

# UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA



## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“EVALUACIÓN *in vitro* DE BACTERIAS RIZOSFÉRICAS CON ACTIVIDAD ANTAGÓNICA SOBRE EL HONGO FITOPATÓGENO *Fusarium oxysporum* QUE AFECTA AL CULTIVO DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum*)”

### TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS

### PRESENTA:

I.B. ALBA ARELY TLILAYATZI BELLO

### DIRECTORA DE TESIS:

DRA. THALÍA ISOLDA RAMÍREZ REYES

### CODIRECTORA:

DRA. PAULA CECILIA GUADARRAMA MENDOZA

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, MARZO 2022.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioprocesos del edificio de Productos Naturales y Alimentos, así como en el invernadero, ambos pertenecientes a la Universidad Tecnológica de la Mixteca, bajo la dirección de la Dra. Thalía Isolda Ramírez Reyes y la codirección de la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza. Se contó con la beca de manutención número 940769, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Parte importante de este trabajo, se presentó en formato cartel en el XXII Congreso Internacional y XLVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, llevado a cabo del 20 al 23 de octubre de 2020, en su modalidad virtual. El trabajo presentado, se publicó en un suplemento de la revista de la misma sociedad. Asimismo, el trabajo se presentó en el Primer Congreso de Posgrados en Biodiversidad y Conservación del Sur-Sureste mexicano, el cual se llevó a cabo del 28 al 30 de octubre de 2020, en la modalidad de presentación oral, organizado por el Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, realizado de manera virtual.

## **DEDICATORIA**

A mi madre... por haber hecho todo para salir adelante, porque sin ella no hubiera llegado hasta aquí. Para ti, la más fuerte de todas, la que lo ha superado todo, esto es para ti mamá.

A ti amor... por todo tu amor, por todo lo que compartes conmigo, por tus consejos y tu respaldo. Por tu apoyo, por tu paciencia, a ti por hacer equipo conmigo.

A mis hermanos... por las batallas que hemos peleado juntos, en especial a Daniel, el ejemplo más grande de superación, gracias a ti por acompañarme en la distancia. Tú me has inspirado a seguir adelante.

A alex, max, milla, kira y amy por ese amor incondicional, ustedes son la evidencia del amor puro y el agradecimiento desinteresado.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Thalía y la Dra. Paula por la dirección de este proyecto. Por sus consejos y por guiarme durante este proceso y en toda esta etapa de mi formación, muchas gracias por todo.

Al Dr. Rogelio, por estar siempre presente. Por ser parte de mi desarrollo y crecimiento académico, sus palabras de motivación me hicieron aprender y superar cada obstáculo, gracias por estar ahí siempre.

Al Dr. Edgar, por los conocimientos y consejos que muy amablemente siempre compartió conmigo y que fueron de gran relevancia para este trabajo, muchas gracias.

Al Dr. Vladimir y al Dr. Sustaita, muchas gracias por sus comentarios y valiosas aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca, por permitirme ser parte de esta gran universidad y seguir con mi preparación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca proporcionada para la realización de este proyecto.

A los doctores que compartieron sus conocimientos en clases. En especial a la Dra. Norma, quien con sus conocimientos me incentivó a superarme cada día más.

A mis compañeras, gracias por los momentos vividos. A ti Viviana, por tu incondicionalidad, tu complicidad, pero sobre todo tu amistad. Por los momentos que pasamos juntas y por los que están por venir.

A todos los que integran el laboratorio de Bioprocesos, de cada uno me llevo recuerdos muy gratos. Muchas gracias por sus consejos, fue un placer coincidir con ustedes.

## RESUMEN

El jitomate es una de las hortalizas más cultivadas en el mundo, sin embargo, al igual que otros cultivos producidos de forma intensiva, es susceptible a diversos fitopatógenos, uno de los que causan mayor daño es *Fusarium oxysporum*. El control de este fitopatógeno en los cultivos de jitomate, por su eficacia, se realiza mediante la aplicación de métodos químicos; sin embargo, el uso indiscriminado de estos agentes sintéticos genera daños y efectos negativos en el ambiente como la contaminación de suelos y de los mantos acuíferos entre otros, además que han provocado la resistencia del fitopatógeno. En las últimas décadas se ha incrementado el interés por el uso de agentes biológicos como una alternativa para el control de fitopatógenos. Un grupo de bacterias conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, han demostrado potencial para actuar como agentes de biocontrol contra fitopatógenos de origen fúngico, a través de la producción de compuestos antimicrobianos. En el presente trabajo, se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de compuestos orgánicos difusibles y compuestos orgánicos volátiles (COV) generados por 32 aislados bacterianos contra el hongo fitopatógeno de jitomate *F. oxysporum*. Los aislados bacterianos fueron obtenidos de la rizósfera de plantas sanas de cultivos de jitomate de una región de la Mixteca en el estado de Oaxaca. La actividad antifúngica por compuestos difusibles se evaluó mediante cultivos duales, colocando un disco micelial de 5 mm de diámetro del hongo fitopatógeno en el centro de una placa de Petri con agar papa dextrosa (APD), en ella, se inoculados tres aislados distintos y un control en forma equidistante. La actividad antifúngica por volátiles se evaluó mediante el método de bases de placas contrapuestas y selladas, para ello, en el centro de una placa de Petri con APD se colocó un disco micelial de 5 mm de diámetro del hongo fitopatógeno y en otra placa con agar nutritivo se estrió el aislado bacteriano. Las placas fueron contrapuestas y selladas. Ambas pruebas se incubaron a 28 °C por 5 d y se midió el crecimiento del hongo para determinar el porcentaje de inhibición. Los datos de inhibición se analizaron mediante una prueba de ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Dunnet ( $P \leq 0.05$ ) y Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los aislados con mayor actividad antagónica se identificaron mediante la secuenciación parcial del gen ADNr 16S. Los resultados mostraron al aislado BTZ-1 como el de mayor inhibición con 61.4% en el ensayo de antagonismo por compuestos difusibles, mientras que el aislado BTZ-17 alcanzó el 32.7% en la prueba de inhibición por COV. Estos aislados se identificaron como cepas pertenecientes al género *Bacillus*, asociados a *B. velezensis* y *B. halotolerans*, respectivamente. Estos recursos biológicos con actividad antagónica podrían en un futuro ser estudiados como una alternativa ecológica para reducir la aplicación de agroquímicos en el cultivo de jitomate.

# CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE .....</b>	<b>3</b>
2.1 Generalidades del jitomate .....	3
2.1.1 Características de la planta de jitomate y su cultivo.....	3
2.1.2 Panorama de la producción de jitomate .....	4
2.2 Principales plagas y enfermedades del jitomate .....	6
2.2.1 Plagas, virus y enfermedades que afectan al jitomate .....	6
2.2.2 Enfermedades fúngicas .....	8
2.3 Métodos de control de hongos fitopatógenos.....	9
2.3.1 Métodos de manejo agronómico .....	9
2.3.2 Métodos agroquímicos.....	10
2.3.3 Métodos biológicos.....	11
2.4 Bacterias rizosféricas como agentes de biocontrol .....	12
2.4.1 Entorno y beneficios de las bacterias rizosféricas .....	12
2.4.2 Microbiología general.....	14
2.4.3 Identificación de bacterias rizosféricas.....	16
2.5 Mecanismos de biocontrol.....	19
2.5.1 Resistencia sistémica inducida y adquirida.....	19
2.5.2 Antibiosis .....	20
2.5.2.1 Compuestos orgánicos volátiles .....	21
2.5.2.2 Compuestos solubles .....	23
2.5.3 Técnicas <i>in vitro</i> para comprobación de existencia de compuestos con actividad antagónica .....	25
2.5.4 Bacterias rizosféricas con actividad antagónica .....	27
2.5.5 Estudios de la actividad antagónica de bacterias rizosféricas contra hongos fitopatógenos .....	27
<b>3. MARCO CONCEPTUAL .....</b>	<b>31</b>
3.1 Originalidad.....	31
3.2 Justificación .....	31
3.3 Objetivos .....	32

3.3.1	Objetivo general .....	32
3.3.2	Objetivos específicos .....	33
3.4	Metas .....	33
3.5	Hipótesis.....	34
<b>4.</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>35</b>
4.1	Colecta de muestras para obtención de material biológico .....	35
4.2	Aislamiento y preservación de microorganismos.....	36
4.2.1	Preservación del hongo fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> .....	36
4.2.2	Aislamiento y preservación de bacterias rizosféricas.....	36
4.2.3	Caracterización morfológica y microscópica de los aislados bacterianos .....	36
4.3	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto del fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> en plantas de jitomate .....	37
4.3.1	Preparación de sustrato y semillas de jitomate.....	37
4.3.2	Preparación de solución de conidios.....	38
4.3.3	Siembra de semillas e inoculación del patógeno.....	38
4.3.4	Trasplante de plántulas e inoculación.....	39
4.3.5	Evaluación del daño en plantas de jitomate por <i>F. oxysporum</i> .....	41
4.4	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los aislados bacterianos contra el hongo fitopatógeno.....	41
4.4.1	Evaluación de la actividad antifúngica por compuestos orgánicos difusibles .....	41
4.4.2	Evaluación de la actividad antagonista de compuestos orgánicos volátiles .....	43
4.5	Identificación molecular de aislados rizosféricos con actividad antagónica.....	44
4.5.1	Extracción de ADN.....	44
4.5.2	Electroforesis en gel de agarosa .....	45
4.5.3	Amplificación del gen ADNr 16S .....	47
4.5.4	Digestión del gen amplificado por enzimas de restricción .....	49
4.5.5	Purificación del gen ADNr 16S.....	50
4.5.6	Secuenciación del gen ADNr 16S y análisis de las secuencias.....	50
4.6	Cinética de crecimiento microbiano .....	51
4.6.1	Cinéticas de crecimiento microbiano de rizobacterias identificadas.....	51
4.7	Análisis estadístico.....	52
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>53</b>
5.1	Hongo fitopatógeno y bacterias rizosféricas .....	53
5.1.1	Hongo fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	53
5.1.2	Bacterias rizosféricas .....	54
5.2	Caracterización morfológica colonial y microscópica.....	54
5.3	Evaluación <i>in vivo</i> del efecto del fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> sobre plántulas de jitomate .....	58

5.3.1	Prueba de patogenicidad de <i>F. oxysporum</i> en plantas de jitomate .....	58
5.4	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> .....	62
5.4.1	Antagonismo por compuestos difusibles de los aislados bacterianos rizosféricos .....	62
5.4.2	Actividad antagónica de COV secretados por las bacterias rizosféricas .....	64
5.5	Identificación molecular de aislados rizosféricos con actividad antagonista .....	67
5.5.1	Digestión por enzimas de restricción de los amplificados .....	69
5.5.2	Análisis de las secuencias .....	71
5.6	Cinética de crecimiento microbiano .....	77
5.6.1	Cinéticas de crecimiento microbiano de rizobacterias identificadas .....	77
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>82</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>84</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>98</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales países productores de jitomate a nivel mundial año 2020.....	4
Tabla 2. Principales estados productores de jitomate a nivel nacional. ....	4
Tabla 3. Fungicidas comerciales empleados para el control <i>Fusarium</i> spp. ....	11
Tabla 4. Solución nutritiva.....	41
Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del gen ADNr 16S .....	47
Tabla 6. Composición de la mezcla para la digestión enzimática del gen ADNr 16S. ....	49
Tabla 7. Clasificación y agrupamiento de bacterias rizosféricas aisladas a partir de rizosfera de plantas de jitomate sanas. ....	56
Tabla 8. Aislados bacterianos con mayor inhibición en pruebas <i>in vitro</i> .....	66
Tabla 9. Aislados bacterianos seleccionados para el proceso de identificación. ....	67
Tabla 10. Asociaciones de aislados con las secuencias depositadas en la base de datos EZBioCloud.....	71
Tabla 11. Procedencia y diversidad de los aislados bacterianos de muestras de rizósfera de plantas de jitomate sanas recolectada en la región de la Mixteca. ....	76
Tabla 12. Cuenta microbiana de aislados con mayor inhibición .....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales países exportadores de jitomate a nivel mundial.....	5
Figura 2. Formas y asociaciones de bacterias .....	15
Figura 3. Características morfológicas coloniales.....	16
Figura 4. Diagrama del procedimiento de identificación molecular por el gen ADN <sub>r</sub> 16S. ....	19
Figura 5. Diagrama de los diferentes grupos de compuesto orgánicos volátiles y difusibles .....	21
Figura 6. Ubicación geográfica de la colecta de plantas de jitomate. ....	35
Figura 7. Procedimiento de la siembra de las semillas de jitomate e inoculación de <i>F. oxysporum</i> .....	39
Figura 8. Trasplante e inoculación de <i>F. oxysporum</i> en plántulas de jitomate para evaluar su patogenicidad. ....	40
Figura 9. Diagrama del método de evaluación de la actividad antifúngica mediante compuestos difusibles.....	42
Figura 10. Diagrama del método cajas contrapuestas y selladas utilizada para las pruebas de antagonismo por compuestos volátiles.....	43
Figura 11. Unidad de electroforesis utilizada para la generación de los geles de agarosa .....	46
Figura 12. Fotodocumentador Fluor Shot Gel Documentation System .....	47
Figura 13. Termociclador 2720 Thermal Cycler.....	48
Figura 14. Características morfológicas del cultivo micelial de <i>F. oxysporum</i> .....	53
Figura 15. Ejemplificación de diversidad morfológica colonial de las rizobacterias de jitomate. ....	54
Figura 16. Ejemplificación de diversidad morfológica bacteriana de las rizobacterias de jitomate. ....	55
Figura 17. Aislados representativos de los morfotipos bacterianos con 24 h de crecimiento. ....	57
Figura 18. Ensayo de patogenicidad.....	59
Figura 19. Raíces de las plantas utilizadas en los ensayos de patogenicidad. ....	60
Figura 20. Crecimiento característico de <i>F. oxysporum</i> aislado de tejido de las raíces infectadas .....	62
Figura 21. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	63
Figura 22. Actividad antifúngica del aislado bacteriano BTZ-1 contra el hongo <i>F. oxysporum</i> .....	64
Figura 23. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno <i>F. oxysporum</i> .....	65
Figura 24. Comparación de la actividad antagonista por compuestos orgánicos volátiles .....	66
Figura 25. Imagen representativa de la electroforesis del ADN genómico .....	68
Figura 26. Imagen representativa de la electroforesis de los productos de la amplificación .....	69
Figura 27. Bando del análisis de enzimas de restricción por la enzima HAE III.....	70
Figura 28. Árbol filogenético construido por el método de Máxima verosimilitud. ....	75
Figura 30. Curvas de crecimiento microbiano de los aislados que mostraron mayor PI. ....	79
Figura 31. Celda de espectrofotómetro con biopolímero generado por la cepa <i>B. velezensis</i> (BTZ-1).....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
APD	Agar papa dextrosa
ARN	Ácido ribonucleico
COV	Compuestos orgánicos volátiles
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ESP	Exopolisacáridos
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LP	Lipopéptidos
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR	Rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas
PR	Péptidos ribosomales
PNR	Péptidos no ribosomales
RSA	Resistencia sistémica adquirida
RSI	Resistencia sistémica inducida
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBE	Tris-Borato-EDTA
UFC	Unidades formadoras de colonias

# 1. INTRODUCCIÓN

La producción de hortalizas, en especial el cultivo de jitomate, ha crecido en todo el mundo. En los últimos años, México se ha posicionado como uno de los principales productores a nivel mundial. De acuerdo a los datos de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), la producción de jitomate propicia una economía favorable para el país [1]. Sin embargo, la producción de jitomate se puede ver limitada por diversos factores, entre los de mayor gravedad se encuentran los ataques de plagas y enfermedades, lo cual reduce su rendimiento e incluso, en casos severos, puede llevar a la pérdida total de las cosechas [2].

Particularmente, se han reportado pérdidas importantes en cosechas de jitomate, generadas por el ataque de diversos patógenos como insectos plaga, bacterias, oomicetos y hongos. Entre las principales plagas que afectan el cultivo de jitomate destaca; la mosca blanca (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*) [3], la mancha foliar bacteriana que es causada por distintas especies de *Xanthomonas* [4] y los oomicetos como *Phytophthora infestans*. Especialmente los hongos fitopatógenos representan una causa importante de daño a estos cultivos. Entre ellos se incluyen a los hongos necrotróficos como *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani* y el hongo de la marchitez vascular *Fusarium oxysporum* [5]; este último, considerado uno de los de mayor importancia a nivel mundial, ya que puede ser altamente virulento afectando así cultivos protegidos y en parcelas. La devastación que provoca este fitopatógeno se ha informado en 32 países, entre los cuales, los más afectados son aquellos en los que predominan las zonas cálidas [6, 7].

El principal método para controlar a este fitopatógeno generador de pérdidas en los cultivos de jitomate, suele ser la aplicación de productos sintéticos como los fungicidas. Si bien, su uso ha permitido reducir la presencia de patógenos que afectan a los cultivos, mejorando los rendimientos agrícolas y las ganancias económicas, los efectos negativos que ha generado esta estrategia impactan de manera significativa en el ambiente y en la salud de los seres vivos en general. Adicionalmente, su uso indiscriminado ha potencializado la aparición de organismos resistentes a los productos sintéticos. Por esta razón, hay una demanda importante de la búsqueda de nuevas y mejores alternativas de control de plagas y enfermedades que permitan el desarrollo de una agricultura sustentable [8].

El uso de microorganismos rizosféricos como agentes de control biológico, es una estrategia cada vez más recurrente en la agroindustria moderna, puesto que han demostrado su potencial para

actuar como agentes de control de plagas y enfermedades en diferentes cultivos agrícolas. La mayoría de estos microorganismos rizosféricos son bacterias, las cuales presentan una acción antagonista hacia agentes fitopatógenos mediante el despliegue de diversos mecanismos, tales como: inducción de la resistencia sistémica, competencia incluyendo la competencia por nicho y por nutrientes, y la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Particularmente, este último tiene un papel relevante por la importante diversidad de compuestos antibióticos difusibles y volátiles que pueden producir, tales como lipopéptidos, cetonas, sulfuros etc., lo que implica bioactividad contra un amplio número de patógenos [9].

Existen diversos géneros de bacterias provenientes de la rizosfera que ejercen una actividad antagonista contra una serie de patógenos. Entre los géneros más relevantes se encuentra *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Azobacter*, *Streptomyces*, entre otros. Los reportes sobre la generación de antagonismo hacia diversos géneros de rizobacterias son extensos. Particularmente el género *Bacillus*, alberga un gran número de especies, muchas de ellas reportadas como eficaces colonizadores gracias a su capacidad de formar endoesporas y sintetizar metabolitos secundarios [10].

La propuesta de estudiar la capacidad de rizobacterias para su aplicación al cultivo del jitomate, toma relevancia dado que es un producto de gran importancia económica para México. Con base en lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo principal, evaluar e identificar la actividad biocontroladora de bacterias rizosféricas aisladas de cultivos de jitomate en la Región Mixteca, contra el hongo fitopatógeno del jitomate *Fusarium oxysporum* en ensayos *in vitro*, con la finalidad de identificar nuevos métodos potenciales para control de enfermedades que afectan la producción del cultivo de jitomate en esta región.

## **2. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE**

### **2.1 Generalidades del jitomate**

#### **2.1.1 Características de la planta de jitomate y su cultivo**

El jitomate (*Solanum lycopersicum L.*) perteneciente a la familia de las solanáceas, es una planta herbácea de tallo grueso y largo. Su fruto generalmente presenta coloraciones que van de amarillo a rojo, debido a la presencia de importantes pigmentos tales como el licopeno [11, 12].

Esta hortaliza puede ser cultivada en parcelas o por cultivo protegido. El cultivo por parcelas no cuenta con algún tipo de contención o sistema controlado en comparación de un cultivo protegido, el cual se lleva a cabo bajo cubierta y cuenta con varios dispositivos como sistema de ventilación, sistema de temperatura controlada, sistema de riego, entre otros. Estos dispositivos ayudan a desarrollar y a mantener las condiciones favorables para el cultivo entre los sistemas de cultivo de este tipo se encuentran los bioespacios, las casas sombra y los invernaderos [13]. Generalmente, el cultivo de esta hortaliza puede darse de manera favorable en zonas cálidas y templadas, con temperaturas óptimas que oscilan entre 26 y 28 °C, mientras que los climas húmedos con temperaturas muy altas y con humedades relativas superiores a 75%, son considerados poco apropiados para su desarrollo [1, 13].

Por su consumo, esta hortaliza es una de las más importantes en el mundo. Aunado a esto, uno de los aspectos de mayor relevancia de este alimento es su aporte nutricional; el jitomate aporta vitamina A y vitamina C, además es rico en diversos compuestos bioactivos en su mayoría antioxidantes [14]. En general, los antioxidantes se relacionan con la protección al daño oxidativo que sufren las células del ser humano [14, 15]. Particularmente, el licopeno es considerado el antioxidante más eficiente y abundante entre los carotenoides presentes en el jitomate [16]. La forma de consumo del jitomate es diversa; se puede consumir como fruta fresca o como ingrediente de diversos platillos alimenticios, además de formar parte de una gran variedad de productos procesados [17].

## 2.1.2 Panorama de la producción de jitomate

La producción de jitomate se ha incrementado de manera constante en las últimas décadas [17], de esta manera México se ha posicionado en el lugar número nueve entre los diez principales productores de jitomate a nivel mundial (Tabla 1) [1, 18].

Tabla 1. Principales países productores de jitomate a nivel mundial [18].

País productor	Producción (Ton)
China	61,523,462
India	19,377,000
E.U.A.	12,612,139
Turquía	12,150,000
Egipto	6,624,733
Irán	6,577,109
Italia	5,798,103
España	4,768,595
México	4,559,375
Brasil	4,110,242

La producción de jitomate en México cubre la demanda interna y las exportaciones. Hasta el año 2020, el estado de Sinaloa era el estado con mayor producción de jitomate a nivel nacional; su producción en ese año fue de 684,332 ton., lo que corresponde al 22.4% de la producción total del país (Tabla 2). Conforme a producción, el estado de Oaxaca se ubica en la posición número 13, aportando el 3.0% de producción de jitomate en México [11].

Tabla 2. Principales estados productores de jitomate a nivel nacional [11].

Estado	Producción (ton)	% de participación nacional
Sinaloa	684,332	22.4
San Luis Potosí	325,832	10.6
Zacatecas	234,878	7.7
Michoacán	211,683	6.9
Baja California Sur	159,220	5.2
Jalisco	155,794	5.1
Puebla	129,173	4.2

Morelos	127,081	4.2
Querétaro	125,323	4.1
Sonora	116,810	3.8
Resto	791,108	25.8

Según datos de la FAO, México es el exportador número uno de jitomate a nivel mundial, con un porcentaje de participación del 25% del valor de las exportaciones [11], la Figura 1 muestra la participación de los diez principales países exportadores de jitomate a nivel mundial [18]. Durante el año 2016, el jitomate mexicano cubrió poco más del 65 y el 90% de las importaciones de Canadá y Estados Unidos respectivamente; este último posicionado como el principal importador de esta hortaliza a nivel mundial. Entre algunos otros socios comerciales de México importadores de jitomate se encuentran: Japón, Cuba, Argentina, Costa Rica, El Salvador, Uruguay, Emiratos Árabes Unidos y Guatemala [11, 18].

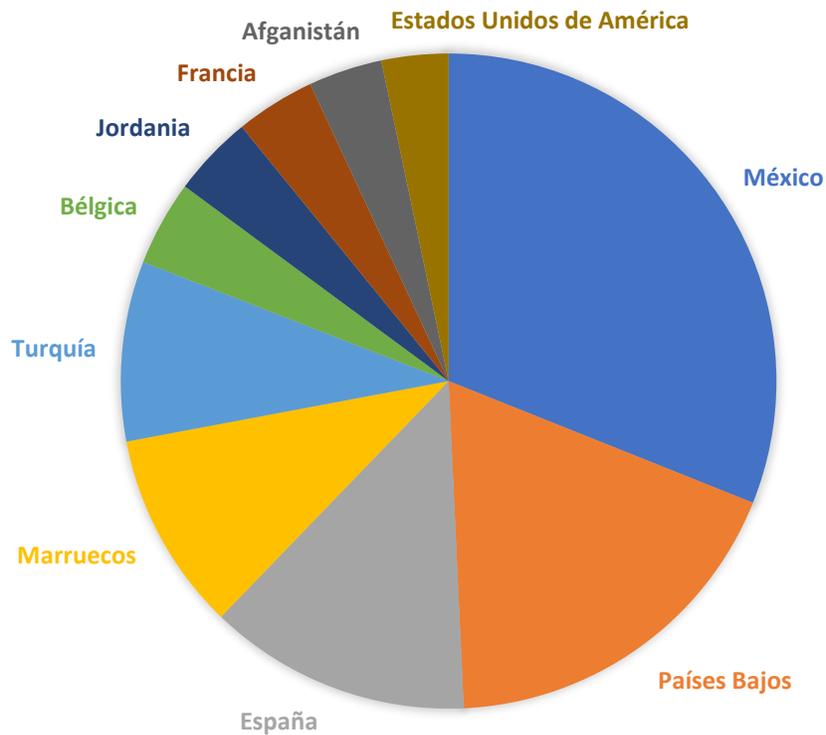


Figura 1. Principales países exportadores de jitomate a nivel mundial

Cabe resaltar que la productividad del cultivo en nuestro país se ha incrementado considerablemente. En el periodo comprendido entre 2003-2016 la producción de jitomate presentó un crecimiento acumulado del 54%, así como un incremento en las exportaciones en fresco del 77% [1]. En un panorama de desarrollo del mercado, se estima que para el 2030 la demanda mundial del jitomate mexicano aumentará de 8.9 a 11.8 millones de toneladas, equivalente a un crecimiento acumulado del 32%. Aunado a lo anterior, los expertos consideran que en México los sistemas de producción nacional de esta hortaliza tienen la capacidad de poder incrementar su producción de 3.4 a 7.6 millones de toneladas, lo que representaría un aumento acumulado de 125% [1, 11]. Esta situación abre un área importante de estudio relacionado con el desarrollo de tecnologías amigables con el medio ambiente que permitan alcanzar niveles de producción adecuados a las demandas nacionales y mundiales.

## **2.2 Principales plagas y enfermedades del jitomate**

Las plantaciones de jitomate son seriamente afectadas por diferentes plagas y enfermedades. El cultivo de esta hortaliza es susceptible a más de 200 enfermedades, ocasionadas principalmente por hongos, oomicetos, bacterias y virus transmitidos por insectos que fungen como vectores [19, 20]. El desarrollo de estas enfermedades puede ser causado por diversos factores; entre los cuales, uno de los más importantes lo constituyen las prácticas de agricultura intensiva, que incluye el empleo masivo de pesticidas y el uso de monocultivos. Estas prácticas promueven la aparición de enfermedades, dado que permiten la proliferación de patógenos al no interrumpir el ciclo de vida de estos [21, 22]. Otro factor importante es la contaminación química del suelo de cultivo, la cual es provocada por el uso indiscriminado de agroquímicos. La degradación del suelo que afecta la biodiversidad de los sistemas agrícolas, causando un desequilibrio en los mismos y afectando los ciclos biogeoquímicos lo que promueve una mayor incidencia de patógenos en los cultivos [8].

### **2.2.1 Plagas, virus y enfermedades que afectan al jitomate**

Entre los insectos plaga más relevantes y los que causan afectaciones severas en el cultivo de jitomate se encuentran, las moscas blancas *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*. Estos insectos utilizan la planta como fuente de alimentación, como lugar de refugio, apareamiento y oviposición, lo que puede generar grandes pérdidas económicas a los productores [23]. Además,

Los insectos son importantes vectores que transmiten virus y otras enfermedades [3, 23]. *B. tabaco* por ejemplo, tiene la capacidad de transmitir alrededor de 300 virus diferentes, entre los que se encuentra el virus rizado amarillo de la hoja del jitomate (TYLCV, por sus siglas en inglés) el cual se asocia con pérdidas importantes en el rendimiento de los cultivos de jitomate [23, 24]. Entre los virus más extendidos y de mayor relevancia se encuentran: el virus del mosaico del jitomate (TOMV, por sus siglas en inglés), el virus del marchitamiento manchado del jitomate (TSWV, por sus siglas en inglés) y TYLCV [19].

Por otro lado, entre las enfermedades más frecuentes y significativas generadas por bacterias en el cultivo de jitomate se encuentran: la mancha foliar bacteriana, provocada por tres principales especies, *Xanthomonas vesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri*; la peca bacteriana causada por *Pseudomonas syringae*; la marchitez bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*; y la úlcera bacteriana causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [4]. Esta última, ha sido reconocida como una enfermedad devastadora que provoca grandes pérdidas en el rendimiento de la producción de jitomate a nivel mundial [25]. En especial la marchitez bacteriana es considerada una de las enfermedades más graves en el cultivo de jitomate, la cual causa grandes pérdidas en el rendimiento de frutos. Esta generalmente se manifiesta en regiones tropicales, subtropicales y temperaturas cálidas [25].

En el caso de los oomicetos, estos puede atacar en cualquier etapa del desarrollo del cultivo y puede acabar con la producción de jitomate en tan solo unos pocos días después de su aparición [5]. Los oomicetos no pertenecen al grupo de los hongos dado que difieren de ellos en diversos aspectos, entre estas diferencias se encuentran; la composición de la pared celular y su conformación de esporas [26], por lo que son denominados pseudo hongos [27]. Un ejemplo claro en el caso de oomicetos es *Phytophthora infestans*, patógeno que provoca la enfermedad de tizón tardío. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por generar necrosis foliar, afectando también el tallo de la fruta hasta llegar a la pudrición y como consecuencia la muerte de la planta, ya que invade las raíces y el sistema vascular.

Otro grupo de patógenos que afecta al cultivo de jitomate son los nemátodos. Por ejemplo, el nemátodo *Meloidogyne* spp. puede infestar la planta generando la enfermedad llamada “nudo de la raíz”. En esta enfermedad, el nemátodo invade las raíces de la planta, provocando grandes pérdidas en el rendimiento del cultivo. Los nemátodos de los nudos de las raíces provocan también que las plantas sean más propensas a enfermedades provocadas por hongos y bacterias [28, 29].

### 2.2.2 Enfermedades fúngicas

Entre los fitopatógenos del jitomate, los hongos son los responsables de las principales enfermedades que afectan seriamente su producción [30]. Dentro de las enfermedades fúngicas se encuentran la generada por *Botrytis cinerea* la cual es conocida como “podredumbre gris o moho gris”. *Botrytis cinerea* se caracteriza por ser uno de los hongos necrotróficos más recurrentes y representativos en los cultivos. Está considerado como segundo lugar entre una lista de los 10 patógenos fúngicos más severos que afecta a diversos cultivos incluyendo al de jitomate [5]. El principal mecanismo de acción de este patógeno es la producción de compuestos fitotóxicos y enzimas, lo que genera la destrucción celular de la planta, dando lugar a la extracción de nutrientes y a la generación de conidios grises [5, 21].

Otro hongo fitopatógeno que afecta al jitomate es *Alternaria* spp. Este hongo está ampliamente distribuido en el aire y en el suelo, causando daños muy recurrentes en los cultivos de jitomate, así como en el procesamiento postcosecha. El hongo afecta en general las hojas, los tallos, las flores y los frutos de la planta de jitomate [31, 32]. La infección por este hongo se favorece en condiciones de alta humedad, y tiene la capacidad de infectar cualquier parte de la planta. Un claro ejemplo de fitopatógeno de este género es la necrosis causada por *Alternaria solani*, que produce la enfermedad del jitomate conocida como “tizón temprano”, una de las enfermedades más comunes y destructivas que afectan a esta hortaliza [5]. Los síntomas de esta enfermedad se manifiestan con manchas en las hojas y lesiones en el tallo, defoliación completa que puede llegar hasta la pérdida de la planta [5, 21, 30]. De manera similar *A. alternata* es uno de los principales hongos generadores de enfermedades en el jitomate, la cual puede presentarse tanto en el periodo de cultivo o después de su cosecha [33].

