



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AMBIENTAL**

**“Evaluación de *Bacillus* spp. en el antagonismo de
fitopatógenos asociados a la secadera en tomate de
cáscara, *Physalis ixocarpa*”**

TESIS Que como parte de los requisitos para obtener el grado
de MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

Presenta I.A. José Antonio Oidor Juárez

Dirigido por Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

C.U. Santiago de Querétaro, Querétaro,.

Diciembre de 2016



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias y Tecnología Ambiental

“Evaluación de *Bacillus* spp. en el antagonismo de fitopatógenos asociados a la secadera en tomate de cáscara, *Physalis ixocarpa*”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencias y Tecnología ambiental

Pesenta:

I.A. José Antonio Oidor Juárez

Dirigido por:

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Dr. Juan Ramiro Pacheco Hernández
Director



Firma

Dr. Alejandro Hernández Morales.
Asesor

Rúbrica
Firma

Dr. Andrés Cruz Hernandez.
Asesor



Firma

Dr. Juan Campos Guillen.
Asesor



Firma

Dr. Miguel Angel Ramos López.
Asesor



Firma



M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Postgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2016.

RESUMEN

En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium* sp y *Phytium* sp, ambos causantes de la secadera del tomate de cáscara de un suelo agrícola con incidencia previa de la enfermedad. Los hongos aislados fueron sujetos a ensayos de inhibición *in vitro* usando tres cepas de *Bacillus* MA04, MA12 y MA07, reportadas previamente como promotoras del crecimiento vegetal, encontrando inhibiciones del 66 % para los aislados de *Fusarium* y del 78 % para un aislado de *Pythium*. La posterior inoculación de *Bacillus* sp. en semillas de tomate de cascara var. Gran Esmeralda mostró su capacidad para mejorar la calidad de las plántulas, registrando incrementos del 37.8 % al 54.2 % en peso fresco, del 31.7 % al 42.9 % en materia seca, del 43.9 % al 45.6 % para la altura y del 31.7 % al 41.3 % para la longitud de raíz, respecto al tratamiento testigo, siendo las plantas inoculadas con MA04 las que presentaron el mayor incremento. Posteriormente, esta cepa junto con los productos comerciales Bactiva y Rhizobac combi, fueron utilizados para evaluar el efecto sobre la producción y calidad del fruto en campo, encontrando que el tratamiento MA04 presentó incrementos del 11.6 % en el número y peso de los frutos 11.7 %, mientras que en segundo corte no se presentaron diferencias. En cuanto a la calidad del fruto se encontraron diferencias en la cantidad de sólidos solubles (° Brix) en los tratamiento Rhizobac (**6.2 ± .07 ° brix**) y MA04 (**5.6 ± .06 °brix**); mientras que en la variable vitamina C (ácido ascórbico) lo fueron el tratamiento Bactiva (**3.25 ± .71 mg a.a *100 g de fruto⁻¹**) y MA04 (**3.26 ± .20 71 mg a.a *100 g de fruto⁻¹**), características que se le pueden atribuir al diferente metabolismo bacteriano de las cepas específicas de microorganismos de los productos comerciales. Frutos del tratamiento Bactiva presentaron diferencias en la coordenada cromática b los cuales son presentaron una tendencia menor hacia el color amarillo con respecto a los demás tratamientos, característica que influye en la calidad sensorial de el tomate de cáscara descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-FF-54-1982, la cual describe un color verde brillante para obtener calidades superiores. Características mejoradas por la inoculación bacteriana de plantas de tomate de cáscara variedad Gran

Esmeralda. El efecto de los microorganismos sobre la calidad del fruto podría estar relacionada con la maduración de los mismos

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, *Physalis ixocarpa*, sólidos solubles totales (SST), ácido ascórbico, plántulas

ABSTRACT

The aim of this work was to isolate and identify organisms phytopathogens causing of secadera disease in tomatillo from agricultural soil with previous incidence of illness, immediately pathogenicity test of these isolates in tomato seedlings were reproduced, Tests were performed with antagonism microbial cell-free supernatant of bacterial strains of *B. subtilis* MA04 , MA07 MA12 and soil microorganisms isolated, obtaining F1 inhibitions *Fusarium* sp (66.88%), *Fusarium* sp F2 (65.51%) y *Pythium* sp P1 (78. 45%). After this inoculate seeds tomatillo variety Grand Esmeralda with strains of *B. subtilis* MA04, MA12, MA07; and evaluate the agronomic variables that improve an adaptation and survival to transplanting. Inoculations made with growth promoting bacteria (PGPR) improve the quality of seedlings with increases of 37.8% to 54.2% on fresh weight, 31.7% to 42.9% for dry matter, 43.9% to 45.6% for variable variables were improved height and 31.7% to 41.3% in root length, bacterial inoculations on treatment control strains MA12, MA07 and MA04, however higher values correspond to the MA04 averages strain. For field work increases in yield for a 11.57% and 11.65% was found weight of fruit is first harvest by the MA04 strain with respect to Bactiva, Rhizobac and control treatments, while for the second harvest not there was a difference in production variables between treatments; The Bactiva treatment (3.25 ± 0.71 mg aa * fruit 100g⁻¹) and MA04 (3.26 ± 0.20 * 71 mg 100 g aa⁻¹ fruit) showed significant differences in quality variables Vitamin C, while the Rhizobac ($6.2 \pm .07$ ° brix) and MA04 ($5.6 \pm .06$ ° brix) treatment were for total soluble solids improving the quality of these chemical variables compared with the control, characteristics that can be attributed to different bacterial metabolism specific strains of microorganisms of the commercial products. Fruits of plants inoculated with beneficial microorganisms not presented a tendency toward yellow with respect to the inoculated treatments, a characteristic that influences the sensory quality of the tomatillo described in the Mexican Official Standard NOM-FF-54-1982, which describes a bright green color to get higher grades. improved by bacterial inoculation of plants tomatillo variety Grand Esmeralda features.

Keyword. *Bacillus subtilis*, *Physalis ixocarpa*, ascorbic acid, Total Soluble Solids, Seedling.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	6
2. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA	8
3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	10
3.1 Tomate de cáscara <i>Physalis ixocarpa</i>	10
3.2 Importancia económica.....	10
3.3 Fenología del cultivo.....	11
3.4 Principales problemas fitosanitarios	14
3.5 Secadera del tomate.....	14
3.5.1 <i>Fusarium</i> sp	15
3.5.2 <i>Pythium</i> sp	17
3.5.3 Manejo convencional de la enfermedad.....	19
3.5.4 Contaminación y riesgo a la salud por plaguicidas	20
3.5.5 Métodos alternativos	20
3.6 Mecanismos de biocontrol	21
3.6.1 <i>Bacillus subtilis</i>	22
3.6.2 <i>Trichoderma</i> sp	24
3.11 Control biológico aplicado a enfermedades causadas por <i>Pythium</i> sp y <i>Fusarium</i> sp	24
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo General.....	26
5.2 Objetivos Específicos.	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Aislamiento de Patógenos en suelo y pruebas de patogenicidad.....	27
6.1.1 Muestreo de suelo.....	27
6.1.2 Aislamiento de <i>Fusarium</i> sp.....	27
6.1.3 Aislamiento de <i>Pythium</i> sp.....	28

6.1.4 Pruebas de patogenicidad.....	29
6.2 Ensayos de antagonismo <i>in vitro</i> de cepas de <i>Bacillus</i> sp. MA12, MA07 y MA04 contra aislados de <i>Pythium</i> sp, y <i>Fusarium</i> sp	30
6.2.1 Aislados de <i>Bacillus</i> sp. empleados para pruebas de antagonismo.....	30
6.2.2 Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	30
6.3 Efecto de las cepas de <i>Bacillus</i> sp sobre la calidad de plántula	31
6.4 Evaluación de inoculantes en el cultivo del tomate de cáscara	32
6.4.1 Localización geográfica del proyecto.	32
6.4.2 Descripción de la unidad experimental.....	33
6.4.3 Material Vegetal	35
6.4.4 Aislados de microorganismos antagonistas comerciales	36
6.4.5 Cultivo	38
6.5 Análisis Estadístico.....	46
7. Resultados y Discusión	47
7.1 Aislamiento de patógenos en suelo y pruebas de patogenicidad	47
7.1.2 Pruebas de patogenicidad.....	51
7.2 Pruebas <i>in vitro</i> de antagonismo de <i>Bacillus</i> sp contra aislados de <i>Pythium</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.	53
7.3 Efecto promotor del crecimiento de plantas de <i>Bacillus</i> sp.....	58
7.4 Evaluación la calidad y rendimiento de frutos de tomate de cáscara	62
7.4.1 Variables de producción (primer corte)	62
7.4.2 Variables de producción (segundo corte.).....	64
7.4.4 Variables de calidad	65
8. CONCLUSIONES.....	71
9. PERSPECTIVAS.....	72
10. LITERATURA CITADA.....	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Antagonismo microbiano entre <i>B. subtilis</i> y diversos fitopatógenos.	25
2	Afiliación genética de las cepas microbianas usadas en el ensayo de antagonismo.	33
3	Composición de solución nutritiva.	34
4	Tratamientos de aplicaciones para el control de secadera en tomate.	43
5	Análisis de sobrevivencia a plántulas inoculadas con patógenos.	55
6	Pruebas de antagonismo microbiano del sobrenadante libre de células.	59
7	Efecto de la inoculación en plántula de Tomate (<i>Physalis ixocarpa</i>) sobre variables de crecimiento	63
8	Variables de producción evaluadas en campo 1er corte.	68
9	Variables de producción evaluadas en campo 2do corte.	69
10	Efecto de la inoculación sobre color en fruto y cáscara de tomate.	71
11	Efecto de la inoculación en variables de calidad en fruto de tomate.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Taxonomía del tomate de cáscara, <i>Physalis ixocarpa</i> (Taboada y Oliver, 2004).	10
2	Fenología del cultivo de tomate de cáscara	13
3	Picudo o barrenador del tomatillo.	14
4	La secadera del tomate; daños en planta y fruto.	15
5	a) Micrografía de macroconidios de <i>Fusarium</i> sp b) Micrografía de clamidospora de <i>Fusarium</i> sp (Romero y col. 2015).	16
6	Ciclo patológico del damping off causado por <i>Pythium</i> sp (Agrios, 1998).	17
7	Estructuras de <i>Pythium</i> sp a) Micelio b) Zoospora inmadura y germinando c) Oogonio y anteridio d) Oospora.	18
8	Plántula de tomate de cáscara Infectada por <i>Pythium</i> sp.	19
9	Muestreo de suelos en cinco de oros.	27
10	Aislamiento de <i>Pythium</i> sp. de suelo. Uso de pepino como cebo (a); Aislado de <i>Pythium</i> sp. crecimiento en medio V8 (b); Aislado de <i>Pythium</i> sp purificado (c).	29
11	Ensayo de infección de <i>Fusarium</i> sp en plántulas de tomate.	30
12	Inoculación de semilla de tomate var. "Gran Esmeralda".	32
13	San Nicolás Tequisquiapan Qro., sitio del ensayo para el cultivo de tomate.	33
14	Análisis de la fertilidad del suelo de la parcela experimental.	35
15	Ficha técnica de la semilla de tomate var. "Gran Esmeralda".	36
16	Ficha técnica producto Rhizobac combi.	37
17	Ficha técnica producto Bactiva.	38
18	Preparación de terreno.	39
19	Distribución espacial de plantas en surcos.	40
20	Diseño experimental en campo.	41
21	Plantación de tomate de cáscara var. "Gran Esmeralda".	42
22	Labores culturales: Escarda mecánica del cultivo.	42
23	Labores culturales: Fertilización en banda (A) Fertirriego (B).	43

24	Manejo de plagas durante cultivo de tomate.	44
25	Espacio de color Hunter lab.	45
26	Cultivo de poblaciones fúngicas de suelo y aislamiento de <i>Fusarium</i> sp.	48
27	Crecimiento micelial en placa de aislados de <i>Fusarium</i> sp.	49
28	Características morfológicas de <i>Fusarium</i> sp	50
29	Crecimiento micelial en caja Petri del aislado de <i>Pythium</i> sp.	51
30	Características morfológicas de <i>Pythium</i> sp	51
31	Infección de plántula de tomate por <i>Fusarium</i> sp. (a) y <i>Pythium</i> sp. (b).	53
32	Cinética del crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. F1 en placas de PDA con sobrenadante de <i>Bacillus</i> sp.	54
33	Cinética del crecimiento de <i>Fusarium</i> sp F2 en placas con PDA conteniendo sobrenadante de <i>Bacillus</i> sp	54
34	Cinética del crecimiento de <i>Pythium</i> sp P1 en placas con PDA conteniendo sobrenadante de <i>Bacillus</i> sp	55
35	Ensayos de antagonismo microbiano empleando sobrenadantes de cepas de <i>Bacillus</i> .	58
36	Plantulas de tomate inoculadas con cepas de <i>Bacillus</i> reportadas como promotoras del crecimiento vegetal.	59
37	Frutos de tomate obtenidos de la primer y segunda cosecha.	63
38	Valor de la coordenada cromática “b” de frutos de plantas inoculadas con cepas de <i>Bacillus</i> y productos comerciales.	67

1. INTRODUCCIÓN

En el manejo de enfermedades en plantas causadas por hongos fitopatógenos, el uso de fungicidas químicos ha sido el método más utilizado para su tratamiento, creando una dependencia a nivel mundial de plaguicidas en cuanto a producción agrícola se refiere debido a su rápido modo de acción contra enfermedades debido a la demanda global de alimento (Köhler y Triebkorn, 2013), siendo los más utilizados los organofosforados, organoclorados y carbamatos, los cuales han sido reportados como probables responsables de problemas relacionados con la salud pública (Curl y col. 2015), además del envenenamiento de animales domésticos, peces, mamíferos y abejas encargadas de la polinización en plantas y la contaminación de productos (Pimentel, 2005). A nivel agrícola, estas aplicaciones han originado que especies de fitopatógenos como *Pythium* sp y *Fusarium* sp, puedan llegar a ser resistentes después de varias aplicaciones, ocasionando problemas ambientales al incrementar las dosis y el número de aplicaciones destinadas para su manejo (Alcalá, 1985; Srivastava y col., 2011), fenómeno que tiene graves repercusiones económicas tanto para los agricultores, como para los consumidores. Además de la probable contaminación de suelos y mantos subterráneos (FAO, 1997). Aunado a la baja efectividad en el control de enfermedades por parte de los plaguicidas sintéticos de hasta un 32 % (Hirooka e Ishii, 2013).

Para disminuir este tipo de problemas, se han creado alternativas de control biológico para estas especies fitopatógenas, por medio de microorganismos antagonistas tales como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma* sp. entre otras. Diferentes cepas de *Bacillus subtilis*, han sido probados con éxito a nivel *in vitro* y en invernadero en cultivos como clavel (Aquino y col., 2008), mango, pera (Sharma y col., 2009), soya (Zhang y col. 2009) etc. Estos microorganismos antagonistas actúan por medio de producción de compuestos anti fúngicos, por parasitismo directo e induciendo la respuesta sistémica adquirida de la planta (Paulitz y Belanger, 2001), disminuyendo el uso de plaguicidas persistentes en el ambiente y a su vez equilibrando el microambiente del suelo.

El manejo eficaz de las enfermedades en la etapa productiva del ciclo de cultivo incrementa el rendimiento de cosecha por hectárea, promoviendo un

cultivo más rentable al disminuir costos. Mientras que los beneficios al ambiente debido a la reducción de aplicaciones de plaguicidas sintéticos van encaminados a la conservación de los suelos, fauna e insectos benéficos de los sitios tratados, así como también a la disminución de los riesgos a la salud de los aplicadores y consumidores finales.

2. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA

En Querétaro el cultivo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*), una de las hortalizas básicas de la alimentación en México (Lopez y col. 2008), ocupa el sexto lugar nacional en cuanto a rendimiento con un promedio de 22.36 Ton/ha por arriba del promedio nacional de 14.94 Ton/Ha. Específicamente en el municipio de Tequisquiapan Querétaro, es de gran importancia agrícola y económica, siendo el principal productor de tomate en el estado con 285 Ha cultivadas y cosechadas en 2014, con un rendimiento por encima de la media estatal de 24.35 Ton/Ha (SIAP, 2015) siendo el quinto cultivo en importancia en superficie cultivada y producción en el municipio; las localidades donde se cultiva presentan durante toda la fenología del cultivo, la enfermedad de la secadera, causada principalmente por hongos fitopatógenos de *Pythium* sp y *Fusarium* sp, que disminuyen considerablemente la producción.

Para el manejo de la secadera, se han utilizado principalmente plaguicidas químicos, provocando diferentes niveles de resistencia (Carvalho, 2006). En el control de *Pythium* sp y *Fusarium* sp se emplean fungicidas químicos de amplio espectro que pueden traer complicaciones ecológicas al ambiente además del probable riesgo de ser carcinógenos (E.P.A., 2013). Entre ellos se encuentran Mancozeb; el cual se puede filtrar a mantos acuíferos y presenta el potencial de movilizarse en suelo, Tiabendazol; tóxico a especies acuáticas y persistencia moderada en suelo. Sulfato de cobre; tóxico a especies acuáticas, cobre acumulable en suelos arcillosos. Benomilo; que es persistente en el ambiente, en suelo principalmente y no es soluble en agua, de acuerdo a las hojas de seguridad de los productos, además de los daños a la salud humana reportados como intoxicaciones agudas, daños neurológicos, reproductivos, respiratorios riesgos que alcanzan a los consumidores finales (Pimentel, 2005). En este sentido se pretende establecer una estrategia de biocontrol de enfermedades fúngicas en *Physalis Ixocarpa* por medio de microorganismos benéficos, que además de controlar las enfermedades en el hospedero, ayuden a mejorar el microambiente del suelo disminuyendo la exposición a fungicidas químicos de parte de los

trabajadores agrícolas de la región, además de evaluar su efecto sobre las variables de calidad en fruto.

3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

3.1 Tomate de cáscara *Physalis ixocarpa*

El género *Physalis* abarca más de 80 especies distribuidas a nivel mundial, de las cuales la mayoría se encuentran en América, siendo México el principal centro de distribución del género con 70 especies, de las cuales 36 se encuentran distribuidas en 26 estados del país, en altitudes que van desde los 8 y hasta los 3,350 (msnm) (Peña y col., 2008; Santiaguillo y col. 2009). *Physalis* se caracteriza principalmente por su cáliz, el cual se expande ampliamente con el fruto que envuelve totalmente a la baya, por esto se le denomina tomate de cáscara (Martínez, 1998; Contreras y Almeida 2003). En México *Physalis ixocarpa* también es conocido como tomatillo, tomate verde, tomate de bolsa y tomate de hoja (Peña y col., 2008; García y col. 2015).

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Dicotyledonae
Orden	Tubiflorae
Familia	Solanaceae
Genero	<i>Physalis</i>
Especie	<i>Physalis ixocarpa</i> Brot. ex Hornem

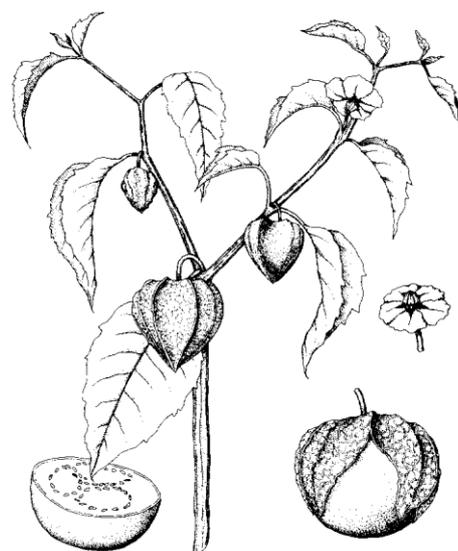


Figura 1. Taxonomía del tomate de cáscara, *Physalis ixocarpa* (Taboada y Oliver, 2004).

3.2 Importancia económica

A partir de 1970 la superficie sembrada del cultivo de tomate tuvo un aumento de manera significativa de mas de 350 %, pasando de 11,286 ha a más de 40 mil ha, cultivándose en todos los estados del país debido al incremento del

consumo per cápita y al inicio de las exportaciones hacia Estados Unidos y Canadá (Peña, 2001; López y col. 2009).

