotosintética (Méndez-Natera, 2002). Estudios llevados a cabo en caña de azúcar inoculados con *Methylobacterium* spp., indicaron un incremento en la actividad fotosintética al incrementar el número de estomas, la concentración de clorofila y el contenido de ácido málico (Madhaiyan, 2005).

4.2 Incidencia de enfermedad en plantas con *Methylobacterium* spp. y plantas control.

En esta parte experimental se determinó un efecto de defensa positivo por parte de las plantas obtenidas de semillas embebidas contra *Fusarium oxysporum*, ya que el porcentaje de daño presentado durante su desarrollo solo alcanzó el 20% en grado 2, contrario a las plantas control que resultaron dañadas en un 45% en grado 3 (Figura 5) lo que propició que su producción se redujera significativamente y que la planta muriera en plena producción temprana. Mientras que el índice de marchitez en plantas control alcanzó resultados de 12, en el caso de las plantas con *Methylobacterium* spp., el índice más alto fue de 6 (de acuerdo con la fórmula establecida por Rodríguez 2002).

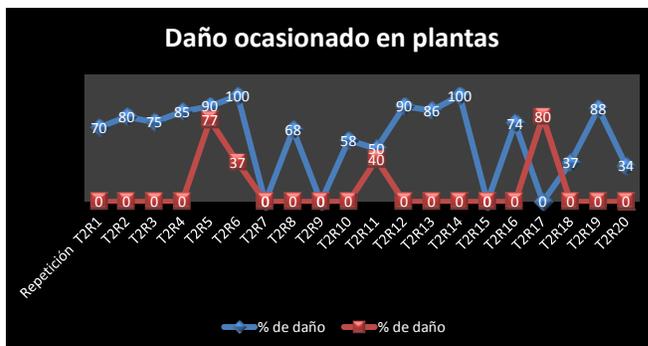


Figura 5. Grafico del porcentaje de daño ocasionado por *Fusarium oxysporum* de acuerdo a los rangos establecidos por Rodríguez (2002).

Cabe señalar que aun a las 4 semanas de presentarse la enfermedad (marchitez), las plantas con *Methylobacterium* spp., resistieron presentando síntomas de leves a severos y continuaron con la producción normal hasta el final del ciclo de cultivo (Figura 5).

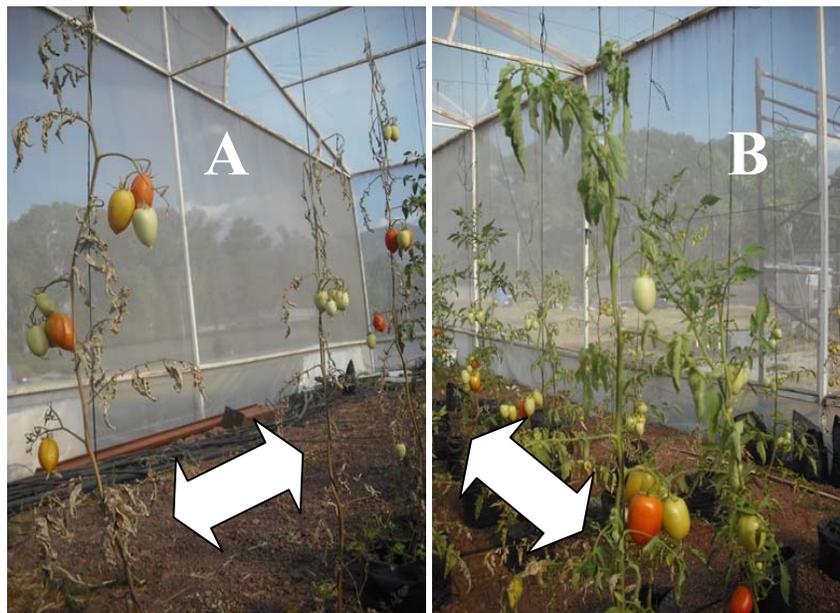


Figura 6. Incidencia de enfermedad: Plantas control (A), Plantas con *Methylobacterium* spp. (B. En la imagen se logra observar como las plantas (A) se encuentran marchitas en grado 3 mientras que las plantas (B) aún se encuentran produciendo y solo algunas en grado 1 (con síntomas iniciales).

4.3 Evaluación del desarrollo vegetal y biocontrol de *Fusarium oxysporum* en plantas tratadas con *Methylobacterium* spp., y plantas control.