Diversas especies del género *Fusarium* suelen afectar también los cultivos de jitomate. Este patógeno se encuentra presente principalmente en el suelo y actúa penetrando en las raíces de la planta invadiendo su sistema vascular, lo cual genera debilitamiento de las partes aéreas, y eventualmente puede provocar la muerte de la planta [5]. Las enfermedades causadas por este patógeno, en especial la pudrición de corona y raíces además del marchitamiento ambas provocadas por *F. oxysporum*, son de gran relevancia en el cultivo del jitomate en todo el mundo por las grandes pérdidas que puede generar tanto en cultivos en invernadero como en parcelas [34, 35]. Algunos de los síntomas que presenta la enfermedad causada por *F. oxysporum* son la coloración amarillenta de la planta y del tallo por la parte interior, con lesiones tornándose a un color marrón las cuales se

extienden al sistema vascular [21, 35]. Este género constituye uno de los principales factores limitantes para la producción de jitomate [34, 35].

Existen reportes que indican altas pérdidas en los cultivos de jitomate sembrados en invernadero, señalando a *F. oxysporum* como el principal causante. En el año 2007, Túnez y Canadá reportaron pérdidas en un 90 y 95 % respectivamente. Adicionalmente, la enfermedad que provoca este patógeno se ha observado con una incidencia del 100% en los cultivos de Estados Unidos. Asimismo, en países como la India, las pérdidas de rendimiento causadas por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* alcanzaron hasta un 45% de la producción total en el año 2012 [35]. Además de esto, se tienen reportes de que al menos 32 países se han visto afectados gravemente por las enfermedades provocadas por *F. oxysporum*, siendo el marchitamiento la enfermedad más letal que enfrentan los cultivos de jitomate en todo el mundo [7].

## **2.3 Métodos de control de hongos fitopatógenos**

### **2.3.1 Métodos de manejo agronómico**

La incidencia de enfermedades causadas por microorganismos patógenos puede favorecerse por ciertos factores como las lluvias, el viento o las condiciones de manejo, tales como: una mala limpieza del área, prácticas de monocultivo, entre otras [13, 36]. En los cultivos establecidos en parcelas a cielo abierto, las posibilidades de controlar los factores que pueden desencadenar una enfermedad son más limitados en comparación con los cultivos protegidos, como aquellos que se realizan en invernadero, en donde existen más posibilidades de controlar estos factores, sin embargo, la pura estructura física de un invernadero no puede ser considerada como una barrera efectiva e impenetrable a las enfermedades. Es por esto que los agricultores deben tomar precauciones para reducir el riesgo de enfermedad del cultivo [13].

Dentro de las prácticas culturales, se debe considerar la distancia entre filas y plantas del cultivo para promover la ventilación. Adicionalmente, se debe evitar la presencia de humedad o rocío en las plantas; estas consideraciones pueden disminuir el riesgo de infecciones por patógenos dependientes del agua, como es el caso de algunas bacterias y de la mayoría de los hongos [21, 22]. En general todas las malezas pueden llegar a ser hospederos para insectos u hongos, por lo que se recomienda mantener el área de cultivo limpia y libre de maleza [22, 36]. Además de lo anterior, periódicamente se debe desinfectar la estructura del invernadero, así como las herramientas de

trabajo para evitar contaminación cruzada. Otra práctica muy utilizada es la rotación de cultivos, la cual permite la interrupción de los ciclos de propagación y adaptación de los patógenos al cultivo, y con esto producir la erradicación del organismo patógeno evitando su proliferación [21, 22]. En este sentido, es importante considerar que cuando los organismos patógenos encuentran un hábitat favorable para su crecimiento, éstos pueden incrementar su resistencia a los métodos químicos de control por lo que un buen manejo de los cultivos ayuda a prevenir enfermedades causadas por organismos fitopatógenos [13].

### **2.3.2 Métodos agroquímicos**

El uso de fungicidas sintéticos o químicos suele ser el método de control de hongos fitopatógenos más empleado [3, 8, 20]. Uno de los mecanismos de acción más importantes de estos agentes es la inhibición de la biosíntesis de esteroides, así como el embalaje de microtúbulos y de la cadena respiratoria mitocondrial [37]. Los fungicidas pueden clasificarse dependiendo de su modo de acción, como preventivos, curativos y erradicantes. Por lo general, los fungicidas de superficie o de contacto tienen un efecto preventivo, por lo que estos se aplican antes o al inicio de los síntomas de la enfermedad. Por otro lado, los fungicidas sistémicos pueden eliminar al hongo, penetrando en el tejido de la planta; es por esto que a estos tratamientos también se les denominan curativos. Adicionalmente, estos fungicidas evitan la formación de esporas lo cual contribuye a una acción erradicante del hongo fitopatógeno [38]. En la Tabla 3, se presenta un listado de los fungicidas convencionales más usados para el control de *Fusarium* spp.

El uso de agentes sintéticos ha sido utilizado como una técnica efectiva para mitigar a los patógenos que afectan los cultivos de jitomate, y de esta manera, esta práctica ayuda a incrementar su producción. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos agentes se ha asociado con efectos negativos importantes entre los que destacan: el riesgo de intoxicación del ser humano y animales [39], la inducción de resistencia en los organismos patógenos [7, 32, 37], la contaminación del suelo y de las aguas subterráneas, así como la interrupción de procesos de polinización y de control biológico natural [20]. De manera particular, se ha documentado en la literatura científica, que cada vez son más recurrentes los casos de hongos fitopatógenos que desarrollan resistencia a los fungicidas sintéticos comerciales, enfatizando la importancia de desarrollar estrategias alternativas al uso indiscriminado de fungicidas [5, 7].

Tabla 3. Fungicidas comerciales empleados para el control *Fusarium* spp [38, 40].

Nombre comercial	Ingrediente activo	Distribuidor
BENOMIL® 50 WP	Benomil	Coljap
BEZIL® 50 WP	Benomil	MK
BAVISTIN® 500 SC	Carbendazim	Basf
DEROSAL® 500 SC	Carbendazim	Bayer
SCORE 250® EC	Difenoconazol	Syngenta
MERTECT® 500 SC	Tiabendazol	Syngenta
RALLY® 40 WP	Myclobutanil	Dow AgroSciences
NATIVO® SC	Tebuconazole + trifloxystrobin	Bayer
ALIETE® 80 WG	Fosetilo aluminio	Bayer
TOPSIN® M 70WP	Tiofanato-metilo	Cerexagri-nisso

### 2.3.3 Métodos biológicos

En un sistema biológico existen continuas interacciones entre patógenos y antagonistas, de manera que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen las enfermedades en las plantas. En el caso de las plantas, en condiciones naturales, los microorganismos se encuentran en equilibrio. Sin embargo, cuando las poblaciones de organismos son reducidas debido a acciones naturales por los mismos que integran el sistema, el proceso se conoce como “control natural”. Ahora bien, la estrategia en la que se utilizan organismos para el control de patógenos en un cultivo agrícola es llamada control biológico o biocontrol. Este tipo de control es una alternativa útil para el control de enfermedades causadas por organismos fitopatógenos en los cultivos agrícolas [41].

Entre los métodos biológicos aplicados se encuentra la desinfestación anaerobia del suelo (DAS). Esta técnica consiste en aplicar materia orgánica para posteriormente regar la superficie del suelo y por último cubrir la superficie con mantillo de polietileno. La finalidad de este tratamiento es crear condiciones anaerobias que favorecen el crecimiento de microorganismos supresores de patógenos del suelo. La disminución en las poblaciones de patógenos fúngicos por esta técnica, se atribuye al conjunto de factores como altas temperaturas, condiciones anaerobias, generación de ácidos orgánicos (como ácido acético y ácido n-butírico), acumulación de compuestos volátiles y liberación de iones metálicos como  $Fe^{2+}$  [35]. El control y la supresión de enfermedades en plantas

mediante el uso de esta técnica también se atribuye a factores biológicos y al aumento en la población de microorganismos que suprimen a los patógenos favoreciendo un mecanismo de biocontrol [35].

Otra forma efectiva de control biológico es el antagonismo microbiano directo. El antagonismo microbiano está dado por el deterioro, muerte o inhibición de alguna especie de microorganismos por efecto de otro. Un gran número de microorganismos del suelo ejercen esta propiedad a favor de las plantas en contra de los patógenos [41]. Entre los grupos microbianos con estas cualidades se encuentran bacterias y hongos benéficos que actúan como agentes de control biológico [35]. Como ya se mencionó, dentro de estos microorganismos se encuentran las bacterias propias del suelo que se han denominado rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR, por sus siglas en inglés), las cuales favorecen el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos e indirectos. Estas bacterias actúan incrementando la disponibilidad de nutrientes en el suelo, regulando los niveles hormonales de las plantas y reduciendo la incidencia y severidad de enfermedades causadas por organismos patógenos [35, 42, 43].

## **2.4 Bacterias rizosféricas como agentes de biocontrol**

### **2.4.1 Entorno y beneficios de las bacterias rizosféricas**

El suelo alberga una gran diversidad de organismos entre los que se encuentran microorganismos, plantas y animales. Todos ellos coexisten formando una red interactiva, dinámica y compleja que cuando está en equilibrio ayuda a la supervivencia de las plantas [44, 45]. En particular, las comunidades microbianas del suelo, consideradas como la mayor reserva de diversidad biológica en el mundo, constituyen el componente biológico principal con el que las plantas viven en estrecha asociación [46].

Especialmente, existe un nicho ecológico llamado rizósfera, la cual comprende una zona estrecha que se encuentra presente alrededor de las raíces de las plantas. La rizosfera es rica en nutrientes gracias a la acumulación de exudados vegetales que contienen aminoácidos y carbohidratos [47]; estos nutrientes constituyen una fuente de energía importante para el reservorio de microorganismos que habitan en esta zona [39, 48]. Entre la amplia diversidad de microorganismos que habitan la rizósfera, existe particularmente un grupo de bacterias con cualidades benéficas; a estas bacterias se les denomina rizobacterias promotoras de crecimiento

vegetal (PGPR) [39, 42, 44, 47]. A estos microorganismos se les relaciona con la salud y la mejora en el crecimiento de las plantas, ya que promueven de manera directa o indirecta efectos positivos en ellas. Las PGPR intervienen de manera directa en interacciones planta-microbio, favoreciendo el crecimiento de la planta facilitándole a estas una mejor adquisición de nutrientes, a lo que se le llama actividad biofertilizante. Los mecanismos de biofertilización incluyen la fijación y nitrificación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y otros compuestos orgánicos, además de la producción de sideróforos para la adquisición de compuestos como el Fe [39, 43, 49]. Además de esto, las PGPR participan en la producción de fitohormonas, tales como el ácido indol acético (IAA, por sus siglas en inglés), giberelinas y citoquininas; proceso al que se le ha denominado bioestimulación [49]. Adicionalmente, a estas bacterias se les relaciona con la capacidad de coadyuvar en el fortalecimiento y crecimiento de las plantas al conferir una mayor resistencia al estrés abiótico y biótico. El primero puede ser provocado por cuestiones ambientales tales como sequía, salinidad, calor y temperatura, y el segundo por ataques de agentes dañinos como los microorganismos fitopatógenos [39, 50].

Aunado a lo anterior, algunas PGPR participan mediante medios antagónicos indirectos, promoviendo la supresión de patógenos mediante diversos mecanismos. Entre los mecanismos que originan este control biológico se incluyen: la competencia por los nutrientes y nicho, la resistencia sistémica inducida (RSI) y la producción de metabolitos antimicrobianos [43, 49–51]. Este último mecanismo ha sido ampliamente estudiado dado que estas bacterias son productoras de un extenso arsenal de metabolitos secundarios que pueden liberar en el espacio que habitan cuando éstas se ven amenazadas por otros microorganismos. Esta variedad de moléculas cumple con diversos roles, tales como: moléculas de fuentes de energía, transductores, moléculas de defensa (antibióticos difusibles y volátiles), entre otros. Todo esto en conjunto ayuda a generar un entorno supresor de enfermedades para el control de patógenos bacterianos y fúngicos en los suelos [39, 43, 52].

Si bien, las PGPR desempeñan un papel fundamental en la salud y productividad de las plantas, en ocasiones la planta no cuenta con esta microbiota [53]. La ausencia de esta microbiota beneficiosa puede deberse simplemente a que la planta nunca contó con ella o que la perdió por cuestiones adversas del medio, como la contaminación y degradación del suelo, generado en buena parte por las diversas prácticas antropogénicas aplicadas a la producción agrícola actual. Lo anterior ha provocado constantes perturbaciones que afectan a las comunidades microbianas, y

como consecuencia la supervivencia de las plantas y su productividad se han visto comprometida [54].

Por todo lo anterior, la inoculación de microorganismos como las PGPR en suelos carentes de las mismas, es una importante estrategia para lograr la sostenibilidad de los cultivos. El impacto de la inoculación de estas rizobacterias benéficas sobre las comunidades microbianas nativas y la eficiencia del crecimiento de las plantas está relacionado con el establecimiento de las PGPR introducidas, así como con su permanencia en la rizosfera, por lo que la aplicación abundante de estos inoculantes puede ayudar a garantizar el establecimiento de estas [54]. Además de los efectos benéficos que una inoculación de PGPR pueda aportar a la planta, el uso eficaz de esta práctica puede desencadenar en la reducción del uso o incluso la eliminación de agentes químicos como fungicidas y/o fertilizantes [55, 56].

## **2.4.2 Microbiología general**

El mundo microbiano por lo general invisible a simple vista es parte fundamental de nuestro medio ambiente. Los microorganismos han formado parte en gran medida de nuestro entorno y juegan un papel fundamental en la organización, funcionamiento y en la evolución de los ecosistemas y de otros organismos vivos. Además, estos han desarrollado mecanismos que les permiten adaptarse y enfrentar diversas condiciones extremas como pueden ser la temperatura, presión, pH, salinidad, etc. Debido a la importancia de los microorganismos en los ecosistemas y en las actividades del ser humano, la disciplina de la microbiología se ha encargado del estudio y la caracterización taxonómica de estos [57].

La vida se basa en unidades morfológicas llamadas células. Existen dos principales clasificaciones de células: eucariotas y procariotas. Las estructuras de estas células se encuentran entre los factores que se utilizan para clasificar a un organismo. Los organismos procariotas concentran a diversos tipos de bacterias, las cuales cuentan con estructuras relativamente simples. Sin embargo, aunque las bacterias son organismos unicelulares pueden asociarse formando filamentos o colonias. La forma, tamaño y asociación de las bacterias pueden ser diversos, en las formas se pueden encontrar esféricas (cocos), o en forma alargada (bacilos) rectos, curvos o en espiral, etc. (Figura 2) [57, 58].

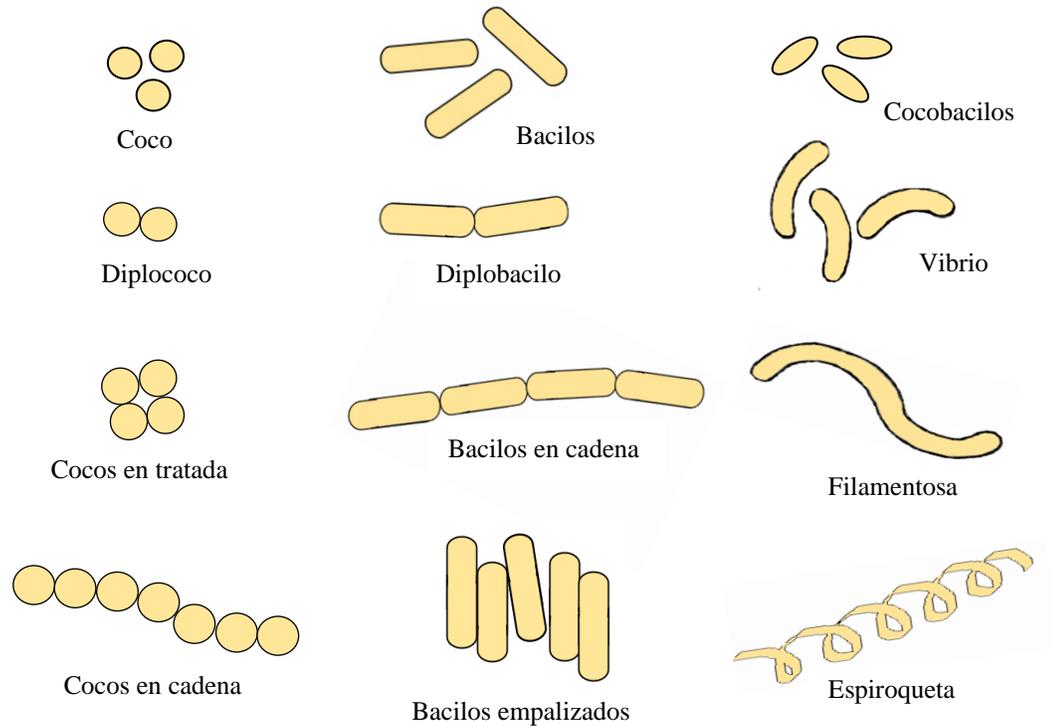


Figura 2. Formas y asociaciones de bacterias

(Figura de: Tlilayatzí-Bello)

La composición de la pared celular de las bacterias también es un factor importante para una clasificación relativamente sencilla. En base a este factor, se pueden diferenciar como bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, dependiendo de su tinción en la técnica llamada tinción de Gram. Esta técnica consiste en la tinción de las células, las cuales se encuentran fijadas a un portaobjetos por medio de calor [58]. La diferente afinidad de color que se observa en las bacterias se relaciona con las diferencias fundamentales en composición de la pared celular. En las bacterias Gram-positivas, que se tiñen de un color azul violeta, el peptidoglicano que integra la pared de estas bacterias es del 90%. En contraste, en las bacterias Gram-negativas el peptidoglicano solo representa el 10% de su pared [57].

La mayoría de las bacterias se reproducen por división celular y su ritmo de multiplicación suele ser rápido. Este crecimiento bacteriano se hace visible en forma de colonias constituidas por los descendientes de una o unas pocas células. Las características de las colonias pueden ser diversas, las hay de diferentes tamaños y formas que pueden variar dependiendo del género bacteriano [57, 58]. Existen diferentes formas de colonias bacterianas que pueden ir desde circular,

irregular o filamentosa, de bordes ondulados, redondeados, en tipo sierra o dentados. Otra característica de comparación colonial es el tipo de elevación, las cuales pueden ser: aplanada, convexa, umbilicada, acuminada, planoconvexa, entre otras. Los colores que las colonias pueden hablar de un microorganismo en particular, como es el caso del color característico de *Pseudomonas*. Además de esto, el comportamiento de la colonia ante la luz también es otra característica a tomar en cuenta; las apariencias pueden ser brillantes, opacas, translúcidas e incluso la formación de algún tipo de halo a contra luz. Otra característica importante es la consistencia; por ejemplo, las colonias mucoides pueden tener un aspecto acuoso y en algunos casos brillantes (Figura 3) [57, 59].

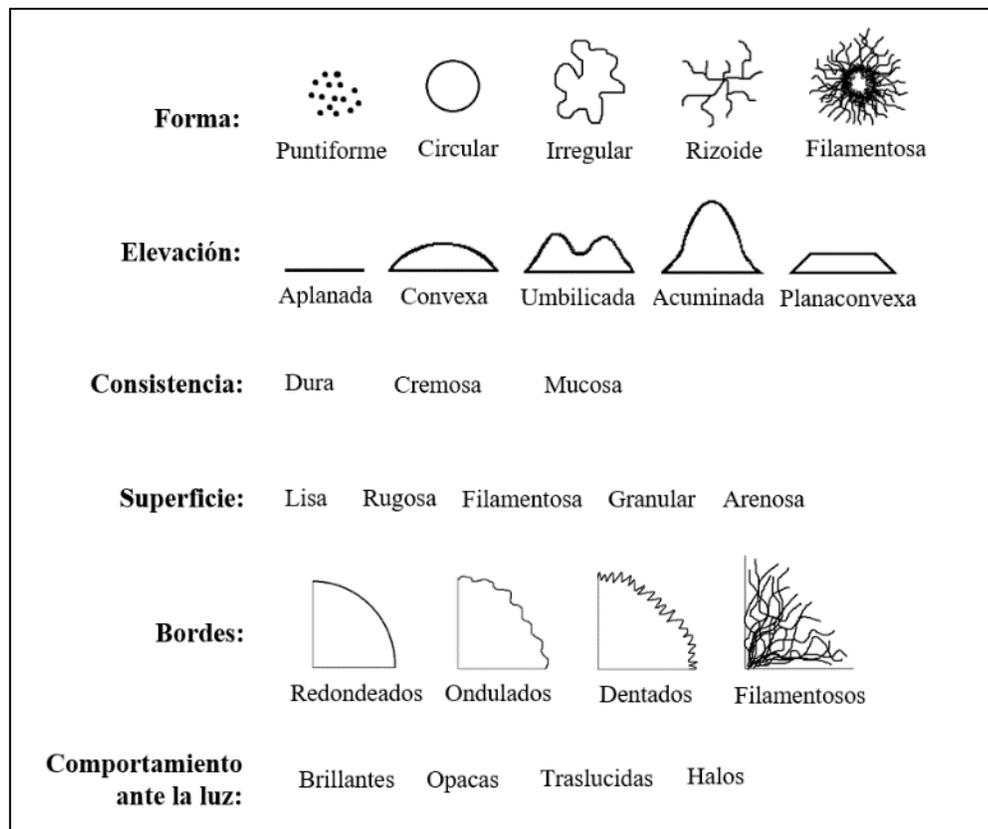


Figura 3. Características morfológicas coloniales [59].

### 2.4.3 Identificación de bacterias rizosféricas

Dado los beneficios que presentan un número importante de bacterias provenientes del suelo, es de gran relevancia e interés conocer la identidad de estos. La identificación de microorganismos

es una herramienta esencial en distintas áreas de interés. Una identificación rápida y exacta puede ser la clave para solucionar diversas problemáticas, desde identificar una contaminación microbiana, así como conocer a microorganismos antagonistas, identificar a microorganismos generadores de productos de interés biotecnológico, entre muchas otras [60].

Existen diversos métodos y técnicas que ayudan a identificar y caracterizar a estas bacterias. Entre las técnicas empleadas para una identificación bacterianas se encuentran: el análisis de las características fenotípicas, el crecimiento en medios selectivos y diferenciales, comparación de la morfología en tinción Gram, algunas pruebas bioquímicas convencionales o comerciales rápidas, métodos de espectrometría y técnicas moleculares [61].

En muchos de los casos, uno de los primeros pasos para la identificación microbiana comienza desde una evaluación fenotípica de la colonia. Cabe mencionar que utilizando los parámetros fenotípicos estándar como son color, la forma y el tamaño de la colonia, así como la morfología en la tinción Gram en muchas ocasiones se vuelve complejo, y por sí solas suelen ser poco confiables para tomar una determinación final [60, 61]. Sin embargo, estos parámetros pueden dar un panorama general y ayudan a generar una clasificación inicial si contamos con un gran número de aislados bacterianos [61].

En este mismo sentido, el análisis del crecimiento bacteriano en medios selectivos, las pruebas rápidas como la oxidasa, catalasa, coagulasa e indol proporcionan una identificación preliminar [61]. De las pruebas bioquímicas anteriormente mencionadas existen técnicas convencionales y pruebas rápidas comerciales. Particularmente estas últimas proporcionan una ventaja sobre los métodos convencionales, ya que requieren un espacio reducido para su almacenamiento y su vida útil generalmente es más prologada. Además, la forma de operar de estas pruebas suele ser relativamente sencillo y el tiempo para obtener un resultado es relativamente corto. Para el caso de las pruebas bioquímicas rápidas comerciales, estas ocupan una inoculación e incubación inmediata de una serie de reacciones bioquímicas en cantidades muy pequeñas. Su sistema se basa en la detección de enzimas o productos bacterianos, cuando no se requiere crecimiento bacteriano, o en su caso se basan en factores metabólicos cuando incluye crecimiento bacteriano. Sin embargo, y a pesar de todos los puntos a favor de estas pruebas aún tiene sus lados negativos, por ejemplo, este tipo de pruebas no son óptimas para todo tipo de microorganismos, como el caso de los de crecimiento lento [61, 62].

Existen métodos de identificación mucho más novedosos y sofisticados, entre los que se encuentran la espectrometría de masas (MALDI-TOF). Esta técnica se basa en la identificación del perfil proteico específico de cada bacteria, lo que representa un resultado con elevada fiabilidad [63]. Otra técnica en este sentido es la cromatografía de gases (GC), la cual tiene como objetivo el análisis de los ácidos grasos celulares de la bacteria. Estos ácidos son caracterizados tomando en cuenta las diferencias en su composición química [64]. Asimismo, existen reportes en los cuales la aplicación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) genera información complementaria útil para la identificación de un grupo de bacterias del mismo género [65]. El tiempo de identificación de estos métodos es relativamente corto; sin embargo, por ser equipos altamente especializados con los que no cuentan la mayoría de los laboratorios, el estudio suele ser costoso lo que hace que la prueba sea inaccesible para el uso en general [61, 63]. Otro desafío que presentan estos métodos son los problemas en relación a la insuficiencia de información en las bases de datos para estos métodos, cuando esto sucede se debe recurrir a herramientas moleculares los cuales brindan resultados más confiables [62, 66].

Entre los métodos de identificación bacteriana más utilizados se encuentran las técnicas moleculares. El análisis comparativo de las secuencias de nucleótidos del gen ADN ribosómico 16S (ADNr 16S), es una de las técnicas más empleadas en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. El ADNr 16S es un polirribonucleótido conformado de 1,500 pares de bases (pb) aproximadamente, y es considerado la diana universal para la identificación bacteriana [67]. Esta molécula se encuentra en los ribosomas, orgánulos complejos encargados de la síntesis de proteínas, específicamente en una pequeña subunidad (30S) de este orgánulo. El análisis de las secuencias de ADNr 16S de distintos grupos filogenéticos proporciona un dato importante, la presencia de una o más secuencias características llamadas oligonucleótidos firma. Estas secuencias cortas específicas aparecen en todos o en la mayoría de integrantes de un determinado grupo filogenético, y nunca o rara vez están presentes en otro grupo [68]. Es por ello por lo que además de ser muy confiable, permite determinar la afiliación genérica de bacterias de diversos grupos.

La identificación por el método molecular se lleva a cabo conforme a las siguientes etapas (Figura 4): 1- Extracción de ADN genómico y total; 2- Amplificación del gen ADNr 16S; 3- Secuenciación del amplicón y 4- Análisis de la secuencia [60, 68].

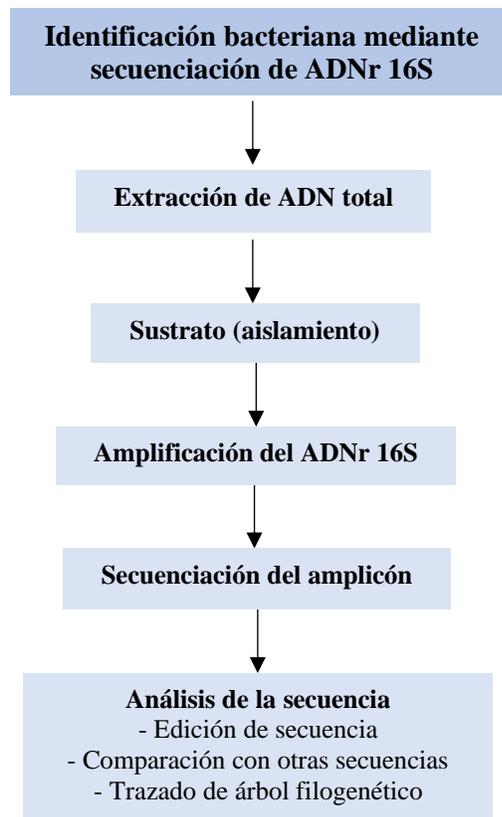


Figura 4. Diagrama del procedimiento de identificación molecular por el gen ADNr 16S [68].

## 2.5 Mecanismos de biocontrol

### 2.5.1 Resistencia sistémica inducida y adquirida

Ante el ataque de patógenos, las plantas evolutivamente han desarrollado sistemas de defensa innatos a través de los cuales adquieren un estado de mayor capacidad de defensa creado por un estímulo previo [35, 69]. En caso de que una planta haya sobrevivido a un estímulo externo generado por algún patógeno, incluso por un microorganismo benéfico, la planta adquiere la capacidad para protegerse de un próximo ataque, esto es debido a que este primer ataque “inmuniza” a la planta contra ataques posteriores. Lo anterior ocurre porque el microorganismo patógeno o benéfico induce en la planta una serie de reacciones de resistencia contra los subsiguientes ataques o daños que estos puedan causar. A este estado se le conoce como resistencia inducida [70].

Generalmente la resistencia suele ser sistémica; es decir, la capacidad defensiva aumenta no solo en las partes afectadas, sino que se expande a toda la planta a través de compuestos que actúan

como moléculas de señalización [71]. La resistencia sistémica adquirida (RSA), la cual se activa por la exposición de la planta a inductores abióticos, así como a microorganismos patógenos [35] y la resistencia sistémica inducida (RSI), en el cual las plantas cuyas raíces han sido previamente expuestas y colonizadas por cepas específicas, particularmente especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, estas plantas desarrollan una forma de protección similar denominada RSI [35, 70].

### **2.5.2 Antibiosis**

La antibiosis es uno de los mecanismos clave del biocontrol, llevado a cabo por algunas rizobacterias, este consiste en la inhibición de patógenos mediante la secreción de productos del metabolismo secundario, los cuales cuentan con diversas propiedades fisicoquímicas y biológicas que cumplen con la acción de inhibir. Estos metabolitos son secretados de manera extracelular por el antagonista bacteriano [7, 50]. Los productos generados son muy variados e incluyen compuestos orgánicos volátiles (terpenoides, compuesto de nitrógeno y azufre, ácidos grasos, entre otros) [48, 72] y compuestos solubles con actividad biológica (enzimas, proteínas, compuestos tóxicos y antibióticos por mencionar algunos) [10, 48, 73] (Figura 5). Se ha reportado en la literatura que estos compuestos son perjudiciales para el desarrollo de las actividades metabólicas de los microorganismos patógenos, incluso a bajas concentraciones [7, 74].