La producción total para 2014 fue de más de 600 mil toneladas producidas en 44 mil hectáreas con un rendimiento de 14.98 Ton/Ha, con un valor de producción de más de 2 mil millones de pesos. Los principales estados productores de tomate de cáscara fueron Sinaloa, Jalisco, Puebla, Nayarit y Zacatecas, mientras que en los estados del centro como Guanajuato, Morelos, Hidalgo y el Estado de México se concentró la mayor producción colocándose entre los primeros productores; estados como Aguascalientes, Baja California, Chihuahua, Coahuila, Querétaro, Tamaulipas y Zacatecas, donde el rendimiento sobrepasó las 20 toneladas por hectárea (SIAP, 2014). Esta variable ha aumentado con respecto a 1993 el cual era de 11.49 toneladas por hectárea, pero sigue siendo bajo, incluso en los estados con mayor rendimiento, en relación con el potencial estimado del cultivo de 40 toneladas por hectárea (Peña, 2001; López y col. 2009). Este bajo rendimiento se debe a factores como las diversas enfermedades en suelo ocasionadas por microorganismos patógenos.

3.3 Fenología del cultivo.

El desarrollo vegetativo del tomate de cáscara cambia en cuanto a tiempos dependiendo del ambiente donde se encuentre y los manejos de cultivo que se dan, principalmente se diferencia si es por siembra directa o trasplante (López y col. 2010; Rodríguez, 2010). La fenología del tomate de cáscara se puede describir en las siguientes etapas:

Germinación. Ocurre una semana después de la siembra. La planta de tomate tiene un periodo de vida aproximado de entre 85 y 90 días después del trasplante (ddt) de plántula.

Elongación del eje principal. Se presenta a la cuarta semana después de la emergencia. Dependiendo de la variedad, el crecimiento puede ser erecto o arbustivo, este crecimiento es lento (1 cm. por día) durante los primeros 20 días

después de la emergencia.

Crecimiento vegetativo. Comienza desde la semana cero a la semana catorce. Se caracteriza por el desarrollo de entrenudos a lo largo del tallo principal, los cuales delimitan zonas denominadas: zona del tallo no ramificado, zona inicial, zona media, zona transitoria y zona terminal; durante la zona terminal, estos entrenudos tienden a ser más cercanos; indicativo del inicio de la senescencia de la planta.

Producción de botones florales. Se manifiesta de la semana tres a la semana catorce. A partir de los primeros 20 ddt aparecen los primeros botones florales, los cuales tardan alrededor de 10 días hasta mostrarse como una flor abierta completamente.

Floración. Inicia de la semana cuatro a la semana catorce. A los 30 ddt aproximadamente aparecen las primeras flores, esta producción se incrementa paulatinamente teniendo su máxima producción alrededor del día 50 ddt con un promedio de más de 120 flores por planta, para después disminuir la producción floral.

Fructificación. Comienza de la semana cinco a la semana catorce. El cuajado de frutos comienza a partir de los 35 ddt esto significa que inicia el desarrollo del fruto que se localiza dentro del cáliz (cáscara) ya formado, este inicio del cuajado de fruto hasta su maduración final transcurren aproximadamente 20 días, los frutos de interés comercial se desarrollan generalmente entre el cuarto y séptimo entrenudo.

Senescencia. Se inicia de la semana doce a la semana catorce ddt. A partir de este punto la planta empieza envejecer y disminuye su vigor (Rodríguez, 2010).

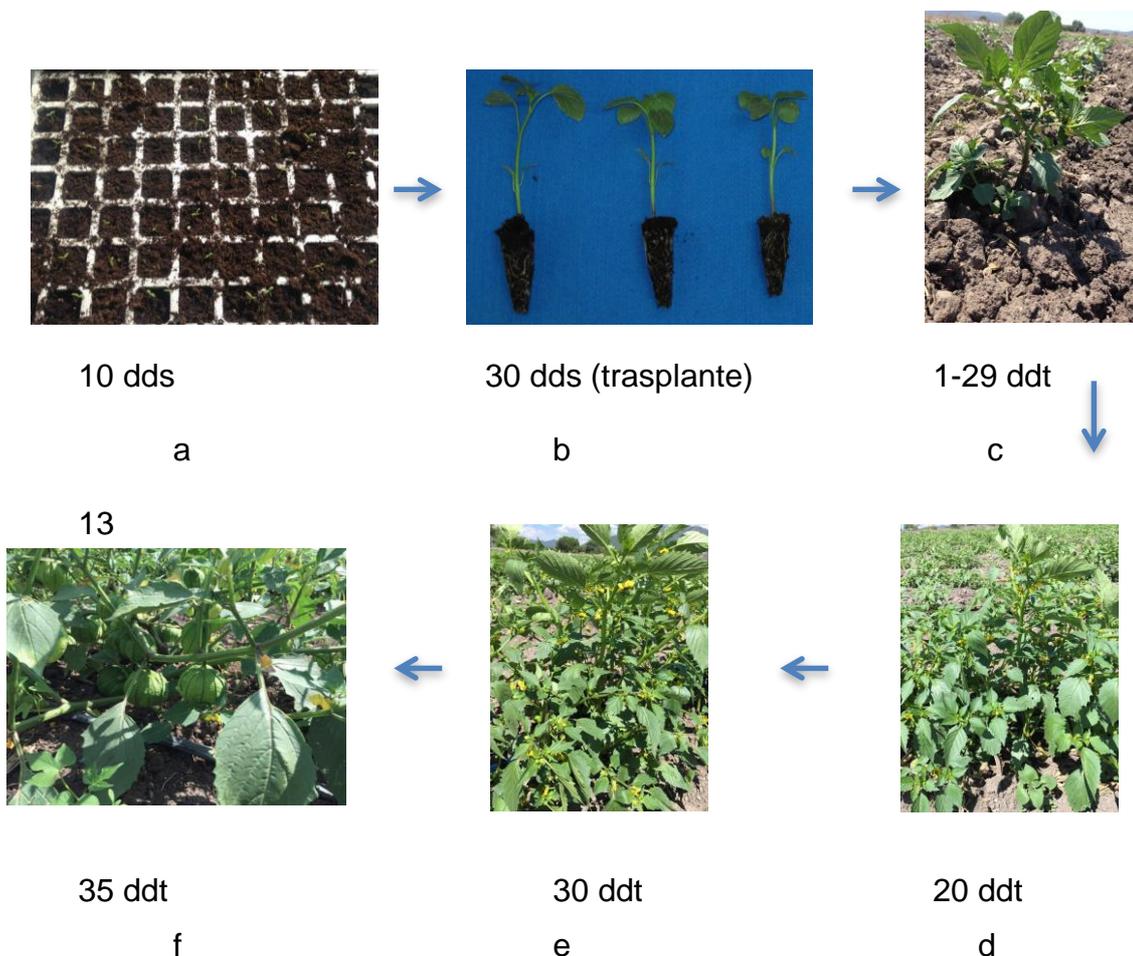


Figura 2. Fenología del cultivo de tomate de cáscara. a) Germinación (días después de siembra) b) Elongación del tallo c) Crecimiento vegetativo (días después de trasplante) d) Producción de botones florales, e) Floración f) Fructificación.

Las principales variedades de tomate verde que se cultiva en México son, Rendidora, Salamanca, Tamazula, las cuales deben su distribución nacional debido a características como la uniformidad de frutos en cuanto a tamaño, color, firmeza y hábitos de crecimiento. Para el desarrollo del cultivo las temperaturas óptimas oscilan entre 20° C a 25° C con un 60 % de humedad a capacidad de campo en suelo, siendo los de tipo arcillo-arenosos en los que se desarrolla mejor el cultivo (Rodríguez, 2010).

3.4 Principales problemas fitosanitarios

Las principales plagas que afectan al cultivo de tomate son: minador de la hoja (*Liriomyza trifoli*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano del fruto (*Helicoverpa zea*), ácaro blanco (*Polyphagotarsonemus latus*), mosquita blanca (*Bemisia argentifolii*), trips amarillo (*Frankliniella* sp), pulgones o áfidos (*Myzus persicae*), picudo o barrenador del tomatillo (*Trichobaris mucorea*) (Soto y col. 1998). Mientras que las enfermedades mas devastadoras reportadas para el cultivo son la secadera, el marchitamiento, la pudrición de la base del tallo y cenicilla (Apodaca y col., 2008).

En la región centro del país la enfermedad de la secadera causada por microorganismos patógenos del género *Fusarium* sp. y *Pythium* sp. tiene una mayor incidencia provocando perdidas económicas tanto en el manejo del cultivo como en la producción final.



Figura 3. Picudo o barrenador del tomatillo.

3.5 Secadera del tomate

La secadera, también conocida como marchitamiento o marchitez, es causada por un complejo de hongos que habitan en el suelo, como lo son *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp.,

Macrophomina phaseolina y *Sclerotium rolfsii*. Se presenta en cualquier etapa de desarrollo del cultivo, con pérdidas que pueden superar el 50 % de la producción.

Estos hongos pueden reducir la germinación por la pudrición de las semillas, y las plántulas no alcanzan a emerger o cuando nacen muestran desarrollo raquítico muriendo prematuramente. A esta fase de la enfermedad también se le conoce como "damping-off" y se presenta tanto en cultivos establecidos de siembra directa, almácigos en campo y en semilleros bajo invernadero. En plantas con frutos en formación y en la etapa de cosecha, la enfermedad también se manifiesta severamente, con una palidez o amarillamiento del follaje, desarrollo raquítico y de menor tamaño. Las raíces muestran una pudrición de color café claro a café oscuro, que a veces se extiende hacia el cuello y base del tallo. En ocasiones los tejidos podridos son de color rosáceo, rojizo o violáceo. En las plantas enfermas, el número y tamaño de los frutos es menor y se caen con facilidad (Apodaca y col., 2008).



Figura 4. La secadera del tomate; daños en planta y fruto.

3.5.1 *Fusarium* sp.

Fusarium sp. es un género de hongos fitopatógenos que dañan diversos cultivos incluyendo a la familia de las solanáceas, algunos de los síntomas de plantas infectadas con *Fusarium* sp. son el aclaramiento de los haces vasculares

y la epinastía de la hoja, seguido por el retraso del crecimiento, amarillamiento de las hojas inferiores, marchitamiento progresivo, defoliación, secreción de enzimas hidrolíticas, producción de micotoxinas y apoptosis celular. En la colonización fúngica, el tejido vascular se vuelve marrón. (Van Der Berg y col., 2007; Michielse y Rep., 2009; Sheng Wu y col., 2009). *Fusarium* sp. al ser un patógeno que causa marchitamientos vasculares, comprende un amplio rango de hospederos que van desde frutales, hortalizas, flores de ornato, cereales y forrajes (Agrios 1998)

Microscópicamente el género *Fusarium* sp. se puede describir por medio de sus características morfológicas de los conidióforos, los cuales son la estructura de la hifa fértil simple o ramificada que soporta las conidias, las cuales pueden ser fiálides simples o ramificadas, finas y afiladas o con forma de botella. Las esporas pueden salir de un sólo orificio (monofiálides) o de varios (polifiálides). Dichas conidias son inmóviles y de reproducción asexual, pueden ser, dependiendo de la especie: Macroconidias, con forma de canoa, hialinas y septadas. Producidas a partir de las monofiálides o en esporodoquias, que pueden tener monofiálides o polifiálides. Las cuales pueden ser descritas como un racimo de plátanos. Microconidias, son pequeñas, generalmente unicelulares y de distintas formas (subglobosas, ovoides, elipsoidales etc.) (Leslie y Summerell, 2006).

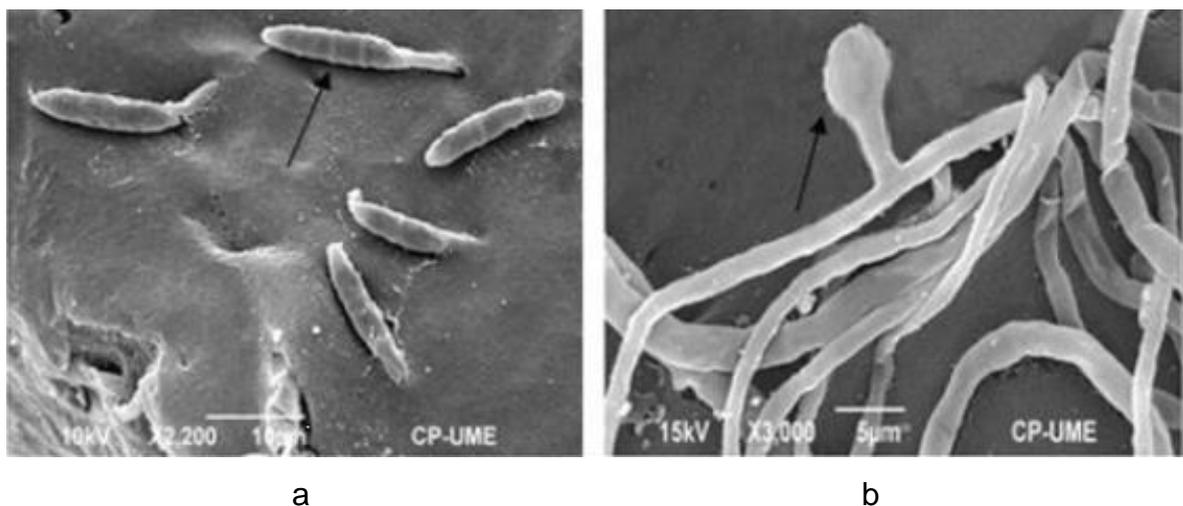


Figura 5. a) Micrografía de macroconidios de *Fusarium* sp b) Micrografía de clamidospora de *Fusarium* sp (Romero y col. 2015).

3.5.2 *Pythium* sp.

Pythium sp. es la causa más importante del ahogamiento durante las fases de preemergencia y postemergencia de las plántulas. Algunas especies reportadas incluyen *P. aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare* y *P. ultimum*. Las plantas adultas rara vez mueren cuando son infectadas por el patógeno, pero muestran lesiones en su tallo y pudriciones en la raíz, su crecimiento puede retardarse en forma considerable y su producción puede disminuir drásticamente (Agrios, 1998).

Los síntomas varían con la edad, en estado adulto, las plantas infectadas por *Pythium* sp. muestran pequeñas lesiones en su tallo; las cuales pueden cubrir el follaje de la planta y ocasionar su atrofia o muerte. Con mayor frecuencia, las infecciones de las plantas adultas se limitan a las raicillas, las cuales son dañadas o destruidas por el hongo; esto da como resultado la atrofia, marchitamiento y muerte de los órganos aéreos de la planta (Agrios, 1998).

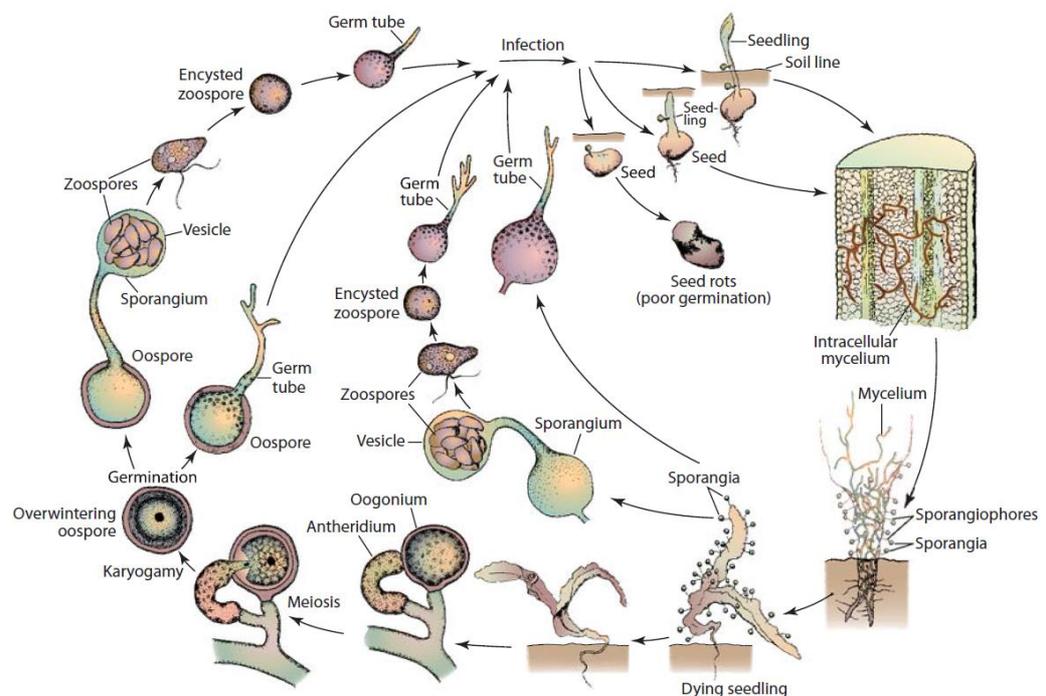


Figura 6. Ciclo patológico del damping off causado por *Pythium* sp (Agrios, 1998).

La producción de zoosporas producidas en esporangios es una de las principales características de *Pythium* sp. Estas zoosporas no poseen pared celular sin embargo mantienen consistencia y flexibilidad localizándose sobre películas de agua en la superficie de las hojas, agua en el suelo, medios hidropónicos y en cuerpos naturales de agua. *Pythium* sp y diversos oomicetos pueden ser capturados de agua en el suelo, o diferentes tipos de cuerpos de agua, dado por la capacidad de las zoosporas de ser atraídas por diferentes cebos o carnadas. La reproducción esta dada vía oogonio y anteridio, los cuales pueden unirse a un costado o en la base del oogonio; cuando el oogonio es fecundado, inicia el desarrollo de una oospora de pared gruesa, dichas oosporas son resistentes a condiciones ambientales secas y frías pero susceptibles a altas temperaturas las cuales invaden tejidos vegetales cuando se producen en plantas o pueden permanecer en periodo de dormancia en suelo por varios años hasta su germinación iniciando con una producción de hifas (Salgado y col., 2011).

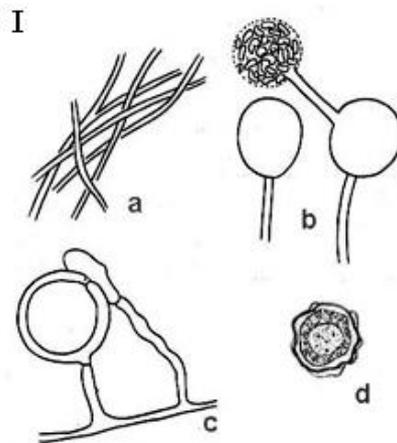


Figura 7 Estructuras de *Pythium* sp. a) Micelio b) Zoospora inmadura y germinando c) Oogonio y anteridio d) Oospora.



Figura 8. Plántula de tomate de cáscara Infeccionada por *Pythium* sp.

3.5.3 Manejo convencional de la enfermedad

El manejo de la enfermedad está dado principalmente por el uso de variedades resistentes, como también por el empleo de fungicidas químicos. Para el tratamiento de semillas se usa Captan (Ftalimidias), Dichlone (Quinonas) y Thiram (Organoazufrados), mientras que para el manejo en campo suele utilizarse Metalaxyl (Acilalaninas), Captan (Ftalimidias), Mancozeb (Ditiocarbamatos), Benomilo (Benzimidazol) y Thiabendazole (Benzimidazol). Sin embargo se ha comprobado la resistencia de diferentes genotipos de hongos patógenos a fungicidas que presentan un mismo modo de acción (Chin y col. 2001; Martínez y col. 2012; Spolti y col., 2014), en especies de *Fusarium oxysporum*. Rubio y col. (2008) reportaron resistencia a productos formulados a base de Benomilo, Thiram y Tolclofos metil, debido a la presencia de una serie de transportadores membranales los cuales actúan como mecanismos de desintoxicación. Mientras que Moorman y Kim (2004) demostraron la resistencia *in vitro* de diferentes genotipos de *Pythium* sp. a fungicidas específicos de oomicetos como lo son Propamocarb y Mefenoxam por variación natural de la sensibilidad a la sustancia activa por medio de una presión de selección debido al uso de los mismos fungicidas de manera constante. Este tipo de resistencia limita la efectividad del manejo de enfermedades y se tienen que incrementar frecuencia de aplicaciones o dosis de las mismas. Estudios en hongos patógenos como *Mycosphaerella fijiensis*, demuestran la capacidad del organismo de desarrollar resistencia a

fungicidas del grupo de los Triazoles, Estrobirulinas, Benzimidiazoles entre otros (Marín y col., 2003; Pérez y col. 2003).

3.5.4 Contaminación y riesgo a la salud por plaguicidas

Las aplicaciones constantes de fungicidas son una fuente de contaminación para el medio ambiente debido a la persistencia de sus elementos en suelo y la capacidad de migrar hacia otros sitios debido a la escorrentía (Mc Connell y col., 2003; Wightwick, 2010), la acumulación en suelo y mantos puede dar lugar a efectos adversos para la salud de los ecosistemas terrestres y acuáticos. Por ejemplo, han surgido preocupaciones sobre el uso a largo plazo de los fungicidas a base de cobre, esto puede originar una acumulación de cobre en el suelo, lo que puede tener efectos adversos en lombrices y microorganismos beneficios que participan en la fertilidad del suelo lo que potencialmente representa un riesgo a largo plazo (Wightwick y col., 2008; Komarek y col., 2010).