4.3.1 Desarrollo vegetal

Es bien conocido que el espacio de vida en la superficie de la hoja, definido como filosfera, alberga una gran variedad de organismos que tienen efectos beneficiosos, perjudiciales o neutros, en la planta y que las interacciones entre estos microorganismos y las plantas superiores con frecuencia afectan a sus actividades fisiológicas. El género de bacterias metilotróficas facultativas de pigmentación rosa *Methylobacterium* spp., se encuentran comúnmente en asociación con las plantas y se ha establecido que son colonizadoras de una amplia gama de cultivos (Abanda-Nkpwatt et al; 2006), (Madhaiyan, 2005) encontrándose localizadas en las hojas, tallos, raíz y meristemas de la planta.

En el experimento anterior se buscaba evaluar el efecto sobre el crecimiento y el desarrollo

en la planta de jitomate una vez que la semilla fuera tratada con *Methylobacterium* spp. Sin embargo el haber obtenido resultados estadísticamente significativos bajo estas condiciones; en esta segunda etapa se compararon los resultados de diversos tratamientos entre los que se incluía la aspersión de la bacteria en solución. Los parámetros altura, amplitud de la planta (Cuadro 7 y 8), producción y peso seco (Cuadro 9) se evaluaron durante dos periodos; el primero abarcó los meses de Febrero a Julio y el segundo de Julio a Octubre en los que se obtuvieron resultados similares entre ellos y de igual manera a los encontrados por Madhaiyan (2005) en caña de azúcar donde los tratamientos por imbibición de semilla y aspersión registraron diferencias significativas respecto al control.

Cuadro 7. Altura y amplitud de la planta de jitomate en invernadero

Tratamientos♦	Periodo Febrero-Julio					
	30dds*	90dds	120dds	30dds*	90dds	120dds
	Altura (cm)			Amplitud (cm)		
C	16.5 c*	78.5 bdc	87.0 bc	25.5 c*	42.7 b	45.0 c
CA	15.7 c	75.7 dc	84 bc	25.2 c	41.5 b	44.0 c
F	14.0 c	67.2 d	77.7 c	21.7 d	36.7 c	38.7 d
M	24.2 a	93 a	114.2 a	37.2 a	56.0 a	59.5 a
MF	19.7 b	81.7 bac	98.5 ab	31.7 b	52.2 a	55.5 b
MFA	19.7 b	89.2 ba	107.7 a	33.2 b	53.5 a	56.7 ba

*Medias con letra diferente son estadísticamente significativas en un análisis de varianza Anova y Tukey con un α del 0.05 y n=8

♦ C= Control, CA= Control aspersión, F=*Fusarium oxysporum*, M= *Methylobacterium* spp., MF= *Methylobacterium* spp., y *Fusarium oxysporum*, MFA= *Methylobacterium* spp., y *Fusarium oxysporum* mas aspersión con *Methylobacterium* spp.

Cuadro 8. Altura y Amplitud de la planta de jitomate en invernadero

Tratamientos♦	Periodo Julio-Octubre					
	30dds*	90dds	120dds	30dds*	90dds	120dds
	Altura (cm)			Amplitud (cm)		
C	16.7 dc*	61.5 bdc	93.5 c	26.7 c*	43.5 dc	45.2 c
CA	16.7 dc	59.5 dc	93.0 c	25.2 dc	42.0 dc	44.5 c
F	14.5 d	56.5 d	76.0 d	23.2 d	40.0 d	39.7 d
M	22.2 a	76.2 a	110.2 a	36.7 a	53.5 a	57.5 a
MF	18.7 bc	67.7 bac	97.5 bc	28.5 cb	46.2 bc	51.5 b
MFA	20.0 ba	69.0 ba	102.2 ba	30.2 b	49.2 ba	53.5 ba

De acuerdo a lo anterior se puede observar que el tratamiento que estableció mejores resultados respecto a la altura y amplitud de la planta fue el tratado con *Methylobacterium* sp., en la semilla (M), sin embargo los tratamientos donde se retó a la planta con el patógeno (MF) y (MFA) obtuvieron mayores resultados en comparación con los controles (C), (CA) e inclusive en el tratamiento con *Fusarium oxysporum* (F) lo que muestra que aun cuando los síntomas presentados por *Fusarium oxysporum* no fueron evidentes, la bacteria ejerció un control de la enfermedad y proporcionó a la planta un mayor desarrollo aun en condiciones de estrés ocasionadas por la presencia del patógeno. Estos resultados se manifestaron en ambos periodos de manera similar (Figura 7).