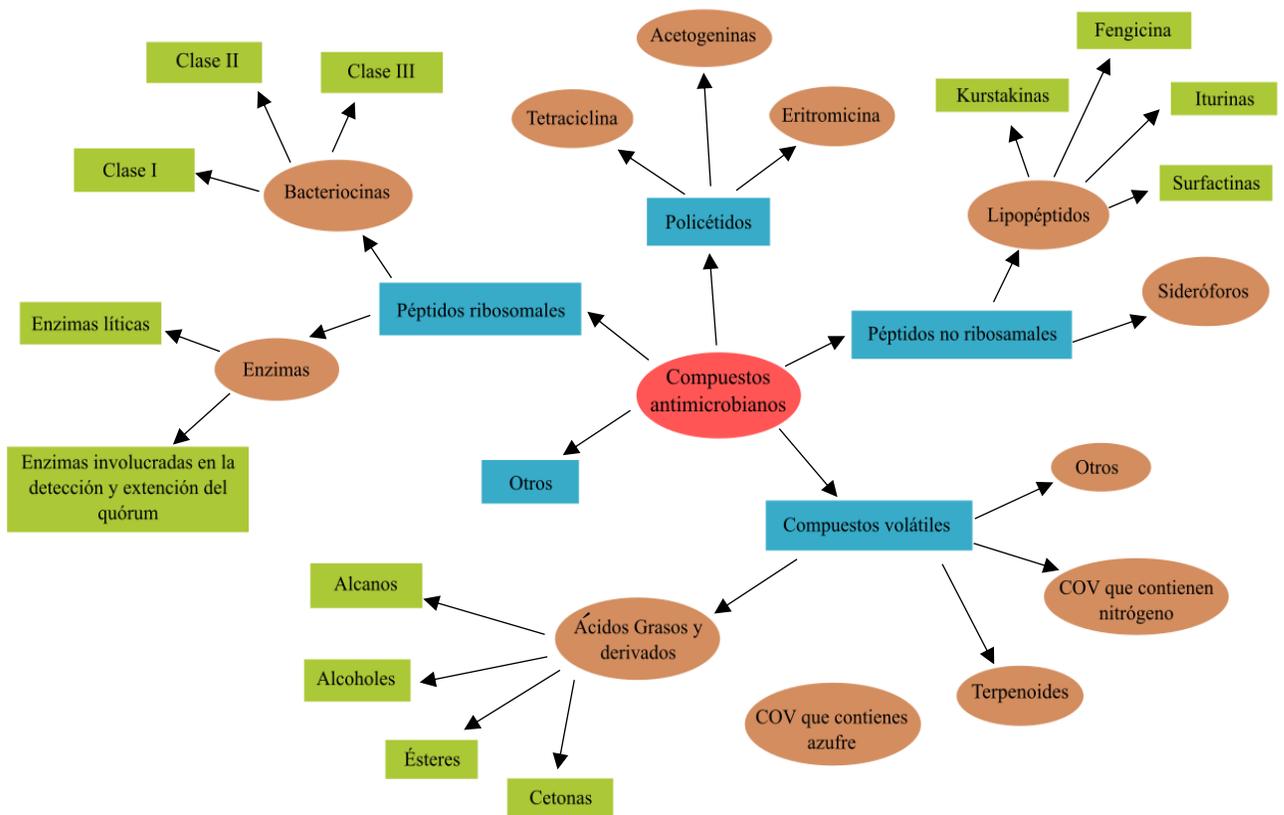


Figura 5. Diagrama de los diferentes grupos de compuesto orgánicos volátiles y difusibles generados por bacterias del suelo, especialmente por bacterias del género *Bacillus* [10].

### 2.5.2.1 Compuestos orgánicos volátiles

Las rizobacterias tienen la capacidad de liberar en su entorno compuestos orgánicos volátiles (COV). Estos compuestos son pequeñas moléculas (<300 Da) que tienen diversas composiciones químicas [10]. Esas características les confieren la capacidad de volatilizarse y de esta manera difundirse fácilmente a través de la red de poros del suelo [48, 75]. La cualidad gaseosa de estos compuestos hace posible su transporte a través de distancias más largas en comparación con los compuestos solubles, de esta manera, estos compuestos desempeñan un rol importante en las interacciones microbianas a larga distancia [72, 76]. Entre los compuestos volátiles ampliamente reportados en la literatura se encuentran los ácidos grasos, los COV nitrogenados, azufrados y los terpenoides [10, 75]. De hecho, en investigaciones realizadas en relación con estos compuestos, se tiene registro de aproximadamente 2,000 compuestos provenientes de cerca de 1000 especies de

microorganismos. Adicionalmente, de los registros de los COV generados por bacterias del género *Bacillus*, se ha reportado que el 70% son derivados de ácidos grasos (alcoholes, cetonas, alcanos, aldehídos, alquenos y ácidos), seguido por compuestos que contienen nitrógeno y azufre [10].

Entre los COV que contienen nitrógeno se encuentran las pirazinas, uno de los más secretados por una gran variedad de bacterias del suelo y son de gran importancia entre los volátiles microbianos por su elevado potencial antimicrobiano. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Chondromyces* y *Streptomyces* son géneros comúnmente reportados, capaces de sintetizar pirazinas. Diversos reportes indican que *Bacillus subtilis* sintetiza pirazinas con actividad antifúngica y nematocida, además de producir otros COV de nitrógeno como 1-etil-1H-imidazol, compuesto que ha mostrado actividad antifúngica contra diversos patógenos del suelo que afectan a las plantas [10, 48].

Por otra parte, los compuestos volátiles que contienen azufre tienen gran diversidad estructural. Es por esta cualidad que estos compuestos volátiles juegan un papel muy importante en las interacciones microbio-microbio y microbio-planta. Entre las diversas estructuras de estos compuestos podemos encontrar el disulfuro de dimetilo (DMDS), el cual afecta de forma importante en el crecimiento de hongos fitopatógenos [77], además de estar reportado como estimulador del crecimiento bacteriano [48, 73].

Otro grupo de compuestos volátiles son los terpenos. Estos compuestos son mejor conocidos como los metabolitos vegetales, aunque en realidad son producidos por todos los organismos vivos. Los compuestos terpénicos encontrados en la naturaleza ascienden a más de 25,000. Estos compuestos volátiles son conocidos por su inhibición de bacterias, hongos y de algunos otros organismos. El modo de acción de estas moléculas puede estar relacionado con su condición lipofílica, lo que confiere la capacidad de desestabilizar la estructura de la membrana celular [48]. Particularmente, aunque los terpenos de procedencia bacteriana se conocen desde hace años, aún falta tener un mayor conocimiento de las funciones o el rol que estos cumplen [10].

Los compuestos volátiles derivados de ácidos grasos son los más diversos. Se tienen registros de que poco menos del 70 % de los COV producidos por *Bacillus* se derivan de ácidos grasos. Esto se debe a que muchos de estos compuestos provienen de la glucólisis, lo que genera una gran variedad de compuestos [10]. Por ejemplo, *B. subtilis* fermenta piruvato para dar paso a compuestos cetónicos como acetoína (3-hidroxi-2-butanona). Algunos otros compuestos como los que provienen de la biosíntesis de ácidos grasos, generando hidrocarburos y algunos derivados de ácidos grasos, mediante una reacción de descarboxilación o una reducción de su grupo carboxilo.

La producción de cetonas, aldehídos y alcoholes proviene de la desaminación oxidativa de aminoácidos. La degradación de L-tirosina o L-fenilalanina pueden dar paso a la síntesis de compuestos aromáticos volátiles, tales como benceno [10, 75]. Por todo lo anterior, los ácidos grasos volátiles constituyen el grupo de mayor importancia de COV sintetizados por microorganismos. Como un caso muy particular, *B. subtilis* es la bacteria de mayor eficiencia para la producción de estos compuestos, ya que el 87 % de los COV antimicrobianos conocidos son producidos por microorganismos de esta especie [10].

### **2.5.2.2 Compuestos solubles**

En comparación con los compuestos volátiles, los compuestos solubles secretados por las bacterias tienen alta polaridad, lo que los hace altamente solubles en agua. A pesar de que el área de difusión de estos compuestos suele ser más limitada que los COV, éstos presentan mayor potencial antimicrobiano [48]. Dentro de los compuestos producidos por algunas rizobacterias que afectan el crecimiento de fitopatógenos, se encuentran los pertenecientes a los policétidos, bacteriocinas, enzimas, antibióticos, compuestos nitrogenados, siderofóros y lipopéptidos [49, 74].

Las bacterias son capaces de sintetizar ribosómicamente una gran variedad de enzimas, las cuales presentan actividad antimicrobiana. Las actividades metabólicas que muestran este tipo de compuestos son muy diversas. Entre las de mayor relevancia se encuentran la generación de lisis celular o la inducción de la competencia genética [10]. En cepas del grupo de *B. subtilis* se han identificado enzimas líticas y las involucradas en la detección y extinción del quórum, por lo que son consideradas como enzimas con actividad con potencial para el biocontrol [10]. Entre estas enzimas se incluyen las glucanasas, proteasas, quitinasas, celulasas, particularmente activas contra los hongos, ya que son capaces de degradar la pared celular de hongos fitopatógenos [10, 74].

Entre la extensa lista de compuestos solubles con potencial de biocontrol existen también péptidos no ribosomales (PNR). Estos compuestos son sintetizados por enzimas péptido sintetasas no ribosomales (PSNR) y conforman una familia versátil de metabolitos secundarios. Los PNR pueden ser estructuralmente muy diversos, ya que pueden presentar estructuras lineales, cíclicas e incluso ramificadas [10, 48]. Entre esta clase de compuestos se encuentran los denominados policétidos. Estos compuestos son sintetizados por los complejos enzimáticos policétidos sintetasas y generados por diversos géneros de bacterias tales como *Pseudomonas*, *Myxococcus*, *Bacillus* entre otras [10, 48]. Una gran cantidad de los productos naturales con actividades biológicas son

policétidos, tal es el caso de la eritromicina y tetraciclina, antibióticos policétidos de importancia médica [78]. Otro policétido de alto valor es el 2,4 diacetilfloroglucinol [48], secretado por especies de *Pseudomonas*, con gran potencial de actividad biocontroladora [7, 39].

Por otra parte, en condiciones de limitación de hierro algunos microorganismos producen sideróforos, estos compuestos son quelantes de hierro de bajo peso molecular que intervienen en la solubilización, transporte y almacenamiento de este microelemento [48, 50]. La producción de estos valiosos compuestos puede generar un efecto antagonista al reducir la presencia del hierro asimilable que se encuentra en el suelo, disminuyendo su disponibilidad para otros organismos. *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* son algunas bacterias productoras de sideróforos [48]. Un ejemplo de la producción de estos compuestos es el sideróforo bacilibactina producido por *B. subtilis*, que ayuda a evitar el crecimiento de *F. oxysporum* en cultivos de pimientos [10]. Además de esto, el género *Pseudomonas* ha mostrado resultados satisfactorios en la producción de sideróforos contra el hongo fitopatógeno de jitomate *F. oxysporum* [79].

En este mismo sentido, otros compuestos que tienen gran importancia por su versatilidad estructural y su actividad antimicrobiana son los lipopéptidos (LP). Los LP se componen de una cola lipídica unida a un oligopéptido lineal o cíclico, lo que les confiere una propiedad anfifílica [10, 73]. Estos compuestos pueden diferir en la longitud y composición de la cadena de ácidos grasos, así como en el número, tipo y configuración de los aminoácidos presentes en la fracción peptídica. Estas características les proporcionan a los LP una gran diversidad tanto estructural como funcional [73]. Debido a lo anterior, estos compuestos además de tener propiedades anfifílicas, propiedad que los convierte en excelentes tensoactivos [10], también son resistentes a la hidrólisis por peptidasas, insensibles a la oxidación y estables a temperaturas relativamente altas [80]. Para el caso de bacterias del género *Bacillus* sp., los lipopéptidos más representativos se pueden clasificar en cuatro familias de acuerdo a su configuración de aminoácidos: kurstakinas [10], surfactinas, iturinas (micosubtilina, iturina A y bacilomicina) y fengicinas [81].

Gracias a su gran diversidad, los lipopéptidos tienen distintos objetivos de antibiosis de acuerdo con su actividad antimicrobiana. Un ejemplo de esto es la micosubtilina, compuesto similar a la iturina y la bacilomicina, que muestran propiedades antimicrobianas, en comparación de las surfactinas que han mostrado actividad contra virus envueltos [10]. Las iturinas y fengicinas; las cuales son conocidas principalmente por su actividad antifúngica contra una diversa gama de patógenos vegetales, donde el género *Bacillus* se ha reportado como uno de los principales grupos

bacterianos productor de estos compuestos. Entre estas especies se encuentran; *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* y *B. velezensis*, entre muchas otras [10, 82, 83].

Los lipopéptidos actúan principalmente desestabilizando las membranas celulares de los microorganismos objetivo, mediante la formación de poros o canales que conlleva a la permeabilización de la membrana, fuga de electrones y finalmente a la muerte celular [10, 73]. Estos compuestos también actúan en la actividad biocontroladora por medio de mecanismos como la formación de biopelículas en la superficie de las raíces, que sirven como protección contra patógenos [42, 43], y como medio de colonización de las raíces [10]. De manera particular, se ha reportado que las bacterias que sintetizan lipopéptidos muestran buenos resultados de antagonismo en contra de hongos fitopatógenos. Para el caso de estos fitopatógenos, algunas de las anormalidades que presentan las hifas fúngicas cuando se ejerce biocontrol por estos compuestos incluye ampollas, hinchazones, ramificaciones excesivas y anormales. Aunado a esto, estos compuestos inhiben la producción, liberación y germinación de esporas. Entre los reportes de hongos fitopatógenos que sufren daños por este tipo de compuestos se encuentran *B. cinérea*, *A. brassicae*, *P. capsici*, *F. oxysporum*, entre otros [73].

### **2.5.3 Técnicas *in vitro* para comprobación de existencia de compuestos con actividad antagónica**

El interés en el aprovechamiento de los microorganismos con la finalidad de generar un ambiente supresor para los fitopatógenos dio paso a diversos métodos de comprobación del antagonismo. Además de la identificación y caracterización morfológica de los microorganismos existen pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, las cuales ayudan a la búsqueda de microorganismos antagonistas. El principal objetivo de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* es proporcionar una proyección confiable sobre la respuesta de los microorganismos a una actividad antimicrobiana, tomando en cuenta que una actividad antimicrobiana está dada por la inhibición, deterioro o muerte de una especie de microorganismo por la acción de otro microorganismo. Técnicamente, en estas pruebas se lleva a cabo la confrontación de microorganismos en diversos medios de crecimiento, dependiendo la naturaleza de los que integran la confrontación [73, 84, 85].

Idealmente las pruebas *in vitro* deberán ser simples, reproducibles, rápidas y económicas [84, 85]. Existen diversas pruebas, algunas de las cuales se han adecuado a las diferentes necesidades

de investigación. Entre las pruebas antimicrobianas se encuentra la técnica por difusión en medio sólido o cultivo dual, esta técnica consiste en la co-inoculación de los microorganismos a confrontar, colocados a cierta distancia en el mismo medio, proporcionándole condiciones óptimas para su desarrollo. Conforme a lo anterior, si el microorganismo de prueba sintetiza compuestos difusibles antimicrobianos, estos migraran por el medio interactuando con la zona del microorganismo confrontado. De esta manera, que si alguno de ellos es supresor del microorganismo confrontado, se observará una zona de inhibición, siendo el diámetro proporcional a la susceptibilidad de los compuestos antimicrobianos. El resultado de lo anterior indica la presencia de compuestos solubles secretados por alguno de los microorganismos [73, 85].

Otra técnica de susceptibilidad antimicrobiana es la dilución del microorganismo a probar en un medio de cultivo, puede ser medio líquido o medio sólido. El microorganismo antimicrobiano es incorporado previamente al medio de cultivo. En el caso de medio de cultivo sólido, el agente se agrega antes de que solidifique el medio y una vez esto el microorganismo de prueba se puede aplicar en pozos realizados en el medio o en la superficie de la placa [41, 86]. De manera muy similar, la dilución en medio líquido consistirá en la inoculación del patógeno en el medio enriquecido con el agente antimicrobiano. Para esta última prueba es de mayor importancia las concentraciones de los dos componentes en el medio [85, 86]. En ambas pruebas, el crecimiento del microorganismo patógeno dependerá de la inhibición que ejerza el microorganismo de prueba, es de esta manera como se puede observar la susceptibilidad antimicrobiana [87].

Dada la necesidad de encontrar microorganismos con los mayores beneficios antimicrobianos, se desarrollan pruebas como la confrontación de microorganismos en placas contrapuestas selladas. Esta prueba tiene como objetivo la búsqueda de microorganismos generadores de compuestos volátiles con efecto antimicrobiano. El principio de esta técnica es tener, en diferentes placas, a los agentes a confrontar. Debido a ello, los microorganismos son inoculados en bases de placas Petri, una para cada microorganismo. Una vez esto, las placas se contraponen y sellan herméticamente proporcionándole las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos. Debido al sistema hermético y a que los microorganismos probados no tienen contacto directo, el efecto antimicrobiano dependerá de los compuestos volátiles sintetizados. Si el efecto existe, habrá una inhibición en el crecimiento del microorganismo patógeno influenciado por estos compuestos [72, 88, 89].

#### **2.5.4 Bacterias rizosféricas con actividad antagónica**

En la literatura se han reportado diversos géneros de bacterias rizosféricas que presentan actividad biocontroladora contra serie de fitopatógenos, ejerciendo además un beneficio en las plantas como promotoras de crecimiento vegetal. Entre los géneros bacterianos más importantes se pueden mencionar *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Azosprillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobia*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Sinorhizobium*, *Sphingomonas*, *Streptomyces* y *Variovorax* [50]. Particularmente, los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, han sido ampliamente estudiados por su eficiencia en el control de agentes fitopatógenos en los que se incluyen a los hongos filamentosos, que como ya se mencionó anteriormente, constituyen uno de los grupos principales causantes de enfermedades en los cultivos de jitomate [90].

El género *Bacillus*, por ejemplo, incluye especies colonizadoras eficaces, ya sea del suelo o de la rizósfera [9]. Esta característica se debe a la enorme capacidad de estas bacterias para formar endoesporas, a su diversidad fisiológica y a su compleja capacidad para sintetizar diversos metabolitos secundarios que favorecen su proliferación [10]. El complejo de *B. subtilis* está constituido por un grupo de especies del género *Bacillus*, las cuales son las más aplicadas en contra de enfermedades de plantas, gracias a su amplia diversidad de metabolitos secundarios; se conoce que el 4-5% de su genoma está dirigido a la producción de antibióticos [10, 90].

#### **2.5.5 Estudios de la actividad antagónica de bacterias rizosféricas contra hongos fitopatógenos**

En los últimos años ha aumentado la investigación orientada a la búsqueda de nuevas y mejores alternativas para el combate de fitopatógenos en los cultivos, siendo la actividad biocontroladora de rizobacterias una de las más prometedoras en este sentido y ha sido demostrada previamente en diversos reportes. En un estudio realizado por Guevara-Avenidaño *et al.* [91], observaron que bacterias rizosféricas del género *Bacillus* presentaron actividad antifúngica en ensayos *in vitro* contra los hongos *Fusarium* spp. y *Graphium* spp., responsables de la muerte de árboles de aguacate. Los resultados mostraron una inhibición de hasta un 46%, concluyendo que

estos resultados se atribuían a la producción de compuestos bacterianos difusibles con actividad antifúngica. En otro estudio, Guevara-Avenida *et al.* [72], evaluarón el efecto antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles generados por las rizobacterias de aguacate en contra de *F. solani* y patógenos asociados a *Fusarium* sp. Además de obtener los perfiles volátiles generados por las rizobacterias de prueba, se concluyó que siete rizobacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* presentaron una inhibición mayor al 20%, por lo que fueron tomadas en cuenta para próximas pruebas contra otros fitopatógenos que afectan al cultivo de aguacate.

Moreno-Tolosa *et al.* [92], aislaron y caracterizaron bacterias provenientes de cultivos de uchuva con actividad antagonista contra *F. oxysporum*. Realizaron caracterizaciones conforme a su morfología colonial, tinción de Gram y pruebas bioquímicas convencionales. Los aislados bacterianos fueron probados *in vitro* por cultivo dual para evaluar su actividad antagonista, teniendo como resultado que 24 de los aislados probados presentaron porcentajes de inhibición por encima del 30%. Dos de los veinticuatro aislados, identificados como *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. mostraron la mejor actividad de inhibición con 80.6 y 79.9% respectivamente.

De manera similar, Calvo *et al.* [90] probaron el potencial antagonista de una cepa de *B. amyloliquefaciens* contra *B. cinérea*, *Monilinia fructicola*, *M. laxa*, *Penicillium digitatum*, *P. expansum* y *P. italicum*, patógenos que afectan a los cultivos de naranja, manzana y uva posterior a la cosecha. Se utilizaron cultivos duales como pruebas de inhibición, utilizando células, endoesporas y sobrenadantes de cultivos líquidos de *B. amyloliquefaciens*. Los resultados arrojaron que la *B. amyloliquefaciens* fue capaz de inhibir el crecimiento de todos los patógenos fúngicos, mostrando porcentajes de inhibición de hasta el 100%.

En el caso específico del cultivo de jitomate, existe también un amplio registro de estudios en el mismo sentido. Ramírez-Cariño *et al.* [93], estudió *in vitro* e *in vivo* la efectividad biocontroladora de las cepas *B. paralicheniformis* y *Trichoderma asperelloides* contra los patógenos *F. oxysporum* y *A. alternata*, causantes de importantes enfermedades en la planta de jitomate. Para las pruebas *in vitro* los autores utilizaron cultivos duales, y microscopía electrónica de barrido para evidenciar la interacción entre los agentes. Para las pruebas *in vivo* se realizaron tratamientos por agente antagonista y en conjunto, reportando una reducción en la severidad de la enfermedad hasta en un 53.8 % para el caso de *A. alternata*, y un 66.7% para *F. oxysporum* en las plantas de jitomate. Las pruebas también arrojaron buenos resultados cuando los agentes biocontroladores se emplearon en conjunto.

Mohammed *et al.* [94], evaluaron la actividad biocontroladora *in vitro* de 52 bacterias aisladas de las raíces de plantas de jitomate contra *F. oxysporum*. Los autores reportaron que sólo dos de las 52 bacterias aisladas presentaron antagonismo en contra de hongos fitopatógenos, siendo éstas *P. fluorescens* y *B. subtilis*. Además de esto, los autores demostraron que las dos cepas con actividad antifúngica también favorecieron el crecimiento de la planta.

Dias *et al.* [43], evaluaron la capacidad de seis cepas de *Streptomyces* spp. para promover el crecimiento y modular el metabolismo relacionado con la defensa de las plantas de jitomate contra *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*. Usando pruebas *in vitro*, por cultivo dual, los autores determinaron que cuatro de las seis cepas causaban inhibición de fitopatógenos, asimismo demostraron que los aislados bacterianos probados eran capaces de producir sideróforos, solubilizaban fosfato y además eran productores de compuestos orgánicos volátiles, lo que contribuía al crecimiento de la planta.

Hammami *et al.* [95], evaluaron *in vitro* por cultivos duales 12 aislados rizosféricos pertenecientes al género *Pseudomonas* en contra de tres fitopatógenos *Sclerotinia sclerotiorum*, *F. solani* y *A. alternata*, causantes de diversas enfermedades en cultivos de jitomate y pimiento. Los aislados se obtuvieron del suelo de plantas sanas de estos cultivos en diversas regiones de Túnez. Adicionalmente, los autores realizaron pruebas sobre la eficiencia de los aislados como promotores de crecimiento, utilizando pruebas como la producción de sideróforos.

Syed-ab-rahman *et al.* [96] reportaron la aplicación de cepas *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* y *Acinetobacter* sp. como agentes de biocontrol contra *Phytophthora capsici*, oomiceto causante de la pudrición de raíz en el jitomate. Los agentes de biocontrol se aplicaron en semillas, antes y después de la infección, con una suspensión bacteriana de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Se llevaron a cabo dos tratamientos. En el primer tratamiento el inoculo bacteriano se aplicó previo a la exposición del patógeno, mientras que, en el segundo el inoculo bacteriano se aplicó posterior a la exposición al patógeno. Los autores concluyeron que existe una mejora significativa en el crecimiento de la planta y una reducción de la carga del patógeno en las raíces de las plantas de jitomate. Considerando lo anterior, los autores confirmaron la naturaleza biocontroladora de estas cepas.

Gowtham *et al.* [97] caracterizaron y evaluaron 10 cepas de rizobacterias antagonistas del fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Dos de las cepas identificadas como *B. amyloliquefaciens* mostraron una mayor supresión del fitopatógeno, con 31 y 28% de inhibición. Asimismo, en el estudio se concluyó que los aislamientos bacterianos probados resultaron positivos

para la colonización de las raíces de las plantas, dando como resultado la solubilización del fosfato y la producción de antifúngicos. Finalmente, los autores reportaron que la presencia de estas rizobacterias aumentó el vigor de la planta y mejoró su crecimiento.

## **3. MARCO CONCEPTUAL**

### **3.1 Originalidad**

Una de las principales actividades económicas en la región de la Mixteca Oaxaqueña es la agricultura. Sin embargo, la siembra de hortalizas tanto en parcelas como en invernadero se ve afectada por diversos agentes fitopatógenos, entre ellos, los hongos. Una alternativa para el control de estos agentes puede ser el aprovechamiento del microbiota rizosférica nativa, especialmente las rizobacterias beneficiosas, las cuales al estar adaptadas a las condiciones ambientales atmosféricas y del suelo, pueden representar ventajas potenciales en control de los fitopatógenos. Sin embargo, poco se sabe de los patógenos que afectan la producción agrícola en la región, al igual que se desconoce el potencial de las rizobacterias nativas para actuar como agentes de control biológico. Es por esto por lo que realizar un estudio enfocado en el aislamiento e identificación de rizobacterias beneficiosas de la región, puede ampliar el conocimiento entorno al aprovechamiento de las rizobacterias nativas para el control de fitopatógenos. Con este trabajo se busca sentar bases para estudios posteriores, enfocados en el desarrollo de estrategias ecológicas para el control de patógenos agrícolas en la región Mixteca.

### **3.2 Justificación**

El jitomate es una de las hortalizas más cultivadas y consumidas en el mundo. Una de las razones de su valoración es por su aporte nutricional, ya que contiene vitaminas y metabolitos como el licopeno el cual se relaciona con efectos benéficos a la salud. Por otra parte, su cadena de valor representa altos ingresos económicos para nuestro país debido a que México se ha posicionado como uno de los productores más importantes a nivel mundial, ocupando el noveno lugar en el año 2020. Así también, México se posicionó como el principal exportador de jitomate a nivel mundial, siendo Canadá y Estados Unidos sus principales socios comerciales.

Sin embargo, considerando que el jitomate se cultiva de forma intensiva, este se ve seriamente amenazado por la presencia de fitopatógenos. Particularmente, los hongos filamentosos del género *Fusarium*, figuran entre los fitopatógenos que generan mayores pérdidas en la productividad de dicho cultivo a nivel mundial. Debido a esto, es de suma importancia dedicar esfuerzos científicos y tecnológicos que permitan a disminuir la ocurrencia de enfermedades

fúngicas en el cultivo de jitomate. Por décadas, estos tipos de agentes patogénicos han sido controlados con métodos que implican el uso de fungicidas sintéticos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha generado la contaminación de los suelos y del agua, así como el daño a la salud de las personas que consumen el jitomate y de las que se exponen a estos productos. El uso masivo de estos fungicidas también ha propiciado la aparición de hongos fitopatógenos resistentes a estos mismos tratamientos, del mismo modo han degradado el suelo afectando su biodiversidad. Por este motivo, no solo se requieren estrategias para maximizar la producción de jitomate, es una necesidad urgente desarrollar estrategias nuevas, eficientes y amigables con el medio ambiente que generen cultivos saludables.

Diversos estudios han reportado que algunos microorganismos como las bacterias que habitan en la rizósfera actúan como agentes de control biológico contra patógenos responsables de importantes enfermedades en los cultivos. De tal forma que su uso y aprovechamiento puede ayudar a la reducción en el uso de fungicidas sintéticos en los sistemas agrícolas.

Dadas las proyecciones a futuro, la cuales indican un incremento importante en la demanda de jitomate en México y considerando todo lo anterior, el presente trabajo representa la búsqueda de una alternativa biotecnológica para el control de enfermedades a través de un método amigable con el medio ambiente y la salud humana. Por ello consideramos que, el estudio de la actividad biocontroladora desplegada por bacterias nativas de la región Mixteca sobre patógenos causantes de enfermedades de jitomate, constituyen un aporte relevante en el desarrollo de estrategias sustentables en el cultivo de este producto.

### **3.3 Objetivos**

#### **3.3.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad antagónica de bacterias rizosféricas mediante pruebas inhibitorias *in vitro* por compuestos difusibles y volátiles contra el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* que afecta al jitomate.

### 3.3.2 Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar bacterias de la rizosfera de plantas de jitomate, cultivadas bajo condiciones de invernadero y parcelas a cielo abierto.
2. Evaluar *in planta*, la patogenicidad del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (H8UTM).
3. Evaluar *in vitro* la actividad antagonista de compuestos difusibles y volátiles secretados por bacterias rizosféricas seleccionadas contra el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (H8UTM).
4. Identificar mediante la secuenciación parcial del gen ARN ribosomal 16S las bacterias rizosféricas que presenten mayor actividad antagonista contra *F. oxysporum* (H8UTM).
5. Caracterizar la cinética microbiana de los aislados bacterianos previamente identificados que presentaron mayor potencial antagónico en las pruebas *in vitro*.

### 3.4 Metas

#### Para el objetivo específico 1 las metas son:

- 1.1. Aislamiento de bacterias rizosféricas de plantas de jitomate cultivadas en invernadero y parcelas a cielo abierto.
- 1.2. Caracterización y clasificación por morfotipos de las bacterias rizosféricas aisladas.

#### Para el objetivo específico 2 las metas son:

- 2.1. Preparación de material, siembra y monitoreo de plantas de jitomate en invernadero de la Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- 2.2. Evaluación de la patogenicidad de *F. oxysporum* en plantas de jitomate.

#### Para el objetivo específico 3 las metas son:

- 3.1. Evaluación *in vitro* de la actividad antagonista de los aislados rizosféricos contra *F. oxysporum* mediante el ensayo de cultivo dual por el mecanismo de compuestos orgánicos difusibles.
- 3.2. Evaluación *in vitro* de la actividad antagonista de los aislados bacterianos contra *F. oxysporum* mediante el ensayo en cajas contrapuestas y selladas por el mecanismo de compuestos orgánicos volátiles.
- 3.3. Selección de los aislados con mayor actividad antagónica en ambas pruebas *in vitro* contra *F. oxysporum*.

**Para el objetivo específico 4 las metas son:**

- 4.1. Obtención de ADN genómico de las bacterias previamente seleccionadas.
- 4.2. Amplificación del gen ADN 16S por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.
- 4.3. Análisis de los genes amplificados por enzimas de restricción.
- 4.4. Secuenciación del gen ADN 16S ribosomal de los aislados bacterianos.
- 4.5. Capacitación para el análisis de las secuencias ADN 16S y construcción del árbol filogenético por los programas BioEdit y MEGA.

**Para el objetivo específico 5 las metas son:**

- 5.1. Cultivo de los aislados de mayor inhibición en medio líquido de las bacterias previamente seleccionadas.
- 5.2. Monitoreo del crecimiento máximo mediante mediciones de absorbancias.
- 5.3. Conteo bacteriano de los puntos de crecimiento exponencial.

### **3.5 Hipótesis**

Las rizobacterias aisladas de plantas de jitomate cultivadas en la región de la Mixteca, secretan compuestos difusibles y volátiles capaces de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Colecta de muestras para obtención de material biológico

La cepa del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* (H8UTM), que se utilizó en este trabajo fue proporcionada por la Dra. Thalía Isolda Ramírez Reyes y la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, profesoras investigadoras de la Universidad Tecnológica de la Mixteca. Esta cepa fue aislada de un invernadero ubicado en San José de la Pradera, Oaxaca, a partir de plantas de jitomate enfermas con síntomas de enfermedad por *F. oxysporum*.