La aplicación indiscriminada y la exposición constante a plaguicidas, ha sido reportada como actividad de riesgo para la salud humana, siendo sus principales daños el cáncer, malformaciones fetales, intoxicaciones agudas, daño neurológico y efecto en el sistema nervioso (Pimentel, 2005; Dabrowski y col., 2014).

Los efectos negativos de los plaguicidas en la salud pueden ser mucho más significativos en los niños que en los adultos, debido a que tienen mayores tasas metabólicas que los adultos, y a su capacidad para activar, desintoxicar y excretar pesticidas tóxicos. Además, debido a su tamaño, pueden ingerir una mayor cantidad de sustancias tóxicas por unidad de peso corporal que los adultos. Este problema es especialmente importante para los niños ya que su cerebro es aproximadamente cinco veces más grande en proporción a su peso corporal en comparación con adultos (Pimentel, 2005).

3.5.5 Métodos alternativos

Existen métodos alternativos para el control de enfermedades pre y postcosecha, uno de ellos es la inducción en la producción de metabolitos

secundarios específicos en las plantas. Estos metabolitos secundarios pueden ser compuestos aromáticos, reguladores del crecimiento, protectores naturales frente a parásitos y otros tipos de bacterias que son inducidos por medio de algún tipo de estrés o fertilización (Sepúlveda y col., 2003).

Una alternativa adicional, es la aplicación de monoterpenos como aceites esenciales vegetales para el manejo de algunas enfermedades fúngicas, lo cual ha sido probado contra varios hongos por su efecto sobre la membrana plasmática (Lucini y col., 2006).

El uso de microorganismos antagonistas, es uno de los métodos más aceptados como sistema de defensa, teniendo mejores resultados en el control para enfermedades postcosecha debido a diversos mecanismos por el cual suprimen las enfermedades como lo son, la competencia por nutrientes y espacio. Además, de la producción de antibióticos, parasitismo directo y resistencia inducida en los productos cosechados son otros modos de acción por las que suprimen la actividad de los patógenos de plantas, frutas y verduras. Algunos de los principales microorganismos antagonistas incluyen a *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* sp., *Gliocadium* sp. y algunas especies de *Pseudomonas* sp. (Sharma y col., 2009; Janisiewicz y Korsten, 2002).

3.6 Mecanismos de biocontrol

Algunas de las características que se buscan para la aplicación de microorganismos antagonistas como agente de biocontrol son: estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, no exigente en requerimientos nutricionales, capacidad de sobrevivir a las condiciones adversas del medio ambiente, efectividad para un amplio rango de microorganismos patógenos en una variedad de plantas, frutos y hortalizas, capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos, que se mantenga en una formulación durante un largo período de vida, que sea fácil de aplicar sin producción de metabolitos secundarios que causen daños a la salud humana, resistente a los fungicidas y compatible con los procedimientos comerciales y no patogénico sobre el la planta

hospedera (Hernandez y col., 2007), Además de estas características de biocontrol sobre patógenos se busca que también estos microorganismos se apliquen como inoculantes al suelo, semilla o área foliar de cualquier planta y puedan traer beneficios para mejorar la calidad de fruto, rendimiento, salud del suelo, crecimiento y calidad del cultivo (Terugo y James , 1997).

Existen dos enfoques de aplicación de estos microorganismos; el uso de microorganismos que ya existen en el mismo suelo o material vegetal de los cultivos a tratar por bioaumentación o bioestimulación y el que es aplicado o introducidos artificialmente para contrarrestar los patógenos (Sharma y col., 2009).

3.6.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es un microorganismo propio del suelo que coloniza eficientemente diferentes hábitats debido a cualidades, tales como: formación de endosporas, capacidad de crecer en un amplio rango de temperaturas, mostrar velocidades de crecimiento altas, producir enzimas hidrolíticas extracelulares y una variedad de antibióticos (Slepecky y Hemphill, 1992). Se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva en forma de bacilo, la cual es resistente a altas temperaturas y desinfectantes químicos, capaz de generar efectos simbióticos en el crecimiento de las plantas por varios mecanismos de acción, además ha sido probado contra varias enfermedades provocadas por organismos patógenos como lo son *Botrytis cinerea*, *Phytophthora ultimum*, *Rhizoctonia solani*, utilizando diferentes modos de acción como la competencia por nutrientes, parasitismo, antibiosis y la inducción de un sistema de resistencia adquirida (Paulitz y Belanger, 2001; Kokalis-Burelle y col., 2006; Bishnoi y col. 2015).

Gueldner y col. (1988), encontraron que *Bacillus subtilis* producía un antibiótico llamado iturina con el cual se controlaron diversas enfermedades fúngicas en cítricos. Bais y col. (2004) demostraron la capacidad antagonista a nivel *in vitro* de la cepa de *B. subtilis* 6051 contra la infección de *Pseudomonas syringae* en raíz en *Arabidopsis*, por medio de la formación de biofilm y producción de surfactina al no mostrar mortandad en los tratamientos inoculados.

En otros trabajos (Li y col., 2015) reforzaron la capacidad antagonista de *B. subtilis* sobre *Fusarium oxysporum* en pepino y analizaron su comportamiento en suelos con diferentes características fisicoquímicas como textura, densidad aparente, capacidad de retención de agua, pH, y relación carbono-nitrógeno; donde la concentración del inoculante variaba pero la capacidad de inhibir al patógeno seguía siendo efectiva.

De igual manera diferentes cepas de *Bacillus subtilis* han sido probadas en pepino y tomate contra *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora aphanidermatum* (cepa FZB 13, FZB 44); también se ha comprobado su actividad como promotoras de crecimiento en tomate, mayor desarrollo de raíces (cepa FZB-G) y la producción de antibióticos en contra de *Fusarium oxysporum* (FZB-G y C) producción de ácido indolacético (Paulitz y Belanger, 2001). En el cuadro 1 se muestran algunos otros microorganismos contra los cuales han sido probadas cepas de *B. subtilis* de manera satisfactoria.

Cuadro 1. Antagonismo microbiano entre *B. subtilis* y diversos fitopatógenos.

Enfermedad	Hongo fitopatógeno	Fruto	Referencia
Pudrición del tallo	<i>Botryodiplodia theobromae</i> Pat.	Aguacate	Demoz y Korsten (2006)
Marchitez por <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Pepino	Cao y col. (2012)
Pudrición del fruto	<i>Botrytis cinerea</i>	Cereza	Utkhede y Sholberg (1986)
Pudrición del fruto	<i>Alternaria alternata</i>	Litchi	Jiang y col. (2001)
Moho gris	<i>Botrytis cinerea</i>	Fresa	Zhao y col. (2007)
Pudrición del tallo y fruto	<i>Alternaria alternata</i>	Melón	Yang y col. (2006)

3.6.2 *Trichoderma* sp.

Trichoderma sp. es un hongo saprofito con la habilidad de disminuir la población de patógenos de plantas, siendo sus mecanismos de control la competencia, parasitismo y la inducción del sistema de resistencia adquirida en la planta (Patil y col., 2012), además de la producción de antibióticos y enzimas hidrolíticas que actúan para el control de microorganismos patógenos a nivel de la rizósfera (Yedidia y col., 1999). Estos efectos de antagonismo microbiano se han probado en frutos de platano (Sharma y col. 2009), jitomate incrementado los niveles de ácido indolacético en plántulas inoculadas (Gravel y col. 2007) arroz con reducciones del 42 % en plantas inoculadas con *Rhizoctonia solani* respecto al control (Mathivanan y col. 2005)

3.11 Control biológico aplicado a enfermedades causadas por *Pythium* sp. y *Fusarium* sp.

El daño causado por los hongos patógenos *Pythium* sp. y *Fusarium* sp. en plantas, han sido estudiados por varios años. El-Mohamedy (2012), reportó que en condiciones *in vitro*, el antagonismo de *Trichoderma harzianum* G1 dirigida a *Pythium ultimum* B1 mostró una reducción del 100 % del crecimiento del patógeno, mientras que ensayos en condiciones de invernadero aplicados a plantas de brócoli para el control de *Pythium ultimum* obtuvo un control del 88 % en reducción de la pudrición de raíz causada por el patógeno, utilizando el método de mezcla de suelo + *Trichoderma harzianum* y la inmersión de raíces en solución de *Trichoderma harzianum* de manera conjunta

Aquino-Martínez (2007) evaluaron cepas nativas y comerciales de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum* y *Gliocladium* sp. para el control de *Fusarium* sp. en clavel, encontrando diferencias entre el tratamiento comercial y las cepas nativas sobre variables como la invasión de colonia del patógeno, crecimiento radial del antagonista y diferencia de crecimiento radial *in vitro*. La producción de enzimas líticas como mecanismo de control para *Fusarium* sp., por parte de las cepas comerciales fue significativamente superior en suelo con desinfección con metam sodio al 24 % y en suelo sin desinfectar.

Por otro lado, Martínez y col. (2016) ensayaron formulaciones de *Bacillus subtilis* (1.0 a 1.41×10^7 u.f.c. g⁻¹) en plantas de maíz para controlar *F. verticillioides* encontrando una reducción de hasta un 55.45 %. Mientras que Romero y col. (2015) probaron cepas de *B. subtilis* en cultivo de chayote presentando inhibiciones efectivas contra *Fusarium oxysporum* y *F. Solani* del orden de 49.3 - 56.6 %

4. HIPÓTESIS

Cepas de *Bacillus* sp. reportadas como promotoras del crecimiento vegetal poseen actividad antagonista *in vitro* contra aislados de *Phytium* sp. y *Fusarium* sp. obtenidos de suelos con presencia de secadera, y su aplicación al cultivo en campo reducirá la incidencia de la enfermedad y mejorará la calidad de la cosecha.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General.

Evaluar el efecto antagonico *in vitro* de cepas de *Bacillus* contra aislados de *Phytium* sp. y *Fusarium* sp., y sus efectos sobre la incidencia de la secadera durante el cultivo y sobre la calidad del fruto.

5.2 Objetivos Específicos.

- Obtener aislados de *Phytium* sp. y *Fusarium* sp. de un suelo con incidencia de secadera en cultivos de tomate.
- Evaluar *in vitro* el efecto antagonista de las cepas de *Bacillus* MA12, MA07 y MA04 contra aislados de *Pythium* sp. y *Fusarium* sp.
- Determinar el efecto promotor del crecimiento vegetal de las cepas de *Bacillus* spp. sobre la calidad de la plántula de tomate.
- Evaluar en campo la incidencia de la secadera y la calidad del fruto en plantas inoculadas con *Bacillus* sp. MA04 y productos biológicos comerciales.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Aislamiento de Patógenos en suelo y pruebas de patogenicidad

6.1.1 Muestreo de suelo

La recolección del suelo se realizó en una parcela agrícola de la comunidad San Nicolás, Tequisquiapan Qro. (Longitud (dec): -99.931667 Latitud (dec): 20.470833), la cual presentó incidencia de la enfermedad de secadera. Las muestras fueron recolectadas entre los primeros 30 cm de profundidad (Leslie y Summerell, 2006). En el método de muestreo se tomaron 5 muestras de 5 kg cada una; las muestras se tamizaron con una malla de abertura de 2 mm y se dejaron secar al aire durante 48 horas para eliminar el exceso de humedad.



Figura 9. Muestreo de suelos en cinco de oros (a) Muestras de suelo (b).

6.1.2 Aislamiento de *Fusarium* sp.

Para el aislamiento de *Fusarium* se empleó el método de la dilución del suelo y siembra en placa, esta técnica implica una distribución uniforme de suelo en suspensión a para la posterior siembra en medios de cultivo. Para ello se utilizó una dilución de 10 gr de suelo por muestra de suelo (5 muestras) en 90 ml de agua estéril destilada (10^{-1}) y de esta dilución se tomó 1 ml y se adicionó a 9 ml de agua estéril destilada (10^{-2}), de esta dilución se aplicó 200 μ l a la caja Petri con medio selectivo PPA (Peptona PCNB Agar) para *Fusarium* spp. (Leslie y Summerell, 2006), el cual contenía: Peptona 15 g l⁻¹, KH₂PO₄ 1 g l⁻¹ MgSO₄•7H₂O 0.5 g l⁻¹, PCNB (Pentachloronitrobenzene) 750 mg l⁻¹ y agar 20 g l⁻¹, de cada

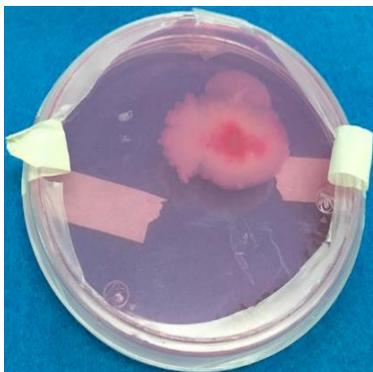
muestra de suelo se realizaron diluciones con tres repeticiones, se etiquetaron y se incubaron por 96 horas. Después de esto se sembraron las colonias de mayor crecimiento en agar de hojas de clavel (CLA) (Leslie y Summerell, 2006), el cual se contenía por litro de medio, 20 g de agar y 20 g de hojas de clavel previamente lavadas, desinfectadas y trituradas; las cajas se incubaron a 30° C por 4 días; de las colonias resultantes se llevaron a microcultivo para identificar las estructuras características de *Fusarium*.

6.1.3 Aislamiento de *Pythium* sp.

Para el aislamiento de *Pythium* sp, se utilizaron frutos de pepino (*Cucumis sativus*) como cebo, colocándolos en una bandeja que contenía suelo del campo humedecido hasta saturación (Dhingra y Burton, 1995), dejando incubar a temperatura ambiente, hasta observar desarrollo y crecimiento de micelio alrededor del fruto, para después colectar una muestra y sembrarla en agar de jugo V8 adicionado con PCNB 100 mg l⁻¹, vancomicina 200 mg l⁻¹, rosa de bengala 5 mg l⁻¹ y pimaricina 10 mg l⁻¹. Las placas fueron incubadas a 30°C hasta observar el crecimiento de micelio y desarrollo de estructuras, enseguida se purificaron en un medio PDA para después observarse por medio de la técnica de microcultivo en placa para reconocer las estructuras y morfología característica de *Pythium* sp.



a



b



c

Figura 10. Aislamiento de *Pythium* sp. de suelo. Uso de pepino como cebo (a); Obtención de aislado de *Pythium* sp medio V8 (b); Aislado de *Pythium* sp purificado (c).

6.1.4 Pruebas de patogenicidad

Para las pruebas de patogenicidad se utilizó la metodología propuesta por Bruna (1991). Primero, se preparó el inóculo proveniente de cada aislado de *Fusarium* sp. de *Phytium* sp, creciéndolos en medio PDA e incubándolos por 7 días a 30° C, posteriormente, se inocularon 100 g de avena humedecida cada uno de los micelos activos humedeciendo el inóculo con agua destilada, este cultivo en sólido se dejó crecer por 45 días a una temperatura promedio de 25° C.

Para en ensayo de patogenicidad, se utilizaron ocho macetas por cada patógeno, en las cuales fueron añadidos 12 g de avena inoculada. Después, fueron trasplantadas plántulas de tomate var Gran esmeralda con 35 días de edad, realizando previamente un corte de 1 cm horizontal a las raíces; para el tratamiento testigo se procedió de la misma manera sin embargo se utilizaron los granos de avena sin inocular que no presentó contaminación alguna. A partir de este momento, diariamente se registró la sintomatología de las plántulas hasta su marchitez.



Figura 11. Ensayo de infección de *Fusarium* sp en plántulas de tomate.

6.2 Ensayos de antagonismo *in vitro* de cepas de *Bacillus* sp. MA12, MA07 y MA04 contra aislados de *Pythium* sp, y *Fusarium* sp

6.2.1 Aislados de *Bacillus* sp. empleados para pruebas de antagonismo

Los aislados utilizados como antagonistas, fueron las cepas de colección *Bacillus subtilis* MA12, MA17 y MA04 del laboratorio de Química Agrícola de la facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, que han sido empleadas previamente en ensayos de promoción del crecimiento de plántulas de jitomate y pimiento (Luna y col. 2013) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Afiliación genética de las cepas microbianas usadas en el ensayo de antagonismo.

Cepa	Organismo Reportado	Similitud (%)
MA04	<i>Bacillus</i> sp. 9B_1	98
MA12	<i>Bacillus subtilis</i> AU55	99
MA17	<i>Bacillus megaterium</i> EJM-7	99

6.2.2 Pruebas de antagonismo *in vitro*

El efecto antagonista *in vitro* de las cepas MA12, MA17 y MA04 de *Bacillus* sp., contra los aislados encontrados en suelo de *Fusarium* sp. y *Phytium* sp., se probó utilizando la técnica descrita por Cao y col. (2012). Para ello, cada cepa de *Bacillus* fue crecida en 150 mL de caldo nutritivo (CN) por triplicado por 24 h a 30 °C y 180 rpm. Posteriormente, cada cultivo se centrifugó en tubos falcon de 50 ml por 20 minutos a 4000 rpm en centrifuga rotofix 32 A, donde se obtuvo 400 ml de sobrenadante por cada cepa bacteriana y se esterilizó con 15.6 g de PDA para después verter aproximadamente 20 ml de medio en cajas Petri estériles. Después, se procedió a inocular las cajas con discos de micelio activo de los aislados de hongos fitopatógenos de *Fusarium* sp. y *Phytium* sp., empleando un

sacabocados con orificio de 5 mm previamente esterilizado, inoculando 5 cajas por cada hongo fitopatógeno, además del respectivo testigo correspondiente a 5 cajas Petri con PDA.

6.3 Efecto de las cepas de *Bacillus* sp sobre la calidad de plántula

Para la obtención del inóculo, las cepas MA04, MA12 y MA17 se sembraron en 500 mL de caldo nutritivo durante 18 h a 30°C en agitación constante, para después centrifugar los cultivos a 8000 Xg durante 20 minutos con el objetivo de recuperar las células bacterianas, las cuales fueron lavadas en dos ocasiones con solución salina esteril al 0.8 % y disueltas en 2 mL de solución salina para ajustar la concentración celular a 10⁸ células mL⁻¹ (Márquez y col., 2003).

Enseguida se inocularon por inmersión 200 semillas de tomate var. ‘Gran Esmeralda’ en 10 mL de cada suspensión bacteriana en gama arábica al 10 %, como testigo fueron puestas en solución salina con goma arábica 200 semillas sin bacteria. Después, se agitaron durante 1 h a 140 rpm, seguido de la siembra en charolas de 200 cavidades llenadas con turba y vermiculita (2:1), humedecida a capacidad de campo, y puestas en oscuridad hasta el momento de la germinación (Figura 12); diez días después de la germinación las plántulas fueron fertilizadas con una solución nutritiva cuya composición en (g L⁻¹) se muestra en el cuadro 3:

Cuadro 3. Composición de solución nutritiva.

Nutriente	Concentración (g L ⁻¹)
KNO ₃	0.75
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.175
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.675
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O.	0.05

Adicionalmente se utilizó el fertilizante foliar ‘Bayfolan’ cada tercer día para corregir deficiencias, el cual contiene: (N) 11.470%, (P₂O₅) 8.000%, (K₂O) 6.000%,

(B) 0.036%, (Cu) 0.040%, (Fe) 0.050%, (Mo) 0.005%, (Zn) 0.080%, Clorhidrato de tiamina 0.004%, (S) 0.230%, (CaO) 0.025%, (Co) 0.002%, (Mn) 0.036%, (MgO) 0.025%, Acido indolacético 0.003%, aplicándose a razón de 5 (g L⁻¹).



Figura 12. Inoculación de semilla de tomate var. “Gran Esmeralda”.

Las plántulas de tomate se cultivaron por 30 días después de la siembra (dds); y al término del periodo se registraron las siguientes variables de crecimiento: altura, diámetro de tallo, peso fresco y seco del vástago y raíz, además de la relación entre altura y diámetro de tallo para indicar el vigor de la plántula. El diseño experimental fue en bloques completamente al azar tomando cinco grupos de 10 plantas por unidad experimental.

