

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN
Y DESARROLLO A.C.**



BACTERIAS ANTAGONISTAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) EN TOMATE (*Solanum lycopersici* L.)

POR:
MARIA TRINIDAD VALDEZ MORALES

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN CULIACÁN DEL CIAD EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA
PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:


MAESTRÍA EN CIENCIAS

CULIACÁN, SINALOA


SEPTIEMBRE, 2016

APROBACIÓN


Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de María Trinidad Valdez Morales, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias




M.C. José Armando Carrillo Fasio
Director de Tesis



Dr. Raúl Allende Molar
Asesor



Dr. Raymundo Saúl García Estrada
Asesor



Dra. Josefina León Félix
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por brindarme en la vida tantas cosas maravillosas y permitirme disfrutar de este momento acompañada de los seres que más amo, por iluminar mí camino y orientar mis pasos.

A mis padres; Carmen María Morales Montes y Modesto Valdez Tolosa[†] porque gracias a ellos, a sus consejos, apoyo y amor he podido alcanzar las metas que me he propuesto en la vida.

A mis hermanos; Gerónimo, Reynaldo, Martha, Arcelia, Luis, Abelardo y Nidia por aconsejarme, por apoyarme en todo momento y por el cariño que siempre nos ha mantenido unidos.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Coordinación Culiacán, por abrirme sus puertas al aceptarme en el programa de Maestría en Ciencias y permitirme desarrollarme profesionalmente al ser integrante de la comunidad CIAD.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo financiero durante mi estancia en el programa de Maestría en Ciencias en CIAD.

A mi Director de tesis; MC. José Armando Carrillo Fasio, por otorgarme la oportunidad de ser parte del comfortable grupo de Nematodos, del cual llevo su esencia, por los 4 años en los que ha compartido conmigo sus conocimientos, por los consejos, apoyo, paciencia y confianza que siempre me ha brindado, por creer en mi e impulsarme a seguir avanzando, por formar parte de este logro con el optimismo y disponibilidad para ayudar que siempre lo han caracterizado. Pero sobre todo agradezco su amistad y cariño que siempre me ha brindado.

A mis asesores quienes orientaron mis pequeños grandes pasos al conocimiento científico dando forma a esta investigación:

Dr. Raúl Allende Molar, antes que nada agradezco su amistad, por transmitir sus conocimientos y por sus consejos inteligentes, en busca siempre de mejorar la presente investigación.

Dr. Raymundo Saúl García Estrada, por su apoyo y preocupación depositados en este trabajo, por su disponibilidad para ayudarme y aconsejarme en la elaboración de este proyecto.

Dra. Josefina León Félix, por apoyarnos siempre creyendo y animando nuestro trabajo, lo cual además de alentar nuestra investigación, alentaba en nuestra persona la superación.

A los técnicos: Ing. Luis Alfredo Osuna, Ing. Isidro Márquez Zequera, QFB. Celida Martínez, Ing. Rosalba Contreras, Ing. Daniel Ibarra Báez, en especial al Ing. Yoshio Smith Félix Gutiérrez, y a la Ing. Brissa Darinka Plata Vargas, por su disponibilidad y apoyo durante el tiempo de realización de este trabajo.

A los investigadores que integraron el cuerpo de docencia: Dra. María Dolores Muy Rangel, Dra. J. Adriana Sañudo Barajas, Dra. Noelia Castro del Campo, Dr. Basilio Heredia, Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz, Dr. Juan Ramón Ibarra, Dr. Tomás Osuna, MC. Manuel Alonso Báez Sañudo, Dr. Osvaldo López Cuevas, Dr. Andrés Medrano Félix y en especial al Dr. José Benigno Valdez Torres por transmitirnos sus conocimientos y por su disponibilidad para ayudar en la mejora de este trabajo.

A los Estudiantes que integran el laboratorio de nematodos: Paola, Giovanni, Gabriel y Sergio, por los momentos de convivencia, en especial a los compañeros: José Ángel Martínez por su apoyo y su amistad, a Laura Belen Tapia por su apoyo, ayuda y amistad, a Miguel Ángel Velázquez por su ayuda en la elaboración de este trabajo y amistad y a Raúl Antonio Rivera por su ayuda y disponibilidad para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de maestría generación 2014-2016; Wendy, Suhail, Jaime, Flor, Grecia, Nancy y Gabriela, por su amistad y los momentos divertidos de convivencia.

A mis compañeros y amigos: Indira Rojo Báez, Irvin González López y Brando Álvarez Rodríguez, por la ayuda y apoyo incondicional que siempre me brindaron, por los consejos y agradable convivencia que siempre recibí, sobre todo por la amistad que me han brindado.

A la MC. María Belia Contreras Soto, por su ayuda y consejos para la elaboración del trabajo y por su amistad.

A todos los estudiantes del CIAD unidad Culiacán; por compartir conmigo sus opiniones para la mejora de esta investigación, Especialmente agradezco a Erick Gutiérrez y Daniel Ibarra por su ayuda y consejos.

A todas las personas que forman parte de esta institución y que en su momento me brindaron su ayuda, apoyo y amistad, Especialmente a Víctor Manuel Arana por su particular forma de ser. **Gracias.**

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xv
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Producción Mundial del Tomate	3
Producción del Tomate en México	3
El Cultivo de Tomate en Agricultura Protegida	4
Enfermedades Bacterianas del Tomate bajo Condiciones de Cultivo Protegido	5
Marchitez Bacteriana de las solanáceas (<i>Ralstonia solanacearum</i>).....	6
Importancia Económica de la Marchitez Bacteriana del Tomate.....	7
Epidemiología y Ciclo de la Enfermedad.....	7
Taxonomía de <i>Ralstonia solanacearum</i>	8
Adaptabilidad y Supervivencia	9
Métodos de Control de <i>Ralstonia solanacearum</i>	10
Utilización de Compostas como Enmienda Orgánica.....	12
Microorganismos de Compostas Utilizados como Antagonistas	14
La Rizósfera, las Rizobacterias y el Control Biológico	15
Mecanismos de Acción de los Antagonistas	16
Microorganismos Benéficos en la Agricultura.....	17
Microorganismos Antagonistas Utilizados en el Control Biológico de <i>Ralstonia solanacearum</i>	17
<i>Bacillus</i> spp. como Antagonista de Enfermedades Fitopatógenas del Suelo	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	23
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	24

JUSTIFICACIÓN.....	25
OBJETIVOS.....	26
Objetivo General.....	26
Objetivos Específicos	26
HIPÓTESIS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Aislamiento y Multiplicación de <i>Ralstonia solanacearum</i>	28
Análisis Microbiológico de la Composta	29
Aislamiento y Multiplicación de las Bacterias Antagonistas.....	30
Detección <i>in vitro</i> de Potenciales Antagonistas Contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	31
Cultivos Duales (Cruza).....	32
Disco de Papel Filtro	32
Placa de Agar Perforado	33
Evaluación <i>in vitro</i> de Antagonistas por Medio de Cultivos Duales (Cruza) Contra <i>Rs</i>	33
Evaluación <i>in vivo</i> de Antagonistas Seleccionados para el Control de la Marchitez Bacteriana en Plantas de Tomate.....	34
Pruebas de Patogenicidad de <i>Rs</i> en Plantas de Tomate	34
Punción.....	34
Inmersión.....	34
Inoculación de <i>Rs</i> y Antagonistas en Plantas de Tomate	35
Colonización de los Antagonistas en Sustrato Rizosférico en Plantas de Tomate	36
Diseño Experimental	36
Caracterización de las Bacterias Antagonistas Eficientes Contra <i>Rs</i>	37
Caracterización Morfológica	37
Caracterización por Pruebas Bioquímicas.....	38
Caracterización por Pruebas Moleculares (PCR).....	38
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
Análisis Microbiológico de la Composta	42
Obtención de Microorganismos Antagonistas	43

Evaluación <i>in vitro</i> de los Antagonistas contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	44
Selección <i>in vivo</i> de los Mejores Antagonistas de <i>Ralstonia solanacearum</i> ..	45
Evaluación de Incidencia de la Enfermedad en Plantas de Tomate Tratadas con Antagonistas	45
Evaluación de Severidad de la Enfermedad en Plantas de Tomate Tratadas con Antagonistas	46
Efectividad Biológica (EB) de los Antagonistas Contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	47
Colonización de los Antagonistas en Sustrato Rizosférico de Plantas de Tomate	48
Caracterización de los Microorganismos Efectivos Contra Rs	49
Caracterización morfológica	49
Identificación bioquímica	50
Identificación molecular	51
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56
ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: interpretación de bioensayos de té de composta	30
Cuadro 2: Índices de diversidad biológica de composta (BBC Lab).....	30
Cuadro 3: Escala de Severidad para <i>Ralstonia solanacearum</i> en plantas de tomate ...	35
Cuadro 4: Mezcla de PCR para la amplificación de la región 16S del ADNr de los antagonistas bacterianos (Kit GoTaq® PCR Core System I marca Promega de USA).	39
Cuadro 5. Condiciones de PCR para la amplificación de la región 16S de los antagonistas bacterianos	40
Cuadro 6: Bacterias presentes en composta de estiércol vacuno	42
Cuadro 7: Hongos, levaduras y actinomycetes presentes en composta de estiércol vacuno.	42
Cuadro 8. Análisis microbiológico de la composta.	43
Cuadro 9. Cuantificación de <i>Bacillus</i> spp. en la rizósfera de plantas de tomate bola (híbrido Horus).....	49
Cuadro 10. Porcentaje de identidad de las cepas antagonistas con especies del género <i>Bacillus</i> por medio de pruebas Api 50 CHB/E	50
Cuadro 9: Porcentaje de identidad molecular de los aislados efectivos contra <i>Rs</i> con <i>Bacillus</i> spp.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Halo de inhibición formado por los antagonistas de <i>Ralstonia solanacearum</i>	44
Figura 2. Severidad de marchitez bacteriana en plantas de tomate bola tratadas con diez antagonistas	45
Figura 3. Incidencia de marchitez bacteriana en plantas de tomate bola tratadas con antagonistas	46
Figura 4. Severidad de marchitez bacteriana en plantas de tomate bola tratadas con cuatro antagonistas	47
Figura 5. Efectividad biológica de los antagonistas contra <i>Ralstonia solanacearum</i>	48
Figura 6: Productos de Amplificación con los iniciadores FD2 y RP1 que flanquean un región conservada en el género <i>Bacillus</i>	52

RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) es una de las hortalizas más importantes y consumidas en México y el mundo; sin embargo, este cultivo es afectado por diversos microorganismos fitopatógenos, dentro de los cuales destacan las bacterias fitopatógenas. Una de las limitantes en la producción de tomate en Sinaloa, ha sido la constante incidencia y severidad de la enfermedad conocida como “marchitez bacteriana”, ocasionada por *Ralstonia solanacearum* (*Rs*). El control de esta enfermedad es complicado ya que ninguno de los productos químicos excepto la kasugamicina está autorizada por la FDA o COFEPRIS para su aplicación como bactericidas en la agricultura; además, tanto los productos químicos como los productos a base de cobre no han mostrado efectividad para el control de la enfermedad. El objetivo del trabajo fue evaluar el potencial de bacterias antagonistas provenientes en composta de estiércol vacuno para el control de *Rs*.

Se tomaron muestras de composta y se realizaron los análisis microbiológicos correspondientes para cuantificar su carga microbiana; posteriormente, se aislaron microorganismos de tipo bacteriano y se evaluó su potencial antagonista contra *Rs* a nivel *in vitro* por medio de cultivos duales; enseguida se seleccionaron las bacterias que mostraron mayor inhibición contra *Rs*. De 80 cepas aisladas, 10 fueron seleccionadas para ser evaluadas a nivel *in vivo* en plantas de tomate bola (híbrido Horus) y de éstas, cuatro fueron seleccionadas por su mayor inhibición en la severidad de la enfermedad. Estas últimas cuatro bacterias fueron evaluadas en un experimento adicional, en el cual se incluyó un testigo bactericida comercial a base de sulfato de gentamicina + oxitetraciclina y una mezcla de las cuatro bacterias. Se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad; así como, la capacidad de colonización de los antagonistas en la rizósfera del suelo.

Las cuatro cepas con mayor actividad antagonista contra *Rs* fueron caracterizadas por medio de pruebas morfológicas, bioquímicas (Api 50 CHB/E) y moleculares (PCR). El mejor antagonista obtuvo una efectividad biológica de 89% en la reducción de severidad e incidencia de *Rs* en plantas de tomate y se identificó como *Bacillus subtilis* con 99% de identidad.

SUMMARY

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important and consumed vegetables in Mexico and the world; nevertheless, this crop is affected by several plant pathogenic microorganisms, such as plant pathogenic bacteria. A limiting factor in Sinaloa's tomato production has been the frequent incidence and severity of a plant disease known as "bacterial wilt"; this disease is caused by *Ralstonia solanacearum* (*Rs*), its control is complicated because the chemical products that are commonly used as bactericides are not allowed by FDA and COFEPRIS regulations for its agricultural application; in addition, copper based products haven't shown effective control. Therefore, the aim of this work was to evaluate the potential of antagonist bacteria present in cow dung compost for *Rs* control.