La colecta del suelo rizosférico se llevó a cabo en cultivos de jitomate de invernadero y cultivo en parcelas, en el mes de noviembre de 2018, en el Rancho “Los Hernández”, ubicado en Santiago Huajolotitlán, Huajuapán de León, Oaxaca. La ubicación geográfica del sitio de colecta se observa en la Figura 6, con coordenadas Latitud: 17°49'35" N Longitud: 97°43'5" W.

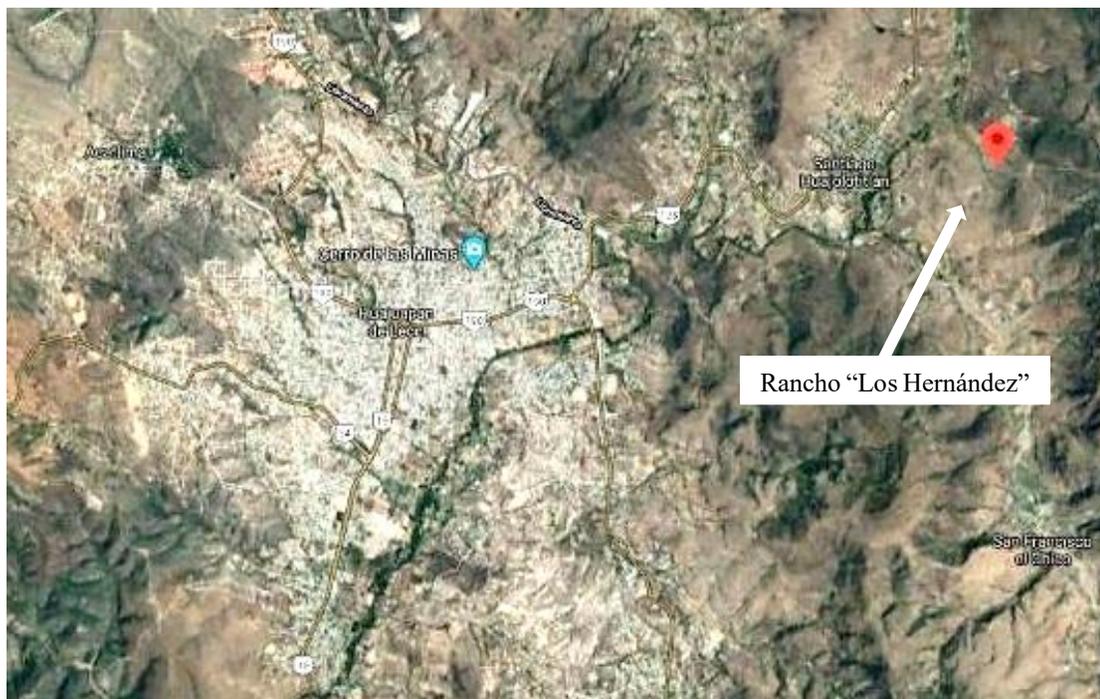


Figura 6. Ubicación geográfica de la colecta de plantas de jitomate.

(Imagen Tomada de Google Maps.)

## **4.2 Aislamiento y preservación de microorganismos**

### **4.2.1 Preservación del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum***

La cepa *F. oxysporum* (H8UTM), se reactivó en placas con medio de cultivo agar papa dextrosa (APD). Para ello, con ayuda de una aguja de disección estéril se tomó un pedazo del crecimiento micelial periférico y se colocó en el centro de una placa estéril. Las placas se incubaron a 28 °C por 7 d. La cepa fúngica se sembró periódicamente y se mantuvo en refrigeración a 4 °C. Siguiendo el procedimiento anterior la cepa fueron preservadas en tubos inclinados con glicerol estéril al 30% a una temperatura de -20 °C.

### **4.2.2 Aislamiento y preservación de bacterias rizosféricas**

El aislamiento de las bacterias rizosféricas se llevó a cabo de la siguiente forma; se tomó 10 g del suelo cercano a la raíz (suelo rizosférico) de plantas sanas de jitomate sembradas en invernadero y parcelas, aproximadamente de 5 a 10 cm de profundidad. A partir de 1 g de suelo se realizaron diluciones seriadas en agua pasada por ósmosis estéril. Se tomaron alícuotas de 100 µL de las diluciones de  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  y se sembraron en agar nutritivo marca BD Bioxon. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se seleccionaron las distintas morfologías coloniales y se resembraron por estriado en AN hasta la obtención de cultivos puros. Los aislados fueron resembrados periódicamente y conservados en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Adicionalmente, los aislados fueron preservados en glicerol al 30% a una temperatura de -20 °C.

### **4.2.3 Caracterización morfológica y microscópica de los aislados bacterianos**

La caracterización microscópica se realizó con cultivos bacterianos cultivados en medio AN con un tiempo de desarrollo de 24 h. A cada aislado bacteriano se le realizó un frotis. Posteriormente se realizó una tinción de Gram, la cual consiste en la aplicación de colorantes y enjuagues en el frotis. Para esta técnica se utilizaron los siguientes reactivos: cristal violeta, lugol, alcohol y safranina (Anexo A). Por último, se procedió a la observación microscópica a 100X en un microscopio óptico compuesto (AmScore, EUA). De esta manera y a partir de esta caracterización los aislados se clasificaron en bacterias Gram-positivas o negativas, esta técnica permitió observar mejor su morfología y arreglo celular [98, 99]. Posteriormente se registraron las

características para cada aislado en base en los criterios establecidos en la Figura 3 [59]. En función de estos parámetros se realizó la clasificación de los aislados por morfotipos.

### **4.3 Evaluación *in vivo* del efecto del fitopatógeno *F. oxysporum* en plantas de jitomate**

Con la finalidad de evaluar la patogenicidad del hongo *F. oxysporum* (H8UTM), se realizaron pruebas en plantas de jitomate. Para lo cual se ocuparon semillas de jitomate “El Cid F1” (Harris Moran®, México), esta variedad fue seleccionada porque es utilizada comúnmente por productores de la región Mixteca.

#### **4.3.1 Preparación de sustrato y semillas de jitomate**

**Preparación de sustrato.** La mezcla de sustrato utilizada consistió en vermiculita: peat moss (40:60%). El sustrato fue esterilizado en bolsas de plástico a 121 °C durante una hora y media. Para el trasplante de las plántulas de jitomate a bolsas de polietileno de 1.5 kg, se utilizó como sustrato una mezcla de 60% composta y 40% de tierra lama, la cual también se esterilizó a 121 °C por 1.5 h.

**Conos de germinación.** Para la germinación de las semillas de jitomate se utilizaron conos forestales de germinación de 20 cm x 4 cm, los cuales fueron lavados con jabón y agua. Posteriormente, fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% por 24 h. Transcurrido este tiempo, los conos se enjuagaron con agua de garrafón y se escurrieron para posteriormente dejarlos secar para su llenado.

**Desinfección y lavado de semillas.** Las semillas fueron desinfectadas sumergiéndolas en un matraz con 30 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 1%, por un tiempo de 5 min con agitación a 150 rpm. Posteriormente, se retiró la solución de hipoclorito de sodio y se agregaron 60 mL de agua destilada estéril, se colocó en agitación a 150 rpm por 10 min. Este último procedimiento se repitió dos veces más, para asegurar el lavado de las semillas. Finalmente, las semillas fueron puestas en una placa de Petri que contenía papel filtro estéril y se dejaron secar en la campana de flujo laminar [100].

### 4.3.2 Preparación de solución de conidios

**Preparación de solución de conidios de *F. oxysporum*.** Para preparar el inóculo de conidios a partir de *F. oxysporum*, se sembraron 17 cajas de Petri con el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* incubándolas a 28°C por 10 d, de acuerdo con el procedimiento descrito en la Sección 4.2.1. Una vez transcurrido el tiempo de desarrollo del hongo, se agregó 20 mL de agua destilada estéril a cada caja con crecimiento fúngico y se realizó un raspado con una espátula estéril; esto con la finalidad de desprender la mayor parte de conidios. Esta suspensión se llevó a agitación a 150 rpm por 45 min a 28 °C, en una incubadora con agitación orbital. Posteriormente, la suspensión se filtró a través de gasas estériles para eliminar el micelio suspendido. Por último, la concentración de la suspensión de conidios fue cuantificada con una cámara de Neubauer (Anexo B) y ajustada a una concentración de  $1.4 \times 10^7/\text{mL}$  [101].

### 4.3.3 Siembra de semillas e inoculación del patógeno

**Siembra.** Cada cono forestal fue llenado con 50 g de sustrato. Los conos con sustrato se regaron con agua potable estéril a capacidad de campo. A continuación, se sembró una semilla por cono con apoyo de unas pinzas estériles. Se seleccionaron aleatoriamente 20 conos para el control y 20 conos para el tratamiento con el hongo de prueba. Con ayuda de una pipeta estéril se vertió 10 mL de agua destilada estéril al control, mientras que al tratamiento se le vertió 10 mL de suspensión de conidios. Los conos se mantuvieron a temperatura ambiente y con fotoperiodos de 16 h luz/8 h oscuridad, con acceso a la luz solar. A partir del segundo día de la siembra, los conos se regaron con 5 mL de agua potable estéril hasta su germinación.

Una vez germinadas las plantas, se llevaron al invernadero de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM), y se regaron diariamente con agua potable; se monitoreó la temperatura y la humedad con ayuda de un termohigrómetro digital Dostmann 30.5000.02 (TFA, Alemania) y la radiación fotosintéticamente activa (PAR, por sus siglas en inglés), con ayuda de un piranómetro Lightscout (Spectrum Technologies Inc., E.U.A.). Al cabo de 15 d después de la germinación, se inoculó nuevamente el sustrato con una suspensión de conidios con una concentración similar a la primera; esto con la finalidad de promover la infección del patógeno en la plántula (Figura 7).

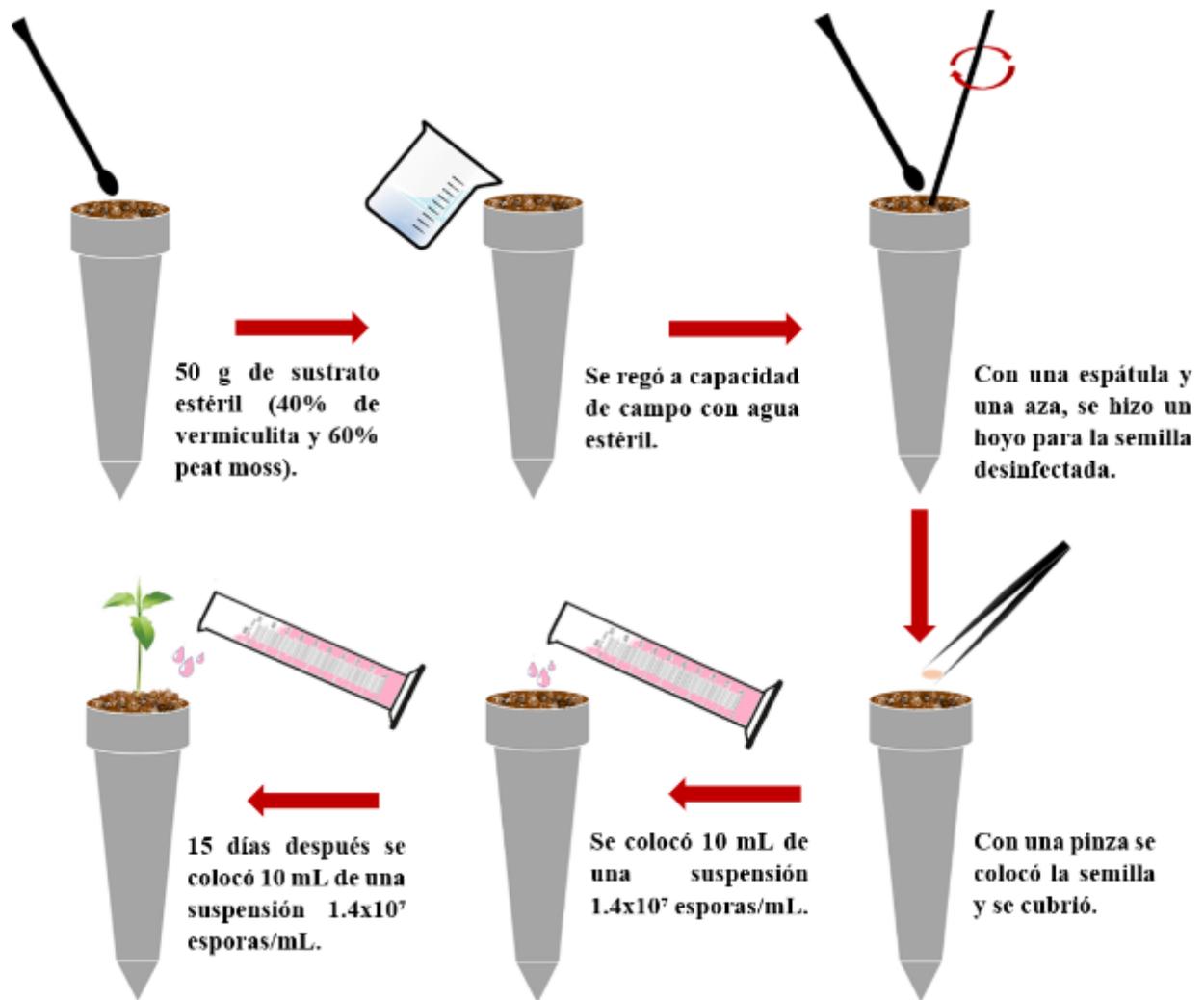


Figura 7. Procedimiento de la siembra de las semillas de jitomate e inoculación de *F. oxysporum* para evaluar su patogenicidad en plántulas de jitomate (Figura de: Tlilayatzí-Bello)

#### 4.3.4 Trasplante de plántulas e inoculación

**Trasplante de plántulas y re-inoculación de *F. oxysporum*.** Las plantas de jitomate fueron trasplantadas 35 d después de la germinación. Para ello, en bolsas de polietileno se colocó 1.5 kg de sustrato previamente esterilizado y se regó a capacidad de campo con agua potable estéril antes del trasplante. Por otro lado, las plantas de jitomate se removieron de los conos de germinación con mucho cuidado y las raíces fueron enjuagadas en dos ocasiones con agua estéril para desprender la mayor cantidad de sustrato. Con ayuda de una jeringa estéril se realizaron 5 punciones a lo largo

de la raíz principal. Inmediatamente después, las raíces heridas se sumergieron por 5 min en una solución de conidios con concentración similar a las dos soluciones de conidios usadas anteriormente en la etapa de crecimiento en conos de germinación. Para asegurar que la solución cubriera completamente la raíz de la planta se utilizaron 40 mL de solución por cada 4 plantas. Transcurrido el tiempo de exposición a la solución, se trasladaron a las bolsas con sustrato estéril. Para finalizar, se regó el sustrato con 20 mL de la suspensión de conidios, (Figura 8). A partir del día siguiente del trasplante, las plantas se regaron con agua potable.



Figura 8. Trasplante e inoculación de *F. oxysporum* en plántulas de jitomate para evaluar su patogenicidad.

(Figura de: Tlilayatzí-Bello)

Con la finalidad de proporcionar los elementos necesarios para el desarrollo y crecimiento de las plantas, se les adicionó a éstas una solución nutritiva con la formulación que se muestra en la Tabla 4 [102], de la cual se aplicaron 50 mL de la solución nutritiva cada 48 h [100].

Tabla 4. Solución nutritiva.

Componente	Cantidad (g/100 L de agua)
Nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	98.918
Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4$	49.494
Nitrato de potasio $\text{KNO}_3$	9.126
Fosfato monopotásico $\text{KH}_2\text{PO}_4$	13.608
Urea	26.000

#### 4.3.5 Evaluación del daño en plantas de jitomate por *F. oxysporum*

Transcurridos 25 días después del trasplante, se evaluó el daño en las plantas de jitomate. El daño se determinó por la marchitez de la planta o la necrosis en raíz y cuello (presencia/ausencia), en comparación con el control. Con la finalidad de confirmar la presencia del patógeno *F. oxysporum* en las plantas de jitomate, se sembraron partes del tejido vegetal con daños en placas de APD y se incubaron a 28 °C hasta su desarrollo. El mismo procedimiento se realizó con tejido de plantas no infectadas [100].

### 4.4 Actividad antifúngica *in vitro* de los aislados bacterianos contra el hongo fitopatógeno

#### 4.4.1 Evaluación de la actividad antifúngica por compuestos orgánicos difusibles

La evaluación de la actividad antagónica *in vitro* por acción de compuestos orgánicos difusibles se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Guevara-Avenidaño *et al.* [91], el cual consistió en la confrontación de aislados bacterianos contra el hongo fitopatógeno *F. oxysporum*. Previo a la prueba, los aislados bacterianos y *F. oxysporum* se cultivaron como se describió en la Sección 4.2. Posteriormente, se tomó un disco micelial de 5 mm de diámetro a partir del borde del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno, con ayuda de un perforador de corcho estéril. El disco micelial se colocó en el centro de una placa con medio APD estéril. Con un palillo estéril, se tomó una colonia de los aislados bacterianos y se inocularon a una distancia de 1.5 cm

del hongo fitopatógono. Se inocularon tres aislados diferentes por placa y un control, para el cual se realizó la punción solo con un palillo estéril ( Figura 9).

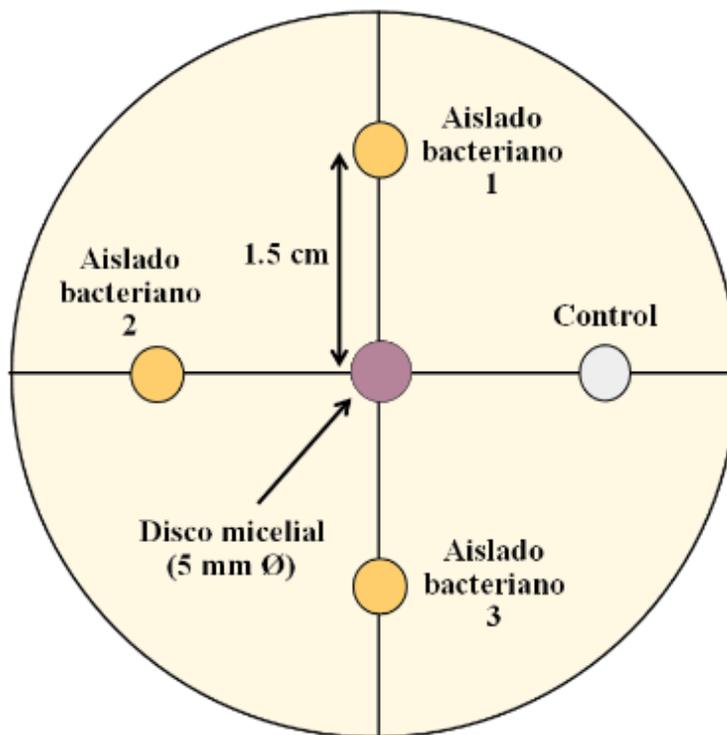


Figura 9. Diagrama del método de evaluación de la actividad antifúngica mediante compuestos difusibles [91].

Se inocularon tres aislados diferentes por placa y un control, para el cual se realizó la punción solo con un palillo estéril. Las placas se incubaron a 28 °C durante 5 d. Cada tratamiento fue evaluado por triplicado. Durante el transcurso de la incubación se midió diariamente el crecimiento radial del hongo, en dirección al tratamiento bacteriano correspondiente y del control. Los promedios de las mediciones se analizaron por la prueba estadística Dunnet ( $P \leq 0.05$ ), para aquellos tratamientos que en la prueba resultaron significativamente diferentes, se calculó su porcentaje de inhibición correspondiente del crecimiento micelial, utilizando la siguiente fórmula:

$$PI = [(R-r) / R] \times 100;$$

donde: **R** es el radio de crecimiento del hongo desde el centro de la placa hasta el tratamiento control y **r** es el radio de crecimiento del hongo en dirección del tratamiento bacteriano de prueba.

Una vez calculados los porcentajes de inhibición, los resultados se sometieron a una prueba estadística Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### 4.4.2 Evaluación de la actividad antagonista de compuestos orgánicos volátiles

La actividad antagonista de los compuestos orgánicos volátiles se evaluó de acuerdo a la metodología descrita por Guevara-Avenidaño *et al.* [72], la cual se detalla a continuación. Los aislados bacterianos de prueba fueron resembrados 24 h antes de los ensayos de antagonismo de acuerdo con lo descrito en la Sección 4.2. Con ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó una colonia del aislado y se estrió en una placa estéril de agar nutritivo, de modo que no quedara agar sin inocular. Por otro lado, en el centro de otra placa con APD estéril fue colocado un disco micelial de 5 mm de diámetro procedente de la periferia del crecimiento de *F. oxysporum*, resembrado con anticipación como se describió en la Sección 4.2. Una vez realizado esto, las tapas de ambas placas fueron retiradas y sus bases fueron contrapuestas y selladas con Parafilm®, tal como se indica en la Figura 10.

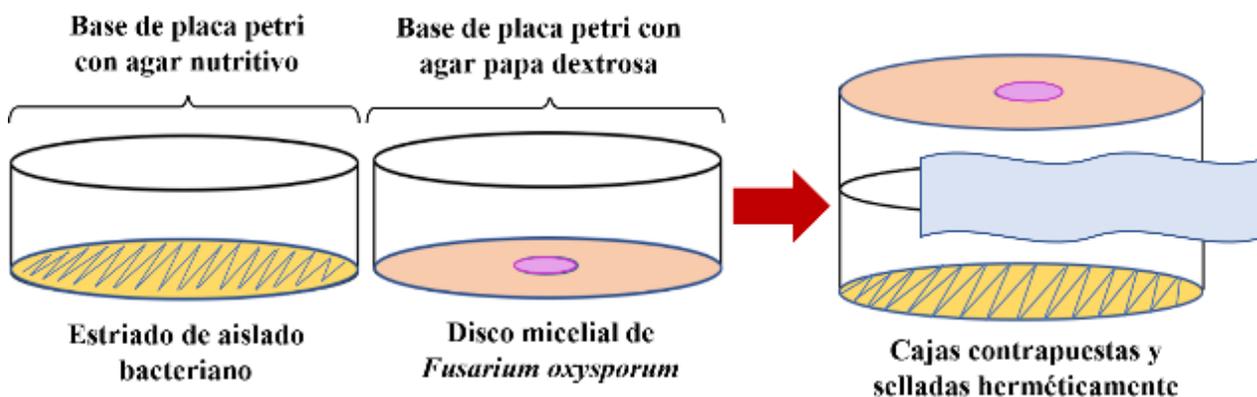


Figura 10. Diagrama del método cajas contrapuestas y selladas utilizada para las pruebas de antagonismo por compuestos volátiles.

(Figura de: Tlilayatzi-Bello)

Las cajas fueron incubadas a 28 °C por 6 d. Cada ensayo se realizó por triplicado. Como control, se hicieron pruebas similares con medios sin inoculación de bacterias. El diámetro de crecimiento micelial se midió diariamente hasta los 6 días de incubación. Los promedios de las mediciones se analizaron por la prueba estadística Dunnet ( $P \leq 0.05$ ), de aquellos que en la prueba

resultaron significativamente diferentes, se calculó su porcentaje de inhibición correspondiente del crecimiento micelial, utilizando la siguiente fórmula:

$$PI = ((C - T) / C) \times 100;$$

donde: **C** es el diámetro del crecimiento micelial del hongo para el tratamiento control y **T** es el diámetro del crecimiento del micelio del hongo expuesto a los COV bacterianos [72, 89].

Una vez calculados los porcentajes de inhibición, los resultados se sometieron a una prueba estadística Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## **4.5 Identificación molecular de aislados rizoféricos con actividad antagónica**

### **4.5.1 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN se empleó el método de extracción fenol-cloroformo-alcohol isoamílico [103]. En un tubo microcentrífuga de 2 mL estéril se colocó 1 mL de solución PBS 1X (Anexo C), donde se suspendieron 3 asadas de los aislados bacterianos a identificar. Dichos aislados se cultivaron previamente en caja Petri como se describe en la Sección 4.2. La mezcla se homogenizó y centrifugó por 5 min a 12,500 rpm. Seguido de esto, se decantó el sobrenadante y al sedimento obtenido se le agregó nuevamente 1 mL de PBS 1X. Posteriormente, la mezcla se homogenizó y centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Terminado esto, el tubo se decantó con precaución evitando perder el sedimento (pelet).

El pelet obtenido, se re-suspendió en 200  $\mu$ L del buffer de lisis. A esta suspensión se agregó 4  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL), después de la cual se mezcló e incubó a 37 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, a la mezcla se agregó 4  $\mu$ L de Proteinasa K (Sigma- Aldrich) a una concentración de 0.5 mg/mL. A esta mezcla se le adicionó SDS para obtener una concentración en la muestra de 1%. Se mezcló suavemente e incubó a una temperatura de 55 °C por una 1 h. Una vez transcurrido este tiempo, el tubo con la mezcla se colocó inmediatamente en hielo. A partir de este paso las muestras se mantuvieron en cadena de frío a 4 °C.

A continuación, al tubo, se le agregó 200  $\mu$ L de solución de fenol estabilizado con 10 mM de Tris HCl, pH 8.0, adicionando con 1 mM EDTA (Sigma- Aldrich), y se mezcló. Seguido de

esto, el tubo se centrifugó a 12,500 rpm por 5 min a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, con ayuda de una micropipeta se tomó la fase acuosa (sobrenadante), evitando tomar la fase precipitada, y ésta fue transferida a un nuevo tubo. A continuación, al nuevo tubo con la fase acuosa se le agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (Sigma- Aldrich) y se mezcló. Después de esto, la mezcla se centrifugó nuevamente a 12,500 rpm por 5 min a 4 °C. Posteriormente, la fase acuosa fue separada a un tubo nuevo, al que se le agregó 2 volúmenes de alcohol absoluto y 2 décimos del volumen de la mezcla de acetato de sodio 3 M. El tubo fue mezclado manualmente y centrifugado a 12,500 rpm durante 30 min a una temperatura de 4 °C. Transcurrido el tiempo de centrifugación, el sobrenadante se decantó para obtener el pelet, al cual se le agregó 500 µL de etanol al 70% seguido por un mezclado manual. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12,500 rpm por 5 min, a 4 °C y se decantó subsecuentemente. Para finalizar se dejó secar el exceso de líquido al aire libre. Una vez seco, el pelet fue re-suspendido en 50 µL de agua ultrapura estéril y se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

#### **4.5.2 Electroforesis en gel de agarosa**

Una vez llevada a cabo la extracción, las muestras de ADN genómico se sometieron a un análisis de electroforesis en gel de agarosa, para evaluar si el proceso de extracción de ADN se llevó a cabo de manera correcta. Se preparó un gel de agarosa al 1% disolviendo 0.4 g de agarosa en 40 mL de buffer TBE de electroforesis al 1X. Por otra parte, se armó la cubeta de electroforesis como se muestra en la Figura 11, y se vertió la solución de agarosa dejándola solidificar durante aproximadamente 20 min. Una vez gelificada la solución de agarosa se retiraron los topes y la peineta, y el gel fue colocado en la cámara de electroforesis. Posteriormente se agregó buffer TBE hasta cubrir el gel.



Figura 11. Unidad de electroforesis utilizada para la generación de los geles de agarosa en las pruebas de biología molecular.

Para realizar la carga de los pozos, sobre un trozo de Parafilm® se realizó una mezcla que contenía 2  $\mu\text{L}$  de la muestra con 2  $\mu\text{L}$  de colorante de carga 6X DNA Loading, (Thermo Fisher Scientific, EUA). Esta mezcla se colocó sobre un pocillo del gel. Por otra parte, para calcular el tamaño aproximado del ADN total analizado, en un pocillo se cargó la mezcla de 2  $\mu\text{L}$  del colorante de carga con 1.5  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular GeneRuler de 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, EUA) la cual está compuesta por fragmentos de ADN de peso conocido.

Una vez cargados los pocillos se corrió la electroforesis a 90 V durante 40 min aproximadamente o hasta que el frente del colorante alcanzara las dos terceras partes del gel. Una vez transcurrido el corrimiento del gel, se realizó un baño que contenía 2.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio (1 mg/ml) más 50 mL de buffer TBE por 15 min. La visualización del gel se realizó empleando un fotodocumentador Fluor Shot Gel Documentation System (Biotop, China) (Figura 12), manipulando el gel de agarosa con guantes de nitrilo en todo momento.



Figura 12. Fotodocumentador Fluor Shot Gel Documentation System

### 4.5.3 Amplificación del gen ADNr 16S

La amplificación del gen ADNr 16S se realizó usando una solución Taq PCR Master Mix kit (Qiagen, Alemania). Los primers 27F y 1492R (Macrogen Inc., Corea de Sur) fueron empleados para el PCR y la secuenciación de los aislados bacterianos de este trabajo (Anexo D). Previo a la amplificación del gen ADNr 16S, las soluciones primer y muestras de ADN de los aislados bacterianos fueron descongeladas y colocadas en hielo hasta su uso. Adicionalmente, se descongeló la solución de Master Mix y se agitó mediante vortex por unos segundos. La mezcla de reacción para la amplificación del gen ADNr 16S por PCR se preparó como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del gen ADNr 16S

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración
Taq PCR Master Mix	50	2.5 U Taq ADN polimerasa 1x Buffer Qiagen PCR 200 $\mu\text{M}$ de cada dNTP
Mezcla de primer (2 $\mu\text{M}$ de cada <i>primer</i> )	10 de cada <i>primer</i>	0.2 $\mu\text{M}$ de cada primer
H <sub>2</sub> O libre de ARN	28	-
Muestra de ADN	2	$\leq 1$ $\mu\text{g}$ /reacción
Total	100	

Se preparó una mezcla de reacción de PCR de acuerdo con el número de muestras extraídas, sin agregar la muestra de ADN, y realizando un mezclado suave y completo de la mezcla de reacción. A continuación, se transfirió 98  $\mu$ L de la mezcla a microtubos para PCR y se agregó la muestra de ADN. Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizó un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapur), Figura 13. En este equipo se programaron las temperaturas y el número de ciclos necesarios para lograr la amplificación del gen o fragmento de ADN de interés. Las condiciones de reacción utilizadas para la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial (94 °C, 3 min), 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C, 45 seg; anillamiento a 52 °C, 30 seg; extensión a 72 °C, 1 min), y una extensión final a 72 °C por 10 min.



Figura 13. Termociclador 2720 Thermal Cycler

El producto amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia única de fragmentos de 1.5 kb (peso aproximado del gen ADN<sub>r</sub> 16S), siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 4.5.2. El análisis de los geles de las muestras se comparó contra el patrón de bandeado del marcador molecular GeneRuler de 1 kb DNA Ladder.

#### 4.5.4 Digestión del gen amplificado por enzimas de restricción

La digestión enzimática del gen ADNr 16S fue empleada para evaluar si distintas muestras de los aislados bacterianos pueden pertenecer genotípicamente a una misma especie. Para esta técnica, se usó una enzima de restricción, la cual se encarga de realizar la ruptura específica y controlada del ADN [104]. La enzima que se utilizó para la digestión del gen ADNr 16S fue la BsuRI Hae III 3000 U (Thermo Fisher Scientific, EUA). La mezcla de reacción se preparó conforme a la Tabla 6.