6.4 Evaluación de inoculantes en el cultivo del tomate de cáscara

6.4.1 Localización geográfica del proyecto.

El ensayo en campo se desarrolló en la localidad de San Nicolás municipio de Tequisquiapan Querétaro., localizado en: Longitud (dec): -99.931667 Latitud (dec): 20.470833. La localidad se encuentra a una mediana altura de 1900 metros sobre el nivel del mar (INEGI 2014), presenta un clima semiseco con temperaturas promedio anual de 17.6 °C, siendo los meses mas calurosos abril, mayo y junio. La precipitación anual promedio es de 485 mm con los meses más lluviosos en junio, julio y agosto; el periodo de heladas se reporta durante los meses de octubre, noviembre, diciembre, enero, febrero y marzo. Localizada en la Región hidrológica de Pánuco, cuenca del rio Moctezuma y subcuenca del rio San

Juan la cual comprende el 99.45 % de la; el 52.26 % de la superficie municipal es dedicado a la agricultura, los principales cultivos son maíz, frijol, sorgo y trigo (INEGI, 2016).

Análisis fisicoquímicos muestran suelos de textura franco con pH moderadamente alcalino, libres de carbonatos y sales. Moderadamente bajos en el contenido de fósforo y nitrógeno inorgánico, y contenido medio de materia orgánica (2.34 %). En cuanto a la disponibilidad de micronutrientes se encuentra muy bajo en hierro disponible, moderadamente bajo en zinc y muy pobre en boro.

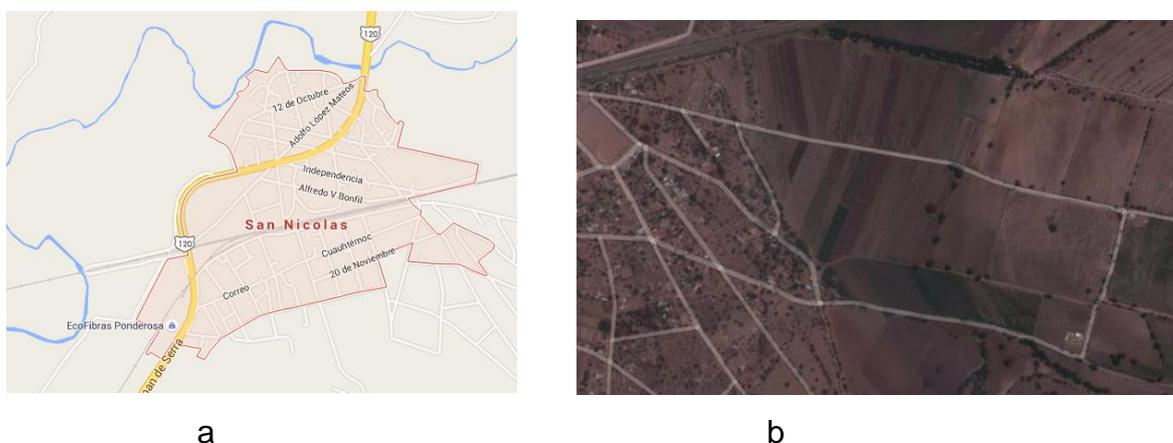


Figura 13. San Nicolás Tequisquiapan Qro., sitio del ensayo para el cultivo de tomate. a) Localización geográfica b) Vista satelital del ejido.

6.4.2 Descripción de la unidad experimental

La parcela experimental donde se llevo a cabo el ensayo fue de 10 100 m², la cual cuenta con sistema de riego por goteo y presenta una clase textural de suelo Franco Arcilloso en una parte del mismo, mientras que en otra presenta una textura de suelo Franco; es un suelo con pH moderadamente alcalino, libre de carbonatos, libre de sales, moderadamente bajo en fosforo con un suministro moderado de nitrógeno inorgánico y un porcentaje de materia orgánica de 2.34 % y 2.14 %, estos datos se muestran de una manera mas completa en la figura 14.

Propiedades Físicas del Suelo			
Clase Textural	Franco		
Punto de Saturación	47.0	%	Mod. Alto
Capacidad de Campo	25.1	%	Mod. Alto
Punto March. Perm.	14.9	%	Mod. Alto
Cond. Hidráulica	4.50	cm/hr	Mod. Alto
Dens. Aparente	1.03	g/cm ³	

Fertilidad del Suelo			
Det	Resultado	Unid	Clasificación
MO	2.34	%	Muy Alto
P-Bray	10.7	ppm	Bajo
K	386	ppm	Med. Alto
Ca	7064	ppm	Alto
Mg	466	ppm	Med. Alto
Na *	189	ppm	Mod. Alto
Fe	2.28	ppm	Bajo
Zn	1.05	ppm	Bajo
Mn	10.7	ppm	Med. Alto
Cu	0.96	ppm	Med. Alto
B	0.25	ppm	Bajo
S	14.2	ppm	Med. Alto
N-NO ₃	37.5	ppm	Med. Alto

Relacion Entre Cationes (Basadas en me/100g)				
Relación	Ca/K	Mg/K	Ca+Mg/K	Ca/Mg
Resultados	35.7	3.87	39.5	9.22
Interpretación	Muy Alto	Alto	Alto	Muy Alto

* Es deseable que estos elementos tengan un bajo contenido

pH del Suelo y Necesidades de Yeso, Cal y Lavado		
pH (1.2 agua)	7.47	Mod. alcalino
pH Buffer	ND	
Carbonatos Totales (%)	4.65	Bajo
Salinidad (CE Extracto)	1.00	Bajo
Requerimientos de Yeso	No Requiere	
Requerimientos de Cal	No Requiere	

Cationes Intercambiables							
Gráfico Basado en % de Saturación							
Muy Alto	86.3	9.36	2.42	2.00	ND	ND	—
Alto	35.3	3.83	0.99	0.82	ND	ND	40.9
Mod. Alto	Ca	Mg	K	Na*	Al*	H*	CIC
Medio							
Mod. Bajo							
Bajo							
Muy Bajo							

Propiedades Físicas del Suelo			
Clase Textural	Franco Arcilloso		
Punto de Saturación	53.0	%	Alto
Capacidad de Campo	28.3	%	Alto
Punto March. Perm.	16.8	%	Alto
Cond. Hidráulica	2.90	cm/hr	Mod. Bajo
Dens. Aparente	1.12	g/cm ³	

Fertilidad del Suelo			
Det	Resultado	Unid	Clasificación
MO	2.14	%	Med. Alto
P-Bray	17.7	ppm	Bajo
K	435	ppm	Med. Alto
Ca	5890	ppm	Alto
Mg	644	ppm	Med. Alto
Na *	155	ppm	Mod. Alto
Fe	8.51	ppm	Bajo
Zn	0.53	ppm	Bajo
Mn	28.7	ppm	Med. Alto
Cu	1.35	ppm	Med. Alto
B	0.32	ppm	Bajo
S	1.42	ppm	Bajo
N-NO ₃	35.2	ppm	Med. Alto

Relacion Entre Cationes (Basadas en me/100g)				
Relación	Ca/K	Mg/K	Ca+Mg/K	Ca/Mg
Resultados	26.5	4.77	31.3	5.55
Interpretación	Muy Alto	Muy Alto	Alto	Mediano

* Es deseable que estos elementos tengan un bajo contenido

pH del Suelo y Necesidades de Yeso, Cal y Lavado		
pH (1.2 agua)	7.22	Mod. alcalino
pH Buffer	ND	
Carbonatos Totales (%)	2.66	Bajo
Salinidad (CE Extracto)	0.68	Bajo
Requerimientos de Yeso	No Requiere	
Requerimientos de Cal	No Requiere	

Cationes Intercambiables							
Gráfico Basado en % de Saturación							
Muy Alto	80.5	14.5	3.04	1.84	ND	ND	—
Alto	29.4	5.30	1.11	0.67	ND	ND	36.5
Mod. Alto	Ca	Mg	K	Na*	Al*	H*	CIC
Medio							
Mod. Bajo							
Bajo							
Muy Bajo							

Figura 14. Análisis de la fertilidad del suelo de la parcela experimental.

En cuanto a la disponibilidad de micronutrientes: El suelo se encuentra muy bajo en hierro disponible, moderadamente bajo en zinc y muy pobre en boro. Todo

esto de acuerdo al análisis de suelo realizado a dos muestras que presentaban una coloración diferente en dos secciones de la unidad experimental.

6.4.3 Material Vegetal

Para la producción de plántula y el ensayo en campo se utilizaron semillas de tomate var. Gran Esmeralda de la casa semillera Harris-moran, cuyas plantas producen frutos grandes, uniformes esféricos de color verde intenso y consistente, con una alta vida de anaquel y con un buen potencial de rendimiento (Figura 15).



Gran Esmeralda Tomatillo



VENTAJAS:

- Buenos Tamaños
- Muy precoz
- Frutos de color verde intenso
- Planta de porte medio, semi abierta
- Cosecha semi-concentrada
- Frutos de muy buena vida de anaquel
- Alta producción

Gran Esmeralda	
Madurez Relativa	Planta
Precoz	Vigorosa, tallo grueso

SEMILLAS HARRIS MORAN MEXICANA S. A. DE C. V.
 Av. Miguel Negrete 1700-A, 21100 Mexicali, B. C. Tel/Fax: (666) 553-3422 URL: www.harrismoran.com/mexico



La información ofrecida es un promedio de los datos obtenidos en nuestros lugares de ensayos. El rendimiento puede variar dependiendo del ambiente y las condiciones de producción. Consulte la "Información de Harris Moran al Comprador" para conocer las responsabilidades y las limitaciones de garantía. Para obtener mayor información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web en: www.harrismoran.com/mexico.

Figura 15. Ficha técnica de la semilla de tomate var. "Gran Esmeralda".

6.4.4 Aislados de microorganismos antagonistas comerciales

Para los ensayos en campo se utilizaron los productos biológicos: Bactiva y Rhizobac combi, cuya formulación se muestra en las fichas técnicas de las figuras 16 y 17.

6.4.4.1 Rhizobac



DOSIFICACIÓN

Su aplicación debe de iniciarse desde plántulas en invernadero.

Primera aplicación: mezclar Rhizobac Combi con el sustrato en proporción de 1 g/L para humedecer el sustrato.

Segunda aplicación: hacerla por inmersión de las charolas con plántulas en una superficie de 1 g/L de agua, justo antes del trasplante.

En Campo: aplicar en el sistema de riego con frecuencia quincenal y dosis de 1 Kg/ha por aplicación hasta el inicio de la cosecha.

En cultivos de variedades indeterminadas o bajo invernadero, continuar las aplicaciones hasta mediados del periodo de cosecha

INCOMPATIBILIDAD

No aplicar Rhizobac Combi antes ó después de 72 Hrs de la aplicación programada de bactericidas, cobres ó con soluciones de fertilizantes cuya conductividad eléctrica sea mayor a 5 dS/m.

ESPECIFICACIONES

*Pseudomonas fluorescens; Bacillus cereus var. mycoides;
B. megaterium y B. subtilis*

1 X 10⁹ UFC/g

Carbono Orgánico Oxidable Total*

% p/p
21.0

* Provenientes del proceso patentado ECCA Carboxy® con certificación orgánica.

REGISTRO COFEPRIS: **EN TRÁMITE**

Figura 16. Ficha técnica producto Rhizobac combi.

6.4.4.2 Bactiva



Bactiva[™]

Bacterias benéficas y biofungicida (*Trichoderma*)

Ficha técnica

Av. Tecnológico 709
Col. Cd. Industrial
C.P. 38010 Celaya, Gto., México
Tel/ Fax:01-800-4008432
www.bactiva.com
info@bactiva.com

Bacterias benéficas que estimulan el crecimiento del sistema radicular y fertilizan de manera biológica; así como *Trichoderma* que controla hongos patógenos como *Pythium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Verticillium*

Bactiva[™] es un **biofungicida** seco y soluble que previene la pudrición de las raíces por hongos patógenos. El producto contiene *Bacillus polymyxa* altamente antagonico a *Fusarium*, *Bacillus subtilis* y varias especies del hongo benéfico *Trichoderma*; éstos compiten con hongos patógenos por el espacio y nutrientes en la rizósfera, los parasitan y previenen su crecimiento al producir y liberar toxinas. **Bactiva[™]** es un **bioenraizador**, es decir, un estimulante del crecimiento del sistema radicular por bacterias productoras de hormonas de crecimiento (giberelinas, citoquininas), como son *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas fluorescens*. Las bacterias y el *Trichoderma* estimulan el crecimiento del sistema radicular durante todo el ciclo de cultivo y son indispensables durante la germinación de plántulas o en la recuperación de raíces dañadas. **Bactiva[™]** es un **biofertilizante** microbiano por sus bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fósforo. Las bacterias fijan o liberan elementos que están presentes en el suelo pero que las plantas no pueden aprovechar. Los microorganismos están suplementados por bioestimulantes que promueven su actividad biológica, aumentando la propagación de células y yemas laterales además de retrasar el envejecimiento de los tejidos vegetales.

	Mejora	Reduce
Beneficios:	Masa radicular • floración y color de las flores • supervivencia de trasplantes • disponibilidad de nutrientes • absorción de agua y nutrientes • rendimiento en condiciones de estrés • respiración y fotosíntesis • división celular • desarrollo de yemas laterales	Pérdida de plantas • uso de fertilizantes y fungicidas químicos • previene: <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Verticillium</i>
Compatibilidad:	Fertilizantes: El producto es compatible con fertilizantes. Fungicidas: Los siguientes fungicidas son compatibles pero no los mezcle en el mismo tanque: Carboxin, Thiram, Thiabendazol, Mancozeb, Metalaxil, Procymidone y Propamocarb clorhidrato. Bactericidas no compatibles: Evite el uso de bactericidas y otros fungicidas por 2-3 semanas antes y después de la aplicación.	
Cultivos:	Bactiva[™] esta recomendado para su aplicación en los siguientes cultivos: Jitomate, chile, pimiento, brócoli, lechuga, curcúbitaceas y árboles frutales.	
Dosificación y aplicación:	Hortalizas: Diluya Bactiva[™] en agua. Aplique con bombas de aspersión o por el sistema de riego. Charolas: Asperje 1g/charola a los 5 días de siembra, bajando el producto a la zona de las raíces con un riego ligero. En campo: Aplique un total de 0.5-1.5kg/Ha en pequeñas cantidades a intervalos de 2-3 semanas. Granos: Aplique un total de 500g/Ha al momento de la siembra. Vivero forestal (charola, contenedor o almácigo): Aplique 1kg/70,000 plantas al mes, durante los primeros 3 meses. Después aplique la misma cantidad en intervalos de 2 meses. Pastos: Aplique de 0.5-1.5kg/Ha durante el año a intervalos de 2-3 meses en dosis de 250g. Caña de azúcar: Aplique 500g al momento de la siembra. Ornamentales: Aplique 50g por cada 1,000m ² . Aplique cuando la radiación ultravioleta del sol no dañe los organismos benéficos. Bactiva[™] es un biofungicida preventivo que controla la pudrición de raíces (sustituye los fungicidas químicos). Puede resultar necesario rotar las aplicaciones con fungicidas químicos compatibles.	
Almacén:	<ul style="list-style-type: none"> Mantenga el producto en un lugar fresco y seco No lo exponga a temperaturas elevadas ni a la luz directa del sol El producto tiene una vida máxima de anaquel de 18 meses 	
Ingredientes:	Bacterias benéficas: Antagonistas a hongos patógenos de la raíz, fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de hormonas de crecimiento vegetal Hongos benéficos: Antagonistas a hongos patógenos de la raíz Vitaminas promotoras del crecimiento Aminoácidos Extracto soluble de yuca Extracto soluble de alga marina Ácidos fúlvicos	100 millones UFC/g (10 ⁸ UFC/g) UFC = Unidades Formadoras de Colonias <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>T. reesei</i> , <i>T. viride</i> , <i>Gladiadium virens</i> : 100 millones UFC/g (10 ⁸ UFC/g) Biotina, ácido fólico, B, B2, B3, B6, B7, B12, C y K Proteína vegetal <i>Yucca schidigera</i> <i>Ascochylium nodosum</i> Derivados de leonardita

Figura 17. Ficha técnica producto Bactiva.

6.4.5 Cultivo

6.4.5.1 Preparación de terreno

Se realizó un barbecho con un arado de 3 discos, seguido de un rastreo para remover el suelo, triturar los terrones, cortar e incorporar en el terreno los residuos vegetales, airear y esponjar el terreno. Posteriormente, se hicieron surcos a 1.4 m de distancia a lo largo de la parcela agrícola. Para finalizar la preparación del terreno se procedió a utilizar una fertilización base con la formulación 50-30-30 (NPK) kg por hectárea.



Figura 18. Preparación de terreno.

6.4.5.2 Diseño experimental

El diseño experimental en campo fue de bloques al azar con cuatro tratamientos, cada uno con tres repeticiones, tomando como unidad experimental 20 plantas (Figura 20) de un surco aleatorio a una distancia entre plantas de 20 y 25 cm (Figura 19).

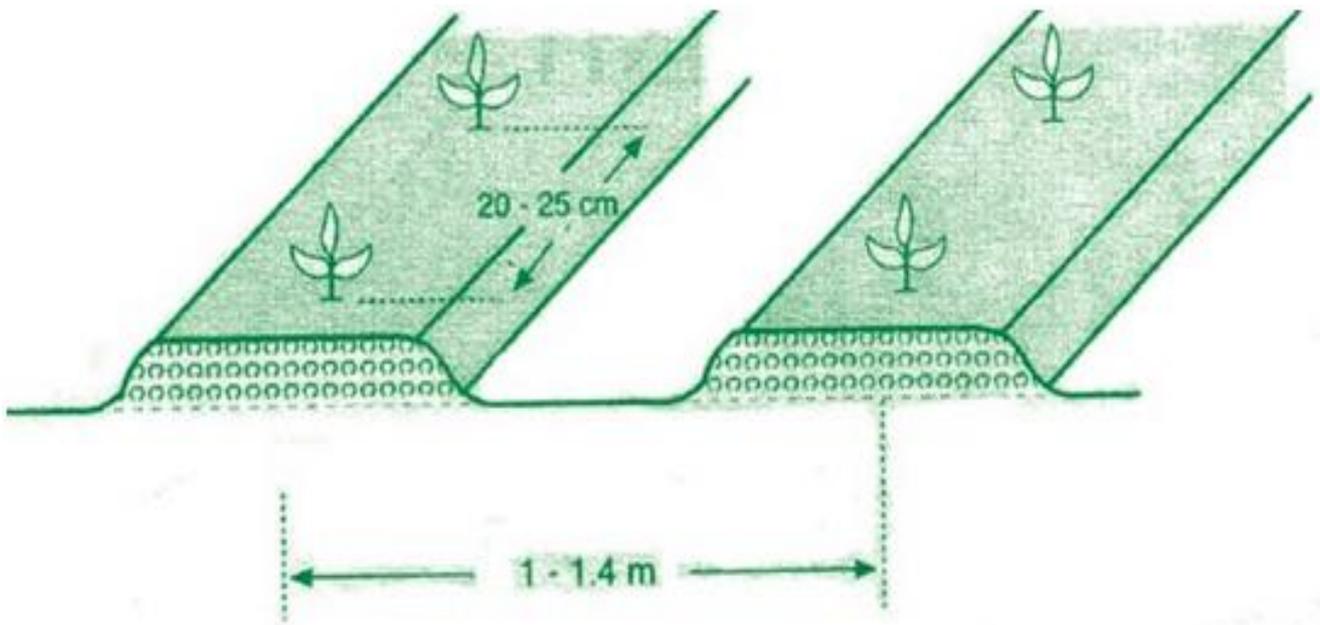


Figura 19. Distribución espacial de plantas en surcos.

Cuadro 4. Tratamientos de aplicaciones para el control de secadera en tomate.

Clave	Tratamiento
T1	Rhizobac combi
T2	Cepa M4
T3	<i>Bactiva</i>
T4	Manejo convencional

Contabilizándose un total de 80 plantas arregladas de la siguiente manera por triplicado.