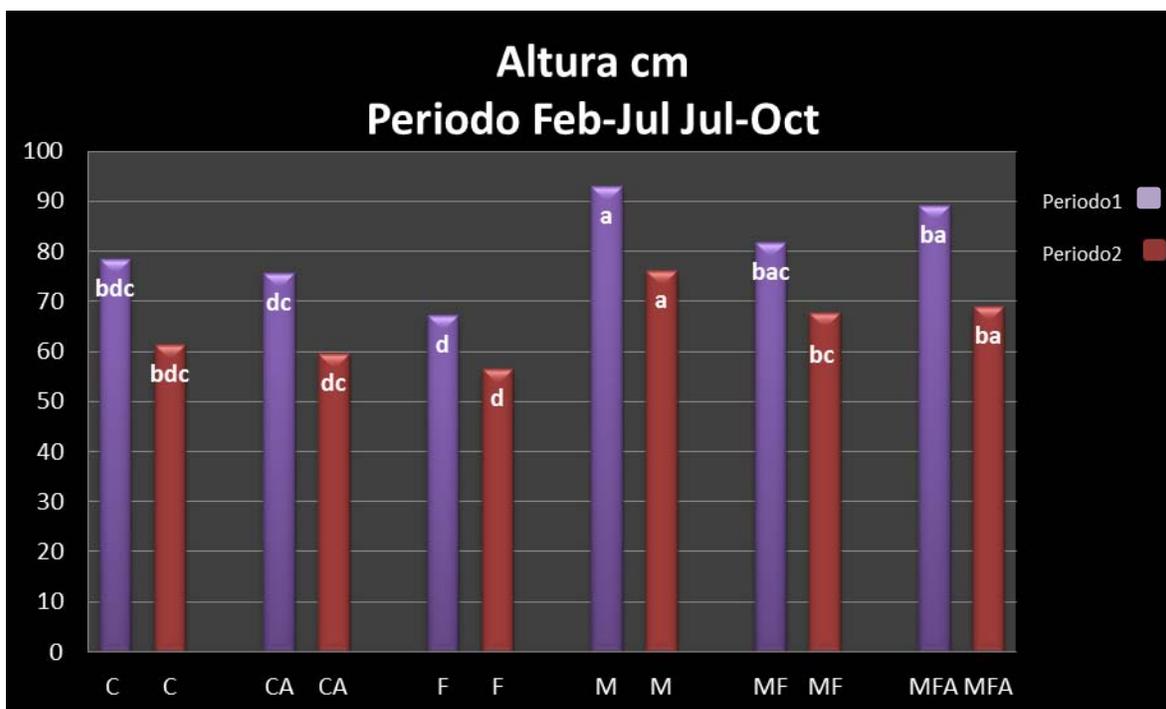


Figura 7. Altura final de plantas en invernadero, comparando periodos y distintos tratamientos. Medias con letra diferente son estadísticamente significativas con un análisis de varianza Anova y Tukey con un $\alpha=0.05$

De igual forma los resultados se reflejaron en la producción y en la obtención de peso seco. En el caso de la producción, los tratamientos que presentaron un resultado significativamente mayor fueron; el establecido con *Methylobacterium* sp. en semillas (M) y el de aplicación por aspersión más el patógeno (MFA) lo que nos indica que aun en presencia de *Fusarium oxysporum* las plantas de jitomate embebidas y asperjadas con *Methylobacterium* sp. a una concentración de 10^9 UFC ml^{-1} pueden llevar a cabo un desarrollo estable y llegar al término de su producción sin problema, presentando además una ventaja sobre las plantas control (Cuadro 7 y 8).

Cuadro 9. Producción y Peso seco de las plantas de jitomate en invernadero

Periodo Febrero-Julio			
Tratamientos♦	Producción (g)	Peso Promedio de fruto	
		Por tratamiento(g)	Total (g)
C	434.0 bc*	75.7 a*	48.5 b*
CA	333.7 dc	72.0 a	51.0 b
F	182.0 d	47.5 b	47.2 b
M	647.0 a	71.7 a	63.5 a
MF	550.5 ba	72.5 a	52.2 b
MFA	594.2 a	70.7 a	52.5 b

*Medias con letra diferente son estadísticamente significativas en un análisis de varianza Anova y Tukey con un α del 0.05 y n=8

♦ C= Control, CA= Control aspersión, F=*Fusarium oxysporum*, M= *Methylobacterium* spp., MF= *Methylobacterium* spp., y *Fusarium oxysporum*, MFA= *Methylobacterium* spp., y *Fusarium oxysporum* mas aspersión con *Methylobacterium* spp.