Compost samples were taken and microbiological analysis were made in order to quantify the microbial populations of the sample, subsequently bacterial microorganisms were isolated and its antagonist potential was evaluated against *Rs* at *in vitro* level through dual cultures; later, those bacteria that demonstrated higher inhibition against *Rs* were selected. 80 strains were isolated, from which only 10 were selected to be evaluated at *in vivo* level in tomato ball plants (Horus hybrid), from these, four were carefully chosen as the ones with higher disease inhibition, which were further evaluated in an additional experiment, where a commercial bactericide was used as control (gentamicin sulfate + oxytetracycline) and a four antagonist mixture. Incidence and severity was evaluated as well as colonization ability of the antagonists in the rhizosphere soil.

Four strains were selected due to their higher antagonist activity against *Rs*, and were characterized through morphological, biochemical (Api 50 CHB/E) and

molecular (PCR) tests. Our results show that the best antagonist was identified as *Bacillus subtilis* (99% identity) with 89% biological effectivity.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos más demandados en la actualidad a nivel mundial y es la hortaliza más cultivada en el mundo, alcanzando 4.7 millones de hectáreas en el año 2011 con una producción de 159 millones de toneladas. A nivel mundial, el tomate ocupa el primer lugar tanto en superficie como en volumen de producción (Flaño, 2013).

En Sinaloa, la superficie sembrada de hortalizas en la temporada 2014-2015, fue de 47,275 ha, de las cuáles 10,078 ha fueron destinadas al tomate. Además, es la hortaliza de mayor exportación (en base a la temporada 2014-2015) con 307,108 t (CAADES, 2015).

En la última década, la superficie de siembra protegida en Sinaloa ha ido en aumento, siendo el tomate tipo bola el cultivo con mayor superficie de siembra en invernadero-malla sombra con 227 hectáreas (CAADES, 2015).

Dentro de los principales patógenos que afectan al cultivo de tomate se encuentran las bacterias, las que ocasionan enfermedades de gran importancia a nivel mundial y son responsables de la gran mayoría de las pérdidas económicas en la producción de hortalizas; tal es el caso de *Ralstonia solanacearum* (Rs) que ocasiona la marchitez bacteriana de las solanáceas, siendo una de las enfermedades más importantes en plantas de esta familia, la cual está presente en regiones tropicales, subtropicales y templadas donde se cultivan estos hospedantes. Esta bacteria es una de las limitantes en la producción de cultivos de importancia económica, incluyendo tomate, papa, chile, pimiento, berenjena, tabaco y plátano (Hayward, 1991). La bacteria

invade a las plantas hospederas a través de la raíz y coloniza los vasos del xilema en el sistema vascular. Las plantas infectadas muestran disminución de crecimiento, amarillamiento, marchitamiento repentino y mueren rápidamente (Sánchez, 2008).

Los métodos de control que se han utilizado contra *Rs* son: el uso de agroquímicos, variedades resistentes, rotación de cultivos, entre otros. El control biológico se encuentra todavía en su fase de investigación, con pocos estudios que informan sobre microorganismos antagonistas de *Rs*, agente causal de la marchitez bacteriana, el control biológico no solo aumenta el rendimiento del cultivo y suprime la enfermedad sino que también evita la contaminación ambiental por el uso de agroquímicos y antibióticos (Van Overbeek et al., 2004).

Por otro lado, en México no existe información suficiente sobre estudios de microorganismos del suelo para su utilización como control biológico de enfermedades como la marchitez bacteriana. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de antagonistas provenientes de composta elaborada con estiércol vacuno, para el control biológico de *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate bola en el estado de Sinaloa, México.

REVISIÓN DE LITERATURA

Producción Mundial del Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más importantes en el mundo tanto por la superficie cultivada como por la producción obtenida; ya que ocupa el segundo lugar después de la papa. Además de la alta remuneración económica, generación de empleos y propiedades nutricionales (Ramírez y Sainz, 2010).

China, India, Estados Unidos de América, Turquía y Egipto, son los cinco países que generan el 71 % de la producción mundial de tomate. China produce aproximadamente 48,642,425 t al año para el consumo en fresco (FAO, 2007).

Producción del Tomate en México

En México, los principales estados productores de tomate son: Nayarit (2,002 ha), Veracruz (1,961 ha), Michoacán (1,532 ha), Sonora (906 ha), Baja California Sur (874 ha) y Tamaulipas (646 ha). Destacando Sinaloa como el principal productor, ubicándose como el estado más importante en la producción de tomate (10,078 ha) ya que el resto de los estados cuentan con superficies menores (CAADES, 2015).

El inicio de la producción del tomate en Sinaloa para la comercialización hacia los Estados Unidos de Norteamérica, data del año de 1908 (León, 1982). En la década de los años veinte, éste presentó un auge que se acompañó de la mejora de la tecnología del cultivo, las formas de transporte y comercialización; así como, variaciones cíclicas en el precio del tomate en el mercado norteamericano (Ibarra, 1993). A medida que los precios de las hortalizas aumentaban, el volumen producido por México también se incrementaba, dando como resultado ganancias sin precedentes a los horticultores sinaloenses durante el inicio de los años cuarenta.

En la actualidad, Sinaloa es productor de una gran diversidad de cultivos; dentro de éstos, el tomate es la hortaliza más importante por su superficie sembrada, con una producción total de 782,909 t (SIAP, 2015).

El Cultivo de Tomate en Agricultura Protegida

En general, la finalidad que persigue la producción de cultivos bajo el concepto de agricultura protegida, es la obtención de productos en oportunidad con alta calidad y cantidad por unidad de superficie, con el propósito de comercializar a precios medios a altos, tendientes a recuperar los altos costos de inversión y producción.

En la actualidad, en México son pocos los cultivos producidos en estas condiciones, entre los que destacan la producción de flores y algunas hortalizas como tomate, pimiento, berenjena y pepino. La obtención de hortalizas bajo este sistema va dirigido hacia el mercado de exportación, zonas turísticas, y un grupo reducido de consumidores que se preocupan por el origen de las hortalizas que consumen, cuyos precios son más elevados.

La ventaja del sistema de cultivo protegido sobre el método tradicional a cielo abierto, es que se establece una barrera entre el medio ambiente externo y el cultivo, esta protección permite al agricultor controlar la temperatura, la cantidad de luz y aplicar efectivamente el control químico y biológico para proteger el cultivo (Muñoz, 2004).

Enfermedades Bacterianas del Tomate bajo Condiciones de Cultivo Protegido

El uso de cultivos en sistema protegido aporta beneficios en el manejo y control de insectos plaga y/o vectores de virus; sin embargo, en general las enfermedades constituyen el factor limitante en la producción de tomate en muchas partes del mundo, cuando no se utilizan cultivares con resistencia a varias de ellas. Existen aproximadamente 200 enfermedades que afectan el cultivo de tomate originadas principalmente por microorganismos fitopatógenos como son virus, hongos, nematodos y bacterias. Estas últimas son de los fitopatógenos de mayor impacto negativo sobre el cultivo de tomate, dentro de las bacterias consideradas como fitopatógenas se encuentran: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas corrugata*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Ralstonia solanacearum* (Reho, 2006).

De todos los fitopatógenos que pueden afectar el cultivo de tomate, *Ralstonia solanacearum* (Rs) tiene la capacidad de destruir por completo un cultivo, en cuestión de semanas, por lo que en muchos países está considerada como una plaga de importancia cuarentenaria (Ramírez y Sainz, 2010).

Marchitez Bacteriana de las solanáceas (*Ralstonia solanacearum*)

R. solanacearum E.F. Smith (Yabuuchi et al., 1995) es el agente causal de la marchitez bacteriana de las solanáceas. La cual afecta a más de 200 especies pertenecientes a aproximadamente 50 familias de plantas superiores; entre los hospedantes se incluyen cacahuate, papa, tomate, berenjena, chile, tabaco, banano, plátano, geranio, jengibre, algunas especies de árboles y arbustos de importancia económica, siendo responsables de cuantiosas pérdidas económicas en estos cultivos en todo el mundo (Hayward, 1991). Normalmente este patógeno infecta a las plantas a través de las raíces e invade a la planta de forma sistémica a través del xilema y floema y ocasiona síntomas de marchitez que usualmente son letales (Hartman et al., 1991; Denny y Hayward, 2001; Williamson et al., 2002; Genin y Boucher, 2004; Elphinstone, 2005).

La marchitez bacteriana de las solanáceas es una de las enfermedades más virulentas en plantas, la cual limita la producción en tomate y muchos otros cultivos de importancia económica cultivados en climas tropicales, subtropicales y en regiones con temperaturas cálidas en diferentes partes del mundo (Elphinstone, 2005).

La bacteria *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) fue reportada por primera vez a finales del siglo XIX en el cultivo de papa, tabaco y cacahuate en Asia, sur de Estados Unidos y Sur de América. *Rs* fue uno de los primeros patógenos bacterianos de plantas descritos por A. F. Smith en 1994. En un inicio la bacteria fue conocida como *Bacillus solanacearum* y en el siglo pasado como *Pseudomonas solanacearum*; sin embargo, estudios de hibridación de ácidos nucleicos, separaron a esta especie del género *Pseudomonas* para agruparla en el género *Ralstonia* (Saddler, 2000).

Importancia Económica de la Marchitez Bacteriana del Tomate

La marchitez bacteriana de las solanáceas se encuentra distribuida por todo el mundo, su presencia es esporádica, pero puede ser devastadora, como en el caso del grupo de cepas clasificado como *Rs* Raza 3 biovar 2, que es considerado como un organismo cuarentenado en la Unión Europea (EU) y Estados Unidos de Norte América (EEUU), países en los que se encuentra enlistado entre los 10 patógenos de plantas considerados dentro de la categoría de bioterrorismo (Lambert, 2002; Elphinstone, 2005). Esta bacteria ocasiona pérdidas económicas cercanas a mil millones de dólares cada año (Elphinstone, 2005).

Durante los últimos años, esta bacteria se ha presentado tanto en cultivos de tomate en campo abierto como cultivos protegidos del valle de Culiacán, en donde se han detectado brotes esporádicos que han ocasionado pérdidas económicas importantes (Perea, 2010).

Epidemiología y Ciclo de la Enfermedad

Ralstonia solanacearum es una bacteria que habita principalmente en suelo e infecta a las plantas a través de la raíz, en donde penetra por heridas formadas por la emergencia de raíces secundarias, por heridas realizadas por microorganismos como nematodos y por aberturas naturales (Hayward, 1991; Deberdt et al., 1999) y puede penetrar a la planta por medio de lesiones en el tallo realizadas por insectos o por herramientas durante las labores culturales. Una vez instalada en el sistema vascular de la raíz o en el tallo, la bacteria

coloniza los vasos del xilema, donde se multiplica rápidamente y alcanza poblaciones hasta 10^9 ufc g^{-1} de tejido de la planta (Schell, 2000).

Las plantas de tomate infectadas con *Rs* muestran disminución del crecimiento, presentan amarillamiento, marchitez repentina en hojas más jóvenes durante las horas más calurosas del día. Por la noche, con las temperaturas frescas las plantas enfermas recuperan su turgencia, hasta que llegan a la etapa de marchitez permanente debido al taponamiento de los vasos conductores (xilema y floema) de nutrientes y agua. Bajo condiciones favorables las plantas se marchitan y mueren rápidamente (Schell, 2000; Sánchez, 2008; Champosieau et al., 2009).

Este patógeno puede causar infecciones latentes, ya que se han observado poblaciones de la bacteria en altas concentraciones dentro de los tejidos de plantas sin presencia de síntomas de la enfermedad (Marco et al., 2008). Lo mismo ocurre en condiciones de estrés por temperaturas inferiores a 4 °C y en respuesta ante la exposición prolongada de iones de cobre, donde la bacteria es capaz de entrar en un estado viable pero no cultivable (VBNC por sus siglas en inglés) (Marco et al., 2008). En dicho estado VBNC, la bacteria se encuentra fisiológicamente activa pero no puede ser desarrollada en medio de cultivo artificial (McDougald et al., 1998).

Taxonomía de *Ralstonia solanacearum*

Clase; proteobacteria

Familia: *Burkholderiaceae*

Género: *Ralstonia*

Especie: *solanacearum* (considerada patógena de plantas con un amplio rango de hospederos) (Denny, 2006).

Género *Ralstonia*

El género *Ralstonia* posee especies saprófitas, patógenas de humanos, animales y plantas. *Ralstonia solanacearum* causa marchitez letal en una diversidad de especies de plantas y es considerada como uno de los patógenos más importantes en plantas (Ralston et al., 1973; Coenye et al., 2003; De Baere et al., 2001; Agrios, 2005; Denny, 2006).

Adaptabilidad y Supervivencia

La bacteria *Rs* presenta una amplia diversidad que es considerada en variabilidad en rango de hospedantes, agresividad y adaptación a diferentes climas que es con frecuencia influenciado por el genotipo del hospedante, hábitat natural y prácticas agrícolas (Hanson et al., 1996). La bacteria puede sobrevivir por días o incluso años, principalmente en el suelo (Champoiseau et al., 2009).

En Sinaloa se identificaron y caracterizaron cepas de *Ralstonia solanacearum* aisladas de plantas de tomate cultivadas en el Valle de Culiacán. Estas cepas fueron identificadas como *Ralstonia solanacearum* Raza 3 Biovar 2, las cuales presentan una capacidad similar para afectar los cultivos de tomate, papa, berenjena y chile pimiento (Perea, 2010).

Métodos de Control de *Ralstonia solanacearum*.