Tabla 6. Composición de la mezcla para la digestión enzimática del gen ADNr 16S.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer 10X (R)	2
Enzima HAE III	0.125
H <sub>2</sub> O	12.875
ADN	5
Total	20

La mezcla de reacción fue preparada de acuerdo con el número de muestras a analizar. Posteriormente, se transfirió 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla a tubos de microcentrífuga de 0.5 mL. Enseguida se adicionó a la mezcla 5  $\mu\text{L}$  del ADNr 16S. A continuación, los tubos se incubaron a 37 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla digerida se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Esta concentración se usó teniendo en consideración que los fragmentos obtenidos son mucho más pequeños que para el caso del análisis de los amplicones. La electroforesis se corrió a 70 V durante 40 min. Posteriormente se analizó el patrón de bandeo de electroforesis de los diferentes aislados bacterianos. Para este análisis se consideró que, si el patrón de bandeo de dos muestras es similar, significa que es muy probable que los microorganismos analizados pertenezcan a la misma especie; si, por el contrario, se observan distintos patrones de bandeo, entonces es probable que los aislamientos pertenezcan a especies bacterianas diferentes. De acuerdo con esto, se procedió a agrupar los aislados bacterianos en función de sus patrones de bandeo. A continuación, se realizó la purificación del gen ADNr 16S de los aislados seleccionados conforme a los resultados obtenidos en el análisis de enzimas de restricción.

#### 4.5.5 Purificación del gen ADNr 16S

Los productos de la reacción de PCR deben ser purificados para proceder a la secuenciación del gen. Para la purificación se utilizó un kit de purificación GeneJet™ PCR Purification kit (Fermentas, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de PCR del gen ADNr 16S fue mezclado con la solución *Binding buffer* en una relación de volúmenes 1:1. Dependiendo del volumen obtenido del producto de PCR, se agregó a la muestra el mismo volumen de la solución y se agitó en vortex para su homogenización. Seguido de esto, la mezcla se pasó por una columna de purificación GeneJet, después de lo cual se centrifugó durante 1 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se desechó el sobrenadante para proseguir con la purificación del ADN retenido en la columna de purificación.

A la columna de purificación se le agregó 700 µL del *buffer de lavado*. Posteriormente la columna se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente, después de lo cual el sobrenadante fue desechado. A continuación, la columna de purificación se colocó en un tubo de microcentrifugación nuevo de 2.5 mL. Después de esto, a la columna le agregó 50 µL de *buffer de elución* previamente calentado a 65 °C. Posteriormente, la columna se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Finalmente, se colectó el sobrenadante conteniendo el gen ADN 16S purificado.

Previo a la secuenciación se midió la cantidad de ADN en la muestra purificada. Esta se cuantificó utilizando el equipo Genova Nano (Jenway, Reino Unido), el cual es un espectrofotómetro a microescala. El equipo se calibró con 4 µL de agua ultrapura. Posteriormente, se pusieron en el puerto de muestreo del equipo 4 µL del producto de PCR purificado y se determinó la concentración de ácidos nucleicos, a una relación de absorbancia de 260nm/280nm. [105].

#### 4.5.6 Secuenciación del gen ADNr 16S y análisis de las secuencias

Las muestras del gen ADNr 16S purificado de los aislados bacterianos se envió para su secuenciación a la compañía MacroGen® (Corea del Sur). A partir de las secuencias *Forward* y *Reverse*, se obtuvieron las secuencias consenso para cada aislado, empleando el software BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 [106]. Las secuencias obtenidas se compararon contra la base de datos EZBioCloud [107], la cual se encuentra ligada al NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Utilizando el software MEGA X versión 10.1.8 [108] se realizó una alineación de las secuencias por Clustal W de las secuencias consenso de cada aislado junto a las mejores coincidencias encontradas en la base de datos. La alineación generada fue editada manualmente. Se construyó un árbol filogenético por el método de máxima verosimilitud utilizando el modelo Kimura 2 con sitios evolutivamente invariables (+ I) con 1000 repeticiones.

## **4.6 Cinética de crecimiento microbiano**

### **4.6.1 Cinéticas de crecimiento microbiano de rizobacterias identificadas**

La cinética de crecimiento microbiano se realizó con la finalidad de conocer la velocidad de crecimiento de las cepas identificadas en medio de crecimiento estándar como parte de su caracterización tecnológica para posteriores aplicaciones. Para realizar la cinética, en un matraz con 25 mL de caldo LB (Luria Bertani) estéril se re-suspendieron 3 asadas del cultivo de la cepa de prueba pura, previamente cultivadas conforme a lo descrito en la Sección 4.2. Las células se mezclaron vigorosamente en el caldo con la finalidad de homogenizar su contenido. Finalizado esto, se procedió a tomar una alícuota del medio inoculado para medir la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis GENESYS™ 50 (Thermo Scientific™, EUA) a 600 nm. Esta lectura se consideró como la muestra para el inicio de la cinética. Una vez realizada la primera lectura, el matraz se colocó en agitación a 120 rpm con una temperatura de 37 °C en una incubadora con agitación orbital (Luzeren). Cada 6 h se tomó una alícuota del medio de cultivo y se midió su absorbancia a 600 nm. Este procedimiento se realizó hasta observar que las lecturas de las absorbancias fueran constantes (fase estacionaria). La cinética de cada aislado bacteriano sometido a esta prueba se realizó por triplicado. A esta prueba se sometieron cuatro de las cepas presentaron mayor inhibición en las pruebas *in vitro*.

Las absorbancias de las réplicas de cada aislado de estudio se promediaron. A continuación, se graficaron los datos de absorbancia contra tiempo, con la finalidad de obtener la curva de crecimiento de cada cepa. Con esta proyección se pudo establecer el tiempo de la fase exponencial para cada aislado. Una vez establecido el tiempo de crecimiento exponencial, se procedió a realizar el conteo de microorganismos viables en el medio.

La cuantificación de la concentración celular se realizó en medio de cultivo por extensión en placa. Previamente, se realizaron dos series de diluciones por cada matraz de hasta  $10^{-6}$ . Después

de esto se inoculó 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones seriadas de los rangos  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en placas de agar LB extensión con una espátula Drigalski estéril. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C por 16 h. Para cada matraz el conteo celular se realizó por duplicado. Los resultados se reportaron como UFC/mL.

## 4.7 Análisis estadístico

Los datos de inhibición del crecimiento micelial se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de una prueba de comparación de múltiples Dunnet con un nivel de significancia ( $P < 0.05$ ) por cada uno de los tratamientos, con tres réplicas. Adicionalmente, se realizó un análisis de comparación de medias de los datos, mediante una prueba de Tukey, con un nivel de significancia ( $P < 0.05$ ). Para el análisis de los datos se utilizó el software de análisis estadístico Minitab 2019 (Minitab Inc., EUA).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Hongo fitopatógeno y bacterias rizosféricas

#### 5.1.1 Hongo fitopatógeno *F. oxysporum*

Para un mayor reconocimiento de la cepa *F. oxysporum* se examinaron las características morfológicas del cultivo micelial, así como las estructuras conidiales. El cultivo presentó micelio abundante y de un color blanco a violeta, asimismo se observó la presencia de esclerocios (masas compactas de micelio de color blanquecino sobre el crecimiento). En las observaciones microscópicas del micelio mostraron, hifas redondeadas y conidias en diversas formas. Se pudieron observar en su mayoría microconidios y ocasionalmente macroconidios. Las formas más comunes de microconidios observados fueron: oval, reniforme (en forma arriñonada), ovoide con base truncada. En la Figura 14, se muestran las características anteriormente descritas de la cepa de *F. oxysporum* utilizada en el presente trabajo, las cuales coinciden con las características morfológicas descritas por Leslie y Summerell [109] para este fitopatógeno.

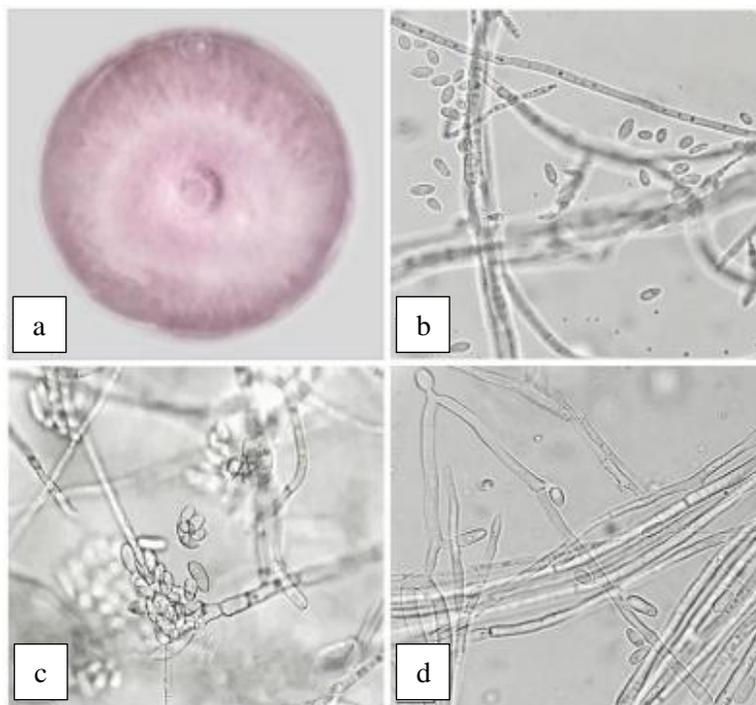


Figura 14. Características morfológicas del cultivo micelial de *F. oxysporum*

a: Cultivo en caja Petri de *F. oxysporim*. b-c: Observación microscópica 100X de hifas y microconidios, d: Microconidios en monofialidas.

### 5.1.2 Bacterias rizosféricas

Se obtuvieron dos lotes de aislados bacterianos a partir de la rizósfera de plantas de jitomate provenientes de dos tipos de cultivo: parcelas e invernadero. En total se obtuvieron 43 aislados, de los cuales 11 no tuvieron un desarrollo satisfactorio, quedando finalmente 32 aislados bacterianos para el trabajo posterior. Se observó que el 75% de estos aislados fueron provenientes de cultivos en parcelas a cielo abierto y el 25% restante de invernadero. En la literatura, los reportes de aislamiento de bacterias provenientes del suelo con actividad de biocontrol son extensos. Diversos estudios coinciden con lo reportado por Mota *et al.*, los cuales refieren que la mayoría de los aislados bacterianos con algún potencial de biocontrol provienen del suelo rizosférico [45].

## 5.2 Caracterización morfológica colonial y microscópica

En la observación morfológica de los 32 aislados, se encontró que las formas más predominantes fueron la irregular, circular y rizoide, presentando en su mayoría una elevación plana y convexa. De acuerdo con su superficie colonial, la mayoría presentaron superficies lisas, mientras que algunos aislados tuvieron superficies con un aspecto arenoso y filamentoso. La consistencia de la mayoría de las colonias fue cremosa y algunas de consistencia mucosa. Los colores observados en la mayoría de las colonias fueron blanco y color crema; la mayoría traslúcidas (Figura 15). Un grupo de aislados presentó una característica particular, al colocar la placa a contraluz las colonias se notaron tornasoles, algunas otras presentaron la formación de halos.



Figura 15. Ejemplificación de diversidad morfológica colonial de las rizobacterias de jitomate. En la imagen se muestran los aislados bacterianos ATY-2, BTZ-17 y ATZ-6 con 24 h de incubación en medio AN.

Conforme a la tinción de Gram, se encontró que solo el 9% de los aislados bacterianos correspondieron a Gram negativos, siendo el 91% restante bacterias Gram positivas. De acuerdo con las formas bacterianas, se observaron desde cocobacilos, hasta bacilos largos a medianos en su gran mayoría. En la Figura 16 se ejemplifica la diversidad microbiana encontrada en algunos de los aislados bacterianos.

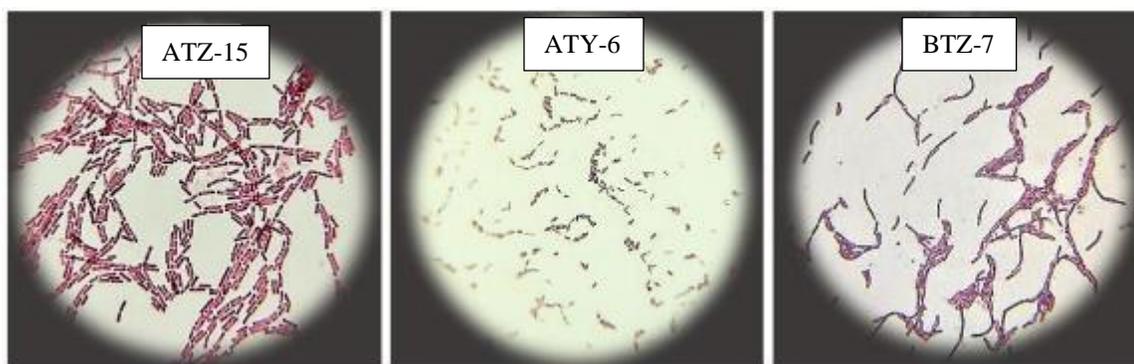


Figura 16. Ejemplificación de diversidad morfológica bacteriana de las rizobacterias de jitomate. En la imagen se muestran los aislados bacterianos ATZ-15, ATY-6 y BTZ-7 mediante tinción Gram.

Con base en los resultados de la caracterización colonial y microscópica de los aislados rizosféricos, se conformaron 12 grupos o morfotipos (Tabla 7, Figura 17). La información de esta agrupación se encuentra detallada en el Anexo E. La clasificación de los aislados ayudó a tener un panorama general de los grupos bacterianos presentes en las muestras de suelo rizosférico del presente trabajo. Adicionalmente, el agrupamiento se utilizó para reducir el número de aislados sometidos a estudio en la etapa de identificación molecular.

Tabla 7. Clasificación y agrupamiento de bacterias rizosféricas aisladas a partir de rizosfera de plantas de jitomate sanas.

<b>Grupo</b>	<b>Característica colonial</b>	<b>Característica bacteriana</b>	<b>Tinción Gram</b>	<b>Número de aislados</b>
A	Blancas amarillentas, tornasoladas e irregulares.	Bacilos largos	+	2
B	Blancas, opacas e irregulares	Bacilos largos	+	1
C	Blancas, opacas, circulares con superficie arenosa	Bacilos largos	+	2
D	Blancas, planas, irregulares de superficie filamentosos	Bacilos largos	+	1
E	Blancas translúcidas, presentan un halo difuminado	Cocobacilos	-	3
F	Blancas transparente, con apariencia de cera (irregulares)	Cocobacilos	+	1
G	Blancas transparente, con apariencia de cera (irregulares)	Bacilos medianos	+	2
H	Blancas translúcidas, crecimiento irregular llena toda la caja	Bacilos medianos	+	2
I	Blancas opacas, con superficie arenosa	Bacilos medianos	+	2
J	Blancas opacas de superficie arenosa con halos a contraluz	Bacilos medianos	+	2
K	Blancas circulares formando halos	Bacilares medianas a cocobacilos	+	7
L	Blancas opacas, irregulares y planas	Bacilares medianas a cocobacilos	+	7

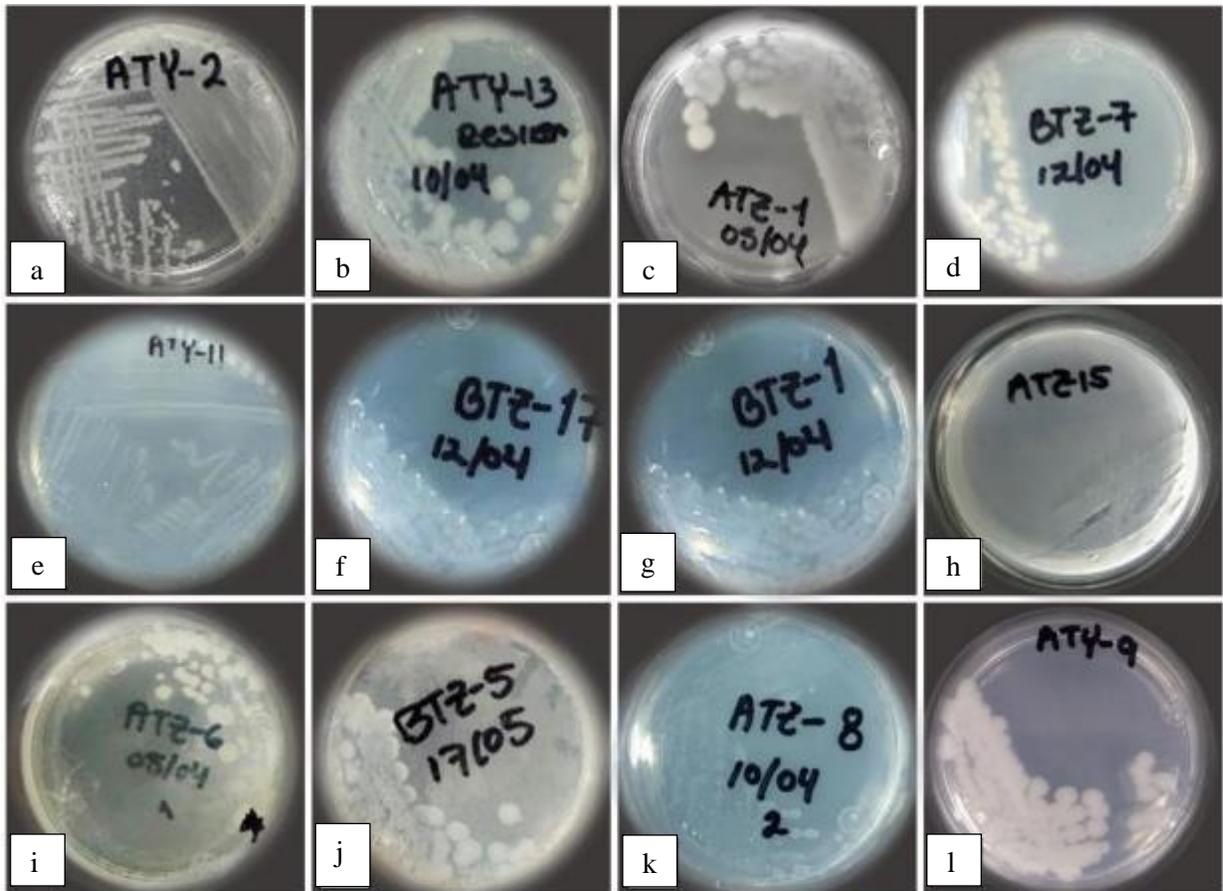


Figura 17. Aislados representativos de los morfotipos bacterianos con 24 h de crecimiento.

Dado el gran número de grupos bacterianos que se obtuvieron a partir de la caracterización colonial y microscópica, la posibilidad de obtener una cepa con buena actividad biocontroladora en este proyecto acrementaba. En la literatura se ha reportado ampliamente la efectividad de bacterias rizosféricas en el control de enfermedades de plantas de cultivos comerciales. Calvo y Zuñiga caracterizaron cepas del género *Bacillus* spp., cuyas descripciones morfológicas coinciden con algunas de las observadas en la caracterización colonial y bacteriana del presente trabajo [110]. Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* son Gram positivas en forma de bacilo; su capacidad de formar endoesporas y numerosos compuestos antimicrobianos hace posible que se encuentren presentes en las raíces de algunas plantas. Es posible que algunos de los aislados bacterianos pertenezcan a este género, considerando que este grupo es uno de los más abundantes en los ecosistemas rizosféricos, y que gracias a sus diversas propiedades favorecen su distribución en el suelo [10, 110].

Los trabajos donde se han reportado el hallazgo de al menos una bacteria del género *Bacillus* son extensos. Huang *et al.* [111], aislaron 50 bacterias de la rizósfera de plantas de jitomate sanas. Estas fueron probadas en experimentos *in vitro* para comprobar su actividad antagonista contra *Ralstonia solanacearum*, un patógeno causante de enfermedades que afectan al cultivo de jitomate. Los datos obtenidos demostraron que, de las 50 bacterias aisladas solo 7 presentaron algún efecto contra el patógeno. La identificación genética de los siete aislados evidenció que al menos uno de ellos pertenecía al género *Bacillus*.

Papa-Rao *et al.* [49] aislaron bacterias a partir de muestras de diferentes zonas de un cultivo; rizoplano, rizósfera, filoplano y suelo no rizosférico. En total obtuvieron 74 aislamientos bacterianos, mientras que específicamente para la zona de la rizósfera se tuvieron 21 aislamientos. El total de los aislados fueron sometidos a pruebas de promoción de crecimiento y actividad antagónica contra *F. solani*, *F. moniliforme* y *Macrophomina phaseolina*, patógenos que afectan al cultivo de jitomate. De las pruebas realizadas siete de los aislados presentaron un buen desempeño. Se determinó que los aislados pertenecían a cuatro géneros entre los que se encontraba el género *Bacillus*. Asimismo, el aislado bacteriano perteneciente a este género, provenía de muestras de la rizósfera de la planta jitomate, y se demostró que colonizaba extensamente la superficie de la raíz de la planta. Lo anterior se demostró con ayuda de un microscopio electrónico de barrido, en el cual se observaron las raíces provenientes de una semilla inoculada con *Bacillus*. Los autores también reportaron que esta bacteria era capaz de producir una matriz extracelular que favorecía una mejor unión a la superficie, por lo anterior, se concluyó que la colonización por parte de las bacterias que se encuentran en la rizósfera, especialmente del género *Bacillus*, se consideran esencial para establecer interacciones beneficiosas.

### **5.3 Evaluación *in vivo* del efecto del fitopatógeno *F. oxysporum* sobre plántulas de jitomate**

#### **5.3.1 Prueba de patogenicidad de *F. oxysporum* en plantas de jitomate**

En los ensayos de patogenicidad producida por *F. oxysporum* a plántulas de jitomate, se observó que las semillas germinaron a los 5 días después de la siembra. Para el tratamiento con *F. oxysporum* (TF), las 20 plántulas emergieron, y en el caso del control solo 19 de las 20. Transcurridos 10 días después de la germinación, las tres plántulas que se observaron con un

desarrollo menor al resto en el tratamiento con el patógeno detuvieron su crecimiento. Sin embargo, las restantes no presentaron ningún cambio aparente (Figura 18). A los 35 días después de la germinación, en ambos tratamientos, visualmente las plantas no presentaron diferencias entre ellas, el tratamiento con *F. oxysporum* tenía características similares al tratamiento control, en color, altura, desarrollo de hojas.



Figura 18. Ensayo de patogenicidad. Plántulas a los 15 días después de la siembra e inoculación de *F. oxysporum* a: lado izquierdo tratamiento control (TC), lado derecho tratamiento con *F. oxysporum* (TF); b: Plántula del tratamiento TF que detuvo su crecimiento.

Debido a la ausencia de daño aparente, las plántulas se trasplantaron realizando una nueva inoculación, en la cual se realizó una punción en la raíz principal. Transcurridos 23 d después de la última inoculación, las plantas de jitomate fueron revisadas. No se observaron daños visibles aparentes en la parte superior externa de las plantas, por ello se procedió a revisar la raíz.

La revisión externa de las raíces primarias de las plantas inoculadas con *F. oxysporum*, mostraron una tonalidad café a marrón en diferentes áreas. En algunas zonas el tejido se observó desprendido, hundido y sin rigidez. Las raíces secundarias se observaron disminuidas en número y un poco más oscuras en comparación al tratamiento control. En el corte longitudinal de la raíz primaria se observaba un oscurecimiento de tono café que se apreciaba mucho más intenso en las lesiones y parecía haberse extendido a las paredes y en general al resto del tejido (Figura 19a). La incidencia de los síntomas observados en las plantas de jitomate utilizadas en el presente trabajo fue del 100%.

Por otra parte, las raíces de las plantas no inoculadas con *F. oxysporum* mostraron un color ligeramente púrpura con raíces secundarias de una tonalidad blanca, sin lesiones aparentes. Al corte

longitudinal de la raíz principal, en todas ellas se observó un tejido limpio, de color verde hasta llegar a blanco. En la parte terminal de la raíz, se observaron las lesiones realizadas por la punción en la inoculación, sin embargo, no se apreciaron mayores daños en el tejido (Figura 19b).

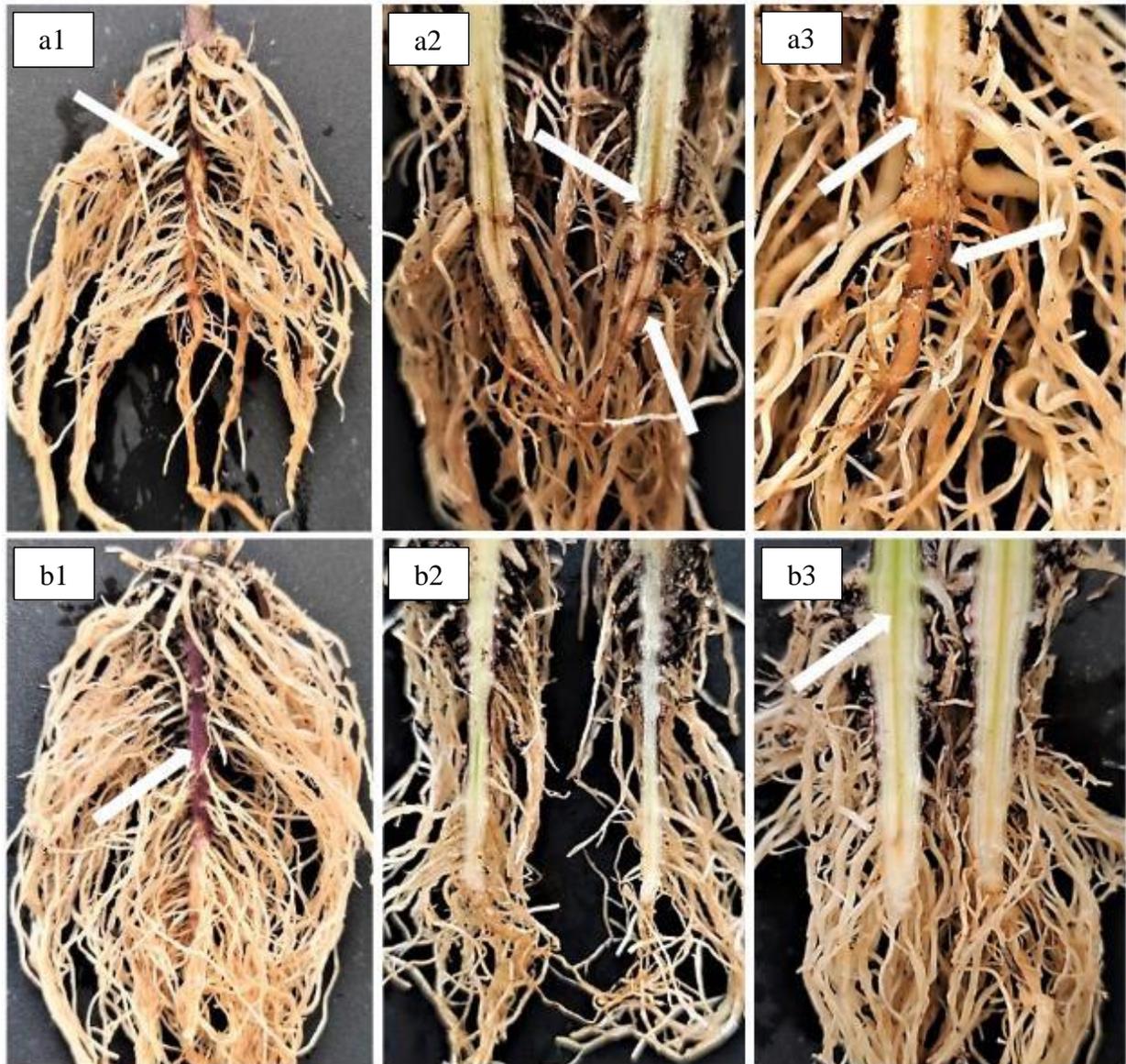


Figura 19. Raíces de las plantas utilizadas en los ensayos de patogenicidad.

a) Raíz de planta con tratamiento con *F. oxysporum* (TF), b) Raíz de planta control, a1: Raíz de planta TF, se observó oscurecimiento y cambios en la raíz primaria; a2-a3) Raíces de planta TF cortada de manera longitudinal, se apreció la presencia de lesiones y oscurecimiento en la parte terminal de la raíz primaria, así como cambios en la estructura de la pared. b1: Raíz de planta control en donde se observó una coloración púrpura y la estructura de las paredes sin cambios, b2-b3) Raíces de planta control cortadas de manera longitudinal, no se observó daño aparente.

McGovern [35], en una revisión sobre *F. oxysporum* indicó que la infección de este patógeno en plantas de jitomate puede expresarse con lesiones, cambios de coloración y pudrición en las raíces. Los síntomas observados en el experimento de patogenicidad de la cepa *F. oxysporum* del presente trabajo se asemejan a los reportes referentes al mismo patógeno. El autor también indica que este patógeno puede provocar síntomas más evidentes como marchitamiento y amarillamiento, sin embargo, apunta que estos síntomas suelen ser más perceptibles después de la floración incluso poco después de la primera cosecha. Es posible que, en nuestro trabajo, los daños observados en las raíces no provocaron la marchitez de la planta y los síntomas de la enfermedad no fueron severos debido al corto tiempo del experimento lo cual no permitió el avance de la enfermedad.

Boix-Ruiz *et al.* [112] refieren que la relación entre la patogenicidad y la temperatura es muy estrecha. Los autores indican que para que el patógeno *F. oxysporum* se exprese, la temperatura debe ser la idónea, no solo en el ambiente sino también en el sustrato. De manera que el patógeno puede estar presente, pero si la temperatura en el sustrato no es la ideal, este puede expresarse con pocos síntomas o no hacerlo. Lo anterior pudo también ser una causante para la limitada expresión de los daños en el presente trabajo. En este mismo contexto, existen reportes que indican que plantas inoculadas con *F. oxysporum* pueden formar raíces secundarias, lo que puede permitir que lleguen a la madurez sin presentar daños evidentes. Sin embargo, la existencia de alteraciones en la estructura de la raíz puede conducir a que la planta presente daños a mayor edad. No obstante, cabe mencionar que en la mayoría de los casos, las plantas infectadas mueren eventualmente presenten síntomas o no [113].

Es importante mencionar que la semilla utilizada para este estudio tenía resistencia contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* [114], de acuerdo al fabricante. Se utilizó esta semilla debido a la nula disponibilidad de semilla nativa en el mercado y a que la mayoría de los productores de la región utilizan este tipo de semillas comerciales. Sin embargo, aun con esta característica de resistencia sus cultivos presentan síntomas de la enfermedad causada por el hongo fitopatógeno.

Posteriormente, se realizó el postulado de Koch para verificar la presencia de *F. oxysporum*, en el tejido dañado de las plantas de jitomate. Se observó crecimiento de colonias fúngicas similares al aislado de *F. oxysporum* (Figura 20). Por otra parte, no se observó crecimiento de colonias fúngicas del fitopatógeno en los tejidos sembrados de TC. Este resultado demuestra que *F. oxysporum* fue el responsable de los síntomas observados sobre las raíces de las plantas de jitomate.



Figura 20. Crecimiento característico de *F. oxysporum* aislado de tejido de las raíces infectadas.

## 5.4 Actividad antifúngica *in vitro*

### 5.4.1 Antagonismo por compuestos difusibles de los aislados bacterianos rizosféricos

Un total de 32 aislados bacterianos de la rizósfera de plantas de jitomate sanas se confrontaron contra *F. oxysporum* en cultivos duales, como se describió en la Sección 4.4.1. Del total de los aislados bacterianos probados, los ensayos de actividad antimicrobiana mostraron que 7 de ellos inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* en comparación con el control (test de Dunnett,  $P \leq 0.05$ ) Anexo F, alcanzando un porcentaje de inhibición (PI) de hasta un 61.4 % como se muestra en la Figura 21.