Así mismo el peso seco representa una diferencia significativa en el tratamiento de plantas de semillas embebidas con *Methylobacterium* sp. (M) respecto al resto de los tratamientos, ya que la bacteria al ejercer un desarrollo de la raíz proporciona un mayor volumen respecto al control, situación que no es notorio en el caso del resto de los tratamientos establecidos con *Methylobacterium* sp., (MF) (MFA) debido a que estas plantas fueron inoculadas con *Fusarium oxysporum* y de alguna manera se espera que el patógeno dañe una parte de la raíz lo que se ve reflejado en el peso seco total (Cuadro 9).

Cuadro 10. Producción y Peso seco de las plantas de jitomate en invernadero

Tratamientos♦	Periodo Julio-Octubre			
	Producción (g)	Peso Promedio de fruto Por tratamiento(g)	Peso seco Total (g)	Peso seco de la raíz (g)
C	931.2 c*	58.2 a*	53.0 cb*	16 cb*
CA	953.5 c	56.0 a	60.2 b	14.5 cb
F	807.5 d	54.7 b	40.0 c	12.2 c
M	1248.0 a	65.7 a	75.5 a	31.0 a
MF	1067.5 b	58.7 a	60.5 b	20.7 b
MFA	1068.7 b	61.0 a	59.7 b	19.0 cb

*Medias con letra diferente son estadísticamente significativas en un análisis de varianza Anova y Tukey con un α del 0.05 y n=8

♦ C= Control, CA= Control aspersion, F=*Fusarium oxysporum*, M= *Methylobacterium spp.*, MF= *Methylobacterium spp.*, y *Fusarium oxysporum*, MFA= *Methylobacterium spp.*, y *Fusarium oxysporum* mas aspersion con *Methylobacterium spp.*

Debido a que el peso seco de la planta resulto significativamente mayor en ambos periodos fue que realizo la evaluación del peso seco de la raíz en el cual se observan diferencias similares a las presentadas por el peso seco total de la planta, donde el tratamiento que ejerció un mejor resultado es el que se encuentra libre del patógeno e inoculado por la bacteria en la semilla (M) (Cuadro 10).

4.3.2 Biocontrol de la densidad de inóculo de *Fusarium oxysporum* en el sustrato

Así mismo se determinó la densidad de inóculo (número de colonias x 10²) la cual nos proporciona información acerca del desarrollo del patógeno y de acuerdo con la gráfica abajo descrita, los tratamientos inoculados y asperjados con *Methylobacterium* spp., presentaron un decremento significativo de la densidad de inóculo del patógeno, respecto al control infectado con *Fusarium oxysporum* comportándose de manera similar a los controles que no fueron inoculados con el patógeno (Figura 7).

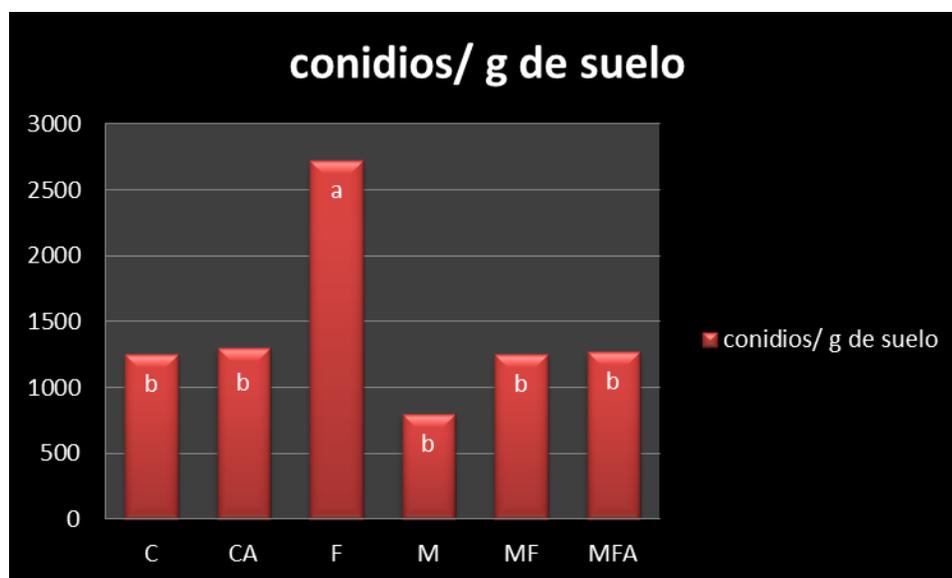


Figura 8. Densidad de inóculo en los distintos tratamientos. Medias con letra diferente son estadísticamente significativas con un análisis de varianza Anova y Tukey con un $\alpha=0.05$