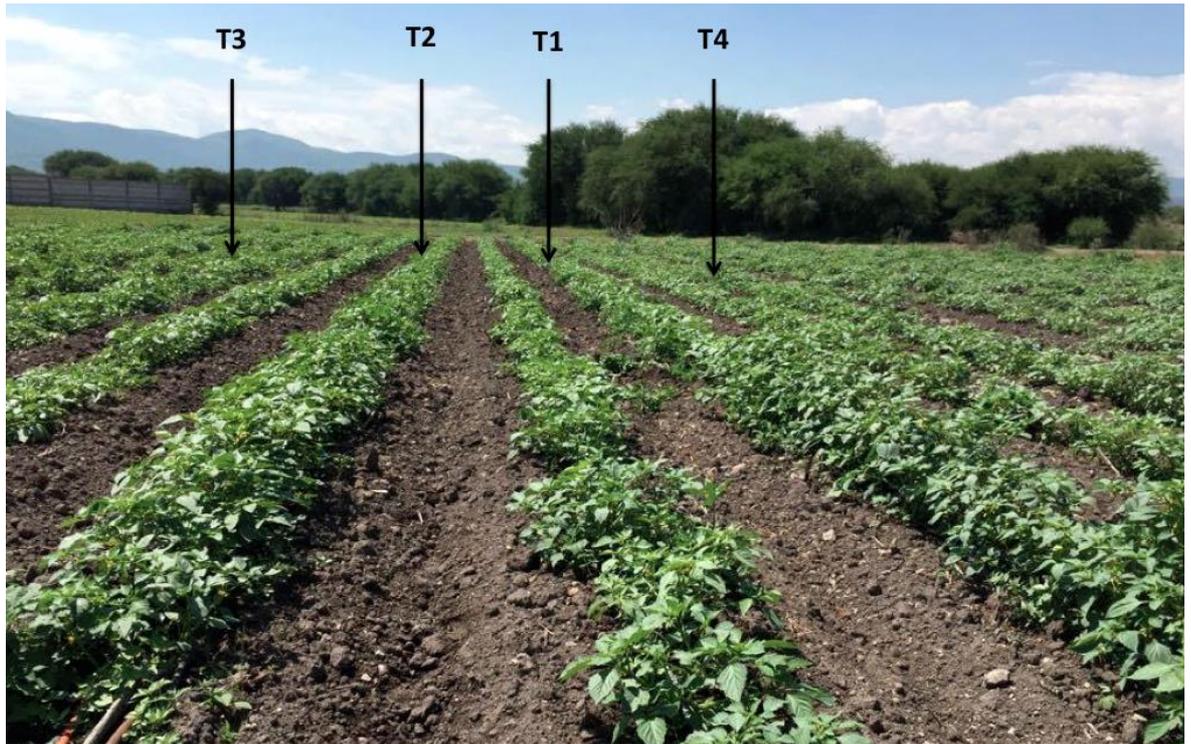


Figura 20. Diseño experimental en campo.

La unidad experimental estuvo constituida por 20 plantas en triplicado, teniendo 3 tratatamiento (Inoculación con MA04, Bactiva y Rhizobac) y el testigo sin inocular. Se evaluaron en el primer corte, 20 plantas por tratamiento por triplicado, para el segundo corte se evaluaron frutos por tratamiento por triplicado, mientras que para las pruebas en calidad se evaluaron para cinco frutos por tratamiento y para las coordenadas de color 10 frutos por tratamiento.

6.4.5.3 Plantación

Las plántulas maquinadas en almacigo se plantaron entre 20 y 25 cm de distancia para una densidad de plantación aproximado de 18,000 plantas por hectárea.



Figura 21. Plantación de tomate de cáscara var. “Gran Esmeralda”.

6.4.5.2.3 Escarda

Se realizaron escardas manuales y mecánicas, con cultivadora, a los 10 y 30 días después del trasplante, esto para aflojar la tierra y permitir un mejor desarrollo radicular.



Figura 22. Labores culturales: Escarda mecánica del cultivo.

6.4.5.2.4 Fertilización

La fertilización se realizó por medio del sistema de riego o de manera manual a diferentes días después del trasplante.

- 70-30-30 a los 15 ddt.
- 00-40-20 a los 30 ddt.
- 35-00-85 a los 60 ddt.

Utilizando sulfato de amonio, fosfato monoamonico y sulfato de potasio como fertilizantes y corrigiendo las deficiencias con fertilizante foliar.



Figura 23. Labores culturales: Fertilización en banda (A) Fertirriego (B).

6.4.5.2.5 Control de plagas y enfermedades

Durante el cultivo se presentaron diferentes plagas como gusano soldado, gusano del fruto, gusano trozador, diabrotica, trips, barrenador del tomate y pulgones. Para ello se utilizaron, *Bacillus thuringensis* como agente de control biológico y el plaguicida clorantranipol considerado como ligeramente tóxico.

Las aplicaciones preventivas se hicieron a los 15, 45 y de los 60 a los 75 días después de trasplante dependiendo de las poblaciones de insectos. Para el control de enfermedades fúngicas se usaron los microorganismos y fungicidas dados por los tratamientos preestablecidos.



A



B



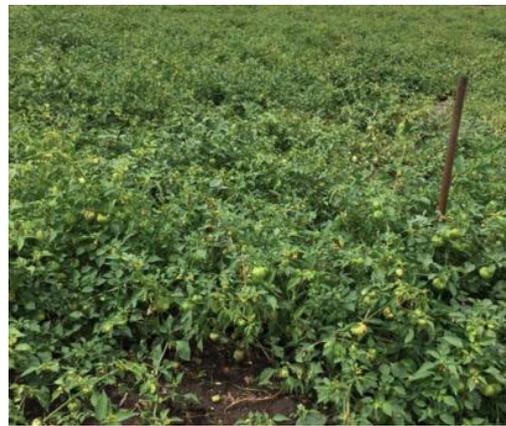
C



D



E



F

Figura 24. Manejo de plagas durante cultivo de tomate. *Diabrotica sp* (A) *Trichobaris mucorea* (B), Enfermedades, marchitez (C) Aplicación por aspersión de plaguicidas (D), Aplicación de tratamientos en drench (E), Límites de tratamientos (F).

6.4.5.3 Cosecha y variables evaluadas

Al inicio de la cosecha se tomaron muestras aleatorias en el primer y segundo corte de los frutos los días 5 y 20 de junio de 2015, respectivamente, evaluando las variables agronómicas de calidad en los tratamientos así como del testigo.

Diámetro ecuatorial y peso del fruto

Esta determinación se realizó midiendo el diámetro ecuatorial de los frutos provenientes de cada uno de los tratamientos utilizando de un vernier digital. Para el peso se registró el peso individual de cada fruto con una balanza digital.

Color

El color del fruto se determinó por medio de las coordenadas “L”, “a” y “b” con ayuda de un colorímetro HunterLab con iluminante A, en 3 puntos equidistantes del fruto en la zona ecuatorial, además de la toma de datos en 2 puntos de la cáscara. Se utilizaron diez frutos por cada tratamiento, reportando el promedio de las lecturas (Hernández-Fuentes y col., 2010). La coordenada “L” representa la diferencia entre la luminosidad (“L”=100) y la oscuridad (“L”=0), “a” representa la diferencia entre el verde (“-a”) y el rojo (“+a”), y “b” representa la diferencia entre el amarillo (“+b”) y el azul (“-b”) (Figura 27) (Francis, 1980).

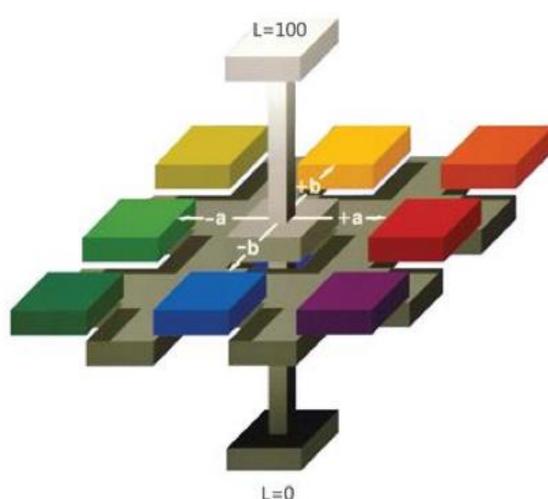


Figura 25. Espacio de color Hunter lab.

Solidos solubles totales (SST)

El contenido de SST del fruto del tomate de cáscara se determinó mediante el uso de un refractómetro digital marca ATAGO, realizando la lectura en forma directa como se describe en el método de la AOAC, (1994).

pH

Para la determinación del pH, se pesaron 10 g de muestra fresca a la que se añadieron 100 mL de agua destilada, homogenizando la mezcla con un procesador de alimentos, después se filtró y se realizó la lectura del pH, en un potenciómetro calibrado previamente con soluciones amortiguadoras de pH 7.0 y 4.0. Este procedimiento se realizó para cinco frutos y por triplicado (AOAC, 1994).

Acidez total titulable

La acidez titulable se determinó empleando el siguiente procedimiento: se homogenizaron 10 g del fruto en 100 mL de agua destilada, de ahí se tomó una alícuota de 5 mL y se agregaron 45 mL de agua destilada, se agitó durante 5 minutos. A continuación se realizó una titulación con hidróxido de sodio 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.2. Los resultados se expresaron como % de ácido cítrico/100 g de fruto fresco de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de Ácido cítrico} = \frac{(\text{Vol de NaOH}) * N(\text{NaOH}) * (\text{Factor de meq de ácido cítrico})}{\text{mL de muestra}} * 100$$

Dónde:

Vol de NaOH = cantidad de mL de NaOH gastados en la titulación.

N = Normalidad de NaOH empleada.

Factor de meq. = 0.064 (ácido cítrico).

mL de muestra = cantidad de muestra empleada en mL.

Para la determinación se emplearon cinco frutos y por triplicado (AOAC, 1994).

Ácido ascórbico

Para la determinación de ácido ascórbico, se homogeneizaron 25 g del fruto con 50 mL de una solución extractora que contiene por litro 30 g de ácido metafosfórico y 80 mL de ácido acético. La mezcla fue filtrada en un matraz aforado de 100 mL y lavada con solución extractora para llevar a aforo. Después, se tomó una alícuota de 5 mL y se tituló con una solución de 2-6 diclorolindofenol preparada con 0.25 gr de 2-6 diclorolindofenol y 0.21 gr de bicarbonato de sodio para 1L de agua destilada, el cual se valoró con 1 mL de ácido ascórbico, utilizando como blanco la solución extractora. La titulación se realizó por triplicado reconociendo el viré cuando la solución cambió a color rosa (AOAC, 1994). Los resultados se expresaron en mg/mL equivalentes de ácido ascórbico.

6.5 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron sujetos a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) (Castaño y Domínguez, 2010) con el paquete estadístico JMP 9.

7. Resultados y Discusión

7.1 Aislamiento de patógenos en suelo y pruebas de patogenicidad

Fusarium sp.

Se obtuvieron diversas cepas de hongos fitopatógenos (2×10^3 unidades formadoras de colonias / gramo de suelo) resultado de la siembra de diluciones de suelo en medio PPA, de las cuales se resembraron en medio CLA los aislados que presentaban un mayor número de colonias, tamaño y coloraciones diferentes, observando el crecimiento de dos aislados de en este medio selectivo (Figura 26).

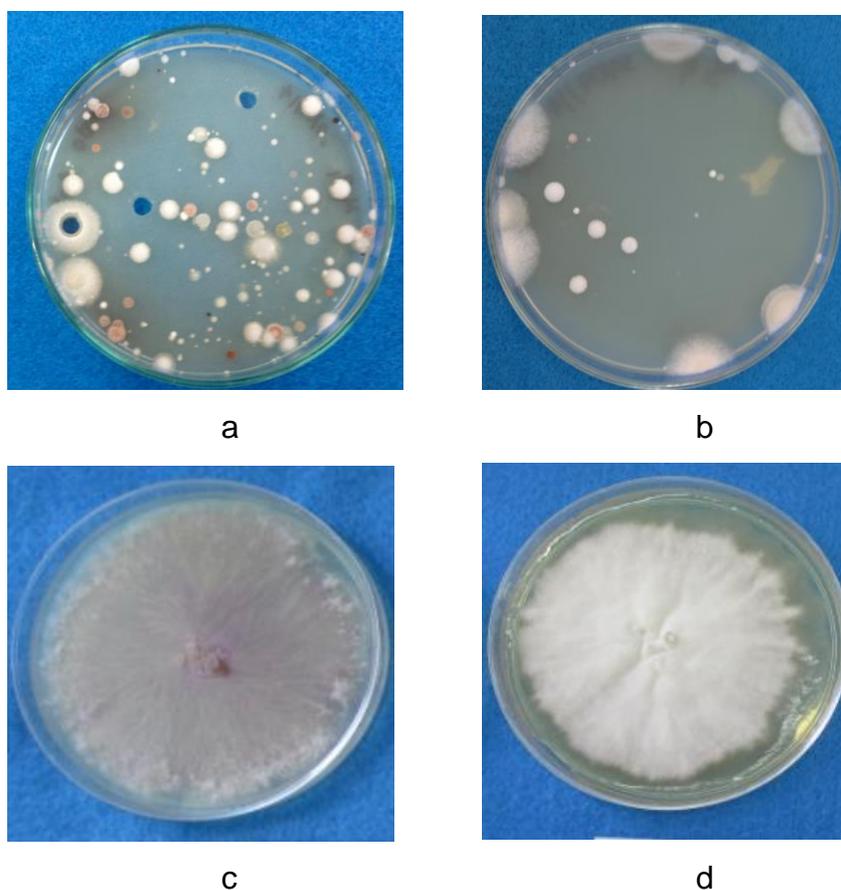


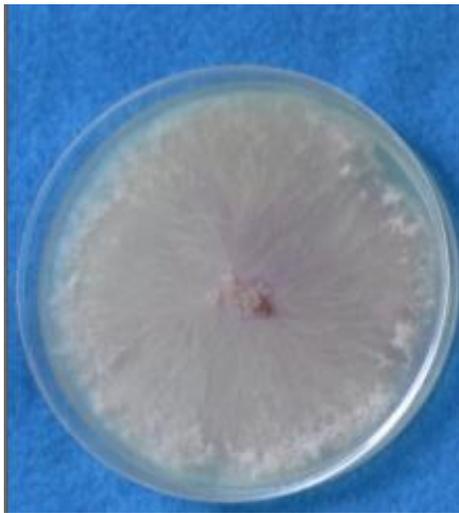
Figura 26. Cultivo de poblaciones fúngicas de suelo y aislamiento de *Fusarium* sp. (a) Diversidad de poblaciones fúngicas creciendo en el medio PPA; (b) Resiembra de poblaciones fúngicas con mayor frecuencia y tamaño; (c, d) Colonias purificadas de *Fusarium* sp.

La colonia presentó un micelio aéreo abundante y algodonoso. Al costado de la caja Petri la colonia es blanca, con centro de color violeta para una cepa y

blanca para otra, su reverso es violeta con tonos blancos.



a



b



c

Figura 27. Crecimiento micelial en placa de aislados de *Fusarium* sp. (a), cepa 1 de *Fusarium* sp. medio CLA (b), cepa 2 de de *Fusarium* sp. medio CLA (c).

En los microcultivos realizados, estos aislados presentaron microconidios abundantes, hialinos, ovalados, elípticos; con uno o dos septos, además de poseer hifas septadas, los conidióforos localizados en el extremo de la hifa están ramificados variablemente (Figura 28, c), presentando clamidosporas debido probablemente a alguna modificación de la hifa (Figura 28, a) estos aislados presentaron pérdida de esporodocios formados por conidióforos ramificados, mientras que se identificaron macroconidios (Figura 28, b) ligeramente curvados en las puntas generalmente con forma de canoa de acuerdo a las claves de Barnett y Hunter (1998).

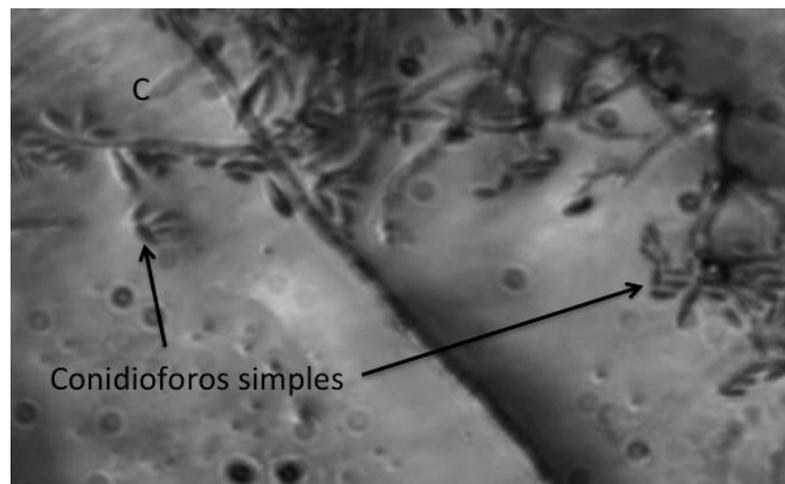
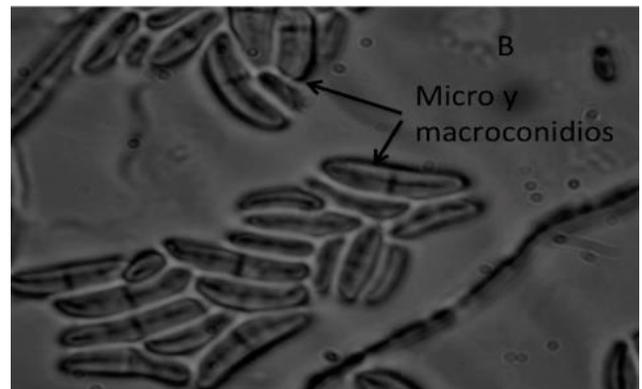
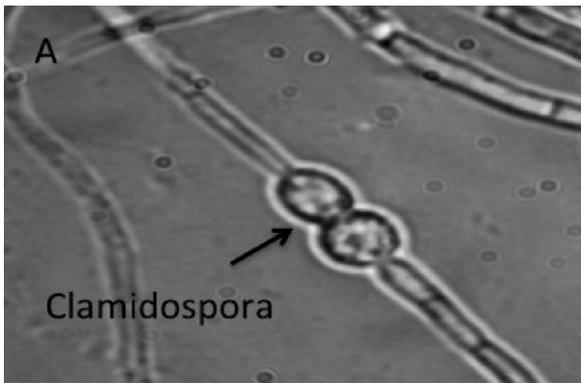


Figura 28. Características morfológicas de *Fusarium* sp. Formación de clamidosporas (a), Micro y macroconidios (b), Conidioforos simples (c).

Pythium sp.

De los aislados obtenidos del medio de jugo V8 selectivo para *Pythium*, se obtuvieron colonias con un desarrollo aéreo (Figura 29) menos abundante que las cepas de *Fusarium* sp., debido a la acción del colorante rosa de bengala.

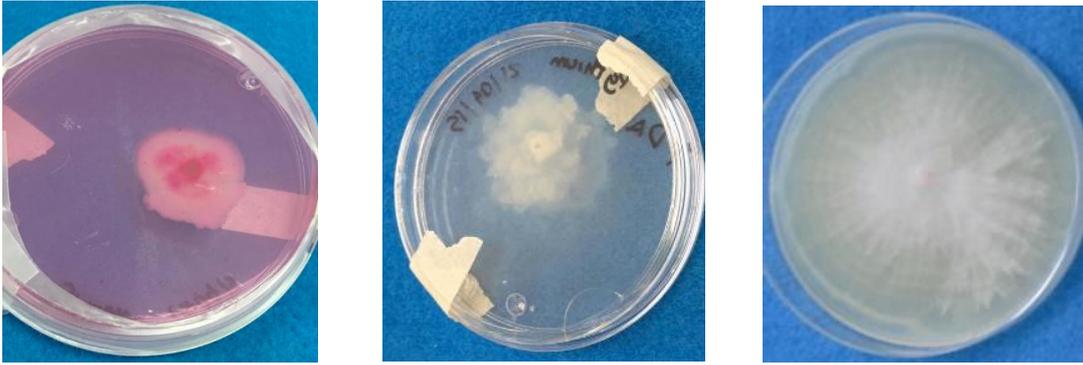


Figura 29. Crecimiento micelial en caja Petri de aislado de *Pythium* sp.

En los microcultivos, se distinguieron estructuras reproductivas tales como anteridios, germinación de esporangios con tubo germinativo, además de esporangios intercalares, (Figura 30, a) y oosporas individuales cilíndricas (Figura 30, b), sin encontrarse zoosporas. Características similares reportadas para el genero *Pythium* sp. (Bernard, 2003; Lévesque y De Cook, 2004)

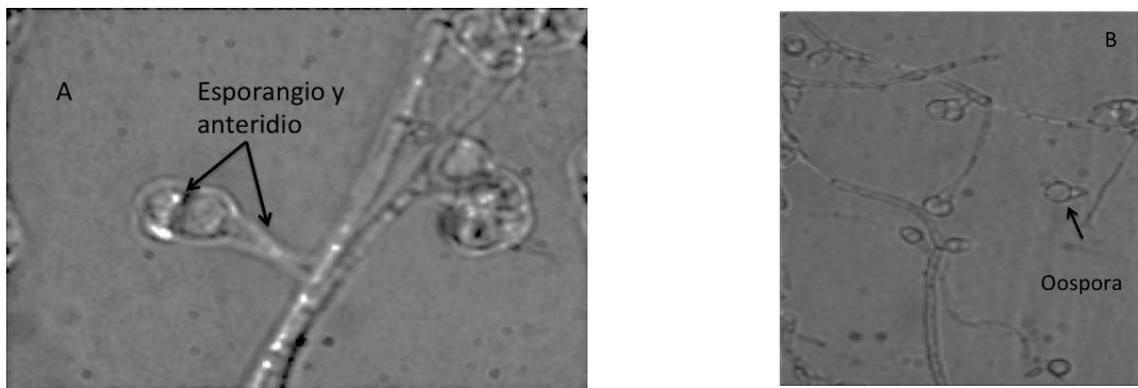


Figura 30. Características morfológicas de *Pythium* sp., Unión de esporangio y anteridio (A) Formación de oosporas (B).