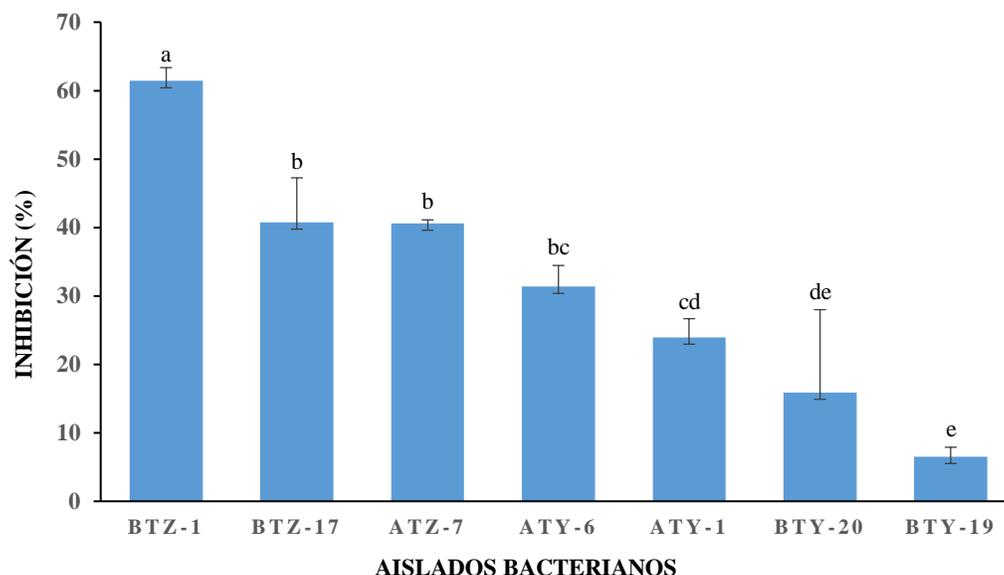


Figura 21. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* por los aislados bacterianos BTZ-1, BTZ-17, ATZ-7, ATY-6, ATY-1, BTY-20 y BTY-19, ensayos de cultivos duales. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ )

Los aislados bacterianos que mostraron actividad antagonica fueron ubicados en los grupos o morfotipos: G, L, F y K. Estos aislados son bacterias Gram positivas y poseen características morfológicas diversas. Los tres aislados de mayor inhibición BTZ-1, BTZ-17 y ATZ-7, se clasificaron en los grupos G y F, los cuales comparten características muy similares entre sí. Estas colonias tienen aspecto ceroso, su consistencia es mucosa y ambas se desarrollan en un tiempo menor a 24 h. Sin embargo, la morfología celular observada en el caso del aislado BTZ-17, perteneciente al grupo F, fue cocobacilar, mientras los aislados BTZ-1 y ATZ-7, pertenecientes al grupo G, mostraron bacterias bacilares de mayor tamaño. El resto de los aislados de menor porcentaje de inhibición pertenecen a los grupos K y L, con diferencias morfológicas coloniales entre ellos, pero una misma morfología celular.

De acuerdo con el análisis de comparación de medias efectuada a los siete aislados bacterianos, esta mostró que el aislado BTZ-1, el de mayor inhibición contra *F. oxysporum* con 61.4%, es significativamente diferente al resto de los aislados bacterianos evaluados, de acuerdo con el test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Las características de este aislado son similares a las reportadas por Calvo y Zuñica, quienes caracterizaron cepas de *Bacillus* spp. [110]. En la Figura 22 se muestra

la imagen de la prueba de inhibición por difusibles en la que se muestra el efecto del aislado bacteriano BTZ-1.

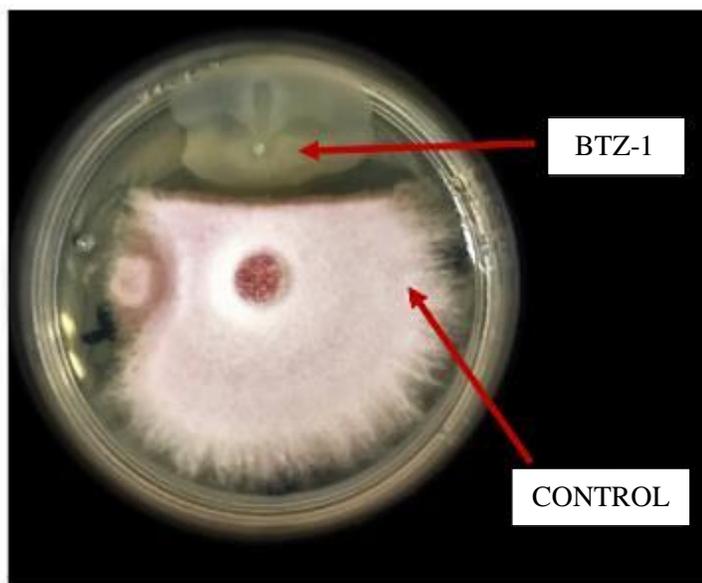


Figura 22. Actividad antifúngica del aislado bacteriano BTZ-1 contra el hongo *Fusarium oxysporum* a través de la producción de compuestos difusibles.

#### 5.4.2 Actividad antagónica de COV secretados por las bacterias rizosféricas

La actividad antagónica de los COV producidos por los 32 aislados bacterianos fue también probada contra *F. oxysporum*. En total 15 aislados mostraron inhibición significativa en comparación del control, de acuerdo con el test Dunnett ( $P \leq 0.05$ ) (Anexo G). Los PI de estos 15 aislados bacterianos alcanzaron hasta un 32.7 %, como lo indica la Figura 23. El aislado bacteriano BTZ-17 presentó mayor inhibición. Según lo reportado por Huang et al., el diámetro de la zona de inhibición es el primer criterio para la detección de bacterias con potencial antagónico. De acuerdo a esto, es posible que los aislados bacterianos con mayores efectos de supresión en las pruebas *in vitro*, tengan un mayor potencial para el control de enfermedades en los cultivos agrícolas [111]. La comparación de medias por el test de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) indicó que no existe diferencia significativa en los PI entre los 15 aislados bacterianos. Lo anterior debido a la dispersión en las desviaciones estándar.

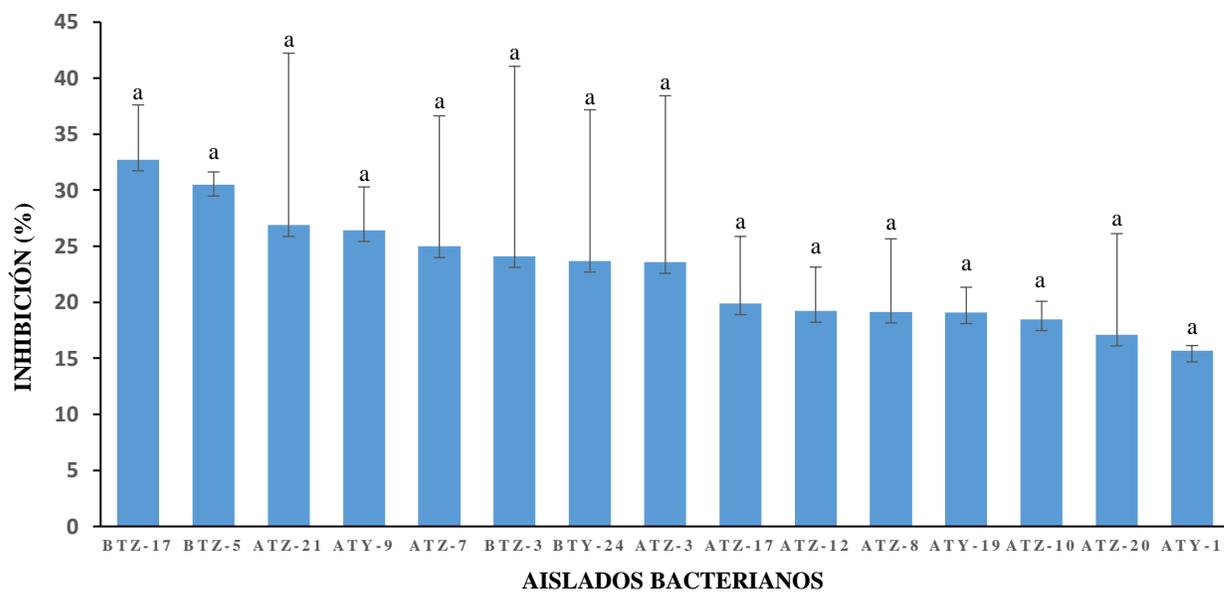


Figura 23. Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *F. oxysporum* por los aislados bacterianos BTZ-17, BTZ-5, ATZ-21, ATY-9, ATZ-7, BTZ-3, BTY-24, ATZ-3, ATZ-17, ATZ-12, ATZ-8, ATY-19, ATZ-10, ATZ-20 y ATY-1, ensayos para la determinación de COV. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Los 15 aislados bacterianos que mostraron actividad antagonista contra *F. oxysporum* mediante la producción de COV, se ubicaron en ocho de los doce grupos o morfotipos conformados. Estos aislados presentaron una tinción Gram positiva, su morfología colonial fue variada, mientras que la morfología celular osciló de cocobacilar a bacilos medianos. En el caso específico del aislado BTZ-17, el que presentó mayor PI contra *F. oxysporum* presentó colonias con apariencia cerosa, con contornos irregulares y consistencia mucosa. Estas características fenotípicas son comunes en el género *Bacillus* [110]. En la Figura 24 se observa la actividad antagonista del aislado BTZ-17 contra *F. oxysporum*.

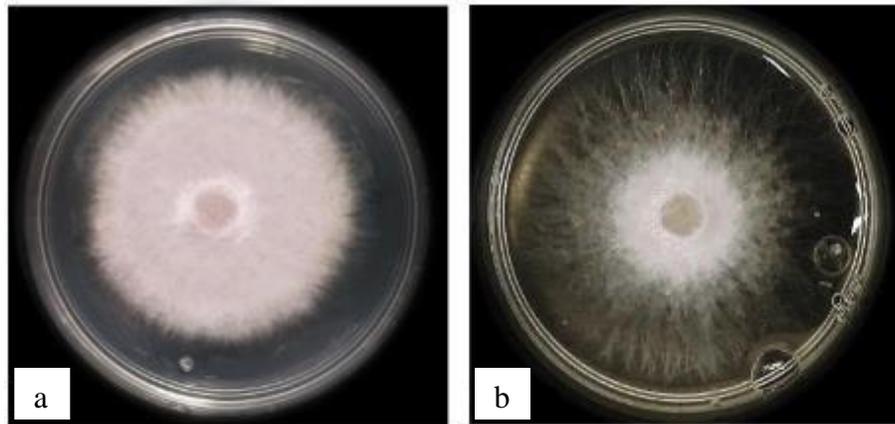


Figura 24. Comparación de la actividad antagonista por compuestos orgánicos volátiles producidos por el aislado bacteriano a: Aislado bacteriano BTZ-17, b: Control.

De forma interesante, el aislado bacteriano BTZ-17, fue el segundo de mayor inhibición en las pruebas de antagonismo por difusibles (Tabla 8). El desempeño de este aislado bacteriano podría representar una posibilidad de obtener resultados satisfactorios en pruebas *in vivo*, puesto que éste aislado exhibe al menos dos mecanismos para el control de *F. oxysporum*. En este sentido, reportes indican que particularmente rizobacterias del género *Bacillus* suele desplegar más de un mecanismo de control. Karthika *et al.* [7] en una amplia revisión sobre rizobacterias antagónicas, reportaron que la mayoría de los antimicrobianos producidos por rizobacterias del género *Bacillus*, muestran actividad contra hongos fitopatógenos, además que diversas especies de este género muestran actividad antagonista por medio de más de un mecanismo. Chaurasia *et al.* [115], reportaron la eficiencia de una cepa del género *Bacillus*, aislada de la rizosfera de arbustos de la planta de Té, para la generación de antagonismo contra seis hongos patógenos en condiciones de cultivo *in vitro*, generando deformidades estructurales en los patógenos. Este efecto se atribuyó a la producción de compuestos antifúngicos difusibles y volátiles.

Tabla 8. Aislados bacterianos con mayor inhibición en pruebas *in vitro*.

Aislado	Grupo	Inhibición por compuestos orgánicos difusibles (%)	Inhibición por compuestos orgánicos volátiles (%)
BTZ-17	I	40.7	32.7
BTZ-1	J	61.4	NS
ATZ-21	D	NS	26.9

\*NS: No significativo

## 5.5 Identificación molecular de aislados rizosféricos con actividad antagonista

Se realizó la extracción del ADN genómico de un aislado bacteriano perteneciente a cada grupo establecido, tomando en consideración los porcentajes de inhibición obtenidos. Para el caso del grupo G, se consideraron dos aislados bacterianos, ya que los aislados bacterianos que integran ese grupo presentaron altos porcentajes de inhibición en las pruebas de antagonismo por difusibles, los aislados bacterianos seleccionados para la extracción de ADN se indican en la Tabla 9. En la Figura 25 se observa un gel de agarosa (1%) con las bandas correspondientes a las muestras de ADN genómico de los aislados bacterianos.

Tabla 9. Aislados bacterianos seleccionados para el proceso de identificación.

Aislados seleccionados para la extracción de ADN	GRUPOS						
	A	B	C	D	E	F	
	ATY-2	ATY-13	ATZ-21	BTZ-7	ATY-15	BTZ-17	
Aislados seleccionados para la extracción de ADN	GRUPOS						
	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	H	I	J	K	L
	BTZ-1	ATZ-7	ATZ-15	ATZ-6	BTZ-5	ATY-6	ATY-1

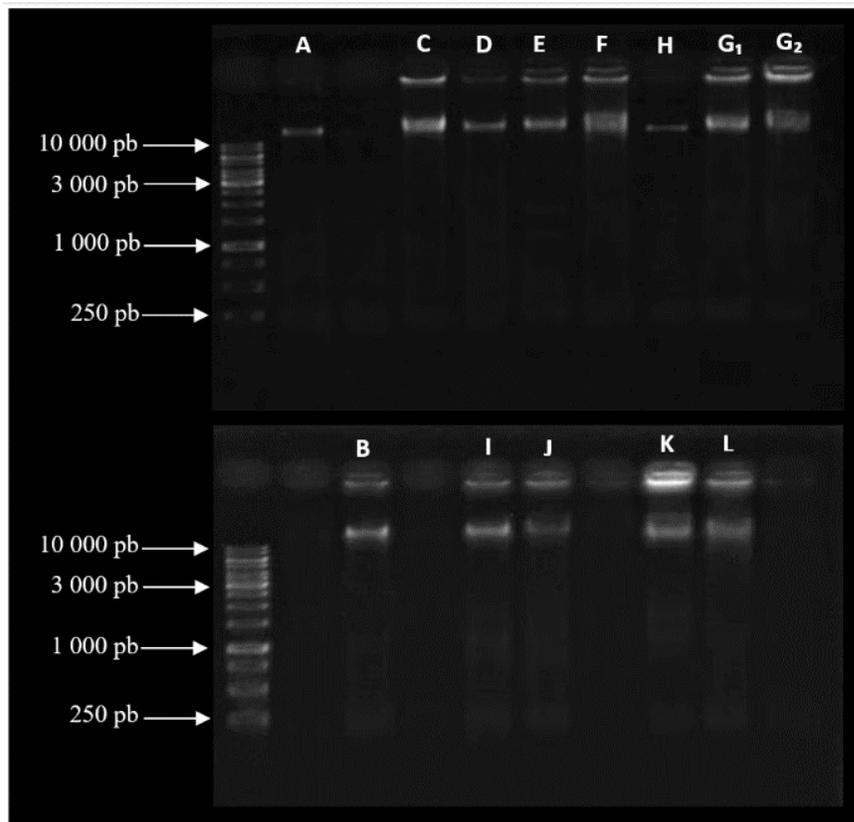


Figura 25. Imagen representativa de la electroforesis del ADN genómico de los 13 aislados bacterianos seleccionados, A: ATY-2, B: ATY-13, C: ATZ-1, D: BTZ-7, E: ATY-15, F: BTZ-17, G<sub>1</sub>: BTZ-1, G<sub>2</sub>: ATZ-7, H: ATZ-15, I: ATZ-6, J: BTZ-5, K: ATY-6, L: ATY-1, mostrados en geles de agarosa (1 %) tomando un marcador de 1 kb como referencia.

Una vez realizadas las extracciones de todos los aislados, se procedió a realizar la amplificación de gen ADN<sub>r</sub> 16S. Los productos de la amplificación se muestran en la Figura 26, en la que se puede observar en el gel de agarosa (1 %) los amplicones a 1.5 kb.

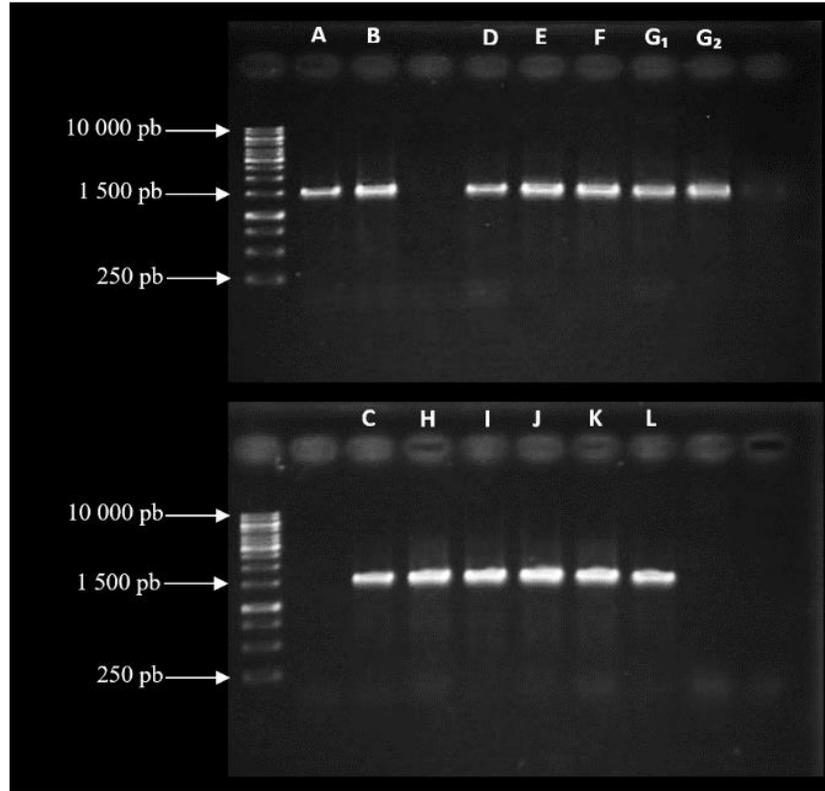


Figura 26. Imagen representativa de la electroforesis de los productos de la amplificación de los 13 aislados bacterianos seleccionados, A: ATY-2, B: ATY-13, C: ATZ-1, D: BTZ-7, E: ATY-15, F: BTZ-17, G<sub>1</sub>: BTZ-1, G<sub>2</sub>: ATZ-7, H: ATZ-15, I: ATZ-6, J: BTZ-5, K: ATY-6, L: ATY-1, en geles de agarosa (1 %) con un marcador de 1 kb como referencia.

### 5.5.1 Digestión por enzimas de restricción de los amplificados

Considerando la gran cantidad de aislados, existe la probabilidad de que algunos de estos pertenezcan a la misma especie. Debido a esto se realizó un análisis de la digestión del gen 16S, por enzimas de restricción de acuerdo con lo establecido en la Sección 4.5.4. Derivado de este análisis se crearon 5 grupos en los que coincidieron las bandas en igual número y posición. A partir de esto, se tomó un aislado de cada grupo para su secuenciación, tomando en cuenta los de mayor porcentaje de inhibición. El primer grupo (1) estuvo conformado por los aislados de los grupos B, D, J, I y K. El segundo (2) por aislados de los grupos F, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y L. El cuarto grupo (4) involucró a los aislados del grupo C y H. El tercer (3) y quinto (5) grupo solo tuvieron un aislado bacteriano (Figura 27). Dado que el grupo 2 incluyó los aislados de mayor porcentaje en las pruebas *in vitro* se decidió tomar dos aislados de este grupo para su identificación. Los aislados bacterianos

seleccionados por grupo fueron: grupo 1, aislado ATY-6; grupo 2, aislado BTZ-17 y aislado BTZ-1; grupo 3, aislado ATY-15; grupo 4, aislado ATZ-21 y grupo 5, aislado ATY-2.

Este procedimiento permitió reducir considerablemente el número de aislados bacterianos, quedando finalmente para su secuenciación, únicamente 6 de los 13 aislados bacterianos considerados al inicio de esta prueba. Este hecho generó un mejor manejo en las muestras, debido a la reducción en el número de aislados lo que a su vez contribuyó en la reducción considerable en el costo final al momento de llevar a cabo la secuencia de cada amplicón. Existen reportes en donde la utilización de este tipo de métodos ha generado ventajas como las ya mencionadas anteriormente, generalmente donde reportan un gran número de aislados [60, 116, 117]

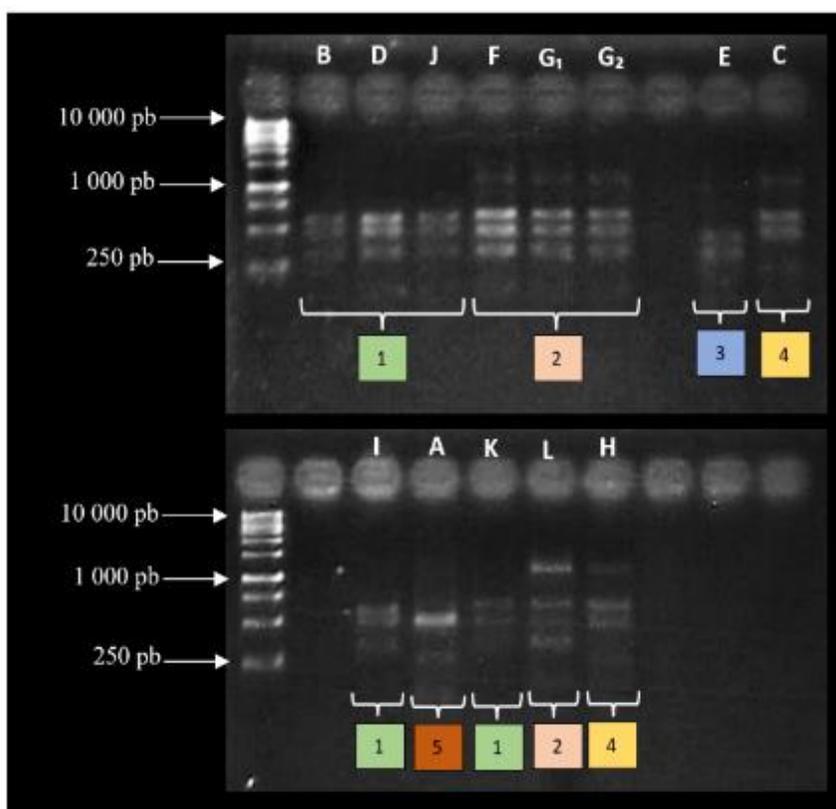


Figura 27. Bando del análisis de enzimas de restricción por la enzima HAE III mostrados en gel de agarosa al 2%, de los aislados bacterianos seleccionados A: ATY-2, B: ATY-13, C: ATZ-1, D: BTZ-7, E: ATY-15, F: BTZ-17, G<sub>1</sub>: BTZ-1, G<sub>2</sub>: ATZ-7, H: ATZ-15, I: ATZ-6, J: BTZ-5, K: ATY-6, L: ATY-1. Los recuadros de color indican los grupos en los que se clasificaron los aislados bacterianos dependiendo del patrón de bandeo resultante.

## 5.5.2 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron ingresadas a la base de datos EZBioCloud [107], que a su vez se encuentra ligada a la base de datos GenBank, esto con el propósito de obtener las secuencias de referencias y su porcentaje de similitud correspondiente para cada aislado bacteriano secuenciado (Tabla 10). Conforme a las asociaciones para cada aislados bacteriano y para fines prácticos del desarrollo de las discusiones los aislados bacterianos se nombraron de acuerdo con la cepa de referencia de mayor porcentaje de similitud.

Tabla 10. Asociaciones de aislados con las secuencias depositadas en la base de datos EZBioCloud.

Aislado	Asociado a:	Similitud (%)
BTZ-1	<i>B. velezensis</i>	99.8
ATY-6	<i>B. halotolerans</i>	99.7
BTZ-17	<i>B. halotolerans</i>	99.9
ATZ-21	<i>B. aryabhatai</i>	100.0
ATY-2	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	99.8
ATY-15	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	100.0

Conforme a la asociación, específicamente para el caso ATY-6 y BTZ-17, ambos se asocian con *B. halotolerans* en un 99.7 y 99.9% de similitud respectivamente. Esta especie de *Bacillus* presenta reportes de efectos nematocidas y antifúngicos. Sagredo-Beltran *et al.* [118], reportaron una cepa de *B. halotolerans*, aislada de muestras de suelo de áreas agrícolas en la región norte de México, con capacidad biocontroladora de cuatro fitopatógenos entre los que se encuentran *F. oxysporum*, causante de la pudrición de la raíz de diversos cultivos de la región. Los resultados de los ensayos de confrontación dual arrojaron que *B. halotolerans* inhibió en un 60% el crecimiento del fitopatógeno *F. oxysporum*. Esta rizobacteria fue probada *in vivo*, en plántulas de pimiento, demostrando una interacción amigable con las plántulas de pimiento cuando se inocularon las raíces con *B. halotolerans*. De acuerdo con esto, es posible hacer un pronóstico favorable sobre la utilización de los aislados bacterianos ATY-6 y BTZ-17 para el biocontrol en cultivos de jitomate. Xia *et al.* [119], estudiaron una cepa de *B. halotolerans* aislada de cultivos de tabaco la cual además de mostrar capacidad para controlar enfermedades fúngicas en las plantas de jitomate mostró efectos nematocidas, reportando la mortandad de juveniles hasta en un 75% a las 12 h de exposición.

Adicionalmente, observaron un incrementando favorable del peso fresco en las raíces de las plantas de jitomate. Los trabajos anteriores enfatizan el potencial que puede tener nuestro aislado para reducir del daño generado por *F. oxysporum* en las plantas de jitomate, así como su potencial para combatir a otros patógenos del cultivo.

El aislado BTZ-1, se asoció a *B. velezensis* en un 99.8% de similitud. Esta especie presenta numerosos reportes orientados al biocontrol de diversos patógenos que afectan a una gran variedad de cultivos, incluyendo: fresa, plátano, trigo y jitomate. Huang-Jianfeng *et al.* [120], reportaron la eficiencia de una cepa de *B. velezensis* en el control de la marchitez por *F. oxysporum* que afecta a la planta de plátano. Los ensayos *in vitro* mostraron inhibición contra este patógeno, por lo cual se realizaron las pruebas *in vivo* en plantas de plátano. La cepa *B. velezensis* fue probada en conjunto con un mejorador ácido de suelo mostrando mayor eficacia, por encima del 66% en la supresión del marchitamiento por el patógeno en comparación con los resultados de los tratamientos sin mejorador. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, puesto que se observan PI semejantes a los reportados. La utilización de una mezcla de *B. velezensis* y un mejorador de suelo, como reportan estos autores, podría potencializar la efectividad biocontroladora del aislado BTZ-1 en pruebas *in vivo*. Además de sus amplias aplicaciones en la agricultura, se ha demostrado que *B. velezensis* tiene aplicaciones en la degradación de subproductos industriales tóxicos, incluso la biorremediación de aguas residuales [121]. Al igual que *B. halotolerans*, *B. velezensis* está ampliamente relacionada al complejo *B. subtilis* [10, 122]. Este complejo está integrado por bacterias del género *Bacillus* las cuales se encuentran sumamente relacionadas entre sí, entre los géneros que integran este complejo se encuentran *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. mojavensis*, *B. tequilensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, entre otras. Las cepas que alberga este complejo son reconocidas por su potencial para ser candidatas de biocontrol por medio de la producción de metabolitos secundarios, especialmente lipopéptidos (LPs) [10, 82]. Particularmente, *B. velezensis* produce una amplia diversidad de LPs con actividad biocontroladora, entre estos los más mencionados son: bacilomicina y fengicina [123]. Los reportes anteriores reafirman la efectividad de BTZ-1 como generadora de antagonismo y dan paso a la posibilidad de emplear a este agente biológico otras áreas de interés.

El aislado ATY-2 se asoció en un 99.8% de similitud a *Brevibacterium frigoritolerans*. *Brevibacterium* fue reclasificada a *Bacillus frigoritolerans* en 2020 en un estudio realizado por Liu *et al.* [124] donde evidencia diversas similitudes con este género. Se ha reportado el uso potencial

de *B. frigoritolerans* en cuestiones de contaminación ambiental, debido a que posee la capacidad para actuar como agente de biorremediación de suelos contaminados con insecticidas organofosforados [125]. Adicionalmente, ha demostrado potencial para actuar como agente de control contra algunos patógenos de humanos como *Candida*, *Vibrio*, *Salmonella*, entre otros [126].

El aislado ATZ-21, se relaciona en un 100% de similitud a *B. aryabhatai*. Esta cepa cuenta con muy pocos reportes sobre sus efectos de biocontrol en cultivos agrícolas, sin embargo, existen reportes sobre su efecto promotor de crecimiento vegetal. Park *et al.* [127], aislaron una cepa de *B. aryabhatai* proveniente del suelo rizosférico de cultivos de soya. La microscopia electrónica de barrido demostró la efectiva colonización de *B. aryabhatai*, además, los resultados mostraron una diferencia significativa en la longitud de los brotes y tamaño de las hojas, en contraste con el control, lo que indicó que *B. aryabhatai* promueve el crecimiento en la planta. El efecto de promoción de crecimiento se observó en plantas cultivadas en condiciones de alta temperatura, lo que determinó que *B. aryabhatai* mejora el estrés por calor. Asimismo, se ha reportado que *B. aryabhatai* tiene potencial en el área de biorremediación. Nagwa *et al.* [128] recolectaron muestras de una zona agroindustrial de Egipto, obteniendo de ello un total de 30 aislados bacterianos, diez de los cuales tuvieron la capacidad de crecer en un medio que contenía glifosato, un herbicida organofosforado que tiene un impacto adverso en los seres humanos. El aislado identificado como *B. aryabhatai* mostró el mayor crecimiento cuando fue expuesto al agente sintético. Aunado a lo anterior, se comprobó mediante herramientas bioinformáticas y moleculares que *B. aryabhatai* contiene el gen *goxB*, el cual codifica la enzima glifosato oxida lo sugiere el uso de esta cepa en ambientes contaminados con glifosato para su biorremediación. Surabhi *et al.* [129], indicó también el efecto biorremediador de *B. aryabhatai*, aislada a partir de aguas residuales en una fábrica de papel. Se determinó que *B. aryabhatai* era capaz de reducir en un 67% y 54% de color y lignina respectivamente, después de 144 h de tratamiento. El estudio concluyó que *B. aryabhatai* era potencialmente significativo para la biorremediación de aguas residuales, incluso a escala industrial. Por lo anterior, el aislado ATZ-21 asociado a *B. aryabhatai* puede significar un beneficio en áreas de importancia medio ambiental.