4.4 Expresión de genes relacionados con la defensa en plántulas con *Methylobacterium* spp., y plantas control.

La inoculación en la raíces de algunas plantas con *Methylobacterium* han reducido el efecto de de *Rhizoctonia solani* en plantas de arroz, incrementado la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis y la producción de fenólicos en la planta. Un gran número de enzimas, incluyendo peroxidasa (PO), PAL, lipooxigenasa, β -1,3-glucanasa y quitinasa se han asociado con la resistencia sistémica. Sin embargo, el aumento de las actividades y la acumulación de estas enzimas dependen principalmente del agente inductor, así como genotipo de la planta, el estado fisiológico y patógeno (Madhaiyan *et al.*, 2004). Otro caso similar ha sido señalado en el estudio realizado en maní inoculado con *Methylobacterium* sp., donde indujo protección contra *A. ninger* y además mejoró significativamente la germinación y el vigor de las plántulas, también aumentaron las proteínas PR y fenoles en comparación con los controles, y por lo tanto la inducción de las barreras físicas y químicas causadas por el aumento de actividad de las enzimas asociadas (Madhaiyan *et al.*, 2006).

Sin embargo aun cuando las plántulas de jitomate fueron asperjadas y cultivadas a temprana edad bajo condiciones controladas, para identificar aquellos genes de defensa que pudieran resultar con mayor intensidad; los resultados indicaron que genes como Pal, PR-6, SOD y LOX no se expresaron significativamente en las plántulas con *Methylobacterium* respecto a las plantas control (Figura 9, 10, 11).

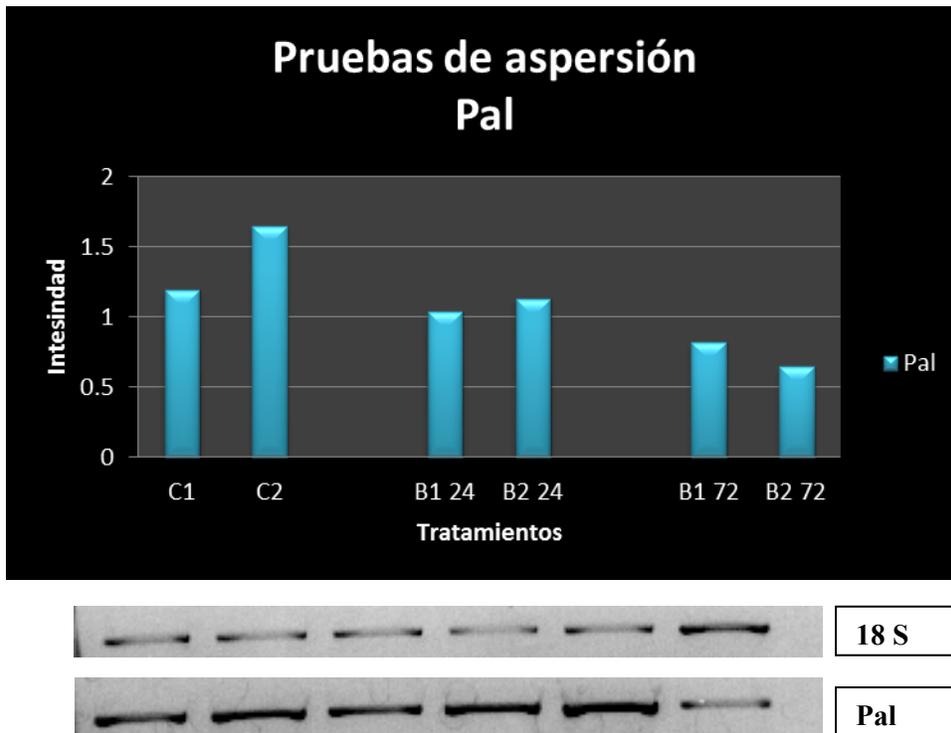


Figura 9. Intensidad del gen Pal en los tratamientos a 0 h control, 24 h con *Methylobacterium* spp. y 72 h con *Methylobacterium* spp. con una n=3 y un α 0.05.

Las figuras anteriores representa la intensidad en la que fue calculada cada muestra respecto al gen PR-6, SOD y Pal en la que podemos observar el comportamiento en la expresión de los genes a mediada del tiempo, esto es posible debido a que como se sabe las plantas en el periodo de reconocimiento con la bacteria pueden hacerse susceptibles o bien activar su sistema de defensa por periodos más largos.