7.1.2 Pruebas de patogenicidad

Los resultados de las pruebas de patogenicidad se obtuvieron al tercer día después de la inoculación de las plántulas con los aislados de *Fusarium* sp. F1 y F2 mostrando un porcentaje de infección y mortandad de entre 66 % y 89 %, mientras que para el aislado de *Phytium* sp. P1 fue de un 100 % P1; contabilizando en tres grupos de tres plantas cada uno las plantas sobrevivientes y las completamente marchitas y por consiguiente muertas, obteniendo los siguientes resultados (Cuadro 5)

Cuadro 5. Análisis de sobrevivencia a plántulas inoculadas con patógenos.

Inoculación	Sobrevivencia (%)
P1	0.00 ± 0.00 c
F1	11.00 ± 0.33 bc
F2	33.33 ± 0.00 b
T	88.66 ± 0.66 a

Medias (n = 3 plantas) ± Error estándar de la media por tratamiento, con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Estos resultados demuestran un alto grado de infección de los aislados de hongos fitopatógenos respecto a plántulas de tomate de cáscara; para *Fusarium* sp. Osada y col. (2004) demostraron la susceptibilidad de las solanáceas a la infección con cepas de *Fusarium oxysporum*; cuyo mecanismo de colonización de los haces vasculares tiene que ver con la capacidad de penetración de cepas (Gao y col., 1995), mientras que Olivain y Alabouvette (1999) reportaron que el nivel de resistencia de las plantas de tomate se localizó en la hipodermis y corteza, pero al momento de la penetración por parte de las cepas patogénicas de *Fusarium* sp. se produjo una infección importante observándose una coloración marrón en cortes transversales de tallo, el amarillamiento de las plántulas y consiguiente muerte de células apicales en plantas de tomate, características

reportadas por Agrios (1998) (Figura 31 a). Estos patógenos, son denominados necrotróficos, por su capacidad de producir la muerte de las células hospedantes obteniendo los nutrientes a partir del tejido muerto de la planta, utilizando toxinas que degradan el tejido de la planta y facilitar la invasión (Madriz, 2002).



a



b

Figura 31. Infección de plántula de tomate por *Fusarium* sp. (a) y *Pythium* sp. (b).

En el caso de *Pythium* sp. se observó un 100 % de infección y posterior muerte de las plántulas, incluso cuando se ha reportado que esta patogenicidad es variable entre especies y no todas las cepas de *Pythium* sp. son patógenas (Grialba y col., 2015). Las plántulas infectadas presentaron ablandamiento de tallo (Figura 31 b) y posterior muerte, signos similares reportados en infecciones de plántulas de tomate reportado por Gonzales y col. (2013), estos resultados positivos en la prueba de patogenicidad también pudieron verse afectados debido a la alta humedad en sustrato, aunado a la alta temperatura durante la inoculación y los días posteriores (28 - 30°C) variables tomadas en cuenta en trabajos como los de Sinobas y Rodriguez (1999) para la patogenicidad de diversas especies de *Pythium* sp. sobre plantas susceptibles al patógeno, entre ellas jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

7.2 Pruebas *in vitro* de antagonismo de *Bacillus sp.* contra aislados de *Pythium sp.* y *Fusarium sp.*

En el ensayo de inhibición en placa empleando el sobrenadante de *Bacillus sp.* en contra de aislados de hongos fitopatógenos, se midieron diariamente el diámetro del crecimiento micelial por quintuplicado hasta el completo crecimiento del micelio de las cepas de *Pythium sp.* y *Fusarium sp.* sobre las cajas Petri utilizadas como testigo, el cual sucedió a los nueve días después de la inoculación. Los resultados se presentan a continuación (Figura 32, 33,34).

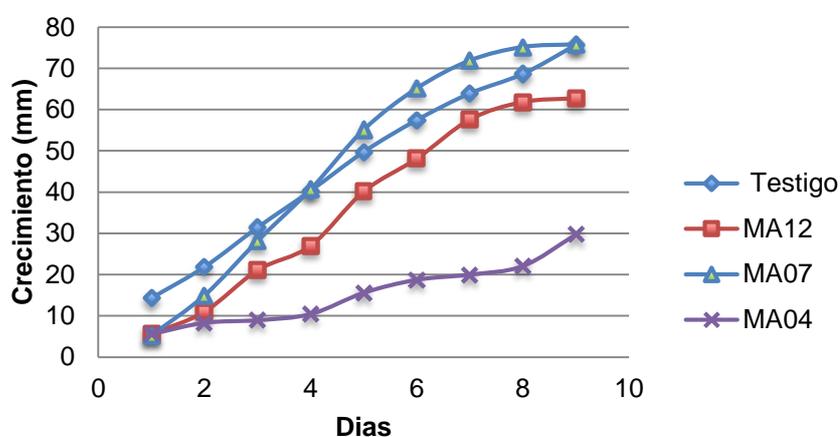


Figura 32. Cinética del crecimiento de *Fusarium sp.* F1 en placas de PDA con sobrenadante de *Bacillus sp.*

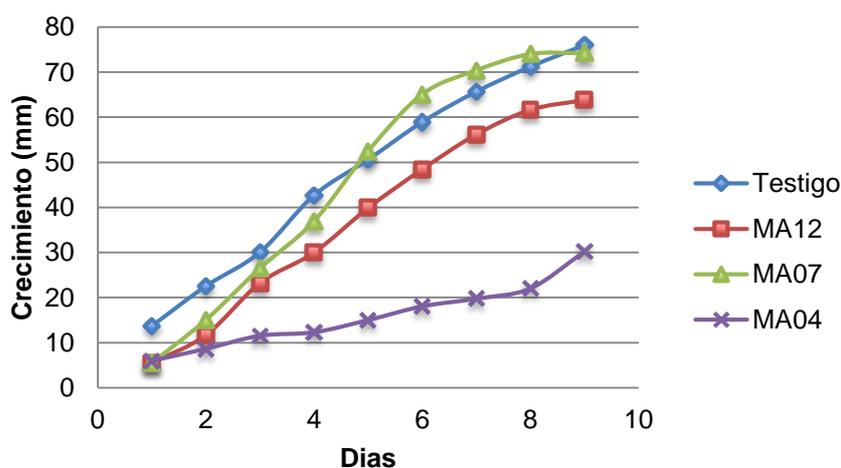


Figura 33. Cinética del crecimiento de *Fusarium sp.* F2 en placas de PDA con sobrenadante de *Bacillus sp.*

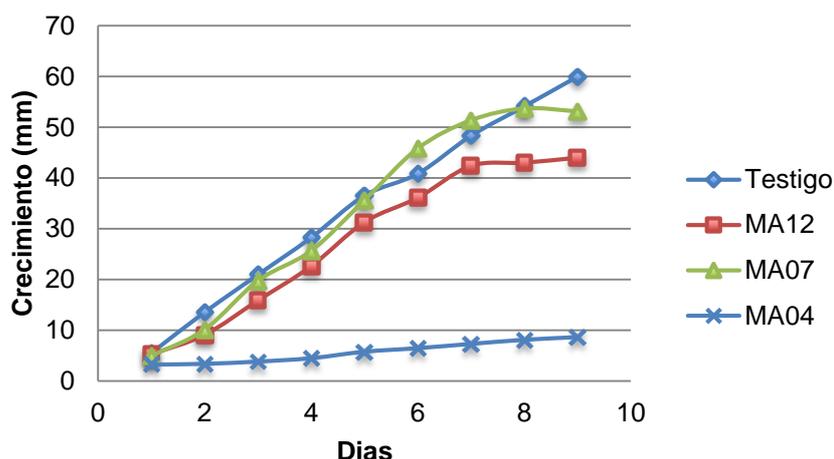


Figura 34. Cinética del crecimiento de *Pythium* sp. P1 en placas de PDA con sobrenadante de *Bacillus* sp.

Se observaron diferencias en la inhibición de crecimiento de las cepas de *Fusarium* sp. y en la de *Pythium* sp. por parte de la cepa bacteriana MA04 respecto a las cepas MA12, MA07 del orden del 66.88 % para la cepa de *Fusarium* sp. F1, 65.51 % para la cepa de *Fusarium* sp. F2 y de un 78.45 % para la cepa de *Pythium* sp. P1 (Cuadro 6) (Figura 35).

Cuadro 6. Pruebas de antagonismo microbiano del sobrenadante libre de células.

Tratamiento	<i>Fusarium</i> sp F1	<i>Fusarium</i> sp F2	<i>Pythium</i> sp P1
MA12	27.67(± 3.72) b	27.05 (± 3.39) b	18.64 (± 1.68) b
MA07	6.40 (± 5.19) b	10.52 (± 4.61) b	5.35 (± 2.09) b
MA04	66.88 (± 1.21) a	65.51 (± 1.38) a	78.45 (± 3.68) a

Medias (n = 5 cajas) ± Error estándar de la media por tratamiento, con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Los valores representan el porcentaje de inhibición con respecto al control.

Estos resultados son mayores a los obtenidos por Yezli y col. (2015) donde reportaron inhibiciones para *Fusarium oxysporum* de filtrados celulares de *B.*

subtilis del orden del 31 %, incubados por siete días, mientras que Abdallah y col. (2015) obtuvieron inhibiciones sobre *Fusarium oxysporum* del 59.5 % a los cinco y 39.8 % a los siete días de crecimiento micelial. Por otro lado para *Pythium* sp., diversos investigadores han reportado inhibiciones de crecimiento micelial por parte de distintas cepas *B. subtilis* del orden del 47 % al 82.2 % (Sarti y Miyazaki, 2013; Saad, 2015; El-Mohamedy, 2012).

Estas inhibiciones utilizando sobrenadantes libres de células de *Bacillus* ha sido reportado para diversos fitopatógenos como *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* (Guillen y col. 2006). Se ha atribuido a la producción de diversos metabolitos secundarios, entre los cuales destacan: antibióticos, compuestos volátiles orgánicos y enzimas líticas que actúan como compuestos con actividad antifúngica, antibacteriana e incluso nematocida, los cuales reducen la capacidad de crecimiento de patógenos (Pal y McSpadden, 2006; Leelasuphakul y col. 2008; Abdulkareem y col., 2014). Algunos de estos compuestos reportados para *B. subtilis* como inhibidores de crecimiento bacteriano y compuestos antifúngicos son bacisubina (Liu y col 2007), bacillomicina D y fengicina (Ramarathnam y col. 2007) iturina A (Ongena y Jaques., 2008). Recientemente Tan y col. (2013) identificaron un nuevo péptido con actividad antibiótica probada para *Fusarium oxysporum f.sp.cubense*, *Corynespora cassiicola*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Aspergillus niger* obtenida de una cepa de *B. subtilis* denominada B25. En 2016 Jiang y col. identificaron una nueva surfactina derivada de una modificación de una cepa de *Bacillus subtilis* PB2-L1, la cual fue probada en el control de *Fusarium moniliforme* dañando las células y estimulando la apoptosis celular del patógeno.

Los resultados del presente trabajo demuestran la efectividad del sobrenadante libre de células de cepas de *Bacillus* sp. para la inhibición de crecimiento de microorganismos fitopatógenos, esto significa que no es necesaria la presencia de células activas metabólicamente, además estos compuestos presentan una alta tolerancia a temperaturas extremas. Sin embargo existen excepciones de este antagonismo para cepas específicas de *Bacillus* sp. (Baysal y col 2013; Darma y col., 2016) tal y como lo demuestran los resultados de este

trabajo, donde las cepas de *Bacillus* sp. MA07 y MA12 no presentaron inhibición al crecimiento radial de organismos patógenos en sobrenadante bacteriano libre de células, en este sentido, para promover la producción de dichos metabolitos secundarios Alamri (2014) demostró que se mejoran los rendimientos de diversas enzimas encargadas del antagonismo microbiano cuando se adiciona quitina coloidal al medio de cultivo donde crecen las cepas de *B. subtilis*. Además se puede sugerir que, si existe un efecto de antagonismo de estas cepas se requiere la presencia de las células vivas, ya que en algunos casos de antagonismo los mecanismos de defensa se activan cuando los microorganismos entran en contacto (Darma, 2016)

Fusarium sp F1

a)



Testigo

MA12

MA07

MA04

b)

Fusarium sp F2



Testigo

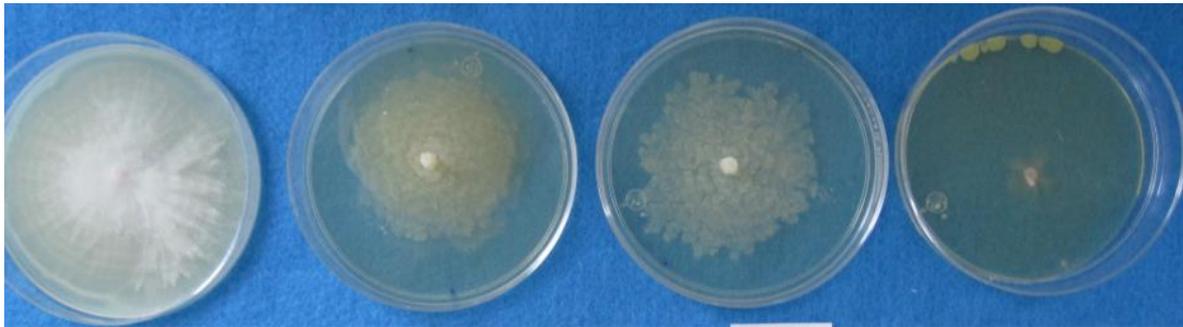
MA12

MA07

MA04

c)

Phytium sp P1



Testigo

MA12

MA07

MA04

Figura 35. Ensayos de antagonismo microbiano empleando sobrenadantes de cepas de *Bacillus*. a) Crecimiento de *Fusarium* sp. F1 en sobrenadante bacteriano de distintas cepas de *Bacillus* sp. b) Crecimiento de *Fusarium* sp. F2 en sobrenadante bacteriano de distintas cepas de *Bacillus* sp. c) Crecimiento de *Pythium* sp. P1 en sobrenadante bacteriano de distintas cepas de *Bacillus* sp.

De esta manera se demuestra la actividad del sobrenadante libre de células de la cepa MA04 para inhibir el crecimiento de aislados patógenos con las cuales fue probada *in vitro*.

7.3 Efecto promotor del crecimiento de plantas de *Bacillus* sp.

Después de 30 días de iniciada la germinación se cosecharon las plántulas inoculadas con las cepas *Bacillus* (Figura 36), para medir las variables de crecimiento: altura, diámetro de tallo, peso fresco y seco del vástago, longitud de raíz e índice de vigor, tanto de los tratamientos así como del testigo sin inocular, registrando los datos en 5 grupos de 10 plantas cada uno por tratamiento con los resultados que aparecen en el cuadro 8.



a



b

Figura 36. Plántulas de tomate inoculadas con cepas de *Bacillus* sp. reportadas como promotoras del crecimiento vegetal. (a) Tratamientos; (b) Efecto de la inoculación en plántulas.

Cuadro 7. Efecto de la inoculación en plántula de Tomate (*Physalis ixocarpa*) sobre variables de crecimiento.

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Diámetro de tallo (cm)	Peso fresco (gr)	Peso seco (gr)	Longitud de raíz (cm)	Índice de vigor
MA04	9.09 (± 0.21) a	0.25 (± 0.05) a	17.88 (± 0.30) a	1.53 (± 0.41) a	6.27 (± 0.03) a	2.25 (± 0.08) a
MA12	8.98 (± 0.18) a	0.22 (± 0.06) b	15.98 (± 0.25) a	1.41 (± 0.38) a	6.44 (± 0.04) a	1.97 (± 0.07) b
MA17	9.05 (± 0.18) a	0.22 (± 0.05) b	17.01 (± 0.20) a	1.51 (± 0.89) a	6.73 (± 0.05) a	2.03 (± 0.06) b
Testigo	6.24 (± 0.12) b	0.22 (± 0.04) b	11.59 (± 0.30) b	1.07 (± 0.71) b	4.76 (± 0.05) b	1.36 (± 0.04) b
CV %	16.78	6.81	17.96	15.34	15.89	20.66

CV = coeficiente de variación. Medias (n = 50) ± Error estándar de la media por tratamiento, con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Las plantas presentaron incrementos significativos con la inoculación de cepa MA04 en las variables de diámetro de tallo e índice de vigor con respecto a los demás tratamientos (Figura 40), en este sentido, el vigor que establece la relación entre tallos gruesos y altura de la plántula favorecen la adaptabilidad de las plántulas a la hora del trasplante en campo ya que el diámetro del tallo puede representar la acumulación de fotosintatos que están disponibles para las partes que así lo requieran al momento del trasplante (Terraza y col, 2012). Estos resultados concuerdan con el trabajo reportado por Luna y col., en 2013, quienes encontraron que las cepas MA04 y MA17 mejoraron la germinación de semillas de tomate saladette variedad 'Rio Grande'. Mientras que en las plántulas de pimiento variedad 'California Wonder', las cepas MA12 y MA17 mejoraron la biomasa (peso fresco). Este aumento en la biomasa puede estar relacionado a la producción de ácido indolacético producido por las cepas bacterianas, Ribaud y col. (2006) encontraron una mayor cantidad de ácido indolacético en plantas de jitomate inoculadas con *Azospirillum sp.* en comparación a las plantas testigo con un incremento en la biomasa de la raíz de un 20 %.

Otros trabajos donde se inocularon semillas de tomate saladette variedad 'Rio Grande' con diferentes cepas de *Bacillus sp.* (Lagunas y col., 2001) se obtuvieron incrementos del 87.5 % y 84 % en el volumen radical y peso seco del vástago respectivamente, además Santillana y col. en 2005 reportaron incrementos en la variable materia seca aérea en un orden del 88 % respecto al testigo en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Miller) debido a la capacidad estimulante de cepas de *Rhizobium* inoculado en las plántulas, con porcentajes mayores en materia seca aérea del 56 % y materia seca de raíz de 58 % respecto al testigo. De igual manera en los resultados obtenidos por Zhang y col. (2009), quienes inocularon *B. subtilis* al suelo y semilla de soya, mejoraron la emergencia en un 13 a 17 %, la altura en un 9 a 18 %, y el peso seco de raíz de 8.4 a 19 %, mientras que Almaghrabi y col. (2012) reportaron en tomate saladette incrementos del 40 y 42.6 % en la altura y materia seca aérea por inoculaciones con *B. subtilis*, obteniendo resultados similares en el presente trabajo con incrementos del 37.8 % al 54.2 % en peso fresco, 31.7 % al 42.9 % para materia seca, 43.9 % a 45.6 % para la variable altura y 31.7 % a 41.3 % en longitud de

raíz, de las inoculaciones con diferentes cepas del genero *Bacillus* sp. sobre el tratamiento testigo. Estos resultados proponen a varias especies de microorganismos entre ellos *Bacillus* sp. el ser considerados como bacterias del suelo promotoras del crecimiento (PGPSB = plant growth promoting soil bacteria); como se había dicho anteriormente debido a la producción de ácido indolacético, además de la estimulación del suministro de fósforo (P) a las plantas, compuesto indispensable en las primeras fases del desarrollo vegetal, esta solubilización se da por la producción de ácidos orgánicos a través de los microorganismos acidificando la rizosfera pudiendo ser un medio directo de conversión en suelo (Van Veen y col., 1997; Lagunas y col., 2001; Fernandez 2007; Badri y col., 2009).

El tratamiento de semillas con bacterias promotoras del crecimiento es un método económico, rápido, práctico y seguro para mejorar la calidad de las plántulas; las cepas MA04, MA12 y MA07 corroboraron su actividad promotora de crecimiento en tomate de cáscara respecto al testigo obteniendo los mayores valores promedio de crecimiento la cepa MA04.

7.4 Evaluación la calidad y rendimiento de frutos de tomate de cáscara

7.4.1 Variables de producción (primer corte)

El día 5 de junio de 2015 se realizó el primer corte evaluando el número y el peso de frutos por planta (Figura 42); y en el segundo corte realizado el 20 de junio, se contabilizó el peso y diámetro de los frutos individuales por tratamiento (Figura 37), esto debido a un periodo de lluvia intenso y constante del 12 al 16 de junio de 2015.