El control de las enfermedades bacterianas como “marchitez bacteriana” del tomate es complicado. Algunas medidas pueden ayudar a evitar su rápida diseminación, entre las cuales se señalan las siguientes: En primer lugar es importante conocer a la perfección todos los síntomas de la enfermedad y detectarlos con oportunidad, en este caso son muy importantes los monitoreos y el diagnóstico rápido (García, 2009); utilizar semillas y trasplantes completamente libres de patógenos que se transmiten por este medio. Por ello se debe exigir la completa sanidad de la semilla. Cuando se sospecha que la semilla presenta cierto grado de contaminación, es preferible tratarla con agua caliente (52 ó 56 °C por 30 o 20 minutos respectivamente) y posteriormente dar una inmersión rápida en una solución de cloro del 2 al 4% para asegurar la desinfección. Los tratamientos superficiales con hipoclorito de calcio o algún otro producto a base de cloro no garantizan la completa sanidad de la semilla (García, 2009).

Para una menor contaminación en invernaderos debe usarse suelo, sustrato y contenedores esterilizados. Así mismo, los estacones de áreas contaminadas se deben esterilizar con fumigantes o calor. Las plantas de tomate que se enferman antes de tener frutos o durante el amarre de los primeros frutos, deben ser arrancadas, quemadas y esterilizar el suelo. Se debe delimitar las áreas dañadas e inspeccionar frecuentemente los lotes (García, 2009).

Antes de la poda se sugiere aplicar productos a base de cobre. En la actualidad, solo la kasugamicina se encuentra con registro de la FDA (Food and Drug Administration) para usarse como antibiótico; sin embargo, este producto no ha mostrado eficacia para controlar la enfermedad. Las tijeras, utensilios y manos de trabajadores que realizan podas deben ser desinfectados frecuentemente (entre planta y planta) (Alvarado y Chávez, 2014).

Para el control de la marchitez bacteriana se han utilizado comúnmente bactericidas a base de cobre y zinc; así como, antibióticos (estreptomina, tetraciclina, gentamicina y kasugamicina); sin embargo, diversas cepas de *R. solanacearum* y de diferentes razas y/o biovars se han reportado como resistentes y/o tolerantes a estos productos químicos (Saddler, 2005). Los productos a base de cobre utilizados como bactericidas, fueron introducidos en 1980 y aun constituyen los métodos más utilizados para el control de enfermedades bacterianas, tanto en campo abierto como en invernaderos, lo que ha provocado la presencia de cepas bacterianas con adaptación genética que les confieren tolerancia a compuestos de cobre. Tanto los antibióticos como los productos a base de cobre han tenido un uso desmedido provocando contaminación del ambiente alrededor como mantos de agua, además de ser costosos para el productor. Por otro lado, el uso exhaustivo de antibióticos ha traído consigo el surgimiento de cepas resistentes a este tipo de productos. Este problema no sólo ocurre en las bacterias fitopatógenas; si no también se presenta en las bacterias que afectan a seres humanos, volviéndose así en un problema mundial de salud pública (Saddler, 2005).

Por otro lado, existen reportes de líneas o cultivares que presentan resistencia a *R. solanacearum*; sin embargo, la resistencia en esas líneas no ha sido totalmente efectiva para el control de la enfermedad, debido a la variabilidad genética de las cepas, las cuales pertenecen a diferentes razas y biovars (Hanson et al., 1996).

En regiones donde el patógeno está establecido, las prácticas culturales pueden ser efectivas bajo ciertas condiciones. Estas prácticas incluyen rotación de cultivos con plantas no hospedantes; no obstante, la bacteria puede permanecer en estado VBNC por largos períodos hasta que de nuevo encuentre a su hospedante. Existen otros tipos de tratamientos alternativos para la erradicación de la marchitez bacteriana en tomate; entre ellos, la modificación del pH del suelo, inductores de resistencia en plantas (acibenzolar-

S-methyl), aceites esenciales (timol) o ácido fosfórico que han demostrado que reducen la población bacteriana y la severidad de la enfermedad. La utilización de estos métodos también implica daños en el ambiente, altos costos en reactivos y mano de obra; así como, su validación a nivel comercial (Ji et al., 2005). En los últimos cinco ciclos hortícolas, los productores de hortalizas en Sinaloa han incursionado en la incorporación de enmiendas orgánicas y entre ellas las vermicompostas y compostas, las cuales son ricas en materia orgánica y alta población de microorganismos fitobenéficos con capacidad antagonista contra los microorganismos fitopatógenos del suelo, como son nematodos, hongos y bacterias (Carrillo, 2016)

Utilización de Compostas como Enmienda Orgánica

El compostaje es el proceso por el cual la mezcla de materiales de origen animal y vegetal son descompuestos parcialmente bajo la acción de factores microbiológicos, incluyendo lombrices, hasta un producto final análogo al humus de composición variable. Este proceso requiere de condiciones adecuadas de oxígeno, humedad y temperatura (Hernández, 1996).

Uno de los principales problemas que enfrentan los agricultores en la actualidad es el alto costo de los insumos externos como fertilizantes sintéticos y agroquímicos, que además causan serios problemas de contaminación ambiental y degradación de los suelos. Una alternativa sostenible para los agricultores y empresas es la producción de composta a partir de residuos vegetales y estiércol (guano) de animales. El compostaje es un proceso dirigido y controlado de mineralización y pre-humificación de la materia orgánica. Las compostas son consideradas como abono orgánico de alta calidad que sirve para recuperar y/o mejorar la fertilidad de los suelos agrícolas, reducir los costos y contaminación por fertilizantes sintéticos e incrementar la biomasa

microbiana en los suelos. Sin embargo, es importante conocer y aplicar muy bien la técnica para elaborar composta a partir de residuos orgánicos, porque de ello depende la calidad del producto final y evita que durante el mismo procesamiento de los desperdicios ocurran problemas ambientales tales como malos olores y la proliferación de moscas (APROLAB, 2007).

Beneficios de la utilización de composta.

1. Mejora las propiedades físicas del suelo. La materia orgánica favorece la estabilidad de la estructura de los agregados del suelo agrícola, reduce la densidad aparente, aumenta la porosidad y permeabilidad, y aumenta la capacidad de retención de agua en el suelo. Se obtienen suelos más esponjosos y con mayor retención de agua.
2. Mejora las propiedades químicas. Aumenta el contenido en macronutrientes N, P, K, y micronutrientes, la capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.) y es fuente y almacén de nutrientes para los cultivos.
3. Mejora la actividad biológica del suelo. Actúa como soporte y alimento de los microorganismos ya que viven a expensas del humus y contribuyen a su mineralización.
4. La población microbiana es un indicador de la fertilidad del suelo.

Existen microorganismos en el aire, en el suelo, en nuestros intestinos, en los alimentos que consumimos, en el agua que bebemos. Las condiciones actuales de contaminación y uso excesivo de sustancias químicas sintéticas han causado la proliferación de especies de microorganismos considerados regeneradores. Estos microorganismos a grandes rasgos, son causantes de enfermedades en plantas y animales y generan malos olores y gases nocivos al descomponer residuos orgánicos. Los microorganismos eficientes, como inoculante microbiano, restablecen el equilibrio microbiológico del suelo, mejorando sus condiciones físico-químicas, incrementando la producción de los

cultivos y su protección; además, conserva los recursos naturales, generando una agricultura sostenible. Entre los efectos sobre el desarrollo de los cultivos se pueden encontrar:

1. Aumento de la velocidad y porcentaje de germinación de las semillas, por su efecto hormonal similar al del ácido giberélico.
2. Aumento del vigor y crecimiento del tallo y raíces, desde la germinación hasta la emergencia de las plántulas, por su efecto como rizo bacterias promotoras del crecimiento vegetal.
3. Incremento de las probabilidades de supervivencia de las plántulas.
4. Genera un mecanismo de supresión de insectos y enfermedades en las plantas, ya que pueden inducir la resistencia sistémica de los cultivos a enfermedades.
5. Consume los exudados de raíces, hojas, flores y frutos, evitando la propagación de organismos patógenos y desarrollo de enfermedades.
6. Incrementa el crecimiento, calidad y productividad de los cultivos.
7. Promueven la floración, fructificación y maduración por sus efectos hormonales en zonas meristemáticas.
8. Incrementa la capacidad fotosintética por medio de un mayor desarrollo foliar.

Microorganismos de Compostas Utilizados como Antagonistas

Las compostas contienen una gran variedad de microorganismos que se encuentran compitiendo fuertemente entre ellos para sobrevivir. Entre los microorganismos que habitan las compostas, sobresalen las bacterias, actinomycetes, hongos, virus, protozoarios, algas, nematodos y artrópodos. En muchos suelos cultivados, los hongos y las bacterias constituyen gran parte de

la biomasa microbiana total y aunque no son los organismos más importantes, aportan una parte significativa de la biomasa debido a la gran cantidad y diámetro de sus filamentos, así como a la extensa red que forman (Alexander, 1977).

Eventualmente, todos los microorganismos entran en contacto con el suelo y algunos de ellos llegan a ser habitantes comunes en él. Se considera que las poblaciones en el suelo son más homogéneas y cosmopolitas que las poblaciones en el ambiente aéreo, debido a que el suelo presenta condiciones ambientales con menor variación que el aire. Una característica de los organismos del suelo es que han desarrollado una capacidad eficiente para sobrevivir bajo condiciones muy adversas. Algunos pueden llegar a sobrevivir por más de 50 años (Alexander, 1977). La sobrevivencia y dominancia de los organismos del suelo está influenciada por muchos factores, entre los cuales la alimentación es el más importante. La temperatura, humedad, nutrientes inorgánicos y la competencia entre varios tipos de organismos también influye en su sobrevivencia. El pH, contenido de materia orgánica y mineral, la estructura, y la porosidad del suelo influirán en la naturaleza de su población; así como, también el drenaje, la irrigación, la fertilización, los cultivos y la adición de productos químicos (Alexander, 1977).

La Rizósfera, las Rizobacterias y el Control Biológico

La rizósfera se define como la estrecha zona de suelo que rodea a la raíz (aproximadamente 2 mm de distancia) y está bajo su influencia. Este hábitat al igual que en el suelo, está ocupado por una gran diversidad de microorganismos tanto benéficos (hongos, bacterias, actinomicetes, levaduras, que ayudan al crecimiento de las plantas) como fitopatógenos (desarrollan enfermedades). Los primeros presentan efectos antagónicos con otros

microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de fitopatógenos. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Los resultados de algunos estudios, junto con la toma de conciencia sobre los efectos adversos de los pesticidas químicos, propiciaron el resurgimiento a escala mundial de la investigación sobre el uso de inoculantes microbianos para controlar patógenos y mejorar el crecimiento vegetal. De esta manera, se utilizan organismos naturales (rizobacterias, hongos, levaduras, actinomicetes, entre otros) para reducir los efectos de organismos indeseables (patógenos) y así favorecer la producción de cultivos vegetales. Esto se conoce como Control Biológico y es utilizado como una alternativa ecológica al uso de pesticidas sintéticos.

Mecanismos de Acción de los Antagonistas

Se han descrito varios mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general, los antagonistas no presentan un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción (Rovira, 1965).

Microorganismos Benéficos en la Agricultura

Las raíces de las plantas producen exudados radiculares (carbohidratos, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos, flavonoides, enzimas y muchos otros materiales), algunos de los cuales son tóxicos para algunos microorganismos. A pesar de esto, existen especies que se han adaptado para utilizar estos compuestos y fácilmente adaptarse sobre los tejidos de la raíz. Entre estos organismos se incluyen una amplia variedad de microorganismos benéficos. Los exudados de las plantas también pueden estimular la emergencia de los propágulos de hongos, bacterias y actinomicetes. Por lo que parásitos invasores (fitopatógenos) de las plantas tienen que sobrevivir a la intensa competencia por nutrientes, a la acción antagonista de los exudados radiculares y a las poblaciones de microorganismos que frecuentemente se encuentran en la rizósfera. Algunas veces se crea una asociación con una micorriza que beneficia a la planta y a la micorriza (Rovira, 1965).

Microorganismos Antagonistas Utilizados en el Control Biológico de

Ralstonia solanacearum

El control biológico en la agricultura es un método muy estudiado en años recientes en muchos países, en donde se han evaluado diferentes alternativas como el uso de suelos supresivos, la utilización de bacteriófagos; así como, la utilización de cepas avirulentas antagonistas de *R. solanacearum* (López, 2014). Estas alternativas muestran buenos resultados a nivel laboratorio; sin embargo, al ser validadas con diversas cepas de *R. solanacearum* en condiciones de campo sus resultados no son eficientes (Saddler, 2005). Aunque el control biológico ha tomado relevancia en los últimos años y por ende ha sido

muy estudiado en diferentes países, en México no se tienen reportes sobre estudios que revelen información sobre microorganismos utilizados como antagonistas de *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate.