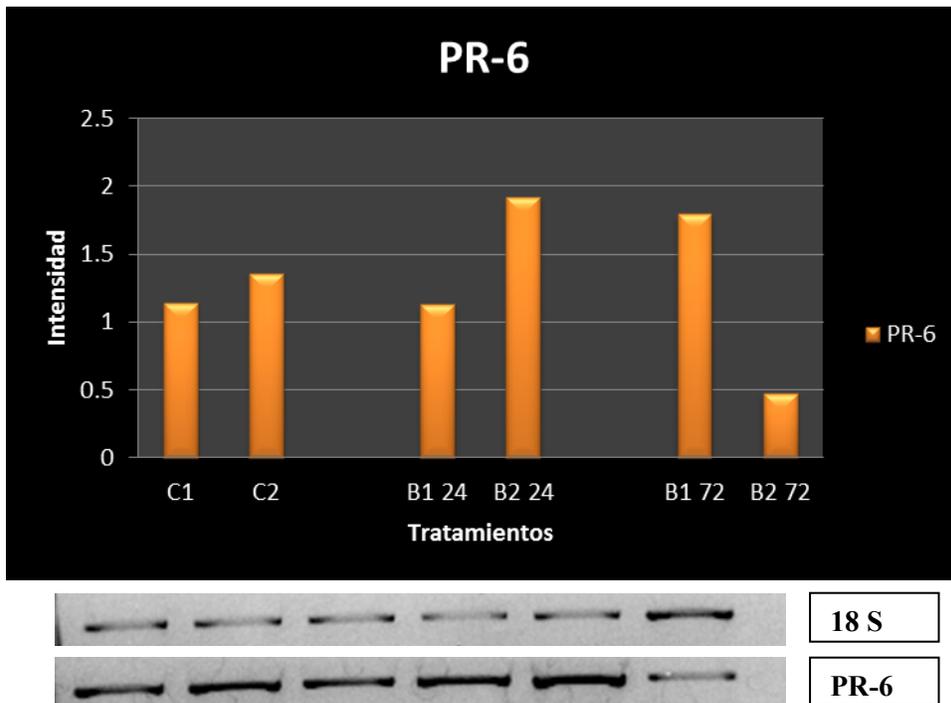


Figura 10. Intensidad del gen PR-6 en los tratamientos a 0 h control, 24 h con *Methylobacterium* spp.y 72 h con *Methylobacterium* spp.. con una n=3 y un α 0.05.

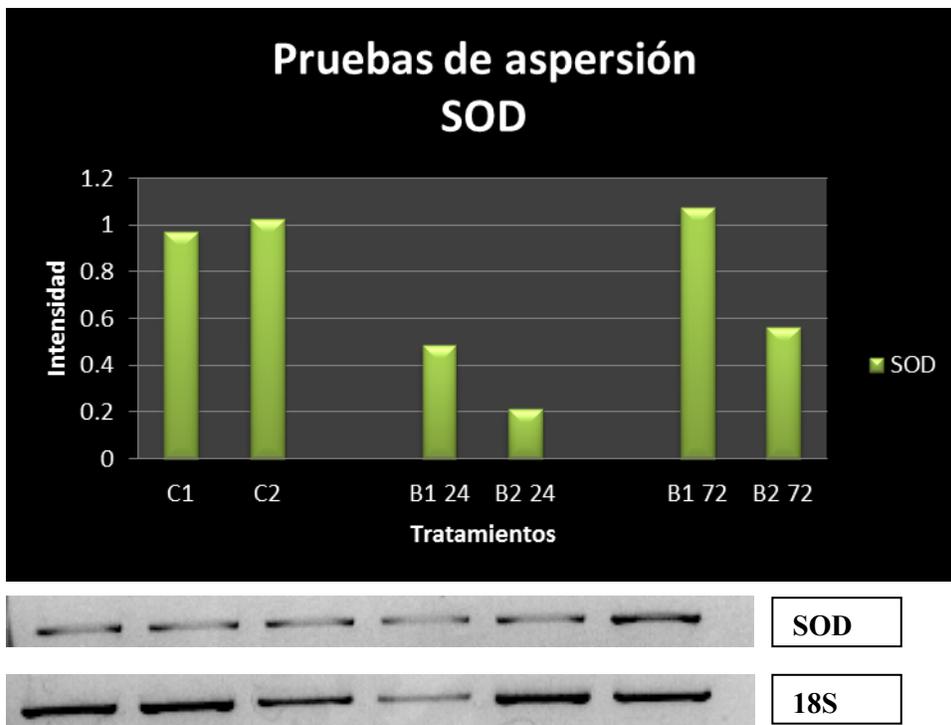


Figura 11. Intensidad del gen SOD en los tratamientos a 0 h control, 24 h con *Methylobacterium* spp.y 72 h con *Methylobacterium* spp.. con una n=3 y α 0.05.