Figura 37. Frutos de tomate obtenidos de la primera y segunda cosecha.

De acuerdo al análisis de las variables de producción, se muestra en el primer corte (Cuadro 8) un aumento en el número de frutos entre plantas inoculadas con la cepa MA04 y los tratamientos Bactiva y Rhizobac pero no así del tratamiento testigo, y en la variable de peso del fruto, los frutos obtenidos de plantas inoculadas con la cepa MA04 presentaron una diferencia mayor entre los demás tratamientos; lo cual se puede atribuir a una aceleración en la maduración y cuajado del fruto, esto debido probablemente al incremento de la actividad fotosintética, proceso fisiológico natural de las plantas el cual mantiene una relación directa con la producción (Sánchez Chávez y col., 2011). Dichos tratamientos estuvieron expuestos a las mismas condiciones de estrés en campo

(temperatura, factores ambientales, hídrico, plagas y enfermedades), los cuales pueden trabajar de una manera conjunta y no aislada en su relación con la producción (Resendiz y col. 2010).

Por otro lado, el incremento observado en el número y peso de frutos del 11.57 y 11.65 %, respectivamente, del primer corte debido a la inoculación por *Bacillus*, indicando que posee potencial, resultados similares reportaron Mena y Olalde en 2007, quienes encontraron un incremento del 25 % en el rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en plantas inoculadas con *Bacillus subtilis* cepa BEB-13bs. De la misma manera diversos autores han reportado incrementos en producción relacionados con las inoculaciones bacterianas como Gravel y col. en 2007 quienes reportaron que la inoculación de plantas de tomate con *Pseudomonas marginalis* y *P. Putida* en producción bajo invernadero, incrementaron el número de frutos en un 11 y 23.3 %, respectivamente. Luna y col. en 2011 inocularon cultivos de tomate con *Gluconacetobacter diazotrophicus* obteniendo incrementos del 7.33 % en el número de frutos y del 13.83 % en el peso de frutos, mientras que cultivos de plátano inoculados con *Azospirillum brasilense* y *Bacillus sphaericus* (Baset y col. 2005) incrementaron la producción en el orden del 50.9 %.

Estos efectos estimulantes de la producción reportados por cepas de *B. subtilis* se originan también a partir de mecanismos indirectos como la supresión de microorganismos patógenos (Camargo y col. 2012; Shehata y col. 2016); pero en cuanto a los mecanismos directos relacionados con el incremento en la producción de los cultivos, la síntesis microbiana de hormonas vegetales como auxinas y giberelinas cobra gran trascendencia (Gutiérrez y col. 2001), además del mejoramiento de la absorción de nutrientes fósforo (P) y nitrógeno (N) principalmente facilitados por el incremento de la disponibilidad de los mismos en la rizosfera (Richardson, 2001), y la adquisición y absorción de agua (Pishchik y col. 2016).

Cuadro 8. Variables de producción evaluadas en campo 1er corte.

Tratamiento	Número de frutos por planta	Peso de los frutos por planta (Kg)
MA04	19.08 (\pm 1.25) a	0.95 (\pm 12.65) a
Rhizobac	14.20 (\pm 0.18) b	0.65 (\pm 9.63) c
Bactiva	15.63 (\pm 0.33) b	0.85 (\pm 16.01) b
Testigo	17.10 (\pm 0.59) ab	0.85 (\pm 18.78) b
CV %	13.74	14.08

CV = coeficiente de variación. Medias (Primer corte n = 20 plantas) \pm Error estándar de la media por tratamiento, con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

7.4.2 Variables de producción (segundo corte.)

En el segundo, en las variables registradas de peso y diámetro ecuatorial de los frutos individuales por tratamiento no se encontraron diferencias (Cuadro 10). La Norma Oficial Mexicana NOM-FF-54-1982, productos alimenticios no industrializados para uso humano- hortalizas en estado fresco- tomate con cáscara, establece como variables de calidad las de origen cualitativo y estado físico como lo son olor, forma, color característico, libre de daño mecánico, pudrición y defectos de origen mecánico, meteorológico, entomológico, microbiológico o genético-fisiológico. Como variables cuantitativas nos indica los diámetros ecuatoriales del fruto, dentro de los cuales no hubo diferencia entre los tratamientos ubicándolos entre los tamaños B (4.7 -5.4 cm) y C (3.9 - 4.6 cm) aptos para calidad EXTRA la cual dice textualmente en el punto 6.2.1.1 “Para la calidad México Extra se permiten los tamaños A, B o C para tomate”. Valores que se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Variables de producción evaluadas en campo 2do corte.

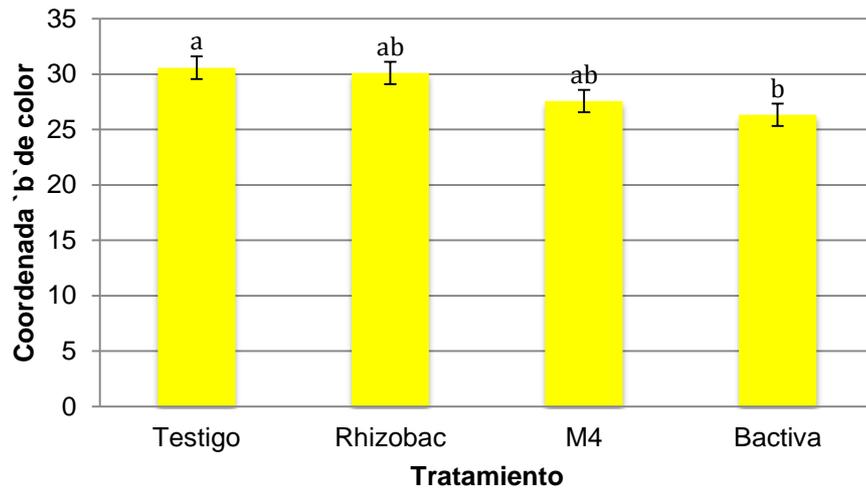
Tratamiento	Peso de frutos (gr)	Diámetro de frutos (mm)
MA04	38.94 (\pm 3.67) a	44.51 (\pm 1.38) a
Rhizobac	42.00 (\pm 3.62) a	45.85 (\pm 1.34) a
Bactiva	48.77 (\pm 3.83) a	48.43 (\pm 1.37) a
Testigo	45.49 (\pm 4.06) a	46.80 (\pm 1.43) a
CV %	38.42	13.36

CV = coeficiente de variación. Medias (n = 20 frutos) \pm Error estándar de la media por tratamiento, con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

7.4.4 Variables de calidad

7.4.4.1 Color

En cuanto a las variables de color (Cuadro 10), se observaron diferencias solo en la coordenada 'b'; donde el testigo presenta un incremento, indicando frutos más amarillos, con respecto a los tratamientos inoculados, pero esto no fue observado en la cáscara. Por el contrario, el tratamiento con bactiva presentó menor tendencia al color amarillo en fruto con respecto a los demás tratamientos



(Figura 43).

Figura 38. Valor de la coordenada cromática “b” de frutos de plantas inoculadas con cepas de *Bacillus* y productos comerciales.

La producción de los pigmentos está influenciada por factores físicos como ceras cuticulares, así como la forma y orientación de las células de la epidermis y sub-epidermis del fruto o cáscara. Estos pigmentos que aunado a la morfología superficial del fruto, absorben y refractan selectivamente la luz visible incidente, para producir un color específico del fruto en particular (Lancaster y col., 1997). Los cambios de color en el fruto y cáscara responden a procesos bioquímicos de la maduración y condiciones de estrés tanto ambientales como de sanidad. Sin embargo aunque no hubo diferencias significativas en la coordenada “a” tanto de fruto como de cáscara (Cuadro 11), que de acuerdo a las características físicas de calidad por la Norma Oficial Mexicana NOM-FF-54-1982 los frutos deben presentar un color verde brillante, brillantez (L) que sin ser diferente de los demás tratamientos se obtuvo el mayor promedio en el tratamiento de Rhizobac en cáscara, parte del fruto de interés por ser la que se expone al mercado, los valores de la coordenada “a” que van desde -6.64 hasta -8.27 en fruto, son similares a los de la variedad Rendidora, valores que según Bautista y col. (2015) se deben a los tiempos de degradación de la clorofila relacionados directamente con la variedad del fruto.

Estos cambios debido a procesos bioquímicos propios de la maduración de los frutos pueden estar dados debido a la actividad microbiana de las cepas con los cuales fueron inoculados, y si la producción de estos metabolitos influyen en el proceso propio de la maduración.

Cuadro 10. Efecto de la inoculación sobre color en fruto y cáscara de tomate.

Tratamiento	Fruto		
	L	a	b
MA04	46.34 (\pm 1.23) a	-7.42 (\pm 0.26) a	27.57 (\pm 0.59) ab
Rhizobac	45.13 (\pm 1.29) a	-8.27 (\pm 0.52) a	30.09 (\pm 1.23) ab
Bactiva	47.09 (\pm 1.74) a	-6.64 (\pm 0.66) a	26.33 (\pm 1.19) b
Testigo	47.57 (\pm 1.01) a	-7.96 (\pm 0.49) a	30.57 (\pm 1.02) a

Medias (n = 10) \pm Error estándar de la media por tratamiento, con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Tratamiento	Cáscara		
	L	a	b
MA04	51.98 (\pm 2.28) a	-5.40 (\pm 1.33) a	35.16 (\pm 3.15) a
Rhizobac	53.83 (\pm 1.82) a	-7.11 (\pm 0.79) a	38.52 (\pm 1.29) a
Bactiva	53.29 (\pm 1.97) a	-5.91 (\pm 1.10) a	38.73 (\pm 1.87) a
Testigo	53.51 (\pm 1.18) a	-8.28 (\pm 0.51) a	38.73 (\pm 0.74) a

Medias (n = 10) \pm Error estándar de la media por tratamiento, con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

7.4.4.2 pH, acidez titulable (AT), sólidos solubles totales (SST) y ácido ascórbico

En cuanto a las variables de calidad en frutos, se observó un aumento de la concentración de grados Brix en el tratamiento con la cepa MA04 y Rhizobac con respecto a los demás tratamientos, en cuanto al pH, todos los tratamientos presentaron un pH ácido sin presentar diferencias, como tampoco en la acidez titulable (Cuadro 11). En este sentido la vitamina C recae su importancia en la salud humana debido al hecho de ser un agente antioxidante al cual, se le atribuye el fortalecimiento del organismo en defensa a enfermedades (Carr y Frei, 1999). En trabajos realizados por Ramirez y col. (2010) en tomate de cáscara, quienes suministraron biorreguladores como Prohexadiona de Ca (P-Ca), obtuvieron promedios de ácido ascórbico de un 3.21 y un 4.66 mg/ 100 g de fruto de tomate, con respecto a donde las concentraciones de ácido ascórbico en los tratamientos MA04 y Bactiva entran en rangos de plantas tratadas con potenciadores de la producción de Vitamina C como lo son los retardantes de crecimiento (Jamalian y col., 2009). Sin embargo en trabajos donde se inocularon cepas de *Bacillus* y se midió el contenido de vitamina C se encontraron incrementos del orden del 14 % (Erktur y col. 2012) esto en frutos de fresa mientras que en el presente trabajo se encontraron incrementos del 54.5 % de contenido de vitamina C con respecto al testigo.

Cuadro 11. Efecto de la inoculación en variables de calidad en fruto de tomate.

Tratamiento	Sólidos solubles totales ° Brix	pH	% Acidez titulable (% de ácido cítrico)	Ácido ascórbico (mg de a.a. /100 gr tomate)
MA04	5.6 (± 0.06) a	3.97 (± 0.06) a	0.84 (± 0.10) a	3.26 (± 0.20) a
Rhizobac	6.2 (± 0.07) a	3.77 (± 0.03) ab	1.02 (± 0.07) a	2.36 (± 0.65) b
Bactiva	4.0 (± 0.03) ab	3.90 (± 0.19) a	0.75 (± 0.07) a	3.25 (± 0.71) a
Testigo	2.8 (± 0.03) b	3.40 (± 0.09) b	0.86 (± 0.16) a	2.11 (± 0.20) b
CV %	38.39	8.73	29.17	30.92

CV = coeficiente de variación. Medias (n = 5) con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

En trabajos como el de Suárez y col. (2009) en frutos de guayaba, se observó la disminución de ácido ascórbico en frutos de guayaba, ya que al ser un compuesto hidrosoluble se pierde conforme avanza el proceso de maduración.

En los sólidos solubles totales se observó un incremento en los tratamientos inoculados respecto del testigo teniendo el mayor promedio el tratamiento de rhizobac (Cuadro 12), estos valores de sólidos solubles totales son superiores a los reportados por Rodríguez y col. (2015) para frutos de tomate de cáscara (5.33 y 5.57) estos incrementos pueden deberse al efecto de la degradación de macromoléculas orgánicas a moléculas de cadena más sencilla como los azúcares (Seymour y col. 1990). En este sentido las variables de sólidos solubles totales y acidez titulable son parámetros indicadores de la calidad sensorial de los frutos (Ochoa y col. 2016). Mientras que las variables relacionadas de pH y acidez titulable se observa que los tratamientos testigo y rhizobac son mas ácidos respecto a los tratamientos MA04 y Bactiva comportándose de manera relacionada con la acidez titulable ya que cuando el

pH aumenta en los tratamientos, disminuye el porcentaje de acidez titulable, resultados similares fueron los obtenidos por Cruz y col. (2015) donde no encontraron diferencias significativas en la variable de acidez titulable. Sin embargo los frutos difieren en su relación de azúcares y ácidos orgánicos los cuales son utilizados como sustratos de la respiración (Tucker, 1993)

8. CONCLUSIONES

Fusarium sp. y *Pythium* sp. fueron aislados del sitio experimental y muestran patogenicidad en plántulas de tomate de cáscara; se caracterizó morfológicamente dos cepas de *Fusarium* sp. denominadas F1 y F2 y una cepa de *Pythium* sp. denominada P1

La cepa de *Bacillus* sp. MA04 mostró porcentajes satisfactorios de inhibición *in vitro* para los microorganismos patógenos de la región de San Nicolás Tequisquiapan Querétaro aislados de *Fusarium* sp. F1 (66.88 %), *Fusarium* sp. F2 (65.51 %) y *Pythium* sp. P1 (78.45 %) con respecto a las cepas MA12 y MA07 las cuales no presentaron inhibición.

La inoculación de semillas de tomate var. "Gran Esmeralda" con cepas de *Bacillus*, MA04, MA07 y MA12 mejoraron la calidad de la plántula teniendo mayor desarrollo vegetativo, determinado por el incremento variables altura, peso fresco, peso seco, con respecto al testigo, mientras que la cepa MA04 además mostró valores superiores en diámetro de tallo e índice de vigor.

Se determinaron diferencias significativas en las variables de número de frutos por planta y peso de frutos en el primer corte de la cepa MA04 con respecto a los tratamientos Bactiva, Rhizobac y testigo, mientras que para el segundo corte no hubo diferencia en variables de producción entre los frutos de plantas inoculadas con los diferentes tratamientos. Además determinaron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados con el producto Bactiva y la cepa MA04 en variables de calidad como la Vitamina C, mientras que el tratamiento Rhizobac y MA04 lo fueron para sólidos solubles totales mejorando la calidad de estas variables químicas respecto al testigo.

9. PERSPECTIVAS

Evaluar el efecto de las cepas de *Bacillus* utilizados en el trabajo de investigación contra las enfermedades o pérdidas post-cosecha en tomate de cáscara, utilizando sobrenadante libre de células como fungicida, un control químico convencional, además de la alternancia entre aplicaciones para comparar la virulencia de la enfermedad entre los diferentes tratamientos, esto debido a que los microorganismos promotores de crecimiento y antagonistas microbianos, en este caso *Bacillus* sp., son una alternativa de manejo de cultivo para el tomate de cáscara en cuanto a la protección contra enfermedades y las mejoras en variables de calidad de fruto, cepas específicas tienen la capacidad de incrementar y potencializar plántulas a nivel de almacigo para una mejor adaptación al momento del trasplante; sin embargo para el manejo de cultivo en condiciones de campo a cielo abierto no se puede depender de un solo mecanismo de control, debido al estado salvaje de cepas silvestres de los fitopatógenos de interés que ya están adaptados a la zona localizada y que limitan el accionar de los inoculantes incorporados a esperar algún tiempo de adaptación al ambiente cuando las condiciones ambientales son adversas y su propagación es mucho más rápida; manejos adecuados de control biológico, laboreo cultural, conocimiento y manejo de ecología local y en menor medida el uso del control químico, pueden contribuir a mantener un equilibrio en pro de las necesidades de los cultivos, en este caso tomate de cáscara.

10. LITERATURA CITADA

A.O.A.C. 1994. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemist (15th Ed.) Washington, USA.

Abdallah R A. B, Jabnoun-Khiareddine H, Mokni-Tlili S, Nefzi A, Medimagh-Saidana S. 2015. Endophytic *Bacillus* spp. from Wild Solanaceae and Their Antifungal Potential against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Elucidated Using Whole Cells, Filtrate Cultures and Organic Extracts. *J Plant Pathol Microbiol* 6: 324.

Abdulkareem M., Aboud HM, Saood HM, Shibly MK. 2014. Antagonistic activity of some plant growth rhizobacteria to *Fusarium graminearum*. *International Journal of Phytopathology* 3, 49-54.

Agrios, G. 1998. *Fitopatología*; 3a edición; Editorial Limusa, México.

Alamri S.A. 2014. Enhancing the efficiency of the bioagent *Bacillus subtilis* JF419701 against soil-borne phytopathogens by increasing the productivity of fungal cell wall degrading enzymes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2015 Vol. 48, No. 2, 159–170

Alcalá D, Marcano J, Pire A. 1985. Resistencia de cepas del hongo *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary resistentes a metalaxil en siembras de papa del estado de Lara. *Agronomía Tropical*. 35(1-- 3):43-- 55.

Almaghrabi A.O., Massoud I.S., Abdelmoneim S.T. 2012. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20, 57–61

- Apodaca** M. A., Barreras M. A., Cortez E., Quintero J.A. 2008. Enfermedades del tomate de cáscara en Sinaloa. Centro de Investigación Regional del Noroeste. INIFAP. Sinaloa, México.
- Aquino** M., Vázquez L.M., Reyes B.G. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con Hongos Antagonistas Nativos de la Zona Florícola de Villa Guerrero, Estado de México. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 26, Núm. 2, Pag. 127.
- Badri**, D.; Weir, T.; van der Lelie, D. Vivanco, J. 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. Curr. Opin. Biotechnol. 20:642-650.
- Bais** H. P., Fall R., Vivanco J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. vol. 134 no. 1 307-319
- Barnett**, H. L., B.B. Hunter, 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press, Minnesota
- Baset** M. M.A., Shamsuddin Z.H., Wahab Z., Marziah M. 2005. Highyielding and quality banana production through plant growth-promoting rhizobacterial (PGPR inoculation). Fruit 60, 179–185.
- Bautista** B.P., Arellanes J. N., Pérez F. M. E. 2015. Color y estado de madurez del fruto de tomate de cáscara. Agronomía Mesoamericana, [S.l.], p. 115-130.
- Baysal** Ö., Lai D., Xu H.H., Siragusa M., Çalışkan M. 2013. A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* Species. PLoS ONE 8: e53182.

- Bernard P.** 2003. Characterisation of a new species of *Pythium* isolated from a wheat field in northern France and its antagonism towards *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of the grapevine. *FEMS Microbiology Letters* 224 (2003) 215-223.
- Bishnoi U., Polson S.W., Sherrier D.J., Bais H.P.** 2015. Draft genome sequence of a natural root isolate, *Bacillus subtilis* UD1022, a potential plant growth-promoting biocontrol agent. *Genome Announc* 3(4):e00696-15.
- Bruna A.** 1991. Marchitez y pudriciones de corona y raíces en espárrago (*Asparagus officinalis*) causado por *Fusarium oxysporum* Schlecht f *asparagi* Cohen. *Agricultura técnica*. 53 (1) 52-54.
- Camargo R.S.L., Manuel M.N., De la Rosa M.C.J., Arias M.S.A.** 2012. Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*. 13:7. UNAM.
- Cao Y., Xu Z., Ling N., Yuan Y., Yang X., Chen L., Shen B., Shen Q.** 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae* 135 32-39
- Carr, A. C.; Frei, B.** 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 69(6): 1086-107
- Castaño T. E., Domínguez D. J.** 2010. *Diseño de Experimentos: Estrategias y Análisis en Ciencia y Tecnología*. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 418 p.
- Carvalho, A. C. C. S. y otros,** 2009. Evidence of the mechanism of action of *Erythrina velutina* Willd (Fabaceae) leaves aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2009), pp. 374-378.
- Chin K. M., Wirz M., Laird D.** 2001. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Dis*. 85: 1264–1270.