Por último, el aislado ATY-15 se asoció con *Delftia tsuruhatensis* en un 100% de similitud. *Delftia* es considerado un género con diversas aplicaciones dada su capacidad para adaptarse fácilmente a distintos entornos. Se ha reportado la capacidad de *D. tsuruhatensis* para sobrevivir, degradar o transformar compuestos contaminantes como metales pesados [130, 131]. Además de

eso, Panda *et al.* [132] reportaron a *D. tsuruhatensis* como promotora de crecimiento de plantas como maíz, arroz, jengibre y cardomomo. Asimismo, Prasannakumar *et al.* [133] reportaron una cepa de *D. tsuruhatensis* con actividad de promoción de crecimiento y de biocontrol en plantas de jitomate. La cepa de *D. tsuruhatensis* arrojó resultados positivos en la colonización exitosa de las raíces y solubilización de fosfato. Al igual que los demás aislados del presente trabajo, ATY-15 asociado a *D. tsuruhatensis* presenta reportes que indican su potencial como promotoras de crecimiento y en la biorremediación de suelos, por lo cual este aislado puede ser considerado para su estudio futuro en otras áreas.

Los resultados de las secuencias se analizaron y con ellos se realizó la construcción del árbol filogenético el cual permitió observar la formación de 4 clados en los que se distribuyen los aislados del presente trabajo; tres de ellos relacionados con el género *Bacillus* y uno más al género *Delftia* (Figura 28). El primer clado albergó la mayor cantidad de cepas, agrupando a los aislados ATY-6, BTZ-17 y BTZ-1 con las cepas *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. halotolerans*, *B. velezensis* y *B. siamensis*. Como ya se mencionó anteriormente, cada una puede pertenecer a una especie en particular, sin embargo, la cercanía genética de estas cepas hace compleja su identificación. En el segundo clado, el aislado ATY-2 se agrupó con las cepas de referencia de *B. muralis*, *B. frigoritolerans*, *B. simplex* y *B. thuringiensis*. En el tercer clado, el aislado ATZ-21 se agrupó con *B. aryabhatai* y *B. megaterium*. En el último de los clados, en un género completamente diferente se agrupó el aislado ATY-15 junto con *D. tsuruhatensis* y *D. lacustris*.

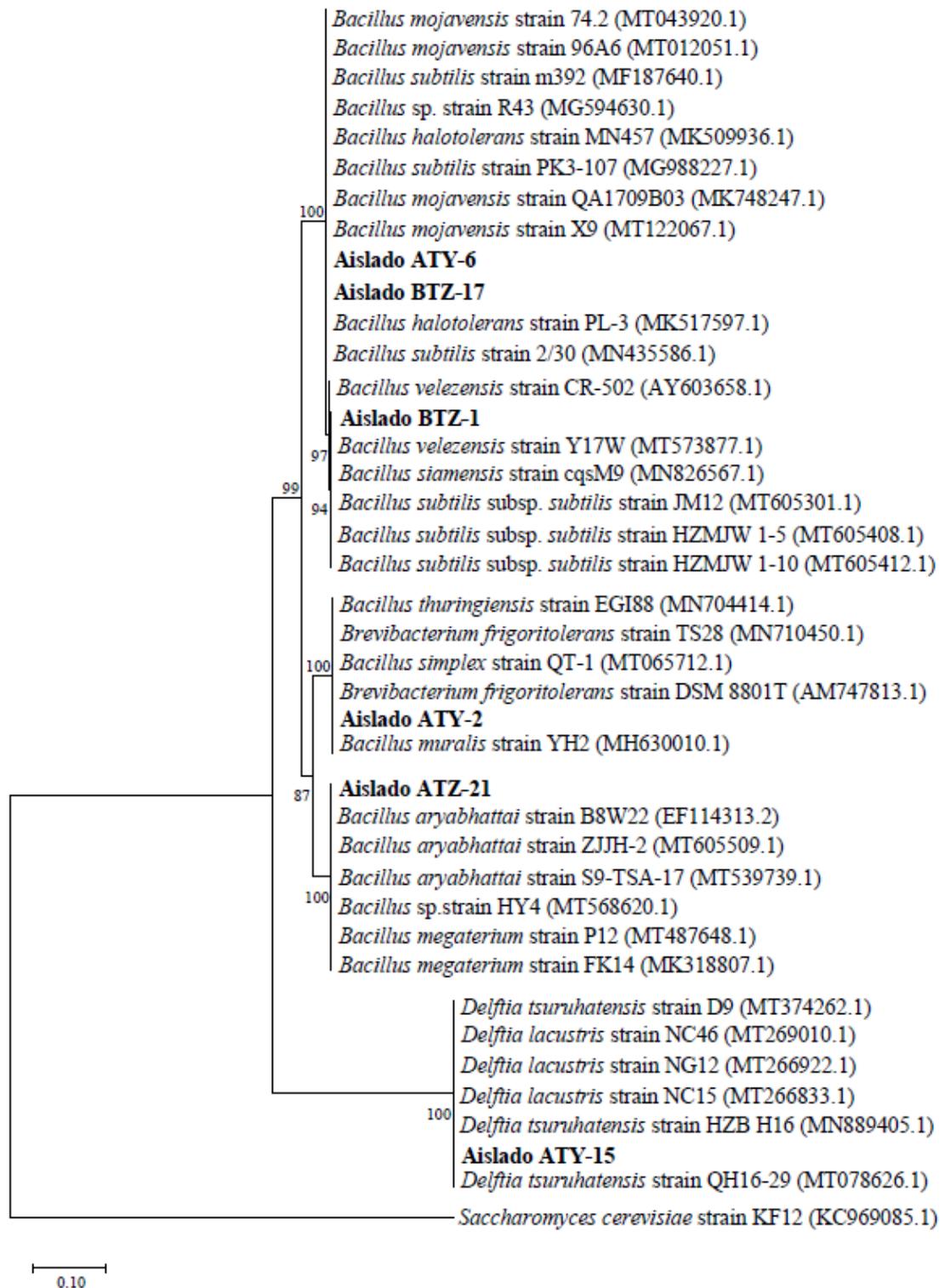


Figura 28. Árbol filogenético construido por el método de Máxima verosimilitud.

Muestra la relación entre los aislados bacterianos seleccionados y cepas bacterianas similares, utilizando como modelo Kimura 2 con sitios evolutivamente invariables (+ I) y un método Bootstrap con 1000 repeticiones. Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* como agrupación externa.

Todos los aislados bacterianos, considerando su asociación, cuentan con referencias de biocontrol como rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas o como biorremediadoras. En particular, el género *Bacillus*, es considerado uno de los más abundantes y eficaces para ejercer antagonismo frente a diversos fitopatógenos, incluyendo a *F. oxysporum*. En este trabajo cinco de los seis aislados bacterianos, pertenecen al género *Bacillus*, lo cual concuerda con los reportes previos que indican a *Bacillus* como el género más abundante con actividad antagonista. En relación con el aislado perteneciente al género *Delftia*, puede ser una alternativa innovadora dado que diversos trabajos revisados la consideran una cepa versátil debido a que ha demostrado ser eficaz en la promoción de crecimiento y en el área medio ambiental como agente biorremediador.

Tomando en cuenta la asociación en la identificación molecular de los aislados bacterianos y siguiendo la ruta del análisis molecular con enzimas de restricción, se realizó el análisis de la diversidad presente en las muestras de rizósfera recolectadas en zona de la Mixteca. Este análisis indicó que de los 32 aislados iniciales estos pertenecen a cinco especies diferentes. En el caso de los aislados bacterianos provenientes de la rizósfera de plantas de jitomate sanas cultivadas en invernadero, se encontraron solo ocho aislados bacterianos, los cuales, corresponden al género *Bacillus*, específicamente dos corresponden a *B. velezensis* y seis de ellos a *B. halotolerans*. Por otro lado, los aislados provenientes de rizósfera de plantas de jitomate sanas cultivadas en parcelas a cielo abierto, es más diversa, con 24 aislados bacterianos. Estos correspondieron a los géneros *Bacillus* y *Delftia*, específicamente *B. velezensis* (7), *B. halotolerans* (8), *B. aryabhatai* (4), *B. frigoritolerans* (2) y *D. tsuruhatensis* (3), como se indica en la Tabla 11.

Tabla 11. Procedencia y diversidad de los aislados bacterianos de muestras de rizósfera de plantas de jitomate sanas recolectada en la región de la Mixteca.

	Invernadero		Parcela a cielo abierto	
	Número	Aislados	Número	Aislados
<i>B. halotolerans</i>	6	BTY-19, BTY-20, BTZ-17, BTZ-5, BTZ-7, BTZ-3	8	ATY-6, ATZ-8, ATY-12, ATZ-17, ATZ-13, ATY-13, ATZ-10, ATZ-6
<i>B. velezensis</i>	2	BTZ-1, BTZ-24	7	ATZ-7, ATZ-3, ATZ-12, ATY-9, ATZ-20, ATY-1, ATZ-9
<i>B. frigoritolerans</i>	-	-	2	ATY-2, ATY-19
<i>B. aryabhatai</i>	-	-	4	ATZ-2, ATZ-1, ATZ-5, ATZ-15
<i>D. tsuruhatensis</i>	-	-	3	ATY-15, ATY-11, ATY-16

Es importante mencionar que el mayor número de aislados bacterianos se encontraron en parcelas a cielo abierto, esto puede deberse a la adaptación de condiciones adversas de estos aislados. Sin embargo, los aislados bacterianos que presentaron mayores resultados de porcentajes de inhibición fueron los encontrados en la rizosfera de plantas de jitomate cultivadas en invernadero. Como ya se mencionó con anterioridad, diversos reportes indican a *Bacillus* como el género más ampliamente distribuido en el suelo, debido a que poseen diversos mecanismos que aseguran su permanencia y supervivencia ante condiciones desfavorables. Ante condiciones físicas adversas, bacterias del género *Bacillus* son capaces de poner en marcha una serie de respuestas, como su capacidad para formar compuestos antimicrobianos, también su capacidad de adaptarse a los cambios bruscos de temperatura, entre muchas otras. Si las respuestas generadas fallan, *Bacillus* tiene la capacidad para formar endoesporas y asegurar su permanencia en el suelo [10, 110].

Conforme al planteamiento anterior, es importante recalcar que este tiene sus limitaciones, debido a que el análisis de las enzimas de restricción puede brindar información escasa dada a la cercanía genética entre algunos de los aislados bacterianos, además de que se requiere la secuenciación de otro gen o en su caso la secuenciación del genoma completo para asegurar la identidad de los aislados bacterianos.

## **5.6 Cinética de crecimiento microbiano**

### **5.6.1 Cinéticas de crecimiento microbiano de rizobacterias identificadas**

Con la finalidad de caracterizar la cinética de crecimiento de las bacterias aisladas de la rizósfera para su uso en estudios posteriores a este proyecto, se monitoreó el crecimiento de cepas bacterianas identificadas en este trabajo, elegidas por sus porcentajes de inhibición en los ensayos *in vitro*: BTZ-1 asociada a *B. velezensis*, BTZ-17 y ATY-6 asociadas a *B. halotolerans* y ATZ-21 asociada a *B. aryabhatai*.

El tiempo óptimo de crecimiento microbiano para las cuatro cepas probadas se registró a las seis horas de incubación (Figura 29), tiempo al cual se cuantificaron las UFC/mL. En la Tabla 12 se puede observar que las cuentas microbianas arrojan una abundante cantidad de UFC, por lo cual, se puede concluir que es posible llevar las cepas con actividad antagonista de este trabajo a un proceso de producción piloto o industrial usando un medio de cultivo complejo estándar como lo es el medio LB.

Tabla 12. Cuenta microbiana de aislados con mayor inhibición

<b>Aislado</b>	<b>UFC/mL</b>
BTZ-1	$2.4 \times 10^9$
BTZ-17	$3.3 \times 10^9$
ATZ-21	$1.9 \times 10^9$
ATY-6	$5.04 \times 10^9$

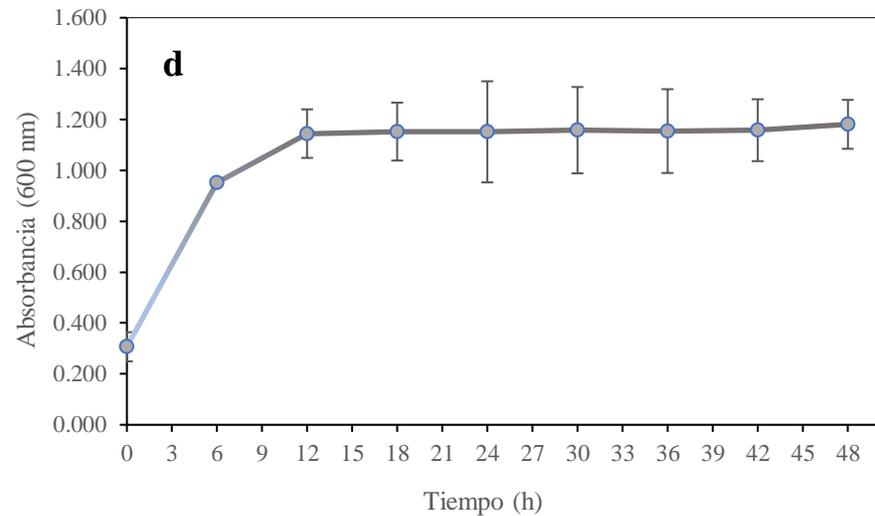
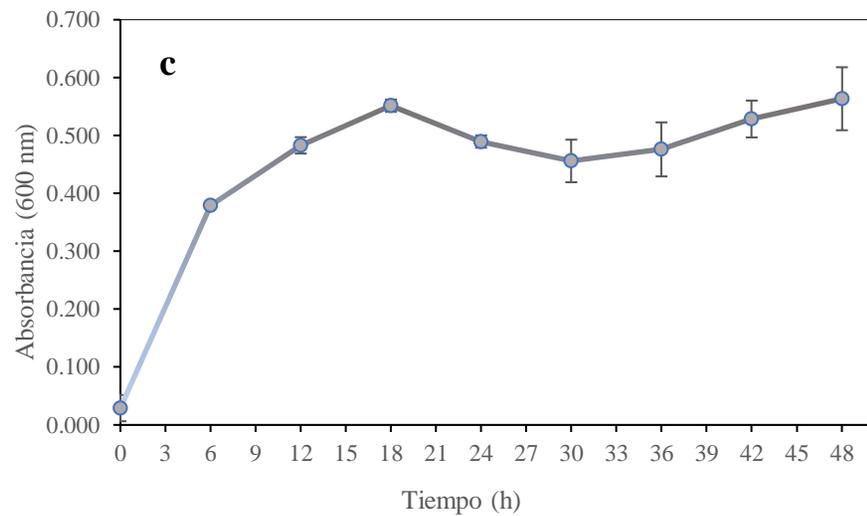
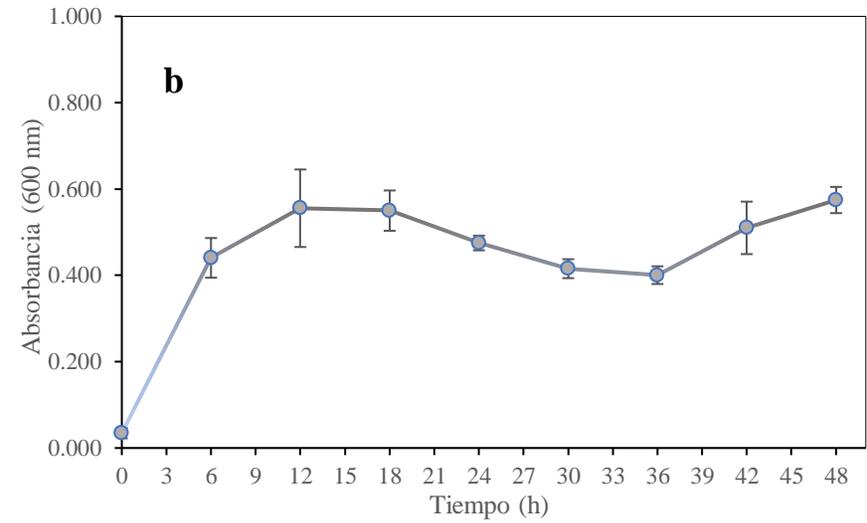
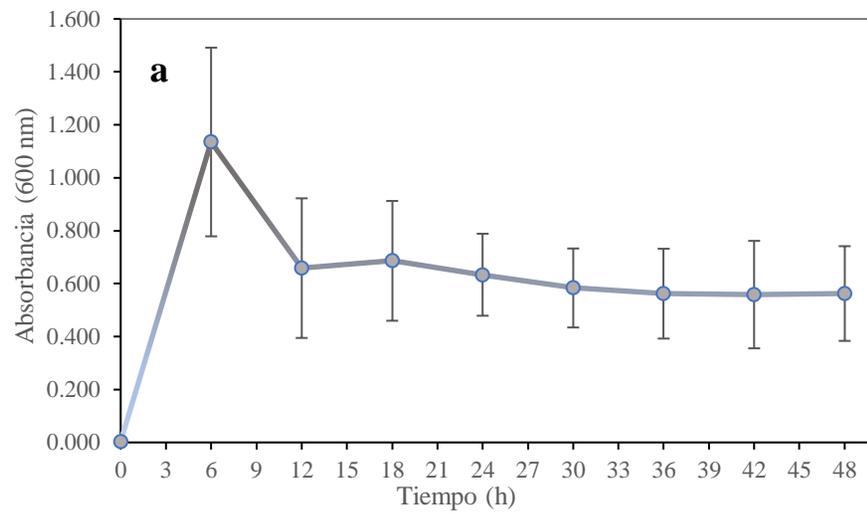


Figura 29. Curvas de crecimiento microbiano de los aislados que mostraron mayor PI.

a) *B. velezensis* (BTZ-1), b) y c) *B. halotolerans* (BTZ-17 y ATY-6), d) *B. aryabhatai* (ATZ-21). En las proyecciones de las cuatro cepas se observa una generación de biomasa acelerada en las primeras 6 h llegando a una fase estacionaria después de las 12 h de incubación.

En el caso de la cepa BTZ-1, Figura 29a, se presentó un salto abrupto en la lectura de absorbancia a las 6 h de incubación, lo que pudo deberse a un crecimiento bacteriano exponencial. Sin embargo, en este periodo de tiempo también se logró observar la generación de biopolímeros (Figura 30) por parte de la bacteria, lo que pudo afectar la medición de la absorbancia, en esta cepa en particular. Lo anterior coincide con lo reportado por Adetomiwa-Ayodele *et al.* [121], en la que se mencionan la generación de biopolímeros exopolisacáridos (EPS) producidos por algunas bacterias entre las que se encuentran *B. velezensis*. Los EPS microbianos, son el grupo más relevante de biopolímeros, se componen principalmente de carbohidratos y algunas proteínas, los cuales son sintetizados por los microorganismos, secretándolos y acumulándolos extracelularmente [134]. Los EPS tienen una amplia gama de aplicaciones en diversas áreas como lo son la industria alimentaria, química, textil, cosmética y farmacéutica, entre otras [135].



Figura 30. Celda de espectrofotómetro con biopolímero generado por la cepa *B. velezensis* (BTZ-1).

El aislado BTZ-1 (*B. velezensis*) es una rizobacteria con diversos puntos que la señalan como eficaz para generar biocontrol, además de ser un importante objeto de investigación bastante prometedor en áreas de la salud, ambiental, agrícola entre otras. Cabe mencionar que los aislados BTZ-17 (Figura 29b) y ATY-6, (Figura 29c), ambos *B. halotolerans*, presentaron la misma tendencia antes mencionada, pero en mucho menor cantidad. Sin embargo, es importante señalar

que los cuatro aislados sometidos a este procedimiento, tuvieron un tiempo de crecimiento corto, lo que es primordial si se desea llevarlo a escala de biorreactor.

## 6. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 32 aislados de rizosfera de plantas de jitomate sanas, las cuales se agruparon en 11 morfotipos según sus características morfológicas coloniales y celulares. Un total de siete aislados bacterianos inhibieron de forma significativa a *F. oxysporum* con respecto al control, en la prueba de actividad antimicrobiana por difusibles. Los porcentajes de inhibición se encontraron en el rango de 6% hasta 61%. El aislado bacteriano que mostró mayor porcentaje de inhibición para esta prueba fue el aislado BTZ-1. En cuanto a la actividad antimicrobiana de los aislados bacterianos mediante la producción de COV, 15 aislados resultaron significativamente diferentes con respecto al control. El aislado de mayor inhibición para esta prueba fue el aislado BTZ-17.

Los ensayos de patogenicidad mostraron que el 100% de las plantas de jitomate utilizadas en el ensayo, tuvieron algún tipo de daño en sus raíces, sin embargo, la severidad de la enfermedad fue aparentemente baja. Es posible que el tiempo del experimento debiera ser más largo, para que el patógeno generara un daño más visible. Siguiendo los postulados de Koch, *F. oxysporum* fue re-aislado de tejido sintomático de raíces de plantas tratadas con el patógeno. Esto confirmó la presencia del patógeno en las plantas de jitomate.

La identificación molecular de las bacterias seleccionadas por su actividad antimicrobiana arrojó un porcentaje de similitud por arriba del 99.7% para los seis aislados bacterianos en la base de datos de secuencias del gen 16S de cepas tipo EZBioCloud. El ingreso de las secuencias a la base de datos indicó, la asociación de cinco de los seis aislados bacterianos como pertenecientes al género *Bacillus* y uno más al género *Deftia*. Particularmente los del género *Bacillus*, se asociaron a la especie *B. velezensis* (BTZ-1), *B. aryabhatai* (ATZ-21), *B. halotolerans* (ATY-6 y BTZ-17) y *B. frigoritolerans* (ATY-2). El aislado bacteriano del género *Deftia* se asoció a la especie *D. tsuruhatensis* (ATY-15). Siendo los aislados pertenecientes al género *Bacillus* los de mejor inhibición, BTZ-1 asociado a *B. velezensis* y BTZ-17 asociado a *B. halotolerans*.

Se determinó que de los 32 aislados bacterianos, 24 de ellos provenían de muestras de rizósfera de plantas sanas de jitomate cultivadas en parcelas a cielo abierto, siendo 21 de estas pertenecientes al género *Bacillus* y tres al género *Deftia*. Por el contrario, las ocho restantes de

ellas, provenían de muestras de rizósfera de plantas sanas de jitomate cultivadas en invernadero, siendo en su totalidad pertenecientes al género *Bacillus*.

En cuanto a las características de crecimiento se concluyó que los cuatro aislados analizados; BTZ-1, BTZ-17, ATY-6 y ATZ-21, todos ellos pertenecientes al género *Bacillus*, tuvieron un tiempo óptimo de desarrollo a las 6 h de crecimiento, lo que puede representar un beneficio en el manejo de los recursos al trabajar con estos aislados, en un escalamiento a nivel reactor para trabajos futuros.

En el presente trabajo se encontró que la rizósfera de plantas de jitomate de la región de la Mixteca Oaxaqueña, alberga a bacterias con potencial antagonista contra hongos fitopatógenos del jitomate, especialmente del género *Bacillus*. Asimismo, el aislado ATY-15 asociado a *D. tsuruhatensis*, es una bacteria que ha sido poco estudiada como agente de biocontrol, por lo cual trabajos posteriores deben ser dirigidos a evaluar en campo, el potencial de estas rizobacterias para controlar los patógenos que afectan el cultivo de jitomate en la región.

## 7. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se lograron identificar hasta género los aislados bacterianos con potencial de actividad antagonista contra *F. oxysporum*, fitopatógeno que afecta el cultivo de jitomate. Por lo cual, la secuenciación adicional de otro gen o la secuenciación del genoma completo de estos aislados bacterianos podría ser una alternativa para la identificación a nivel de especie.

Además, la confirmación de su actividad antagónica se llevó a cabo mediante pruebas *in vitro*; sin embargo, para conocer el verdadero potencial de estas bacterias como agentes de biocontrol es importante la realización de pruebas en sistemas *in planta*. Las pruebas pueden llevarse a cabo con la adición de una o un consorcio de las rizobacterias identificadas, con la finalidad de obtener bio-formulaciones bacterianas más eficientes para el control de fitopatógenos en el cultivo de jitomate [136]. También se sugiere evaluar el efecto biocontrolador de estas cepas en otros cultivos producidos en la región, siempre pensando en la innovación y aplicación a gran escala.

Además de esto, es primordial estudiar a fondo los mecanismos involucrados en el antagonismo que generaron las rizobacterias de mayor inhibición del presente trabajo. Para esto se propone evidenciar los metabolitos secundarios presentes en el antagonismo. Asimismo, el estudio

de los compuestos exopolisacáridos producidos por algunas de las rizobacterias de este trabajo, pueden ser indagados a fondo ya que estas moléculas pueden ser aplicadas en la agricultura u otras áreas biotecnológicas.

## 8. REFERENCIAS

1. SAGARPA (2017) Planeación agrícola nacional 2017-2030. México
2. Macias A. (2003) Enclaves agrícolas modernos : el caso del jitomate mexicano en los mercados internacionales. *Reg y Soc* 15:104–151
3. Mosqueda E.B. (2002) Uso reducido de insecticidas y control biológico de plagas de jitomate en Oaxaca
4. Díez M.J., Nuez F. (2008) Tomato. In: Nuez J.P.F. (ed) *Vegetables II*, Springer. New York, NY, pp 249–323
5. Vos C.M., Yang Y., Coninck B. D., Cammue B.P.A. (2014) Fungal ( -like ) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biol Control* 74:65–81 . <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.04.004>
6. Aydi Ben Abdallah R., Mokni-Tlili S., Nefzi A., Jabnoun-Khiareddine H., Daami-Remadi M. (2016) Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. *Biol Control* 97:80–88 . <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.005>
7. Karthika S., Varghese S., Jisha M.S. (2020) Exploring the efficacy of antagonistic rhizobacteria as native biocontrol agents against tomato plant diseases. *3 Biotech* 10:1–17 . <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02306-1>
8. Mejía Z. (1999) Management Alternatives for Plant Diseases. *Terra* 17:201–207
9. Fernández-Larrea Vega O. (2001) Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. *Manejo Integr Plagas (Costa Rica)* 96–100 . <https://doi.org/10.1080/09583150310001517992>
10. Caulier S., Nannan C., Gillis A., Licciardi F., Bragard C., Mahillon J. (2019) Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front Microbiol* 10:1–19 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
11. SIAP (2020) Panorama agroalimentario 2020. México
12. Rahman M.M., Rashid M.H., Hossain M.M., Zakaria M. (2018) Morphological characterization of tomato ( *Solanum lycopersicum* L . ) genotypes. *J Saudi Soc Agric Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.11.001>
13. Dios J., Orañeui B., Miguel J., Vázquez P., Campos A.T., Reyes J.R., Flores O.E. (2013)

Manual para el cultivo del jitomate en bioespacios e invernadero

14. Kaur C., Walia S., Nagal S., Walia S., Singh J., Singh B.B., Saha S., Singh B., Kalia P., Jaggi S., Sarika (2013) Functional quality and antioxidant composition of selected tomato (*Solanum lycopersicon L*) cultivars grown in Northern India. LWT - Food Sci Technol 50:139–145 . <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.013>
15. Powell A.L.T., Bennett A.B. (2002) Tomato. In: Valpuesta V (ed) Fruit and Vegetable Biotechnology. Spain, pp 185–221
16. Dorais M., Ehret D.L., Papadopoulos A.P. (2008) Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: From the seed to the consumer. Phytochem Rev 7:231–250 . <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9085-x>
17. Labate J.A., Grandillo S., Fulton T., Muños S., Caicedo A.L., Peralta I., Ji Y., Chetelat R.T., Scott J.W., Gonzalo M.J., Francis D., Yang W., Van E., Knaap D., Baldo A.M., Smith-white B., Mueller L.A., Prince J.P., Nicholas E. (2007) Tomato. In: Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, C. Kole. Berlin Heidelberg, pp 1–125
18. FAO (2020) FAOSTAT-Food and Agricultural Commodities Production
19. Rosell S., Jo M., Nuez F. (1996) Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop . I . The Tomato spotted wilt virus - a review. Sci Hortic (Amsterdam) 67:117–150
20. Umpiérrez M.L., Lagreca M.E., Cabrera R., Grille G., Rossini C. (2012) Essential oils from Asteraceae as potential biocontrol tools for tomato pests and diseases. Phytochem Rev 11:339–350 . <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9253-5>
21. Bernal R. (2010) Enfermedades de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) en invernadero en las zonas de salto y bella unión, Unidad de. Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay <http://www.inia.org.uy>
22. FAO (2003) Manejo integrado de enfermedades. 1–27
23. Grille M.E.L, Bonato C.B.O. (2016) Host preferences and biotic potential of *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* ( Hemiptera : Aleyrodidae ) in tomato and pepper. Arthropod Plant Interact 10:293–301 . <https://doi.org/10.1007/s11829-016-9434-z>
24. Zaidi S.S., Briddon R.W., Mansoor S. (2016) Engineering Dual *Bemisia tabaci* Resistance in Plants. Trends Plant Sci xx:1–3 . <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.005>
25. Yuqing W., Yaxian Z., Zhipeng G.A.O., Wencai Y. (2018) Breeding for Resistance to

- Tomato Bacterial Diseases in China : Challenges and Prospects. *Hortic Plant J* 4:193–207 .  
<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.004>
26. Gijzen B.M.T. (2014) The phytophthora sojae Genome Sequence: Foundation for a revolution. In: Ralph A. Dean, Ann Lichens- Park CK (ed) *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes : Dicot Pathogens*. USA, pp 133–157
  27. Andrade Lourenço D., Branco I., Choupina A. (2020) Phytopathogenic oomycetes: a review focusing on *Phytophthora cinnamomi* and biotechnological approaches. *Mol Biol Rep* 47:9179–9188 . <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05911-8>
  28. Zhou L., Yuen G., Wang Y., Wei L., Ji G. (2016) Evaluation of bacterial biological control agents for control of root- knot nematode disease on tomato. *Crop Prot* 84:8–13 .  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.12.009>
  29. Ma Y., Li Y., Lai H., Guo Q., Xue Q. (2017) Effects of two strains of *Streptomyces* on root-zone microbes and nematodes for biocontrol of root-knot nematode disease in tomato. *Appl Soil Ecol* 112:34–41 . <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.01.004>
  30. Noval B., Pérez E., Martínez B., León O. (2007) Exogenous systemin has a contrasting effect on disease resistance in mycorrhizal tomato ( *Solanum lycopersicum* ) plants infected with necrotrophic or hemibiotrophic pathogens. *Mycorrhiza* 17:449–460 .  
<https://doi.org/10.1007/s00572-007-0122-9>
  31. Estiarte N., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J. (2016) International Journal of Food Microbiology Effect of 1-methylcyclopropene on the development of black mold disease and its potential effect on alternariol and alternariol monomethyl ether biosynthesis on tomatoes infected with *Alternaria alternata*. *Int J Food Microbiol* 236:74–82 .  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.001>
  32. Pawar P.R., Bhosale A.M., Lolage Y.P. (2016) Early Blight of Tomato. *Int J Adv Technol Innov Res* 08:1721–1728
  33. Pane C., Fratianni F., Parisi M., Nazzaro F., Zaccardelli M. (2016) Control of *Alternaria* post-harvest infections on cherry tomato fruits by wild pepper phenolic-rich extracts. *Crop Prot* 84:81–87 . <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.02.015>
  34. Basco M.J., Bisen K., Keswani C., Singh H.B. (2017) Biological management of *Fusarium* wilt of tomato using biofortified vermicompost. *Mycosphere* 8:467–483 .  
<https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/3/8>