Por otro lado aun cuando PR-6 y Pal se les conoce como marcadores relacionados con la señal de defensa mediada por ácido salicílico, en el caso de Pal (Figura 7) observamos que no se expresa de manera importante mientras que PR-6 si lo hace justo a las 24 h (Figura 8) lo que puede resultar de la vía por la que se expresan, ya que el Pal resulta de una secuencia más larga que la de PR-6. En cuanto a SOD se reprime parcialmente durante fase de reconocimiento y después se dispara a las 72 con tendencia a reprimirse nuevamente después de ese tiempo, lo cual hace evidente que esos no son las vías por las cuales se da la inducción de resistencia en plantas inoculadas con dicha bacteria.

5. CONCLUSIONES

Methylobacterium spp., promovió de manera significativa el crecimiento de las plántulas en términos de raíz a una concentración de 10^9 UFC ml⁻¹.

La imbibición de semillas de jitomate en solución MgSO₄ a una concentración de 10^9 UFCml⁻¹ con *Methylobacterium* spp., ejerce un efecto positivo en la promoción de crecimiento, en el desarrollo vegetal y en la producción de fruto en la planta de jitomate. Así mismo provee un mayor desarrollo de la raíz en las plantas adultas y eleva el peso seco de las plantas.

El inocular *Methylobacterium* spp., a una concentración de 10^9 UFC ml⁻¹ en la semilla y asperjar las plantas a la misma concentración contribuye a que el cultivo de jitomate presente cierta resistencia a *Fusarium oxysporum* al menos hasta el término de su producción.

Methylobacterium spp. no promueve la expresión de genes de defensa Pal, SOD, PR-6 y LOX en plántulas de jitomate.

6. LITERATURA CITADA

- Abanda-Nkpwatt, D. M. (2006). Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. *Journal of Experimental Botany*, 4025-4032.
- Apodaca, M. Z. (2004). Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* schlechtend. F. sp. *radicis-lycopersici* w.r. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología.*, 7-13.
- Ascencio-Álvarez, A. L.-B.-E.-H.-O.-D.-V. (2008). Marchites Vascular del Tomate: I Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología.* , 114-120.
- Candelas, C. A. (2006). Cuantificación de licopeno y otros carotenoides en tomate y polvo de tomate. *Revista Mexicana de agronegocios.*, 1-11.
- Carrillo, L. (2003). *Fusarium* . En L. Carrillo, *Los Hongos de los alimentos y forrajes* (págs. 70-80).
- Carrillo-Fasio, J. M.-R.-E.-O.-Z.-B. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el valle de Culiacán Sinaloa, México. *Revista de Fitopatología.*, 123-127.
- Choudhary, K. P. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol*, 289-297.
- Corpeño, B. (2004). Manual del cultivo de Tomate. *Centro de inversion, desarrollo y exportacion de agronegocios.*
- Cohen D.J., M.G. William. 2006. Auxin metabolism and signaling. 38-66, en Hedden P., S. G. THOMAS. 2006. *Plant Hormone Signaling*. Editorial Blackwell Publishing. 348 pp.
- Dardanelli, M.S., Carletti S.M., Paulucci N.S., Medeot D.B., Rodriguez E.A., Vita F.A. Bueno M., Fumero M.V., M.B. Garcia. 2010. Benefits of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Rhizobia in Agriculture. 14-15, en Dinesh K. M., 2010. *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Editorial Springer. 445 pp.
- Davies, P.J., 2004. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. 1-15, en Davies, P.J., 2004. *Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Editorial

Kluwer academic publishers. 717 pp.

Do Vale Barreto, F. M. Araujo F.F.S., R. L. Ramos M. 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications 21-36, en Dinesh K. M. 2010. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Editorial Springer. 445 pp.

Díaz, I. V. (1999). Crecimiento vegetativo del pimentón en función de la densidad de plantas y edad de cultivo. *Bioagro.*, 69-73.

Everhart, E. J. (2002). Guía de Horticultura de Iowa State University. *El huerto doméstico.*

Fao. (2007). *Consulta de bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Tomate.*

Fernández, E. A. (2007). Manejo Biológico de *Phytophthora capsici* le., *fusarium oxysporum* schlechtend: fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en Jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.). *Revsita Mexicana de Fitopatología.*, 35-42.

Flores, C. C. (2005). Especies de *Fusarium* de la Quebrada de Lozano. *Revista Argentina de Microbiología*, 109-112.

Gaber, B. W. Wiebe.1997. Enfermedades del tomate. Guía práctica para agricultores. Peto seed Company. 61p.

Gonsalves, A. (2000). *Fusarium oxysporum*. *University of Hawaii at Manoa, extension Plant Pathology.* , 1-3.