Nguyen y Ranamukhaarachchi (2010) realizaron un estudio de búsqueda de microorganismos para inhibir el desarrollo de *Ralstonia solanacearum* en Tailandia, el cual consistió en realizar muestreos de plantas enfermas para el aislamiento del fitopatógeno (*R. solanacearum*) y muestreos de suelo de la misma zona, para el aislamiento de microorganismos benéficos. Además describieron la efectividad de los antagonistas microbianos aislados de los suelos. Donde reportaron a 73 cepas de microorganismos aislados, y solo ocho de ellos presentaron resultados prometedores como antagonistas, los cuales fueron examinados y reevaluados bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* contra *Ralstonia solanacearum*, utilizando tres metodologías de prueba: i) cruza o cultivos duales; (ii) disco de papel de filtro (Dhingra y Sinclair, 1995); y (iii) placa de agar perforado (Doan y Nguyen, 2005). Donde reportan que las ocho cepas seleccionadas inhibieron el crecimiento de la bacteria a nivel *in vitro*. Estas mismas cepas fueron probadas en un experimento a nivel *in vivo* en plantas de tomate y chile, utilizando suelo esterilizado. De las cuales solo cuatro cepas antagonistas mostraron mayor eficacia para el control de la enfermedad; siendo estas identificados mediante técnicas moleculares (PCR) como: *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pichia guilliermondii* y *Candida ethanolica*; estos microorganismos mostraron alto potencial para el combate de la enfermedad; así como, el incremento del peso de la fruta, biomasa radicular y la altura de la planta.

Kheirandish y Harighi (2015) realizaron un estudio en Irán, el cual consistió en la búsqueda de microorganismos del suelo para inhibir el crecimiento de *R. solanacearum* a nivel *in vitro* en plantas de papa. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos antagonistas de algunas rizobacterias aisladas de la rizosfera de plantas de papa contra *R. solanacearum*. Se aislaron un total de 52 rizobacterias. De las cuales solo siete aislamientos presentaron efectos de

inhibición de *R. solanacearum*, los cuales fueron identificados por propiedades fenotípicas y la secuenciación parcial de 16s rRNA como *Pseudomonas fluorescens* (PF11), (PF16) *P. fluorescens*, *Pseudomonas putida* (PP17), *Paenibacillus* sp. (PB28) y *Enterobacter* sp. (En38), *Pseudomonas fluorescens* (PP23) y *Serratia* sp. (SE40). Siendo las cepas PF11, PF16, PP17 y PB28, las que inhibieron por completo el crecimiento del patógeno. Por otro lado, las cepas En38, PP23 y SE40 mostraron una inhibición moderada o débil. Durante el estudio bajo condiciones de invernadero, se evaluaron las cepas para determinar sus efectos en la reducción de la enfermedad y el aumento de la biomasa de las plantas de papa. Las cepas PB28, PP17 y PF11 redujeron significativamente la enfermedad en 55.56 %, 51.50 % y 38,58 %, respectivamente. Además, la biomasa vegetal aumentó significativamente en las plantas tratadas con PB28, PP17, PF11 y PF16, en comparación con el control. Por lo concluyen con este estudio, que las cuatro cepas tienen potencial para ser utilizadas como agentes de control biológico contra *R. solanacearum*.

Ramesh y Phadke (2012) realizaron un estudio en la India en plantas de berenjena, el cual consistió en coleccionar microorganismos de la rizósfera para inhibir el crecimiento de *R. solanacearum*. En el estudio, 48 bacterias endofíticas y 101 rizobacterias fueron seleccionadas por su actividad antibacteriana contra *Ralstonia solanacearum*, agentes causales de marchitez en berenjena. Entre 22 cepas antagonistas eficaces, 18 fueron del grupo de las *Pseudomonas* spp. formando tres grupos basados en la caracterización bioquímica. En este estudio de efectividad biológica, dos especies de *Pseudomonas* (RBH 41 y RBH 42) suprimieron por completo la incidencia de la marchitez hasta 36 días después de la inoculación bajo condiciones de invernadero. El tratamiento con células bacterianas de *Pseudomonas mallei* (RBG4, ET17) y *Bacillus* sp. (RCh6) redujeron la incidencia del marchitamiento en 83 % en comparación con el testigo absoluto. Durante 2008 y 2009, la aplicación de la cepa EB69 registró 100 % de eficiencia en el control de Rs,

seguido por RP7 (96 %), RCh6 (93 %). El aumento del rendimiento de más del 80 % se registró en los tratamientos RP6 y EB69. En los tratamientos RBG4, EB69, RBG4 (*Pseudomonas* sp.) se obtuvo una reducción de la marchitez de más del 65 % y un aumento del rendimiento (75 %) constantemente durante los dos años y, por tanto, estas cepas podrían ser consideradas como buenos agentes de biocontrol contra *Ralstonia solanacearum* en berenjena.

***Bacillus* spp. como Antagonista de Enfermedades Fitopatógenas del Suelo**

Es una bacteria Gram positiva, produce endosporas las cuales son termo-resistentes y también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos. Produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos y ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones. También producen antibióticos como la bacitricina, polimixina, gramicidina y circulina. Fermentan la caseína y el almidón. Se desarrollan entre los rangos de temperatura de 55 a 70 °C. *Bacillus subtilis* promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp., el nematodo agallador de raíces (*Meloidogyne* spp) y *Rhizoctonia solani*, agente causal de la enfermedad denominada “mal del pie” de las plantas (Schaad et al., 2001).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los consumidores están demandando cada vez más productos de alto valor nutritivo y sin residuos de agroquímicos, que hayan sido obtenidos mediante la aplicación de técnicas de cultivo amigables con el medio ambiente y preocupadas por la calidad de vida de los ciudadanos. En México, el control de las enfermedades bacterianas es complicado, frecuentemente se utilizan productos químicos los cuales además de generar resistencia al patógeno, ocasionan daños al medio ambiente y no están autorizados por la FDA o COFEPRIS para su aplicación como bactericidas en la agricultura.

El tomate es la segunda hortaliza de mayor producción a nivel mundial después de la papa. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura en el 2012. México ocupa el décimo lugar en la producción de tomate con más de dos millones de toneladas; además, obtuvo el primer lugar como país exportador de tomate con el 20 % de la participación mundial en el 2011, siendo Estados Unidos su mayor cliente con un valor de más de un millón de dólares. El Estado de Sinaloa es el principal productor de tomate a nivel nacional, por lo que tiene gran potencial como productor y exportador de tomate debido a la calidad de su producción. Actualmente el Estado exportan principalmente a Estados Unidos y Canadá (SIAP, 2015).

La superficie de tomate sembrada en Sinaloa es de más de 18,000 ha, de las cuales aproximadamente 1,600 ha son sembradas bajo malla sombra. El principal problema en cuanto a plagas y enfermedades del tomate bajo este sistema de producción está ligado a los nematodos agalladores *Meloidogyne incognita* y *M. enterolobii* y a las bacterias que afectan el sistema vascular de las plantas, principalmente *R. solanacearum*. Este complejo de patógenos

causa daños importantes tanto en la raíz como en los tejidos vasculares, impidiendo a la planta la absorción y distribución de los nutrientes y agua; disminuyendo así el rendimiento, por lo que se les atribuyen pérdidas en producción de cultivo del 50 %. El cultivo intensivo del tomate ha propiciado la degradación de los suelos y en consecuencia las poblaciones de fitopatógenos (nematodos y bacterias) han prosperado exponencialmente. Siendo el control químico una de las herramientas principales para el manejo de estas enfermedades. Por lo que el uso indiscriminado de agroquímicos ha ocasionado problemas en el medio ambiente; así como, en la salud humana, por lo que la utilización del control biológico para combatir enfermedades bacterianas es una buena opción. Se han realizado trabajos de búsqueda de microorganismos del suelo antagonistas de *R. solanacearum* en países como la India, China y Canadá, los cuales han dado buenos resultados; obteniendo porcentajes de efectividad biológica hasta del 80 %; sin embargo, dichos microorganismos no pueden ser utilizados en otros países ya que estos microorganismos son nativos de los países antes mencionados y al encontrarse en condiciones ambientales diferentes, seguramente no serán tan efectivos.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuáles géneros de bacterias antagonistas se encuentran en composta de estiércol vacuno capaces de inhibir a nivel *in vitro* el desarrollo de *Ralstonia solanacearum*?
2. ¿Cuáles especies de bacterias antagonistas se encuentran en composta de estiércol vacuno capaces de inhibir *in vitro* e *in vivo* a *Ralstonia solanacearum*?
3. ¿Cuál de las bacterias antagonistas tendrá la mejor efectividad biológica en plantas de tomate bola (híbrido Horus) para el control de *Ralstonia solanacearum*?

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Se realizó una investigación de tipo descriptiva y experimental utilizando un diseño completamente al azar con dos factores (antagonistas y *R. solanacearum*). Para este estudio se colectaron plantas de tomate enfermas con marchitez bacteriana y se llevó a cabo el aislamiento del patógeno *Ralstonia solanacearum* (*Rs*); Así mismo, se colectaron muestras de composta de estiércol vacuno para llevar a cabo el aislamiento de bacterias antagonistas de *Rs* y se evaluó el potencial de antagonismo de las bacterias en condiciones *in vitro* (en laboratorio) e *in vivo* en plantas de tomate híbrido Horus cultivadas en invernadero tipo malla sombra.

JUSTIFICACIÓN

En México no existe suficiente información sobre microorganismos antagonistas del suelo para el control biológico de la marchitez bacteriana en plantas de tomate, por lo que en este trabajo se pretende identificar microorganismos provenientes de composta de estiércol vacuno del estado de Sinaloa, para inhibir el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* y así, ofrecer a los productores una alternativa de control eficiente, económica y amigable con el medio ambiente y de esta manera, contribuir a la propagación de alternativas biológicas para el control de fitopatógenos responsables de enfermedades fitopatógenas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el potencial de especies de *Bacillus* antagonistas presentes en composta de estiércol vacuno del estado de Sinaloa, para el control biológico de *Ralstonia solanacearum*.

Objetivos Específicos

Obtener bacterias con potencial antagonista a nivel *in vitro* contra *Ralstonia solanacearum*.

Evaluar a nivel *in vivo* a los antagonistas seleccionados para el control de *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate bola (híbrido Horus).

Evaluar la colonización de los antagonistas en sustrato rizosférico en plantas de tomate bola (híbrido Horus).

Caracterizar las cepas con potencial antagonistas contra *Ralstonia solanacearum* mediante pruebas morfológicas, bioquímicas (API 50 CHB/E) y moleculares (PCR).

HIPÓTESIS

1. De los microorganismos que inhiben el crecimiento de *Ralstonia solanacearum* a nivel *in vitro* e *in vivo* sobresalen especies del género *Bacillus*.
2. De las bacterias antagonistas aisladas se identificarán principalmente especies como: *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. licheniformis*.
3. La mejor cepa antagonista se identificará como *Bacillus subtilis* y al menos tendrá una efectividad biológica del 80%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) Unidad Culiacán. Así mismo, se tomó una muestra de plantas de tomate enfermas con la “marchitez bacteriana”, y de la composta de estiércol vacuno en una agrícola comercial del valle de Culiacán. Esta investigación se realizó en tres etapas. La primera etapa consistió en realizar el aislamiento y multiplicación del fitopatógeno y antagonistas potenciales. La segunda etapa consistió en la determinación bajo condiciones *in vitro* de la capacidad potencial como antagonistas contra *Ralstonia solanacearum* y la caracterización morfológica de dichos antagonistas. La tercera etapa consistió en la evaluación bajo condiciones *in vivo* de los antagonistas seleccionados y evaluados previamente para el control de la marchitez bacteriana en plantas de tomate bola (híbrido Horus). Los antagonistas seleccionados fueron caracterizados por pruebas bioquímicas (Api 50 CHB/E) y moleculares (PCR).

Aislamiento y Multiplicación de *Ralstonia solanacearum*

El aislamiento de la bacteria fitopatógena se efectuó a partir de plantas de tomate que manifestaban síntomas de marchitez bacteriana, éstas fueron colectadas en una agrícola comercial (Belher) ubicada en Villa Adolfo López Mateos en Navolato Sinaloa; corroborando la etiología de las plantas con

síntomas *in situ* por medio de inmunotiras específicas para la enfermedad o fitopatógeno. Una vez realizada la prueba con inmunotiras, las plantas se colectaron y fueron llevadas al laboratorio de fitopatología de CIAD Culiacán. El aislamiento de *Ralstonia solanacearum* se realizó al cortar trozos pequeños de la parte afectada de la planta, los que se depositaron en un tubo de ensaye el cual contenía 3 ml de agua destilada estéril, se dejó reposar por 5 min y finalmente se sembró la bacteria por medio de estriado en placas Petri con medio de cultivo B de King o BK (anexo 1).

Análisis Microbiológico de la Composta

Se colectaron muestras de composta de aproximadamente 1 Kg, las muestras se dividieron en submuestras de 50 g de composta y se depositaron en un matraz con 450 ml de agua estéril, posteriormente se agitó la muestra durante 1 min para llevar a cabo diluciones seriadas 1:3, se tomaron alícuotas y se depositaron en diferentes medios de cultivo como; BK, PDA, AN, Picovscaya, Rojo congo y NFB. Una vez que se desarrolló el crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo se realizó un conteo de colonias y se determinó el índice de diversidad y riqueza de especies en la composta (alta, moderada y baja) del SRDT por sus siglas en inglés, siguiendo los parámetros descritos por la BBC Laboratories (Cuadros 1 y 2)

Cuadro 1: interpretación de bioensayos de té de composta

Parámetro	Enumeración (UFC/g de suelo)	Diversidad Biológica
Aeróbicas heterotróficas	100,000,000	3.0
Anaeróbicas facultativas	10,000,000	2.0
Levaduras y hongos	500,000	3.0
Actinomyces	100,000	1.5
<i>Pseudomonas</i> fluorescentes	1,000,000	2.0
Fijadoras de nitrógeno	1,000,000	1.0

Cuadro 2: Índices de diversidad biológica de composta (BBC Lab).