35. Mcgovern R.J. (2015) Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Prot* 73:78–92 . <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>
36. International (2008) Programa De Diversificacion Hortalizas Proyecto De Desarrollo De La Cadena De Valor Y Conglomerado Agricola. *Chemomics Int Inc* 34
37. Hayes B.M.E., Anderson M.A., Traven A., Weerden N.L. Van D., Bleackley M.R. (2014) Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1573-8>
38. FAO (2007) Listado de plaguicidas usados para el control de enfermedades en tomate
39. Singh D.P., Prabha R. (2019) Microbial interventions in agriculture and environment
40. Bashir M.R., Atiq M., Sajid M., Mohsan M., Abbas W., Alam M.W., Bashair M. (2018) Antifungal exploitation of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* causing *Fusarium* wilt of chilli pepper in Pakistan. *Environ Sci Pollut Res* 25:6797–6801 . <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1032-9>
41. Pérez-Terrón R., Gonzalez-Montfort T.S., Muñoz-Rojas J. (2014) Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum Mill*) y maíz (*Zea Mays*). *Rev Iberoam Ciencias* 1:53–60
42. Perry L.G., Vivanco J.M., Weir T.L., Bais H.P., Gilroy S. (2006) The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266 . <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
43. Dias M.P., Bastos M.S., Xavier V.B., Cassel E., Astarita L. V., Santarém E.R. (2017) Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiol Biochem* 118:479–493 . <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.017>
44. Chauhan A., Guleria S., Balgir P.P., Walia A., Mahajan R., Mehta P., Shirkot C.K. (2017) Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Brazilian J Microbiol* 48:294–304 . <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.001>
45. Mota M.S., Gomes C.B., Souza Júnior I.T., Moura A.B. (2017) Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Brazilian J Microbiol* 48:62–70 . <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.003>
46. Berendsen R.L., Pieterse C.M.J., Bakker P.A.H.M. (2012) The rhizosphere microbiome and

- plant health. Trends Plant Sci 17:478–486 . <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
47. Qiao J., Yu X., Liang X., Liu Y., Borriss R., Liu Y. (2017) Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. BMC Microbiol 17:1–12 . <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1039-x>
  48. Tyc O., Song C., Dickschat J.S., Vos M., Garbeva P. (2017) The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. Trends Microbiol 25:280–292 . <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>
  49. Vaikuntapu P.R., Dutta S., Samudrala R.B., Rao V.R.V.N., Kalam S., Podile A.R. (2014) Preferential Promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) Growth by Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Tomato. Indian J Microbiol 54:403–412 . <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0470-z>
  50. Meena V.S., Meena S.K., Verma J.P, Kumar A., Aeron A., Mishra P.K., Bisht J.K., Pattanayak A., Naveed M., Dotaniya M.L. (2017) Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: A review. Ecol Eng 107:8–32 . <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.06.058>
  51. Zehnder G.W., Murphy J.F., Sikora E.J., Kloepper J.W. (2001) Application of rhizobacteria for induced resistance. Eur J Plant Pathol 107:39–50 . <https://doi.org/10.1023/A:1008732400383>
  52. Bhattacharyya P.N., Jha D.K. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. World J Microbiol Biotechnol 28:1327–1350 . <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
  53. Orozco-Mosqueda M.C., Rocha-Granados M. C., Glick B.R., Santoyo G. (2018) Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. Microbiol Res 208:25–31 . <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.005>
  54. Ambrosini A., Souza R., Passaglia L.M.P. (2016) Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. Plant Soil 400:193–207 . <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2727-7>
  55. Valdenegro M., Barea J.M., Azcón R. (2001) Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid mediterranean

- area. *Plant Growth Regul* 34:233–240 . <https://doi.org/10.1023/A:1013323529603>
56. Xun F., Xie B., Liu S., Guo C. (2015) Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res* 22:598–608 . <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3396-4>
  57. Bertrand J., Caumette P., Lebaron P., Matheron R., Normand P. (2015) *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*
  58. Voet D., Voet J. (2006) *Bioquímica, 3ra Edición*. Uruguay
  59. Flores Tatiana V., Vargas Alvin K. (2014) Morfología Bacteriana. *Rev Actual Clínica* 49:2594–2598
  60. Bazhanov D.P., Yatsevich K.K., Bazhanova A.A. (2010) Phylogenetic identification of three strains of rhizosphere bacteria based on the results of 16s rRNA gene analysis and genetic typing. *Microbiology* 79:374–384 . <https://doi.org/10.1134/S0026261710030148>
  61. Yi-Wei Tang C.W.S. (2018) *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*
  62. Siller-Ruiz M., Hernández-Egido S., Sánchez-Juanes F., González-Buitrago J.M., Muñoz-Bellido J.L. (2017) Métodos rápidos de identificación de bacterias y hongos. Espectrometría de masas MALDI-TOF, medios cromogénicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.010>
  63. Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostrzewa M., Geider K. (2008) Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One* 3: . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002843>
  64. David F., Tienpont B., Sandra P. (2008) Chemotaxonomy of bacteria by comprehensive GC and GC-MS in electron impact and chemical ionisation mode. *J Sep Sci* 31:3395–3403 . <https://doi.org/10.1002/jssc.200800215>
  65. Butler W.R., Kilburn J.O., Kubica G.P. (1987) High-performance liquid chromatography analysis of mycolic acids as an aid in laboratory identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 25:2126–2131 . <https://doi.org/10.1128/jcm.25.11.2126-2131.1987>
  66. Fernández-Olmos A., García-Castillo M., Morosini M., Lamas A. (2012) MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 11:59–62 . <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2011.09.001>

67. Lourdes, Villaescusa de la Rosa M.T., Cámara de Llanza J.R., Espigado I., Grau-Cerrato S., Jurado-Chacón M., Rovira M., Salavert-Lletí M., Serrano D., Solano-Vercet C., Ruiz-Camps I. (2017) Microbioma y secuenciación masiva. *Rev Española Quimioter* ISSN-e 0214-3429, Vol 30, Nº 3, 2017, págs 213-223 30:213–223
68. Rodicio M.D.R., Mendoza M.D.C. (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22:238–245 . <https://doi.org/10.1157/13059055>
69. Van Loon L.C. (2001) Systemic induced resistance. In: *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. USA, pp 521–574
70. Camarena-Gutiérrez, G.; de la Torre-Almaráz R. (2007) Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual. *Ser Ciencias For y del Ambient* 13:157–162
71. Van Loon L.C., Bakker P.A.H.M. (2006) Root-associated bacteria inducing systemic resistance. In: S.S. G (ed) *Plant-Associated Bacteria*. pp 269–316
72. Guevara-Avenidaño E., Bejarano-Bolívar A., Kiel-Martínez A.L., Ramírez-Vázquez M., Méndez-Bravo A., Aguirre-Von Wobeser E., Sánchez-Rangel D., Guerrero-Analco J.A., Eskalen A., Reverchon F., Luisa K.M., Wobeser Von E. (2018) Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiol Res* 219:74–83 . <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.009>
73. Ali G.S, Norman D., El-Sayed A.S. (2015) Soluble and Volatile Metabolites of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPRs): Role and Practical Applications in Inhibiting Pathogens and Activating Induced Systemic Resistance (ISR). In: *Advances in Botanical Research*. Elsevier Ltd, USA, pp 241–284
74. Goswami D., Thakker J.N., Dhandhukia P.C. (2016) Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food Agric* 2:1–19 . <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
75. Audrain B., Farag M.A., Ryu C.M., Ghigo J.M. (2015) Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol Rev* 39:222–233 . <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu013>
76. Schmidt R., Cordovez V., De Boer W., Raaijmakers J., Garbeva P. (2015) Volatile affairs in microbial interactions. *ISME J* 9:2329–2335 . <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.42>

77. Garbeva P., Hordijk C., Gerards S., Boer W. (2014) Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. *FEMS Microbiol Ecol* 87:639–649 . <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12252>
78. Fischbach M.A., Walsh C.T. (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic machinery, and mechanisms. *Chem Rev* 106:3468–3496 . <https://doi.org/10.1021/cr0503097>
79. Arya N., Rana A., Rajwar A., Sahgal M., Sharma A.K. (2018) Biocontrol Efficacy of Siderophore Producing Indigenous Pseudomonas Strains Against *Fusarium* Wilt in Tomato. *Natl Acad Sci Lett* 41:133–136 . <https://doi.org/10.1007/s40009-018-0630-5>
80. Maksimov I. V., Singh B.P., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F., Khairullin R.M. (2020) Prospects and Applications of Lipopeptide-Producing Bacteria for Plant Protection (Review). *Appl Biochem Microbiol* 56:15–28 . <https://doi.org/10.1134/S0003683820010135>
81. Guo Q., Dong W., Li S., Lu X., Wang P., Zhang X., Wang Y., Ma P. (2014) Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiol Res* 169:533–540 . <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.001>
82. Dunlap C.A., Bowman M.J., Rooney A.P. (2019) Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group – important antifungals for plant disease biocontrol applications. *Front Microbiol* 10:1–12 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01794>
83. Kim P.I., Ryu J., Kim Y.H., Chi Y.T. (2010) Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol* 20:138–145 . <https://doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>
84. Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Možina S.S. (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Methods* 81:121–126 . <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
85. OIE WO for AH (2019) Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. In: OIE Terrestrial Manual 2019. p 14
86. Institute and laboratory standards (2012) MIC Testing. *Man Antimicrob susceptibility Test* 32:48

87. Ramirez L.S., Marin Castaño D. (2009) Methodologies for evaluating the *In vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Sci Tech* 263–268
88. Fialho M.B., Toffano L., Pedroso M.P., Augusto F., Pascholati S.F. (2010) Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World J Microbiol Biotechnol* 26:925–932 . <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0255-4>
89. Gotor-Vila A., Teixidó N., Di Francesco A., Usall J., Ugolini L., Torres R., Mari M. (2017) Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiol* 64:219–225 . <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>
90. Calvo H., Marco P., Blanco D., Oria R., Venturini M.E. (2017) Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol* 63:101–110 . <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.004>
91. Guevara-Avenidaño E., Carrillo J.D., Ndinga-Muniania C., Moreno K., Méndez-Bravo A., Guerrero, Analco J.A., Eskalen A., Reverchon F. (2018) Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 111:563–572 . <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0977-5>
92. Toloza-Moreno D.L., Lizarazo-Forero L.M., Uribe-Vélez D. (2020) Antagonist capacity of bacteria isolated from cape gooseberry cultures (*Physalis peruviana* L.) for biological control of *Fusarium oxysporum*. *Trop Plant Pathol* 45: . <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00313-z>
93. Ramírez-Cariño H.F., Guadarrama-Mendoza P.C., Sánchez-López V., Cuervo-Parra J.A., Ramírez-Reyes T., Dunlap C.A., Valadez-Blanco R. (2020) Biocontrol of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma asperelloides* and *Bacillus paralicheniformis* in tomato plants. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 113:1247–1261 . <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01433-2>
94. Mohammed B.L., hussein R.A., Toama F.N. (2019) Biological control of *Fusarium* wilt in tomato by endophytic rhizobacteria. *Energy Procedia* 157:171–179 . <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.178>
95. Hammami I., Hsouna A. B., Hamdi N., Gdoura R., Triki M.A. (2013) Isolation and

- characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia. *Comptes Rendus - Biol* 336:557–564 .  
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2013.10.006>
96. Syed-ab-rahman S.F., Xiao Y., Carvalhais L.C., Ferguson B.J., Schenk P.M. (2019) Suppression of *Phytophthora capsici* infection and promotion of tomato growth by soil bacteria. *Rhizosphere* 9:72–75 . <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.11.007>
  97. Gowtham H.G., Hariprasad P., Nayak S.C., Niranjana S.R. (2016) Application of rhizobacteria antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of *Fusarium* wilt in tomato. *Rhizosphere* 2:72–74 .  
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.07.008>
  98. Prescott L.M., Harley J.P. (2002) Capítulo 3. Estructura y función de la célula. In: *Microbiología*. p 1195
  99. Universidad Regional del Sureste (2019) *Microbiología*
  100. Boix-Ruiz A., Marín-Guirao J.I., Cara-García M., Camacho-Ferre F., Tello-Marquina J.C. (2017) Pathogenicity of plant and soil isolates of *Phytophthora parasitica* on tomato and pepper. *Eur J Plant Pathol* 148:607–615 . <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1116-2>
  101. Shanmugam V, Chugh P, Sharma P (2014) Cold-tolerant *Trichoderma* species for the management of *Fusarium* wilt of tomato plants. *Ann Microbiol* 65:543–551 .  
<https://doi.org/10.1007/s13213-014-0890-3>
  102. Rangel P.P., Hernández M.F., García-hernández J.L., Puente E.R., Ramón J., Rivera E., Herrera A.L., Ángel M., Castruita S., Vidal O. (2011) Evaluación de solución nutritivas orgánicas en la producción de tomate en invernadero. *Interciencia* 36:689–693
  103. Ríos-Sánchez E., Calleros E., González-Zamora A., Rubio J., Martínez O.C., Martínez A., Hernández S., Pérez-Morales R. (2016) Comparative analysis of different DNA extraction methods and their genotyping efficiency in Mexican population. *Acta Univ* 26:56–65 .  
<https://doi.org/10.15174/au.2016.1078>
  104. Escalante A., Giles-Gómez M., Hernández G., Córdova-Aguilar M.S., López-Munguía A., Gosset G., Bolívar F. (2008) Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol* 124:126–134 . <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
  105. Thermo scientific T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers

106. A.Thomas. H. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.* 41:95–98
107. Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J. (2017) Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617 . <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
108. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549 . <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
109. Leslie J.F., Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*
110. Calvo P., Zúñiga D. (2010) Carcterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizosféra de cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecol Apl* 9:31 . <https://doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.393>
111. Huang J., Wei Z., Tan S., Mei X., Yin S., Shen Q., Xu Y. (2013) The rhizosphere soil of diseased tomato plants as a source for novel microorganisms to control bacterial wilt. *Appl Soil Ecol* 72:79–84 . <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.017>
112. Boix-Ruíz A., Gálvez-Patón L., de Cara-García M., Palmero-Llamas D., Camacho-Ferre F., Tello-Marquina J.C. (2015) Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Phytoparasitica* 43:471–483 . <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0444-z>
113. Olivain C., Humbert C., Nahalkova J., Fatehi J., L’Haridon F., Alabouvette C. (2006) Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl Environ Microbiol* 72:1523–1531 . <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1523-1531.2006>
114. Harris Moran S.C. (1903) *Tomate*
115. Chaurasia B., Pandey A., Palni L.M.S., Trivedi P., Kumar B., Colvin N. (2005) Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiol Res* 160:75–81 . <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.013>
116. Mazinani Z., Asgharzadeh A. (2014) Genetic diversity of *Azotobacter* strains isolated from soils by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Cytol Genet* 48:293–301 .

<https://doi.org/10.3103/S0095452714050041>

117. Green M.R., Sambrook J. (2021) Restriction enzymes. Cold Spring Harb Protoc 2021:141–144 . <https://doi.org/10.1101/pdb.top101360>
118. Sagredo-Beltrán J., De La Cruz-Rodríguez Y., Alvarado-Rodríguez M., Vega-Arreguín J., Rodríguez-Guerra R., Alvarado-Gutiérrez A., Fraire-Velázquez S. (2018) Genome sequence of *Bacillus halotolerans* strain MS50- 18A with antifungal activity against phytopathogens, isolated from saline soil in San Luís Potosí, Mexico. Genome Announc 6:1–2 . <https://doi.org/10.1128/genomeA.00135-18>
119. Xia Y., Li S., Liu X., Zhang C., Xu J., Chen Y. (2019) *Bacillus halotolerans* strain LYSX1-induced systemic resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato. Ann Microbiol 69:1227–1233 . <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01504-4>
120. Huang J., Pang Y., Zhang F., Huang Q., Zhang M., Tang S., Fu H., Li P. (2019) Suppression of *Fusarium* wilt of banana by combining acid soil ameliorant with biofertilizer made from *Bacillus velezensis* H-6. Eur J Plant Pathol 154:585–596 . <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01683-5>
121. Adeniji A.A., Loots D.T., Babalola O.O. (2019) *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. Appl Microbiol Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09710-5>
122. Potekhina N. V., Shashkov A.S., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., Kozlova Y.I., Senchenkova S.N., Kudryashova E.B., Evtushenko L.I. (2013) Teichoic acids of three type strains of the *Bacillus subtilis* group, *Bacillus mojavenensis* VKM B-2650, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* VKM B-2582, and *Bacillus sonorensis* VKM B-2652. Microbiol (Russian Fed 82:579–585 . <https://doi.org/10.1134/S002626171305010X>
123. Lee H.H., Park J., Lim J.Y., Kim H., Choi G.J., Kim J.C., Seo Y.S. (2015) Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* G341, a strain with a broad inhibitory spectrum against plant pathogens. J Biotechnol 211:97–98 . <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.07.005>
124. Liu G.H., Liu B., Wang J.P., Che J.M., Li P.F. (2020) Reclassification of *Brevibacterium frigoritolerans* DSM 8801T as *Bacillus frigoritolerans* comb. nov. Based on Genome Analysis. Curr Microbiol 77:1916–1923 . <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01964-x>
125. Jariyal M., Gupta V.K., Mandal K., Jindal V. (2015) *Brevibacterium frigoritolerans* as a

- Novel Organism for the Bioremediation of Phorate. *Bull Environ Contam Toxicol* 95:680–686 . <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1617-2>
126. Jin M., Zhao Q., Zhou Z., Zhu L., Zhang Z., Jiang L. (2020) Draft Genome Sequence of a Potential Organic Phosphorus-Degrading Bacterium *Brevibacterium frigitolerans* GD44, Isolated from Radioactive Soil in Xinjiang, China. *Curr Microbiol* 77:2896–2903 . <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02037-9>
  127. Park Y.G., Mun B.G., Kang S.M., Hussain A., Shahzad R., Seo C.W., Kim A.Y., Lee S.U., Oh K.Y., Lee D.Y., Lee I.J., Yun B.W. (2017) *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *PLoS One* 12:1–28 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173203>
  128. Elarabi N.I., Abdelhadi A.A., Ahmed R.H., Saleh I., Arif I.A., Osman G., Ahmed D.S. (2020) *Bacillus aryabhatai* FACU: A promising bacterial strain capable of manipulate the glyphosate herbicide residues. *Saudi J Biol Sci* 27:2207–2214 . <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.050>
  129. Zainith S., Purchase D., Saratale G.D., Ferreira L.F.R., Bilal M., Bharagava R.N. (2019) Isolation and characterization of lignin-degrading bacterium *Bacillus aryabhatai* from pulp and paper mill wastewater and evaluation of its lignin-degrading potential. *3 Biotech* 9:0 . <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1631-x>
  130. Castro-Sowinski S. (2016) *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*
  131. Bautista-Hernández D.A., Ramírez-Burgos L.I., Duran-Páramo E., Fernández-Linares L. (2012) Zinc and Lead Biosorption by *Delftia tsuruhatensis*: A Bacterial Strain Resistant to Metals Isolated from Mine Tailings. *J Water Resour Prot* 04:207–216 . <https://doi.org/10.4236/jwarp.2012.44023>
  132. Panda B., Rahman H., Panda J. (2016) Phosphate solubilizing bacteria from the acidic soils of Eastern Himalayan region and their antagonistic effect on fungal pathogens. *Rhizosphere* 2:62–71 . <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.08.001>
  133. Prasannakumar S.P., Gowtham H.G., Hariprasad P., Shivaprasad K., Niranjana S.R. (2015) *Delftia tsuruhatensis* WGR-UOM-BT1, a novel rhizobacterium with PGPR properties from *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz also suppresses fungal phytopathogens by

- producing a new antibiotic-AMTM. *Lett Appl Microbiol* 61:460–468 .  
<https://doi.org/10.1111/lam.12479>
134. Moghannem S.A.M., Farag M.M.S., Shehab A.M., Azab M.S. (2018) Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian J Microbiol* 49:452–462 . <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>
  135. Ates O. (2015) Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. *Front Bioeng Biotechnol* 3:1–16 . <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00200>
  136. Santos M.S., Nogueira M.A., Hungria M. (2019) Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express* 9: . <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
  137. Chen Y.L., Lee C.C., Lin Y.L., Yin K.M., Ho C.L., Liu T. (2015) Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics* 16:1–11 . <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S18-S13>

## **9. ANEXOS**

### **Anexo A**

#### **Tinción de aislados por la técnica de Gram**

##### **Elaboración del frotis:**

1. Con ayuda de un asa se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos limpio.
2. Con el asa estéril se tomó parte de una colonia del aislado de estudio y se re-suspendió en la gota del portaobjeto.
3. La mezcla se extendió de manera circular con ayuda del asa y el portaobjeto se pasó rápidamente por la flama del mechero hasta que el frotis quedo fijado (no mantener el portaobjetos sobre la flama por tiempo prolongado, demasiado calor podría dañar la muestra a analizar).

##### **Tinción del frotis:**

1. El frotis se cubrió de colorante cristal violeta (1 minuto), teniendo cuidado que ninguna parte de la muestra quede sin colorante.
2. Transcurrido el tiempo, se retiró el colorante colocando de lado el portaobjeto. Se enjuagó con agua de la llave y se escurrió completamente a manera que no quede con mucha agua.
3. Una vez esto, el frotis se cubrió con solución de lugol (1 minuto), transcurrido el tiempo se procedió a enjuagar de la misma manera.
4. Se cubrió el frotis con alcohol-acetona hasta decoloración (30 segundos) y se enjuagó.
5. Finalmente, el frotis se cubrió con safranina (1 minuto) y se enjuagó.

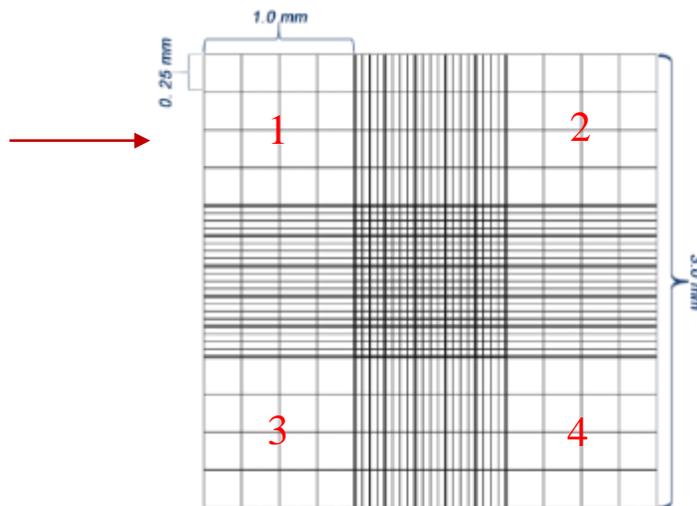
# Anexo B

## Cuantificación de conidios

Se realizó una dilución de la suspensión de conidios 1:10 con agua destilada, seguido de esto se procedió a colocar la muestra en la cámara de Neubauer de forma que se indica a continuación:

Se prepara la cámara colocando el cubreobjetos perfectamente limpio sobre esta. Con ayuda de una micropipeta, se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de la dilución de suspensión de conidios previamente homogenizada por uno de los extremos del cubreobjetos evitando moverlo. Una vez hecho esto, la cámara se colocó en el microscopio (10X) para el conteo de los conidios. Evitar enfocar con otros objetivo para no dañar la cámara.

La cámara contiene 9 cuadros grandes. Fueron contados los cuatro cuadros de los extremos, los cuales están divididos en 16 cuadros pequeños.



Una vez contabilizados los conidios el cálculo final se realizó con ayuda de la siguiente fórmula;

Conidios por  $\mu\text{L}$  =  $\frac{\text{Partículas contadas}}{\text{Superficie contada (mm}^2) \times \text{Profundidad de la cámara (mm)} \times \text{Dilución}}$

Superficie contada (mm<sup>2</sup>) \* Profundidad de la cámara (mm) \* Dilución

## Anexo C

### Preparación de soluciones utilizadas en la extracción del material genético

- **Buffer Fosfato Salino (PBS por sus siglas en inglés)**

#### **Reactivos.**

NaCl 2.015 g.  
KCl 0.055 g.  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2875 g.  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 g.  
Agua destilada 250 mL.

#### **Procedimiento.**

Las sales fueron mezcladas con una fracción agua menor a 250 mL y se colocó en agitación. Una vez completamente disueltos, la mezcla se colocó en un matraz aforado limpio de 250 mL. Con agua destilada se llenó hasta su aforo. Se mezcló la solución por inversión hasta su homogenización total. Una vez mezclado, se colocó en un envase limpio y se esterilizó por 20 min. a 121 °C.

- **Buffer de lisis.**

#### **Reactivos.**

EDTA 9.306 g.  
NaCl 2.19 g.  
Agua destilada 250 mL.

#### **Procedimiento.**

Los reactivos se mezclaron con una fracción agua menor a 250 mL y se llevaron a agitación hasta su completa disolución. Una vez disueltos, la mezcla se colocó en un matraz aforado limpio de 250 mL. Con agua destilada se llenó hasta su aforo y se mezcló por inversión hasta su homogenización total. Se colocó en un envase limpio y se esterilizó por 20 min a 121 °C.

- **Dodecilsulfato sódico (SDS por sus siglas en inglés) al 10%.**

**Reactivos.**

Dodecilsulfato sódico 5 g.

Agua destilada 50 mL.

**Procedimiento**

Se mezcló el SDS en los 50 mL de agua y se colocó en agitación hasta su dilución completa.

Esta solución se esterilizó por 20 min a 121 °C

## **Anexo D**

### **Primers empleados en la amplificación del gen ADNr 16S [137]**

- 27 F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
- 1492 R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

## Anexo E

### Clasificación y agrupamiento de bacterias rizosféricas aisladas a partir de suelo de cultivos de jitomate.

<b>GRUPO A</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
ATY-2	C. Abierto	Blancas amarillentos tornasoles irregulares, planas y lisas. Con tiempo de crecimiento menor a 24 h sobre la estría sembrada.	Bacilos largos la mayoría aislados y en pares.	+
ATY-19	C. Abierto			
<b>GRUPO B</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
ATY-13	C. Abierto	Blanca opaca, plana de forma irregular. Crecimiento extendido con un tiempo de crecimiento de 24 horas.	Bacilos largos, en cadenas que forman conjuntos.	+
<b>GRUPO C</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
ATZ-21	C. Abierto	Blancas, circulares, opaca, superficie arenosa, crecimiento sobre estría con expansión, con un tiempo menor a 24 h.	Bacilos largos, formando cadenas.	+
ATZ-1	C. Abierto			
<b>GRUPO D</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
BTZ-7	Invernadero	Blancas, planas, irregulares, superficie y borde filamentoso. Presenta difuminación. Crece con expansión en menor de 24 h.	Bacilos largos aislados, y algunos en cadenas.	+
<b>GRUPO E</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
ATY-11	C. Abierto	Blancas traslucidas, presentan un halo difuminado. Su crecimiento es sobre la estría en un tiempo menor a 24 h.	Cocobacilos en su mayoría se encuentran aislados y algunos en diplos.	-
ATY-15	C. Abierto			
ATY-16	C. Abierto			
<b>GRUPO F</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
BTZ-17	Invernadero	Blancas transparente, apariencia de cera, tienen bordes hasta que salen de incubación. Su crecimiento es extendido en menor a 24 h.	Cocobacilos la mayoría aislados.	+
<b>GRUPO G</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>

BTZ-1	Invernadero	Apariencia de cera con relieve, mantienen un poco de su aspecto después de refrigeradas. Su crecimiento es extendido en menos de 24 h.	Bacilos medianos, la mayoría aislados.	+
ATZ-7	C. Abierto			
<b>GRUPO H</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
ATZ-15	C. Abierto	Blancas translucidas y planas con superficie lisa. Invade completamente la caja. Su crecimiento puede variar desde menos de 24 h hasta mayor a 24 h.	Bacilos medianos, en su mayoría aislados y algunos se presentan en forma de cadenas.	+
ATZ-5	C. Abierto			
<b>GRUPO I</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
ATZ-6	C. Abierto	Blanca opaca, bordes ligeramente filamentosos, superficie arenosa. Su crecimiento es extendido en un tiempo menor a 24 h.	Bacilos medianos individuales algunos deformes y otros formando cadenas.	+
ATZ-10	C. Abierto			
<b>GRUPO J</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
BTZ-3	Invernadero	Blancas opacas, con superficie arenosa y bordes filamentosos. Su crecimiento es medianamente extendido en menos de 24 h.	Bacilos medianos la mayoría aislados y algunos en cadena.	+
BTZ-5	Invernadero			
<b>GRUPO K</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
ATZ-13	C. Abierto	Blancas planas, circular, formando halo. Su desarrollo en la mayoría es sobre la estría o con poca extensión en menos de 24 h.	Bacilos medianos a cocobacilares aislados.	+
BTY-20	Invernadero			
ATZ-17	C. Abierto			
ATY-12	C. Abierto			
ATZ-8	C. Abierto			
BTY-19	Invernadero			
ATY-6	C. Abierto			
<b>GRUPO L</b>				
<b>Aislado</b>	<b>Muestra</b>	<b>Morfología colonial</b>	<b>Observación microscópica</b>	<b>Gram</b>
ATZ-12	C. Abierto	Blancas opaca, irregulares y planas. Su desarrollo es extendido en un tiempo menor a 24 h.	Bacilos medianos a cocobacilares aislados.	+
BTY-24	Invernadero			
ATY-9	C. Abierto			
ATZ-20	C. Abierto			
ATY-1	C. Abierto			
ATZ-9	C. Abierto			
ATZ-3	C. Abierto			

## Anexo F

### Actividad antagónica de los aislados bacterianos que inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum* en el ensayo de antagonismo por difusibles.

Aislado	Grupo del aislado	Promedio del crecimiento radial micelial hacia aislado (mm)	Promedio del crecimiento radial micelial hacia control (mm)
<b>BTZ-1</b>	G	8.1 ± 0.1	20.8 ± 0.7
<b>ATZ-7</b>	G	12.3 ± 0.6	20.8 ± 0.7
<b>ATY-1</b>	L	13.6 ± 0.5	17.9 ± 1.1
<b>BTZ-17</b>	F	13.7 ± 2.1	23.0 ± 1.0
<b>ATY-6</b>	K	13.7 ± 0.7	20.1 ± 1.2
<b>BTY-20</b>	K	16.1 ± 0.9	19.3 ± 1.7
<b>BTY-19</b>	K	17.0 ± 0.3	18.2 ± 0.4

## Anexo G

**Actividad antagónica de los aislados bacterianos que inhibieron el crecimiento de *F. oxysporum*, en el ensayo de antagonismo por COV.**

Aislado	Grupo del aislado	Promedio del diámetro de crecimiento micelial con el aislado de prueba(mm)	Promedio del diámetro de crecimiento micelial con el control (mm)
<b>BTZ-3</b>	J	32.4 ± 5.2	42.7 ± 1.1
<b>ATZ-7</b>	G	32.0 ± 6.4	42.7 ± 1.1
<b>ATY-1</b>	L	31.3 ± 1.5	37.2 ± 1.0
<b>ATZ-21</b>	C	31.2 ± 5.8	42.7 ± 1.1
<b>ATZ-20</b>	L	30.8 ± 2.1	37.2 ± 1.0
<b>ATZ-10</b>	I	30.3 ± 0.6	37.2 ± 1.0
<b>ATY-19</b>	A	30.1 ± 2.6	37.2 ± 1.0
<b>ATZ-8</b>	K	30.0 ± 0.2	37.2 ± 1.0
<b>ATZ-12</b>	L	30.0 ± 1.2	37.2 ± 1.0
<b>ATZ-17</b>	K	29.8 ± 1.6	37.2 ± 1.0
<b>BTZ-5</b>	J	29.7 ± 0.5	42.7 ± 1.1
<b>BTZ-17</b>	F	28.7 ± 2.8	42.7 ± 1.1
<b>ATZ-3</b>	L	28.4 ± 2.9	37.2 ± 1.0
<b>BTY-24</b>	L	28.4 ± 6.0	37.2 ± 1.0
<b>ATY-9</b>	L	27.3 ± 1.9	37.2 ± 1.0