González, R. M. (2004). Control Biológico de *Fusarium solani* en Tomate mediante el empleo de los biantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e investigacion Agraria.*, 21-28.

Guerrero-Guil, J. L.-F. (2009). Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicum esculentum*) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 123-129.

Heil, M. M. (2002). Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Botanical Briefing*, 503-512.

Hernández, R. A. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología.*, 42-49.

Indiragandhi, P. A. (2007). Induction of defense responses in tomato against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by regulating the stress ethylene level with *Methylobacterium*

- oryzae CBMB20 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *World J Microbiol Biotechnol.*, 1037-1045.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. 2009. <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/michoacan/mpios/16045a.htm>
- Jeounghyun, R. M. (2006). Plant Growth substances produced by Methylobacterium spp. and Their effect on tomato (*lycopersicum esculentum* L.) and red pepper (*Capsicum annum* L.) growth. *Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 1622-1628.
- Jiménez, D. V. (2001). Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Avance y Prespectiva.*, 395-400.
- Loredo-Osti, C. L.-R.-V. (2004). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. *Terra Latinoamericana*, 225-239.
- Lugo, C. N. (2000). Características culturales y patogénicas en aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* procedentes de plantaciones comerciales de tomate. *Agronomia Tropical*, 519-530.
- Lynch, J. (2002). Resilience of the rhizosphere to anthropogenic disturbance. *Earth and Environmental Science* ., 21-27.
- Madhaiyan, M. P. (2004). Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza savita* L.) by *Methylobacterium* spp. *Bot. Bull. Acad. Sin. Botanical Bulletin of Academia Sinica.*, 315-324.
- Madhaiyan, M. P. (2005). Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). *Biol Fertil Soils*, 350-358.
- Madhaiyan, M. S. (2006). Plant Growth-Promoting *Methylobacterium* Induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with root pathogens. *Current microbiology.*, 270-276.
- Mayak, S. T. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science.*, 525-530.
- Mendez-Natera, J. (2002). Relación entre el peso seco total y los caracteres vegetativos y la nodulación de plantas de maní (*Arachis hypogaea* L.). *Revista UDO Agrícola.*, 46-53.

- Michel-Aceves, A. O.-S.-R.-F.-A.-M. (2008). Control Biológico in vitro de enfermedades fúngicas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. *Avances de investigación Agropecuaria*, 55-68.
- Michel-Aceves, A. R.-D. (2001). Especies de trichoderma en suelos cultivados con mango afectados por “escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 154-160.
- Miller, S. R. (2008). *Fusarium and Verticillium wilts of tomato, potato, pepper, and eggplant. The Ohio state university*, 1-4.
- Monrealegre, J. S. (2003). Identificación de *Fusarium solani* (Mart.) como agente causal de la podredumbre del pie de tomate. *Boletín Micológico*, 53-55.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A, and W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University press. 193 p.
- Osorio, S. (2008). Agricultura sustentable: Una alternativa de alto rendimiento. *Ciencia UANL*, 77-81.
- Oyoque, G. (2008). Inducción de resistencia en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) con extractos de bacterias patógenas. *Tesis de maestría en producción agrícola sustentable*.
- Pal, K. G. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1-25.
- Percival, C. (2001). Induction of systemic acquired disease resistance in plants: potential implications for disease management in urban forestry. *Journal of Arboriculture*, 181-186.
- Randhawa, P. (2009). Estrategias para el control de enfermedades en Tomate. San Quintin, B.C., Mexico: California Seed & Plant Lab, Inc.
- Rodríguez, A. J. (2002). Disminución de la marchitez causada por *Fusarium*. *Manejo Integral de Plagas*, 46-50.
- Sagarpa. (2009). Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Consulta de Producción Nacional de Tomate. .
- Sagarpa. (2010). Monografía de cultivos, Jitomate Subsecretaría de fomento a los agronegocios. Consulta Nacional del tomate.

- Sectorial., D. G. (2009). Monografía Tomate Rojo (Jitomate).
- Shirokikh, I. G. (2007). Assesment of the effect of methylotrophic bacteria on plants in vitro. *Russian agricultural Sciences.*, 308-310.
- Wang, Y., Bao, Y., Shen, D., Feng, W., Yu, T., Zhang, J., X. D. Zheng. 2008. Biocontrol of *Alternaria alternata* on cherry tomato fruit by use of marine yeast *Rhodospiridium paludigenum* Fell & Tallman. *International Journal of Food Microbiology.* 123. 234-239.
- Wees, v. S. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene Atvsp upon challenge. *Plant Molecular Biology*, 537-549.
- Zapata, M. G. (2007). Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. *Ciencia, Docencia y Tecnologia.*, 175-193.