SRDT*	Clasificación de compostas sólida
Índice > 12.5	Alta diversidad
Índice de 7 – 12.5	Diversidad moderada
Índice < 7	Baja diversidad

*Species Richness Diversity Index – Compost Tea.

Aislamiento y Multiplicación de las Bacterias Antagonistas

El aislamiento de los antagonistas potenciales se realizó al coleccionar 10 sub-muestras de cada silo de composta de estiércol vacuno de la agrícola comercial (Belher) ubicada en Villa Adolfo López Mateos Navolato Sinaloa, se homogenizaron y se colectó una muestra de aproximadamente 1 kg de composta, de esta muestra se tomó una sub-muestra de 50 g de suelo, la cual se depositó en un matraz que contenía 450 ml de agua destilada estéril, el cual se agitó por un periodo de 5 min en un agitador magnético; posteriormente, se

llevaron a cabo las diluciones seriadas desde 10^{-2} hasta 10^{-6} . De estas diluciones se tomaron alícuotas de 100 μ l y se agregaron en la superficie de las placas de Petri con medio de cultivo BK (anexo 1). Las alícuotas se dispersaron con perlas de cristal estériles sobre el total de la superficie de la caja Petri. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 a 72 h. Cada una de las cepas aisladas se purificaron y para la conservación de las cepas se utilizó glicerol al 40% en temperatura de 4 °C y 80 % de glicerol y temperatura de -20 °C, adicionalmente, las cepas se conservaron en agua destilada estéril a temperatura ambiente.

Detección *in vitro* de Potenciales Antagonistas Contra *Ralstonia solanacearum*

La selección de cepas con actividad antagonista contra *Rs* se llevó a cabo al realizar un ensayo preliminar por el método de estriado, el cual consistió en sembrar mediante la técnica de estriado a *Rs* sobre toda la superficie de las placas de medio de cultivo BK, sembrando enseguida a los posibles antagonistas aislados.

La siembra de los microorganismos sobre *Rs* se realizó de la siguiente manera: con la ayuda de un asa bacteriológica previamente esterilizada, se tomaron colonias de los antagonistas y se colocaron pequeños puntos encima de *Rs*. Las placas fueron incubadas a 28 °C y fueron analizadas al observar a las 72 horas su crecimiento y efecto, con la formación de halos de inhibición del crecimiento bacteriano de *Rs*. La siembra de *Rs* y los antagonistas en placas Petri se llevó a cabo el mismo día.

Después de analizar el resultado del estudio preliminar, se seleccionaron las cepas de los microorganismos que mostraron potencial antagonista (inhibición del desarrollo bacteriano) contra *R. solanacearum*. A los microorganismos antagonistas se les evaluó su potencial por medio de tres métodos: (i) Cultivos

duales (cruza); (ii) Disco de papel de filtro (Dhingra y Sinclair, 1995); y (iii) Placa de agar perforado (Doan y Nguyen, 2005). En todos los casos se usó medio de cultivo BK.

Cultivos Duales (Cruza)

Para llevar a cabo este método primero se sembró *Rs* en cajas Petri con medio de cultivo BK, la siembra se realizó cubriendo toda la caja Petri e inmediatamente con la ayuda de una asa bacteriológica previamente esterilizada se tomó una colonia del antagonista y se colocó en línea horizontal sobre el medio donde se encontraba *Rs* (Dhingra y Sinclair, 1995). 72 horas después de la inoculación del medio se midió la distancia de la inhibición, utilizando un vernier.

Disco de Papel Filtro

Para llevar a cabo este método primero se realizaron suspensiones de las bacterias antagonistas así como de *Rs* por separado; las suspensiones de ambas se ajustaron al utilizar la escala de McFarland de 3×10^8 ufc/ml (Király et al., 1974), se agregaron 100 μ l de la suspensión bacteriana de *Rs* en cajas Petri con medio de cultivo BK y se dispersaron por toda la caja con perlas de cristal esterilizadas, inmediatamente después se tomaron círculos de papel filtro de 0.3 mm de diámetro y se impregnaron en la suspensión bacteriana de los antagonistas y se colocaron en cinco puntos equidistantes sobre la caja Petri donde se había dispersado anteriormente a *Rs* (Dhingra y Sinclair, 1995).

Placa de Agar Perforado

Para llevar a cabo este método, se realizaron suspensiones de las bacterias antagonistas; así como, de las bacterias fitopatógenas. Las suspensiones de ambas se realizaron al utilizar la escala de McFarland de 3×10^8 UFC/ml (Király et al., 1974), se agregaron 100 μ l de la suspensión bacteriana de *Rs* en cajas Petri con medio de cultivo BK y se dispersaron por toda la caja con perlas de cristal esterilizadas, inmediatamente después se realizaron perforaciones en el agar de 0.5 cm de diámetro y una profundidad de 0.3 mm aproximadamente, enseguida se agregaron 20 μ l de la solución de antagonistas dentro de la perforación (Doan y Nguyen, 2005).

Evaluación *in vitro* de Antagonistas por Medio de Cultivos Duales (Cruza)

Contra *Rs*

Para la evaluación *in vitro* de los antagonistas se realizó un diseño experimental completamente al azar de dos factores (antagonista y *Rs*) con 13 tratamientos y 5 réplicas cada tratamiento, se realizó un ANOVA y se analizó la interacción patógeno-antagonista realizando comparaciones de Tukey α 0.05, también se realizó una comparación de los tratamientos con dos testigos (testigo inoculado y testigo bactericida) utilizando el paquete estadístico minitab 17.

Evaluación *in vivo* de Antagonistas Seleccionados para el Control de la Marchitez Bacteriana en Plantas de Tomate.

Para evaluar a nivel *in vivo* a los antagonistas, previamente seleccionados en el laboratorio, se utilizaron plántulas de tomate (híbrido Horus). Las plántulas se colocaron en macetas de plástico (tipo azalea), las cuales contenían una combinación de tierra (60 %), fibra de coco (30 %) y composta (10 %), previamente mantenidas a baño María durante 3 h, con la finalidad de reducir la biomasa microbiana del sustrato.

Pruebas de Patogenicidad de *Rs* en Plantas de Tomate

Se realizaron pruebas de patogenicidad de *Rs* en plantas de tomate híbrido Horus. Una vez aisladas las bacterias *Rs* se ajustaron a una concentración de 3×10^8 ufc/ml y se inocularon en las plantas de tomate por medio de las técnicas de punción e inmersión.

Punción. Se tomó una colonia bacteriana de 48 h de crecimiento en medio de cultivo, la colonia se colocó en la yema principal de las plantas con un palillo realizando una pequeña herida para inducir a la penetración del patógeno.

Inmersión. Con la ayuda de una tijera se realizaron heridas en la parte radicular de las plántulas de tomate y la raíz de la planta se introdujo en una suspensión bacteriana de 3×10^8 ufc/ml de *Rs* durante 5 min. Se realizaron 10 repeticiones en los métodos de punción e inmersión. Las plántulas se sembraron en vasos de poliuretano (unicel) No. 10 que contenían sustrato de suelo (50%) y fibra de coco (50%) (Doan y Nguyen, 2005).

Inoculación de *Rs* y Antagonistas en Plantas de Tomate

Para llevar a cabo la inoculación se realizó una suspensión bacteriana de 3×10^8 ufc/ml (Kyrály et al., 1974) de cada antagonista así como de *Rs*; posteriormente, se añadieron 10 ml de la suspensión bacteriana (antagonistas) en cada maceta donde se encontraban las plántulas de tomate bola de híbrido Horus (5 macetas por tratamiento). La suspensión bacteriana se depositó en el área cercana a la raíz enseguida se añadieron 10 ml de la suspensión de *Rs*. La severidad se analizó utilizando la escala sugerida por Kempe y Sequeira (1983) (Cuadro 3). La incidencia de la enfermedad se determinó al monitorear las plantas semanalmente durante cuatro semanas. Con base a estos resultados de incidencia y severidad, se seleccionaron a los cinco antagonistas más efectivos y se evaluaron en un segundo experimento en el cual las plantas del experimento se mantuvieron durante tres meses. En este experimento, además de evaluar la incidencia y severidad de la enfermedad, se evaluó la efectividad biológica de los antagonistas y se comparó con un testigo comercial, el cual fue un bactericida a base de sulfato de gentamicina + oxitetraciclina (Agri-gent plus 800®) utilizando la misma cantidad de producto que en el resto de los tratamientos (10 ml). Todos los tratamientos se compararon con un testigo inoculado solo con *Rs* y con un testigo blanco, el cual no contenía *Rs* y antagonistas.

Cuadro 3: Escala de Severidad para *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate

Valor de la escala	Descripción (<i>Ralstonia solanacearum</i>)
0	planta sin síntomas
1	0 - 25 % en promedio de la planta con marchitez
2	26 - 50 % de planta con marchitez
3	51 - 75 % de planta con marchitez

4 del 76 al 100 % de la planta con marchitez (muerte de planta)

(Kempe y Sequeira, 1983)

Colonización de los Antagonistas en Sustrato Rizosférico en Plantas de Tomate

Se realizaron dos muestreos, el primero se llevó a cabo ocho días y el segundo, se realizó 67 días después de la inoculación (una semana antes de finalizar el experimento). De las 2 muestras colectadas por maceta se tomó una sub-muestra de 50 g de sustrato y se colocaron en 450 ml de agua destilada estéril, posteriormente se realizaron diluciones seriadas, de las cuales se tomaron alícuotas de 100 μ l y se colocaron en placas Petri con medio de cultivo PDA; después de 48 h, se contabilizó la cantidad de colonias desarrolladas en el medio, se registró el resultado y se obtuvieron las unidades formadoras de colonia de *Bacillus* por gramo de sustrato.

Diseño Experimental

Para el primer experimento se estableció un diseño completamente al azar de dos factores, con 13 tratamientos los cuales fueron constituidos por los 10 antagonistas previamente seleccionados en el laboratorio y dos testigos (testigo inoculado y testigo sin inocular), se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue una maceta con planta de tomate. Se realizó un ANOVA y se analizó la interacción antagonista-patógeno así también como la comparación de medias con la prueba de Tukey, α 0.05. El análisis se llevó a cabo con el paquete estadístico minitab 17. Se seleccionaron cinco bacterias con potencial antagonista para *Rs*.

En el segundo experimento con los 5 antagonistas que mostraron el mejor control de *Ralstonia solanacearum*, se estableció un diseño completamente al azar de dos factores (antagonista-patógeno), con 9 tratamientos los cuales fueron constituidos por las cinco bacterias antagonistas (cada bacteria fue un tratamiento diferente), una mezcla de antagonistas (los 5 antagonistas mezclados formaron un tratamiento) tres testigos (testigo inoculado con *Rs*, testigo sin inóculo y testigo tratado con un bactericida comercial Agri-gent plus), se contó con 5 repeticiones y 3 réplicas por tratamiento.

Caracterización de las Bacterias Antagonistas Eficientes Contra *Rs*

Caracterización Morfológica

Características de las colonias. Se observó al microscopio la forma color y consistencia de las colonias.

Tinción de Gram. Se realizó un frotis de una colonia bacteriana sobre un porta objetos, posteriormente se secó al aire y se fijó con calor; después se adicionó cristal violeta y se dejó actuar por 1 min. Se decantó el colorante inicial y se agregó solución de lugol, dejándose actuar por 1 min, se decantó la solución de lugol y se decoloró con etanol hasta que el colorante se diluyó; posteriormente, se lavó con agua y se adicionó solución safranina al 1 % por 30 s. Por último, se lavó con agua y se dejó secar al aire y se observó al microscopio (Schaad et al., 2001).

Las bacterias que retuvieron el colorante inicial (cristal violeta) fueron consideradas como Gram positivas y las que se decoloraron con el etanol y adquiriendo el colorante contrastante (rojo o rosa) se consideraron como Gram negativas.

Tinción de flagelos. Se llevó a cabo la técnica de Peppler: se tomó la colonia bacteriana, se depositó en un tubo de ensaye; posteriormente, se agregó una gota de la suspensión bacteriana sobre un portaobjetos y se inclinó para desplazar la gota por el portaobjetos, luego se secó al aire para posteriormente adicionar solución mordente por 5 min, posteriormente se lavó con agua, para después adicionar solución de cristal violeta y dejar actuar por 5 min; por último, se lavó con agua y se dejó secar al aire. Finalmente, se observó al microscopio (Acharya, 2013).

Caracterización por Pruebas Bioquímicas

Las cepas que presentaron potencial antagonista significativo contra *Rs* a nivel *in vitro* e *in vivo* fueron identificadas por medio de galerías Api 50 CHB/E, se siguieron las indicaciones sugeridas por el fabricante, empleando cepas puras incubadas en medio de cultivo BK durante 48 h a 37 °C. Los resultados obtenidos se evaluaron en la base de datos del apiweb.

Caracterización por Pruebas Moleculares (PCR)

Extracción del ADN de los antagonistas. La bacteria se reactivó en placas con medio BK y se incubó a 28 °C durante 24 h.