- Contreras** I., Almeida Puentes J. 2003. Micropropagación del tomatillo (*Physalis ixocarpa* L.). Revista de la facultad de farmacia Vol. 45. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Cruz** Á. O., Martínez D. M. T., Rodríguez P. J. E., Colinas L. M. T., Moreno P. E. C. 2012. Conservación poscosecha de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.) con y sin cáliz. Revista Chapingo. Serie horticultura, 18(3), 333-344
- Curl** C. L., Beresford S. A. A., Fenske R. A., Fitzpatrick A. L., Lu C., Nettleton J. A., Kaufman J. D. 2015. "Estimating Pesticide Exposure from Dietary Intake and Organic Food Choices: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)." *Environmental Health Perspectives* 123 (5): 475-483.
- Dabrowski** J. M., Shadung, J. M. & Wepener, V. 2014. Prioritizing agricultural pesticides used in South Africa based on their environmental mobility and potential human health effects. *Environment International*, pp. 31-40.
- Darma** R., Purnamasari I.M., Agustina D., Pramudito T.E., Sugiharti M. 2016. A Strong Antifungal-producing Bacteria from Bamboo Powder for Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* in Melon (*Cucumis melo* var. amanta). *J Plant Pathol Microbiol* 7: 334
- Demoz** B.T., Korsten, L. 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control* 37 (1), 68–74.
- Dhingra**, O. D y Burton, J. 1995 *Basic Plant Pathology Methods*. CRC press, Cleveland, Ohio.

- El-Mohamedy** R.S. 2012. Biological control of Pythium root rot of broccoli plants under greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Technology* Vol. 8(3): 1017-1028
- Erturk**, Y., Ercisli, S. y Cakmakci R. 2012. Yield and growth response of strawberry to plant growth-promoting rhizobacteria inoculation. *Journal of plant nutrition*. 35(6):817-826.
- FAO**. 1997. Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. Consulta de Estudio FAO Riego y Drenaje - 55. Recuperado 9 de noviembre de 2014 de <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s00.htm#Contents>
- Fernández**, M. 2007. Sobre los derivados de la caña de azúcar. *Red de Revistas Científicas de América Latina*. CIDCA. El Caribe, Portugal. 41(2):51-57
- Francis F.J.** 1980. Color quality evaluation of horticultural crops. *HortScience*. 15:58–59.
- Gao** H., Beckman, C.H., Mueller, W.C. 1995. The rate of vascular colonization as a measure of the genotypic interaction between various cultivars of tomato and 64 various formae especiales of *Fusarium oxysporum*. *Physiol. Mol. Plant Pathology*. 46:29-43 pp
- García** O.H., Escobedo B. L., Robledo T. V., Benavides M. A., Ramírez G. F. 2015. Germinación y micropropagación de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) tetraploide. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 0, 2301-2311.
- González** A A., Mateos R. R. A., López M. M., Hernández S M., González C. A. 2013. Alternativas para el manejo de Damping off en plántulas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill (L, 1753) (Solanales: Solanaceae). *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan* 1(1): 1-10

- Gravel**, V; Antoun, H and Tweddell, R. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39:1968-1977.
- Grijalba** P.E., Zapata R.L., Palmucci H.E., Baron C. 2015. Podredumbre basal de plantas adultas de tomate causada por *Pythium aphanidermatum* (Oomycota). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 50 (1): 11-15.
- Gueldner**, R.C., Reilly, C.C., Pussey, P.L., Costello, C.E., Arrendale, R.F., Cox, R.H., Himmelsbach, D.S., Crumley, F.G., Culter, H.G., 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36, 366–370.
- Guillén** C. R., Hernández C. F. D., Padrón C. E., Rodríguez H. R., Reyes V. M. H. Aguilar G. C. N., Gallegos M. G. 2006. *Bacillus* spp. como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24() 105-114
- Gutierrez**. M. F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talon, M. 2001. The plant-growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111, 206–211.
- Hernández** L. A. N., Bautista B. S., Velázquez V. M. G., Hernández R. A. 2007. Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 66-74.
- Hirooka**, T. & Ishii, H. 2013. Chemical control of plant diseases. *J. Gen. Plant. Pathol.*, Volumen 79, pp. 390-401.

- INEGI.** 2016. Cuaderno Estadístico Municipal de Tequisquiapan, Querétaro Arteaga. Consultado 15 de marzo de 2016. <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem05/info/qtr/m017/mapas.pdf>
- Jamalian, S.,** Tehranifar A., Tafazoli E., Eshghi S., Davarynejad G. H. 2009. Paclobutrazol can reduce the negative effects of salinity on reproductive growth, yield and fruit quality of strawberry plant. *Acta Horticulturae* 842: 825–828.
- Janisiewicz W.J.,** Korsten L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40:411-441.
- Jiang Y.M.,** Zhu, X.R., Li, Y.B. 2001. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. *Lebensmittel Wissenschaft Technology* 34 (7), 430–436.
- Jiang J.,** Gao L., Bie X., Lu Z., Liu H., Zhang C., Lu F., Zhao H. 2016. Identification of novel surfactin derivatives from NRPS modification of *Bacillus subtilis* and its antifungal activity against *Fusarium moniliforme*. *BMC Microbiology* (2016) 16:31
- Köhler Heinz-R.,** Tribskorn Rita. 2013. Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond?. 341 (6147),kl 759-765
- Kokalis-Burelle N.;** Kloepper J. W.; Reddy M. S. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology.* 3: 91–100.
- Komarek, M.,** Cadkova, E., Chrastny, V., Bordas F., Bollinger, J-C. 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International.* 36; 138 – 151.
- Lagunas L. J.,** Zavaleta M. E., Osada K. S., Aranda O. S., Luna R. I., Vaquera H.

H. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev. Mex. Fitopat.* 19:57-65.

Lancaster J. E.; Lister C. E.; Reay P. F.; Triggs C. M. 1997. Influence of pigment composition on skin color in a wide range of fruit and vegetables. *Journal of the American Society Horticultural Science.* 122: 594-598.

Leelasuphakul W., Hemmaneea P., Chuenchitt S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biol Technol* 48: 113-121.

Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual.* Blackwell Publishing.

Lévesque C. A., DE COCK A. W. A. M. 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108, pp 1363-1383.

Li L., Ma J., Ibekwe A.M., Wang Q., Yang C.H. 2016. Cucumber Rhizosphere Microbial Community Response to Biocontrol Agent *Bacillus subtilis* B068150. *Agriculture* , 6, 2.

Liu Y., Chen Z., Ng T.B., Zhang J., Zhou M., Song F., Lu F. 2007. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides* 28:553–559

López L. R., Arteaga R. R., Vázquez P. M. A., López C. I. L., Sánchez C. I. 2009. Producción de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) basado en láminas de riego y acolchado plástico. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(1), 83-89.

López L. R., Arteaga R. R., Vázquez P. M. A., López C. I. L., Sánchez C. I. 2010. Evapotranspiración del cultivo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*

Brot.) estimada mediante el potencial mátrico del suelo. *Revista fitotecnia mexicana*, 33(2), 157-168.

Lucini, E. I., Zunno, M. P., López, M. L. & Zygadlo, J. A., 2006. Effect of Monoterpenes on Lipid Composition and Sclerotial Development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *J. Phytopathology*, Volumen 154, pp. 441-446.

Luna M. L., Martínez P. R., Hernández I. M., Arvizu M. S. Pacheco A.J.R. 2013. Characterization of rhizobacteria isolated from tomato and their effect on tomato and bell pepper growth. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36 (1): 63 – 69

Madriz O. K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 63 p. 22 - 32.

Marín D. H., Romero R. A., Guzmán M., Sutton T. B. 2003. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Dis.* 87: 208–222.

Martínez B. L., Téliz O. D., Rodríguez M. J. C., Mora A. J. A., Nieto Á. D., Cortés F. J. I., Mejía S. D., Nava D. C., Silva A. G. 2012. Resistencia a fungicidas en poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* del sureste mexicano. *Agrociencia*, 46(7), 707-717.

Martínez, M. 1998. Revision of *Physalis* Section *Epeteiorhiza* (Solanaceae). *Anales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 69: 71-117.

Martínez A. J. C., Castro M. C., Sánchez P. P., Gutiérrez D. R. Maldonado M. I.E. 2016. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World J Microbiol Biotechnol* (2016) 32:75

Mathivanan N, Prabavathy V, Vijayanandraj V. 2005. Application of Talc Formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma*

viride Pers. ex S.F. Gray Decrease the Sheath Blight Disease and Enhance the Plant Growth and Yield in Rice. J Phytopathology.153:697-701.

McConnell S., Wightwick, A., Smith, T., Porteous, C. 2003. Code of Environmental Best Practice for Viticulture. Sunraysia region. Volume 1 – Environmental best practices. Department of Primary Industries. ISBN 1 74106 638 7. Victoria, Australia.

Mena, H., Olalde, V. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. Sci. Hortic. 113:103-106

Michielse C. B, Rep M. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Mol Plant Pathol. MOLECULAR PLANT PATHOLOGY (2009) 10(3), 311–324

Moorman G. W., Kim, S. H. 2004. Species of *Pythium* from greenhouses in Pennsylvania exhibit resistance to propamocarb and mefenoxam. Plant Dis. 88:630-632.

Ochoa V. C. E., Valadez B. R., Salas C. R., Sustaita R. F., Hernández C. B., García O. S., Santos S. N. F. 2016. Effect of nitrogen fertilization and *Bacillus licheniformis* biofertilizer addition on the antioxidants compounds and antioxidant activity of greenhouse cultivated tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L. var. Sheva). Scientia Horticulturae 201 (2016) 338–345.

Olivain C, Alabouvette C.1999. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. New Phytol.;141(3): 497-510.

Ongena M., Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16(3):115-25.

Osada K., S., García E. R., Apodaca S. M. Á., Valenzuela U. J. G., Zavaleta Me. E. 2004. Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f.

sp. radialis-lycopersici W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México . *Revista Mexicana de Fitopatología*, enero-junio, 7-13.

Pal K. K., McSpadden G. B. 2006. Biological control of plant pathogens.

The Plant Health Instructor 2: 1117-1142.

Patil A., Laddha A., Lunge A., Hariprasad P., Shubhada M. 2012. In vitro antagonistic properties of selected trichoderma species against tomato root rot causing pythium species. *International Journal of Science, Environment and Technology*, Vol. 1, No 4, 302 – 315. Amravati University, Amravati (MS) India

Paulitz Timothy C. Belanger Richard R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2001.39:103-133. Brown University. EUA

Peña L., A. 2001. Situación Actual y Perspectivas de la Producción y Mejoramiento Genético de Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en México. Primer Simposio Nacional. Técnicas modernas de producción de tomate, papa y otras solanáceas. Universidad Agraria Antonio Narro. Saltillo Coahuila. 10 p.

Peña L. A., Molina G. J. D., Sahagún C. J., Ortiz C. J., Márquez S. F., Cervantes S. T., S. J. F. 2008. Parámetros genéticos en la variedad CHF1 Chapingo de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(1), 5-11.

Pérez L. A., Batlle A., Hernández M., Pérez R., Trujillo C., Méndez A. 2003. Evolución de la sensibilidad a fungicidas de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en banano en Cuba. *Fitosanidad* 7: 49–54.

Pimentel D. 2005. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability*. 7: 229–252. Springer.

- Pishchik** V.N., Vorobyov N.I., Walsh O.S., Surin V.G., Khomyakov Y.V. 2016. Estimation of Synergistic Effect of Humic Fertilizer and *Bacillus Subtilis* on Lettuce Plants by Reflectance Measurements, *Journal of Plant Nutrition*
- Ramarathnam** R., Shen B., Yu C., W.G. Dilantha F., Gao X., Kievit T. 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin- and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 2007, 53(7): 901-911, 10.1139/W07-049
- Ramírez** H., Rivera C. C. E., Benavides M. A., Robledo T.V., Reyna G.S. 2010. Prohexadiona Ca, una alternativa en la producción de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Rev. Chapingo Ser.Hortic* vol.16 no.2 .
- Reséndiz** M. R. C., Moreno P. E., Sánchez C. F., Rodríguez P. J. E., Peña L. A. 2010. Variedades de pimiento morrón manejadas con despunte temprano en dos densidades de población. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 16: 223-229.
- Richardson**, A.E., 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 897–906.
- Rodríguez** B. A. 2010. Desarrollo de fruto y calidad de semilla de cinco variedades de *Physalis ixocarpa* brot. en el valle del fuerte, Sinaloa. Colegio de Postgraduados. México.
- Rodríguez** M. M. N., Baca C. G., García C. J. L., Urrieta V. J. A. 2015. Aclareo de frutos y aspersiones foliares de calcio y miel de abeja sobre la calidad de tomate tipo costilla. *Revista fitotecnia mexicana*, 38(2), 197-204.
- Romero** V. S. D., Tlapal B. B., Cadena I. J., Nieto A. D. Arévalo G. M^a. de Lourdes. 2015. Hongos causantes de enfermedades postcosecha en

chayote (*sechium edule* (jacq.) Sw.) y su control in vitro. *Agronomía Costarricense*, 39(2), 19-32.

Rubio R. G., Baltodano S. F., Abanto C. L., Wilson K. J., Muñoz R. M. 2008. Resistencia in vitro de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai- WP. *Revista Biológica de la Universidad de Trujillo, Perú*. 28 (2), 34-46.

Saad A. A. 2015. Enhancing the efficiency of the bioagent *Bacillus subtilis* JF419701 against soil-borne phytopathogens by increasing the productivity of fungal cell wall degrading enzymes, *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 48:2, 159-170.

Salgado G. R., Díaz C. M., Silva R. H. V., Fernández P. S. P., Rodríguez A. G., Pedraza S. M. E. 2011. Identificación de especies de *Pythium* aisladas de plantas ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Noviembre-Diciembre, 431-443.

Sánchez-Chávez E., Barrera T. R., Muñoz M. E., Ojeda B. D. L., Anchondo N. A. 2011. Efecto del ácido salicílico sobre biomasa, actividad fotosintética, contenido nutricional y productividad del chile jalapeño. *Revista Chapingo serie horticultura*.17: 63-68.

Santiaguillo H. J.F., Yáñez S. B. 2009. Aprovechamiento tradicional de las especies de *Physalis* en México. *Rev. Geograf. Agríc.* 43:81-86.

Santillana N., Arellano C., Zúñiga D. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Miller). *Ecol. Aplic.* 4:47-51.

- Sarti G. C.**, Miyazaki, S. S. 2013. Actividad antifúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. *Agrociencia*, 47(4), 373-383.
- Sepúlveda J. G.**, Porta D.H. y Rocha S. M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, diciembre, año/vol. 21. Numero 003.
- Seymour G.B.**, N´diaye, M., Wainwright, H.,Tucker, G.A. 1990. Effects of cultivar and harvest maturity on ripening of mangoes during storage. *Journal of Horticultural Science* 65:479-483.
- Sharma R.R.**, Singh Dinesh., Singh Rajbir., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50 205–221
- Shehata S. M.**, Schmidhalter U., Valšíková M., Junge H. 2016. Effect of Bio-stimulants on Yield and Quality of Head Lettuce Grown Under Two Sources of Nitrogen. *Gesunde Pflanzen*, Volume 68, Issue 1, pp 33-39
- Sheng wu H.**, Yang W., Chao-Yong Z., Wei B., Ning L., Dong-Yang L., Qi-Rong S. 2009. Growth of *in vitro Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in chemically defined media amended with gallic acid. *Biol Res* 42: 297-304.
- SIAP.** 2014. Anuario del Sistema integral de información agroalimentaria y pesquera. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) OEIDRUS (en línea) Disponible en: <http://www.siap.gob.mx> (Consultado 12 octubre de 2014).
- Sinobas J.**, Rodríguez E. 1999. Determinación de la patogeneicidad de *Pythium* spp. sobre pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) y judía (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bol. San. Veg. Plagas*, 25: 279-287,

- Slepecky** RA, HE Hemphill 1992. The Genus *Bacillus*—Nonmedical Cap. En The Prokaryotes 2a. Edición. Ed. Dworkin M, Schleifer KH y Stackebrandt, Springer Verlag, New York, EUA.
- Soto** G., Peña A., Santiaguillo J.F., Rodríguez J.E., Palacios A. 1998. RESISTENCIA A *Fusarium* sp. DE 95 COLECTAS DE TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis* spp.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. (1), :51-55.
- Spolti**, P., Del Ponte, E. M., Dong, Y., Cummings, J. A., and Bergstrom, G. C. Triazole Sensitivity in a Contemporary Population of *Fusarium graminearum* from New York Wheat and Competitiveness of a Tebuconazole-Resistant Isolate. *Plant Dis*. 98:607-613.
- Srivastava**, S., Singh V. P., Kumar R., Srivastava M. Sinha A., Simon S. 2011. *In vitro* evaluation of carbendazim 50% WP, antagonists and botanicals against *Fusarium oxysporum* f. sp. *psidii* associated with rhizosphere soil of guava. *Asian J. Plant Pathol*. 5: 46-53.
- Suarez** J., Perez de C. M., Gimenez A. 2009. Efecto de la temperatura y estado de madurez sobre la calidad poscosecha de la fruta de guayaba (*Psidium guajava* L.) Procedente de MERCABAR, estado Lara, Venezuela. *Revista UDO Agrícola* 9 (1): 60-69.
- Taboada** M.S. y R. Oliver G. (eds) 2004. Cultivos alternativos en México. Primera Edición. Editorial AGT Editor, S.A. México, D.F. 169 P.
- Tan** Z., Lin B., Zhang R. 2013. A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25. *SpringerPlus* 2013 2:543.
- Terraza** P. S., Lara M. P., Villarreal R. M., Hernández V. S. 2012. Crecimiento de plantas y rendimiento de tomate en diversas relaciones nitrato/amonio y concentraciones de bicarbonato *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 35 (2): 143 –153.

- Teruo H., James F. P., 1997.** Microorganismos benéficos y efectivos para una agricultura y medio ambiente sostenible. Fundases. Colombia.
- Tucker, G. A.1993.** Biochemistry of fruit ripening. Editorial Chapman and Hall USA. Pp 9-10
- U.S. Environmental Protection Agency.** 2013. Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Office of Pesticide Programs. Annual Cancer Report. U.S.A.
- Utkhede R.S., Sholberg, P.L., 1986.** In vitro inhibition of plant pathogens: *Bacillus subtilis* and *Enterobacter aerogenes* in vivo control of two postharvest cherry diseases. Canadian Journal of Microbiology 32, 963–967.
- Van Veen, J.A., Van Oberbeek, L.S. and Van Elsas, J.D. 1997.** Fate and activity of microorganisms introduced into soil. Microbiology Molecular Review 61:121-135.
- Van den Berg N. Berger D. .K., Hein I., Birch P. R. J., Wingfield M. Viljoen A. 2007.** Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up- regulation of cell wall- strengthening genes in the roots. Mol. Plant Pathol. 8(3), 333-341.
- Wightwick A., Mollah M., Partington D., Allinson G. 2008.** Copper fungicide residues in Australian vineyard soils. Journal of Agricultural & Food Chemistry. 56; 2457 – 2464.
- Wightwick A., Walters R., Allinson G., Reichman S., Menzies N. 2010.** Environmental Risks of Fungicides Used in Horticultural Production Systems, Fungicides, Odile Carisse (Ed.), ISBN: 978-953-307-266-1, InTech.

- Yang** D.M., Bi, Y., Chen, X.R., Ge, Y.H., Zhao, J. 2006. Biological control of postharvest diseases with *Bacillus subtilis* (B1 strain) on muskmelons (*Cucumis melo* L. cv. Yindi). *Acta Horticulturae* 712 (2), 735–739.
- Yedidia** I., Benhamou N., Chet I. 1999. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(3):1061.
- Yezli**, W.; Zebboudj-Yezli, N.; Hamini-Kadar, N.; Kihal, M.; Henni, J. E. 2015. An *in vitro* antagonistic activity evaluation of rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) isolated from the Algerian west. *International Journal of Biosciences (IJB)* Vol. 7 No. 1 pp. 95-103
- Zhang** J.X., Xue A.G., Tambong J.T. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rots caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. *Plant Disease* 93:1317-1323.
- Zhao** Y., Shao, X.F., Tu, K., Chen, J.K. 2007. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* B10 on the diseases of postharvest strawberry. *Journal of Fruit Science* 24 (3), 339–343