Para llevar a cabo la extracción del ADN, se tomó una colonia de la bacteria, se resuspendió en 100 µL de agua destilada estéril y se colocó en un vórtex. La muestra se calentó a 95 °C en un AccuBlock digital Dry Bath (marca Labnet) durante 15 min, se retiró del Accublock e inmediatamente se colocó en hielo durante 7 min. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 10 000 x g durante 10 min y se decantó el sobrenadante; posteriormente, se resuspendió en 50 µL de agua destilada estéril y finalmente el ADN se conservó a -20 °C para posteriores estudios.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de los antagonistas. Se amplificó la región 16S, utilizando los iniciadores FD2 (AGAGTTTGATCATGGCTCAG) y RP1 (ACGGTTACCTTGTTACGACTT), el cual se espera genere un amplicon de aproximadamente 1500pb. La mezcla de reacción para la PCR se llevó a cabo como se muestra en el Cuadro 4 (Weisburg et al., 1991; McLaughlin et al., 2012). La amplificación se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler de Singapore, bajo las condiciones de tiempo y temperatura indicadas en el Cuadro 5

Cuadro 4: Mezcla de PCR para la amplificación de la región 16S del ADNr de los antagonistas bacterianos (Kit GoTaq® PCR Core System I marca Promega de USA).

Reactivos	µL
Amortiguador	5 µL
MgCl ₂	1.5 µL
dNTP's	0.5 µL
Iniciador FD2	0.5 µL
Iniciador RP1	0.5 µL
ADN	2.0 µL
ADN Taq Polimerasa	0.2 µL
Agua cbp 25 µL	14.8 µL

Cuadro 5. Condiciones de PCR para la amplificación de la región 16S de los antagonistas bacterianos

Condiciones	Temperatura °C	Tiempo
Activación de la enzima	95	5 min
Desnaturalización	94	1 min
Alineamiento	56	1 min
Extensión	72	1 min
Extensión Final	72	10 min

Muestras de 5 µL de los productos de PCR, un testigo blanco (sin ADN), un testigo negativo (ADN del Oomyceto *Phytophthora* spp.), un testigo positivo (ADN de la bacteria *Bacillus* spp.) y 0.6 µL de un marcador molecular de 1 kb DNA Ladder marca Promega de USA (referencia para determinar el tamaño molecular de los productos amplificados), se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñido con GelRed™ Nucleid Acid marca BIOTIUM. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis Powerpac™ Basic marca BIO-RAD de Singapore con amortiguador TAE 0,5 X (242 g Tris, 100 ml Tris-HCl, pH 8.0, 57.1 ml ácido acético glacial, 1:1 agua destilada), aplicando 60 V y 250 mA, durante 1 h, Los resultados se visualizaron en un fotodocumentador de luz UV Gel Doc™ XR+ Imaging System marca BIO-RAD de USA. Una vez obtenido el fragmento esperado (1500 pb), el producto de PCR se purificó y se secuenció.

Purificación del producto de PCR. Una vez amplificado el ADN, se purificó el resto del producto de PCR siguiendo el protocolo del kit de purificación (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System marca Promega de USA), el cual

consiste en agregarle al producto de PCR 500 μ L de la solución BINDING BUFFER II y posteriormente se incubó a 60 °C durante 10 min en un Accu-Block digital marca Labnet de Taiwan. La mezcla del paso 3 se transfirió a una columna Ez-10 del protocolo original y se dejó en contacto por 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min, luego se pasó la columna a un tubo nuevo y se agregaron 750 μ L de la solución de lavado, posteriormente se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 2 min, se deshace la solución del tubo realizando repeticiones de la centrifugación, se transfirió la columna a un tubo nuevo y se agregaron 30 μ L de la solución ELUTION BUFFER dejándola en contacto a temperatura ambiente por 2 min, por último se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 2 min.

Secuenciación de los fragmentos amplificados. Los productos purificados se secuenciaron mediante servicio en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV, Unidad Irapuato, Guanajuato. Una vez obtenidas las secuencias, se realizó una comparación usando la herramienta BLAST de la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Análisis Microbiológico de la Composta

En el análisis microbiológico de la composta se encontró una diversidad moderada de 8.8 de microorganismos benéficos que ayudan a la planta de tomate a desarrollarse como son las bacterias (Cuadro 6), hongos, levaduras y actinomicetes (Cuadro 7)

Cuadro 6: Bacterias presentes en composta de estiércol vacuno

Composta	<i>Pseudomonas</i> fluorescentes	Bacterias aeróbicas	Bacterias anaeróbicas	BFN	<i>Bacillus</i> sp.	BSK
Promedio de 21 silos	507,921	55,492,06 3	4,998,016	665,069	33,201,587	203,67 8

BFN: bacterias fijadoras de nitrógeno. BSK: bacterias solubilizadoras de potasio.

Cuadro 7: Hongos, levaduras y actinomicetes presentes en composta de estiércol vacuno.

Composta	Actinomicetes	<i>Trichoderma</i>	HSP	HSK
Promedio de 21 silos	226,508	5,172	565,106	30,571

HSK: hongos solubilizadores de potasio, HSP: hongos solubilizadores de fosforo

Una de las principales preocupaciones relacionadas con el uso de compostas a base de estiércol es la posible carga microbiana que afecta a la salud humana. Los resultados de los análisis microbiológicos comprueban la ausencia de microorganismos patógenos al humano en la composta, haciéndola inocua para su utilización en la industria hortícola (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis microbiológico de la composta.

Microorganismo	Resultado	Método analítico	Límite permisible NMX-FF-109- SCFI-2007
Coliformes fecales	8.14 NMP/g base seca	EPA 2010, método 1680, modificado	No aplica
<i>Escherichia coli</i>	5.04 NMP/g base seca	EPA 2010, método 1680, modificado	≤ 1000 NMP/g base seca
<i>Salmonella</i> spp.	< 0.32 NMP/4 g base seca	EPA 2006, método 1682, modificado	3 NMP/4 g base seca

Obtención de Microorganismos Antagonistas

En total se obtuvieron ochenta cepas de bacterias provenientes de la composta de estiércol vacuno, de las cuales solo trece de ellas mostraron potencial antagonista contra *Ralstonia solanacearum*. Las cepas con potencial fueron etiquetadas como: CB25, CB28, CB3, CB32, CB38, CB41, CB46, CB49, CB53, CB57, CB58, CB60 y CB69.

Evaluación *in vitro* de los Antagonistas contra *Ralstonia solanacearum*

De las tres técnicas utilizadas evaluadas en un preliminar se seleccionó a la técnica de cultivos duales para llevar a cabo la evaluación *in vitro* de los antagonistas, ya que en esta técnica se observó con mayor claridad la inhibición de *Ralstonia solanacearum* por parte de los aislados.

De las trece bacterias antagonistas evaluadas solo diez de ellas produjeron un halo de inhibición mínimo requerido (5 mm de diámetro) contra *Ralstonia solanacearum*, de acuerdo con Tan et al. (2012), quienes mencionan que para que un microorganismo sea considerado como un antagonista efectivo, debe formar un halo de inhibición mínimo de 5 mm de diámetro. Las cepas CB25, CB46 y CB57 produjeron un halo de inhibición mayor a 5 mm, por lo que no se consideraron efectivas para la producción de metabolitos con actividad bactericida a nivel *in vitro* (Plana et al., 2008) Las mejores cepas fueron CB49 y CB60 con un halo de inhibición de 27.4 mm y 26.2 mm, respectivamente (Fig. 1).

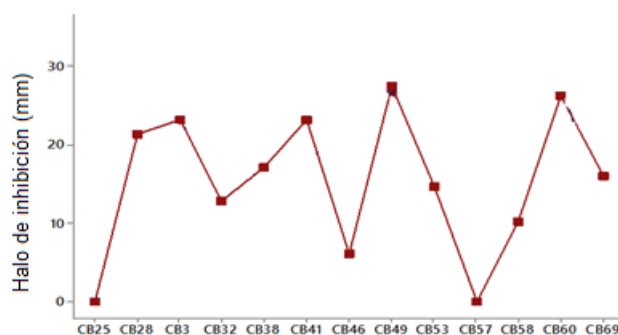


Figura 1. Halo de inhibición formado por los antagonistas de *Ralstonia solanacearum*

Selección *in vivo* de los Mejores Antagonistas de *Ralstonia solanacearum*.

En la primera evaluación *in vivo* se obtuvieron resultados esperados, es decir, el mayor porcentaje de incidencia (100 %) y severidad (60 %) de la enfermedad (marchitez bacteriana) ocurrió en las plantas del tratamiento testigo inoculado; mientras que, el testigo sin inóculo no presentó daño alguno. Las diez cepas evaluadas tuvieron un efecto positivo en las plantas de tomate, las cuales presentaron un daño no mayor al 35 % de severidad; sin embargo, para que una cepa sea considerada como un antagonista eficiente no debe presentar un porcentaje de severidad mayor al 10 % (Plana et al., 2008; Tan et al., 2012; Remesh y Phadke, 2012). Con base a esto, se seleccionaron a las cepas CB53, CB58, CB60 y CB69 para ser evaluadas en el experimento posterior (Fig. 2).

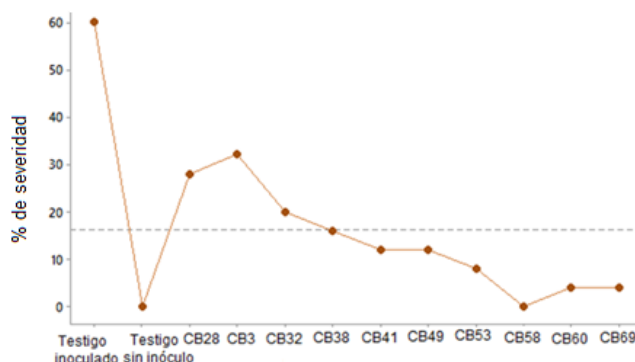


Figura 2. Severidad de marchitez bacteriana en plantas de tomate bola tratadas con diez antagonistas

Evaluación de Incidencia de la Enfermedad en Plantas de Tomate Tratadas con Antagonistas

En la evaluación de incidencia de enfermedad, existió diferencia significativa entre tratamientos, obteniendo un valor P de 0.0 α , al comparar el testigo

inoculado con el resto de los tratamientos, todas fueron diferentes respecto al testigo inoculado. En las plantas tratadas con las cepas CB60, CB69, CB53 y la mezcla de antagonistas, se produjo la menor incidencia de la enfermedad por lo que fueron estadísticamente iguales y se consideraron las mejores cepas antagonistas puesto que tuvieron un comportamiento muy parecido al testigo sin inóculo. Los tratamientos de la cepa CB58 y bactericida presentaron mayor porcentaje de incidencia 80 % y 50 % de incidencia, respectivamente, sin embargo fueron estadísticamente diferentes entre ellos, siendo mejor el testigo bactericida ya que obtuvo menor incidencia de la enfermedad (Fig. 3).

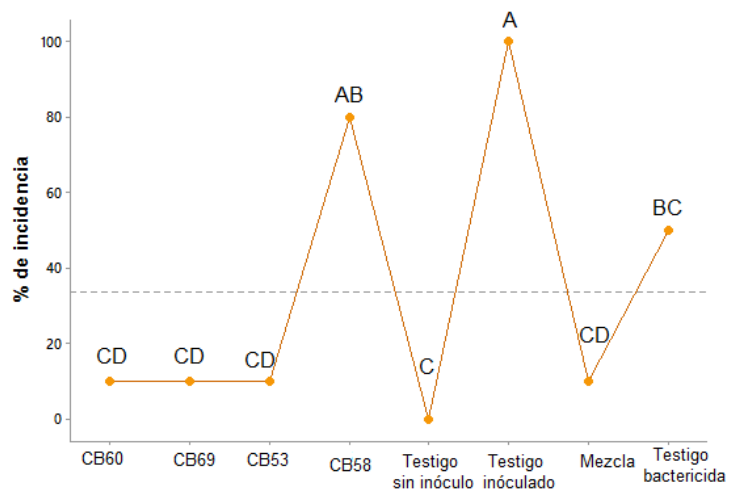


Figura 3. Incidencia de marchitez bacteriana en plantas de tomate bola tratadas con antagonistas

Evaluación de Severidad de la Enfermedad en Plantas de Tomate Tratadas con Antagonistas

Todos los tratamientos mostraron diferencia significativa respecto al testigo inoculado, el cual mostró un 75 % de severidad de marchitez bacteriana. Las cepas CB60, CB69 y CB58 fueron estadísticamente igual al testigo bactericida;

es decir, obtuvieron un porcentaje de severidad similar, por lo que se pudiera decir que las cepas antes mencionadas son iguales de eficientes que el bactericida Agri-gent plus 800 para el control de *Ralstonia solanacearum*. Los tratamientos más efectivos fueron la cepa CB53 y la mezcla de antagonistas, los cuales mostraron menor severidad de la enfermedad que el testigo con bactericida y fueron estadísticamente iguales al testigo sin inóculo (Fig. 4).

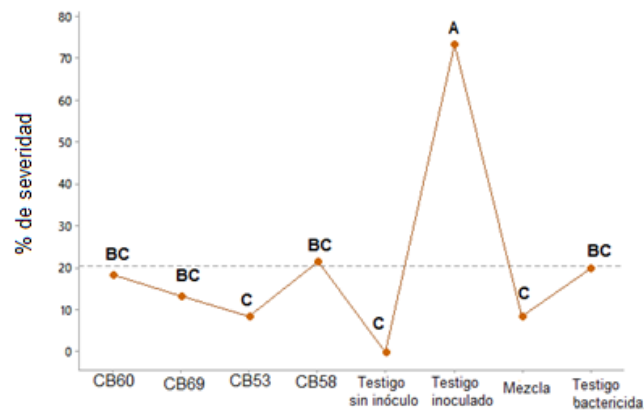


Figura 4. Severidad de marchitez bacteriana en plantas de tomate bola tratadas con cuatro antagonistas

Efectividad Biológica (EB) de los Antagonistas Contra *Ralstonia solanacearum*

Todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales; sin embargo, para que un microorganismo sea considerado como un antagonista eficiente debe tener una efectividad biológica mínima del 70 % (Plana et al., 2008; Tan et al., 2012; Ramesh y Phadke, 2012). Los tratamientos con mayor efectividad biológica fueron la cepa CB53 y la mezcla de antagonistas superando al testigo bactericida con 15 % de EB el cual obtuvo una EB de 75 %.

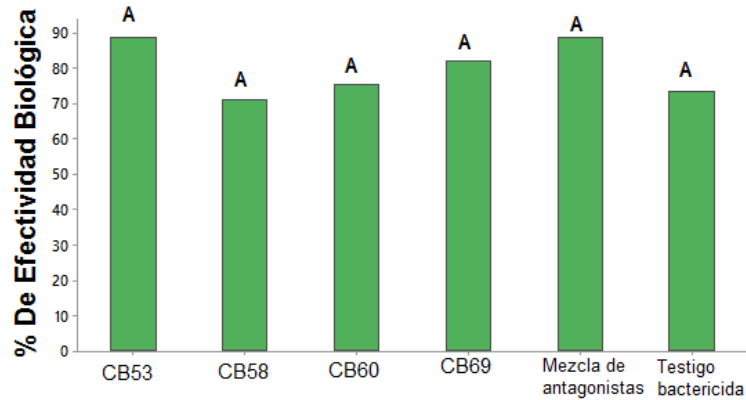


Figura 5. Efectividad biológica de los antagonistas contra *Ralstonia solanacearum*

Colonización de los Antagonistas en Sustrato Rizosférico de Plantas de Tomate

Todas las bacterias pudieron ser cuantificadas en el sustrato rizosférico. Se observó un aumento de ufc/g de sustrato en todos los tratamientos; sin embargo, el tratamiento con mayor colonización fue el de la cepa CB53 con 4×10^6 ufc/g en la primera evaluación, observándose un aumento significativo en la segunda evaluación de 2×10^7 ufc/g. La cepa CB69 fue la que menos colonizó el sustrato con 2×10^6 ufc/g y 5×10^6 en la primera y segunda evaluación respectivamente. Es importante mencionar que la cepa CB49 obtuvo mayor eficiencia como antagonista de *Rs* en la evaluación *in vitro*; mientras que, a en la primera evaluación a nivel *in vivo* obtuvo una severidad mayor al 10 % por lo que no fue considerada en la segunda evaluación a nivel *in vivo*. Esto puede deberse a que la bacteria CB49 aunque produce una gran cantidad de metabolitos que inhiben a nivel *in vitro* el crecimiento de *Rs*, no tiene capacidad de adaptación al medio ambiente (condiciones adversas) y colonización de sustrato rizosférico de plantas de tomate como lo hizo la cepa CB53, por lo tanto es considerada como una cepa con menor eficacia para el control de *Rs* en plantas de tomate (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cuantificación de *Bacillus* spp. en la rizósfera de plantas de tomate bola (híbrido Horus)

Tratamientos	M1	M2
CB53	$4 \times 10^{6*}$	$2 \times 10^{7*}$
Mezcla de los 4 antagonistas	$4 \times 10^{6*}$	$1 \times 10^{7*}$
CB58	$2 \times 10^{6*}$	$8 \times 10^{6*}$
CB60	$1 \times 10^{6*}$	$8 \times 10^{6*}$
CB69	$4 \times 10^{6*}$	$7 \times 10^{6*}$
Testigo sin inóculo	$1 \times 10^{6*}$	$6 \times 10^{5*}$

M1: primera evaluación, M2: segunda evaluación, *unidades formadoras de colonias/g de sustrato.

Caracterización de los Microorganismos Efectivos Contra Rs

Caracterización morfológica

Las cuatro cepas antagonistas de *Rs* más efectivas fueron caracterizadas morfológicamente, observándose colonias de color blanco a crema, dos cepas presentaron forma irregular con elevación, de consistencia mucoide y forman colonias grandes, dos cepas presentaron forma irregular, planas de consistencia seca y forman colonias grandes, las cuatro cepas presentaron endosporas además son Gram positivas y presentan flagelación de tipo peritrica. Estas características coinciden con las características morfológicas de especies del género *Bacillus* (Schaad et al., 2001).

Identificación bioquímica

De las cuatro cepas que mostraron resultados efectivos para la supresión de *R_s* en plantas de tomate, se encontraron dos especies diferentes, las cuales pertenecen al género *Bacillus*. Sin embargo, el porcentaje de identidad para las cepas CB53 y CB58 es bajo con 47.1 % y 59.6 % de identidad respectivamente (Cuadro 10), algunos estudios revelan que las especies de *Bacillus* son muy complejas y parecidas metabólicamente entre sí, por lo que es difícil distinguir diferencias solo con pruebas bioquímicas (Schaad et al., 2001). Es necesaria la utilización de pruebas moleculares, como la amplificación de la región 16S por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para una mejor identificación (Jones y Ellner, 2007).

Cuadro 10. Porcentaje de identidad de las cepas antagonistas con especies del género *Bacillus* por medio de pruebas Api 50 CHB/E

Aislamiento	Especies	% de homología
CB53	<i>Bacillus circulans</i>	47.1
CB58	<i>Bacillus circulans</i>	59.6
CB60	<i>Bacillus licheniformis</i>	96.4
CB69	<i>Bacillus licheniformis</i>	96.4

En un experimento de anaerobiosis se demostró que las cepas en estudio son aeróbicas obligadas ya que solo se desarrollaron en presencia de oxígeno, las especies *B. circulans* y *B. licheniformis* son anaeróbicas facultativas (Schaad et al., 2001), por lo que este resultado no concuerda con lo obtenido en las galerías API 50 CHB/E; esto puede deberse a que las pruebas bioquímicas empleadas en este estudio son muy subjetivas, por lo que es difícil distinguir entre especies del mismo género. (Jones y Ellner, 2007).

Identificación molecular

En la amplificación del gen 16S se obtuvo un fragmento de 1500 pb (Figura 6), esto coincide con el fragmento esperado. Al llevar a cabo la secuenciación y comparación con cepas de referencia en el NCBI se demostró que las bacterias CB53, CB58, CB69 pertenecen a *Bacillus subtilis* ya que poseen un porcentaje de identidad de 99 a 100%, mientras que la cepa CB60 obtuvo un porcentaje de identidad de 99% con *Bacillus amyloliquefaciens* (Cuadro 9). Estos resultados no coinciden con los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica por medio de la galería Api 50 CHB/E, pero si coinciden con los resultados obtenidos en la prueba de anaerobiosis, ya que tanto *Bacillus subtilis* como *Bacillus amyloliquefaciens* son aeróbicas obligadas (Schaad et al., 2001).

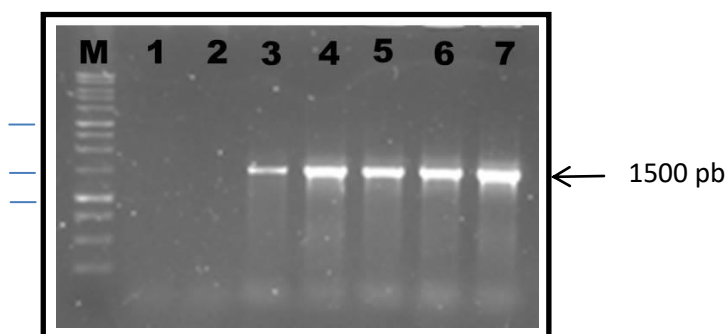


Figura 6: Productos de Amplificación con los iniciadores FD2 y RP1 que flanquean un región conservada en el género *Bacillus*. Gel de agarosa al 1 % que muestra la amplificación de un fragmento de 1500 pb. M: marcador molecular de 1 kb. 1: testigo blanco (agua). 2: control negativo (*Phytophthora* sp). 3: control positivo (*Bacillus* sp). 4: aislado CB53. 5: aislado CB60. 6: aislado CB58. 7: aislado CB69.

Cuadro 11: Porcentaje de identidad molecular de los aislados efectivos contra *Rs* con *Bacillus* spp.

Aislamiento	% de homología	Especie	Número de acceso*
CB53	99	<i>Bacillus subtilis</i>	HQ009753
CB58	100	<i>Bacillus subtilis</i>	KX453895.1
CB60	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KF112077
CB69	100	<i>Bacillus subtilis</i>	KU160383

*Número de acceso del NCBI de la especie homóloga de los aislamientos

Desde hace algunos años se ha demostrado que *B. subtilis*, no solamente inhibe a patógenos de algunas especies de plantas, sino que además, promueve el crecimiento de la raíz y la planta, e incrementa el contenido de lípidos, triglicéridos y esterol en las hojas del tomate (Cuervo, 2010).

El hecho de haber encontrado a especies del género *Bacillus* como microorganismos que ejercen un buen control biológico sobre *R. solanacearum* está previamente bien documentado ya que tanto *B. subtilis* como *B.*

amyloliquefaciens son utilizadas como organismos antagonistas en aplicaciones agronómicas, debido a la acción del ingrediente activo en cepas certificadas de *B. subtilis*, cuya actividad bactericida natural la convierte en agente de control biológico, ya que produce un antibiótico llamado subtilin, el cual impide el desarrollo de bacterias Gram positivas y negativas, al alterar la permeabilidad de la membrana celular e inhibir el paso de potasio y el transporte de ATP (Salgado y Fucikovsky, 1994).

La bacteria *B. amyloliquefaciens* ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de biocontrol, ha destacado su actividad antagonista frente a *Podosphaera fusca* y ciertas bacterias patógenas de cucurbitáceas, siendo la antibiosis mediada por lipopéptidos tales como iturinas y fengicinas, uno de los principales mecanismos de acción (Cuervo, 2010).

Este hallazgo ubica en primer orden la necesidad de conocer la microflora asociada a los diferentes procesos biogeoquímicos que ocurren en la rizósfera y sustratos que se utilizan para la producción de hortalizas. La presente investigación se planteó como una aproximación inicial a la identificación de bacterias asociadas al antagonismo de enfermedades fitopatógenas como lo es la marchitez bacteriana ocasionada por *Ralstonia solanacearum*.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron aislar y caracterizar 13 cepas bacterianas con capacidad potencial de producción de sustancias para inhibir el desarrollo de *R. Solanacearum*, además se identificaron cuatro cepas con capacidad potencia para su uso posterior como biobactericidas en el cultivo del tomate. Con ello se logró, en primer término, confirmar la diversidad de rizobacterias que pueden estar asociados con las raíces de las plantas de tomate bajo condiciones de cultivo protegido (malla sombra), seleccionándose con base en los morfotipos coloniales un total de 80 aislados, cuatro de los cuales fueron identificados con pruebas morfológicas, bioquímicas (Api 50 CHB/E) y moleculares a partir del análisis de secuencias 16S del ADNr.

A pesar de que la selección de los aislamientos a identificar se basó en criterios fenotípicos y genotipos, fue difícil llevar a cabo una identificación exacta de las bacterias, debido al complejo de especies reportadas del género *Bacillus* que son fenotípica y metabólicamente muy parecidas entre sí. Sin embargo, se destacó la presencia de las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*.

Resultará de gran interés evaluar en el futuro, el papel principal de estas bacterias en la rizósfera de las plantas de tomate bajo condiciones comerciales, ya que fueron detectadas creciendo principalmente en medio selectivo para bacterias heterotróficas aeróbicas.

Las especies de *Bacillus* son un grupo de bacterias ampliamente investigado, que se caracteriza por su capacidad promotora de crecimiento vegetal a partir de la producción de compuestos volátiles, los cuales se ha documentado que incrementan el número y longitud de pelos radiculares y raíces secundarias (López et al., 2009; Zou et al., 2010). Estas bacterias han sido reportadas también promoviendo el crecimiento en plántulas de *Phaseolus vulgaris*, debido al aumento en la producción de citoquininas en las plantas inoculadas (Ortíz et al., 2008) y como solubilizadoras de fosfato y biocontroladoras de patógenos en *Capsicum annuum* (Akgül y Mirik, 2008).

Bacillus subtilis y otros miembros del género han sido utilizados como agentes de control biológico (BCA) en la agricultura (Nagorska et al, 2007; Ongena y Jacques, 2008). Por ejemplo, varias cepas de *B. subtilis* se han empleado con éxito en los programas de manejo de enfermedades (Wulff et al., 2002, Bais et al., 2004, Stein, 2005; Lemessa y Zeller, 2007). En este trabajo, se aislaron cepas nativas de *B. subtilis* que demostraron eficacia en el control biológico de *R. solanacearum* en ambos ensayos: *in vitro* y en experimentos realizados bajo condiciones de cultivo protegido en malla sombra.

CONCLUSIONES

La composta elaborada con estiércol de ganado vacuno posee una diversidad moderada de microorganismos, especialmente bacterias del género *Bacillus* que ayudan a la supresión de *Ralstonia solanacearum*.

Los microorganismos que sobresalen como antagonistas de *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate pertenecen al género *Bacillus* destacando principalmente a las especies *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

Bacillus subtilis aplicado en el cultivo de tomate puede ser una alternativa biológica para el control de *Ralstonia solanacearum* llegando a obtener hasta un 80 % de Efectividad Biológica.

REFERENCIAS

Acharya, T. 2013. Bacterial flagella: structure, importance and examples of flagellated bacteria. Microbe online. <http://microbeonline.com/bacterial-flagella-structure-importance-and-examples-of-flagellated-bacteria>. Fecha de consulta; 22 de agosto de 2015.

Agrios, G. A. 2005. Plant pathology. 5th Edition. Elsevier Academic Press. San Diego, California, USA. 556 p.

Akgül, D.S. and Mirik, M. (2008). Biocontrol of *Phytophthora c72* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. J Plant Pathol 90(1): 29-34.

Alexander, M. (1977). Introduction to soil microbiology. 2d. Ed John Wiley and sons. USA, p. 476.

Alvarado, G. J. R. y Chávez, B. R. (2014). Desinfectantes para el control de *Ralstonia solanacearum* Smith Yabuuchi y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en tijeras y manos. Facultad de Agronomía, UAS. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agronómica. Culiacán Sinaloa México. Pág.: 39-47.

APROLAB. (2007). Manual para la producción de composta con microorganismos eficaces (EM). Perú, Pp: 1-8. http://www.em-la.com/archivos-de-usuario/base_datos/manual_para_elaboracion_de_compost.pdf.

Bais, H. P., Fall, R. and Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol. 134:307-319.

BBC Lab. (2016). Laboratories. www.bbclabs.com

CAADES. 2015. Cierre de ciclo de hortalizas: Temporada 2014-2015. 113 pp.

Carrillo, F. J. A. (2016). Impacto de los nematodos en los cultivos hortícolas. II Simposio de manejo de nematodos en Hortalizas. Culiacán Sinaloa, México.

Champoiseau, P. G., Jones, J. B., and Allen, C. (2009). *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Online. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2009-0313-01-RV.

Coenye, T., Goris, J., De Vos, P., Vandamme, P., and LiPuma, J. J. 2003. Classification of *Ralstonia pickettii*-like isolates from the environment and clinical samples as *Ralstonia insidiosa* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53:1075-1080.

Cuervo, L. J. P. 2010. Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. Como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Tesis de licenciatura en microbiología agrícola y veterinaria, Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá D.C. 7-9 pp.

De Baere, T., Steyaert, S., Wauters, G., De Vos, P., Goris, J., Coenye, T., Suyama, T., Verschraegen, G., and Vanechoutte, M. 2001. Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3/‘thomasii’ strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolytica* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:547-558.

Deberdt, P., Queneherve, P., Darrasse, A. and Prior, P. (1999). Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the mi gene in resistance to nematodes and bacterial wilt. Plant Pathology. 48:408-414

Denny, T. P. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. Indonesia, Gnanamanickam (ed.) Plant-Associated bacteria. Springer. Pp 573-644.

Denny, T. P., and Hayward, A. C. 2001. Gram-Negative bacteria. pp. 151-173. In: N.W. Schaad, J.B. Jones, and W. Chun (eds.). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society. St Paul, MN, USA.

Dhingra O. D. and Sinclair J. B. (1995). Basic Plant Pathology Methods, 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Doan, T.T. and Nguyen T.H. (2005). Status of research on biological control of tomato and groundnut bacterial wilt in Vietnam. Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases, Seeheim/Darmstadt, 105-111.

Elphinstone, J.G. (2005). The current bacterial wilt situation: A global overview. In: Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press. St. Paul, MN.

FAO. 2007. FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAOSTAT <http://www.fao.org> (Consulta: 20 Abril 2011).

Flaño, A. 2013. Situación del tomate para consumo fresco. ODEPA Oficina de estudios y políticas agrarias. www.ODEPA.gob.cl.

García, E. R. (2009). Cáncer bacteriano del tomate. Manual de producción de tomate de invernadero. Ed. Intagri. Celaya, Gto. México. pp 383-394.

Genin, S., and Boucher, C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. Annual Review of Phytopathology 42:107- 134.

Hanson P. M., Wang J. F and Licardo O. (1996). Variable reaction of tomato lines of bacterial wilt evaluated at several locations in Southeast Asia. HortScience 31: 143-146.

Hartman, G. L., Hong, W-F., and Wang, T-C. 1991. Survey of bacterial wilt on fresh market hybrid tomatoes in Taiwan. Plant Protection Bulletin. 33:197-

203.

Hayward, A.C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29:65-87.

Hernández, M. L. (1996). Agricultura orgánica: Producción de México hacia el mundo. Perspectivas de la educación y la investigación en materia de agricultura orgánica. México, Editores. 4 pp.

Ibarra, G. (1993). Sinaloa tres siglos de economía. Dirección de investigación y fomento de la cultura regional, México. 70-71 p.

Ji, P., Momol, M.T., Olson, S.M. and Pradhanang, P.M. (2005). Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant Dis. 89:497-500.

Jones, L. E. and Ellner, S. P. (2007). Effects of rapid prey evolution on predator-prey cycles. J. Math. Biol. 55: 541-573.

Kempe, J. and Sequeira, L. (1983). Biological control of bacterial wilt potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. Plant Disease 67:499-503.

Kheirandish, Z. and Harighi, B. (2015). Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato. Biol. control 86 (1):14-19.

Király, Z., Klement, Z., Solymosy, F., Voros, J. 1974. Methods in Plant Pathology, Elsevier Scientific Publishing Company. p. 59-61, 103.

Lambert, C. D. (2002). Agricultural bioterrorism protection act of 2002: Possession, and transfer of biological; agents and toxins; interim and final rule (7CFR Part 331). Federal Register. 67:76908-76938.

Lemessa, F. and Zeller, W., (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. Biological Control 42:336-344

León, G. H. (1982). Enfermedades de los cultivos en el estado de Sinaloa. INIASARH México, D.F. 134-137 p.

López, B. J., Campos, C. J. C., Valencia, C. E., Velázquez, B. C., Farías, R. R., y Macías, R. L. I. (2009). *Bacillus megaterium* modifica la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* independientemente de auxinas y etileno. *Biológicas* 11: 01-08.

López, S. F. S. M. (2014). Caracterización y supervivencia de bacteriófagos para el control biológico de *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C. Tesis de Doctorado en Ciencias, págs: 1-59.

Marco, N. E., Bertolini, E., Morente, C. and López, M. M. (2008). Integrated approach for detection of nonculturable cells of *Ralstonia solanacearum* in asymptomatic *Pelargonium* spp. cuttings. *Phytopathology* 98:949-955.

McDougald, D., Rice, S., Weichart, D. and Kjelleberg, S. (1998). Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiology Ecology* 25:1-9.

McLaughlin, R. W., Chen, M., Zheng, J. and Wang, D. (2012). Analysis of the bacterial diversity in the fecal material of the endangered Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*. *Mol Biol Rep.* 39:5669-5676.

Muñoz, R. J. J. (2004). Condiciones agroclimáticas de México y la horticultura protegida. En: JZ Castellanos (Ed). Manual de producción hortícola en invernadero. Segunda edición INTAGRI. México. Pág. 35-45.

Nagorska, K., Bikowski, M. and Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica* 54:495-508

Nguyen, M.T. and Ranamukhaarachchi, S.L. (2010). Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *Plant Pathol.* 92:395-406.

Ongena, M. and Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16:115-125

Ortíz, C. R., Valencia, C. E. and López, B. J. (2008). Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signal Behav.* 3(4):263-265.

Perea, S. J. M. (2010). Identificación de Cepas de *Ralstonia solanacearum* Aisladas de Cultivos de Tomate del Valle de Culiacán, Sinaloa. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Tesis de Maestría en Ciencias, Págs: 1-43.

Plana, P. L., País, Ch. J., Terrero, S. Y., Tejeda, G. G., Rodriguez, S. J., Rodriguez, W., Morales, G. N., Croche, G. (2008). Aislamiento de metabolitos producidos por la cepa inifat-101 de *Bacillus subtilis*, para el biocontrol de microorganismos fitopatógenos. Instituto de investigaciones fundamentales en agricultura tropical "Alejandro de Humboldt". Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología "CIGB". III Congreso de Agricultura Urbana. Volumen 32.

Ralston, E., Palleroni, N. J., and Doudoroff, M. 1973. *Pseudomonas pickettii*, a new species of clinical origin related to *Pseudomonas solanacearum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 23:15-19.

Ramesh, R. y Phadke, G. S. (2012). Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Crop Protection* 37: 35-41.

Ramírez, V. J. y Sainz, R. R. A. (2010). Manejo de las enfermedades del tomate. Segunda edición. Culiacán Sinaloa México, Págs: 89-92.

Reho, A. I. (2006). Plagas y enfermedades del tomate en: Guía de identificación y manejo. Productores de hortalizas. México. 18 pp.

Rodríguez, Q. G., Armenta, B. A. D., Valenzuela, Q. W., Camacho, B. J. R. Esparza, L. H. M. (2003). Evaluación de sustratos orgánicos para la producción de lombricomposta con *Eisenia foetida*. Naturaleza y Desarrollo. Guasave Sinaloa México. 1:3-9.

Rovira, A. D. (1965). Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. III. The effect of root exudate on the numbers and activity of microorganisms in the soil. Plant & Soil 7:209-217.

Saddler, G. S. (2000). IMI description of fungi and bacteria No. 1220: *Burkholderia solanacearum*. Mycopathologia 128:61-63.

Saddler, G. S. (2005). Management of bacterial wilt disease. Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. In C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN USA. Pags 121-132.

Salgado, M. L. y Faucikovsky, Z. L. (1994). Antagonismo *in vitro* de *B. subtilis* sobre patógenos de frutales. Memoria de la Fundación Salvador Sanchez Colin. Cictamex S.C., pp. 189-192.

Sánchez, C. M. A. (2008). Manejo de enfermedades del tomate. Curso del INCAPA "Manejo Integrado de plagas y enfermedades en tomate, chile y papa.

Schell, M. A. (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. Annu. Rev. Phytopathol. 38:263-292.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3th ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. Pp. 252.

SIAP. (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx>.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 56:845-857.

Tan, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., Xu, Y., Shen, Q. (2012). Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. *Crop Protection* 43:134-140.

Van Overbeek, L. S., Bergervoet, J. H. W., Jacobs, F. H. H. and Van Elsas, J. D. (2004). The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Phytopathology* 94:463-469.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173:697-703

Williamson, L., Nakaho, K., Hudelson, B., and Allen, C. 2002. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. *Plant Disease* 86:987-991.

Wulff, E. G., Mguni, C. M., Mortensen, C. N., Keswani, C. L. and Hockenhull, J. (2002). Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *Euro. J. Plant. Pathol.* 108:317-325.

Yabuuchi, E. K. Y., Yano, I. H. H. and Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen Nov: Prop. Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 197) comb. Nov. *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov: and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology immunology* 39:897-904.

Zou, C., Li, Z., and Yu, D. (2010). *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *J Microbiol.* 48(4):460-466.

ANEXOS

BK

Reactivo	Formula	Cantidad
Fosfato dibásico de potasio	K₂HPO₄	1.5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO₄ 7 H₂O	1.5 g
Bacto peptona		20 g
Glicerina		18 ml
Agar bacteriológico		20 g
Agua destilada		1000 ml

Papa Dextrosa Agar (PDA)

Reactivo	Cantidad
Papa Dextrosa Agar	39 g
Agua destilada	1000 ml

Secuencia consenso de la región 16S de la cepa CB69

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCG
CATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
ACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTT
TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAATTGAGTGCA
GAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCG
AAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC
TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
TCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCATTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTT
AAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATC
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACAC
CACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCCGGTGAGGTAACCTTTAGGAGCCAGCC

Secuencia consenso de la región 16S de la cepa CB53

TGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACC
GCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGG
ACTCGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTAGTACCGCAACGAGCTCAACCCTGATGTTAGTCG
ACAACAAGTACCGTTCGGCATTGTAAGGTGACTTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCGTGTCATCATCCGCTATTACCTAGGTGGCACGCGTGCTACGGAATGGACAGAACGTAAAGGGCATC
GAAACCGCGAGGTTAAGTCTGATGTCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGTCATTGCAGTCTGCAACTTGACT
GCGAGAAGAGTGAATACGTGTAGCTGAATCGCGTAGATCAGCATGCCCGCGGTGAATACGTTCCCGC
TCCTTGACTACTCCCCGTCTACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCCGGTGAGGTA

Secuencia consenso de la región 16S de la cepa CB58

TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCG
CATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGT
ACCGTTGCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGGCCGTTATGACCTCGGCTACACA
CGTGCTACAATGGACAGATGTGAAAGGGCGCAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTT
TCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGAAACACCCGAA
GTCGGTGAGGTAACCTTAGAGCCAGCGCCG

Secuencia consenso de la región 16S de la cepa CB60

GCGTAGAGATGTGGAGGCACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGC
GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGC
AGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAG
AACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCT
GCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCAATAAGTCGGTGAGGTAACGCT
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAG
GTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTTCTTCCCTAACACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC
TCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTG
AGCCATTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTA
TGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGTTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTAC
AGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCT
CGAC