



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



**NUTRICIÓN Y *Bacillus subtilis* EN EL
CONTROL DE MARCHITAMIENTO POR
Fusarium spp. EN TOMATILLO (*Physalis
ixocarpa* B.) EN SINALOA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE**

PRESENTA

OMAR CASTILLO RODRIGUEZ

GUASAVE, SINALOA; MEXICO. DICIEMBRE DE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 08 del mes Diciembre del año 2011, el que suscribe Omar Castillo Rodríguez alumno del Programa de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente con número de registro B091630, adscrito al CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez y Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez, y cede los derechos del trabajo intitulado: Nutrición y *Bacillus subtilis* en el control de marchitamiento por *Fusarium* spp. en tomatillo (*Physalis ixocarpa* B.) en Sinaloa al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

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

Omar Castillo Rodríguez



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-13

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS*

Guasave, Sinaloa a 10 de DICIEMBRE del 2009

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA en su sesión ORDINARIO No. 12 celebrada el día 10 del mes de DICIEMBRE conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

CASTILLO

Apellido paterno

RÓDRIGUEZ

Apellido materno

OMAR

Nombre (s)

Con registro:

B	0	9	1	6	3	0
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
NUTRICIÓN Y BACILLUS SUBTILIS EN EL CONTROL DE MARCHITAMIENTO POR FUSARIUM spp. EN TOMATILLO (PHYSALIS IXOCARPA B.) EN SINALOA

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
SELECCIONAR CEPAS NATIVAS DE BACILLUS SUBTILIS Y PROBAR EL NITRÓGENO EN FORMA DE AMONIO Y NITRATOS CONTRA EL FUSARIUM SPP

2.- Se designa como Directores de Tesis a los C. Profesores:
DR. ADOLFO DAGOBERTO ARMENTA BOJÓRQUEZ Y DIRECTOR DR. MIGUEL ÁNGEL APODACA SÁNCHEZ

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR-SINALOA

Que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios. Proyecto SIP 20090981 de 16,270.73 y Convenio Monsanto 2009, de 75,000.00

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

El Director de Tesis

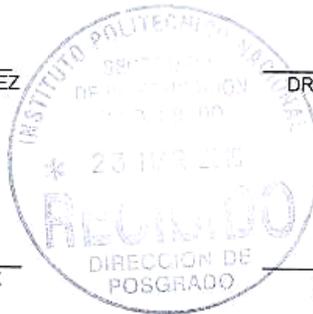
DR. ADOLFO D. ARMENTA BOJÓRQUEZ

El Director de Tesis

DR. MIGUEL A. APODACA SÁNCHEZ

El Aspirante

ING. OMAR CASTILLO RÓDRIGUEZ

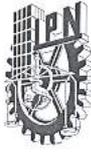


El Presidente del Colegio

DR. JESÚS MÉNDEZ LOZANO



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 14:00 horas del día 08 del mes de Diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SINALOA para examinar la tesis titulada:

“Nutrición y *Bacillus subtilis* en el control de marchitamiento por *Fusarium spp.* en tomatillo (*Physalis ixocarpa* B.) en Sinaloa.”

Presentada por el alumno:

Castillo Apellido paterno	Rodríguez Apellido materno	Omar Nombre(s)
		Con registro: B 0 9 1 6 3 0

aspirante de:

Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente

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

LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez
Director de tesis


Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez
Director de tesis


Dr. Cipriano García Gutiérrez


Dr. Juan Carlos Sainz Hernández


Dr. Manuel Mundo Ocampo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Jorge Montiel Montoya



CIIDIR - IPN
CIIDIR SINALOA
DIRECCION

El trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio de **Nutrición Vegetal** del Departamento de Biotecnología agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa, del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la dirección del Dr. **Adolfo Dagoberto Armenta Bojórquez** E-mail: aarmenta@ipn.mx Domicilio laboral: Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250 CP: 81100 Colonia: San Joachin, Ciudad: Guasave, Estado: Sinaloa, Fax: 01(687) 8729625, Teléfono: 01(687) 8729626; y **Laboratorio de Fitopatología** de la Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte (ESAVF) Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) bajo la dirección del Dr. **Miguel Ángel Apodaca Sánchez** E-mail: esavf@hotmail.com Domicilio laboral: Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte, Universidad Autónoma de Sinaloa, Calle 16 y Av. Xaparaqui CP: 81110, Juan José Ríos, Sinaloa, Tel./Fax: 01(687) 8960908.. Este trabajo fue desarrollado con el financiamiento del proyecto SIP 20090981. El alumno **Omar Castillo Rodríguez** agradece al CIIDIR-IPN y ESAVF-UAS por el apoyo brindado en el uso de la infraestructura para el desarrollo de esta investigación; así mismo, por las becas otorgadas de CONACYT con registro (B091630) y SIP-IPN a través de la secretaria de investigación y posgrado (SIP).

DEDICATORIA

A mi Esposa: **Ana Lizeth López Germán,**

A mis hijos: **Damaris y Uziel.**

Por su amor, paciencia y ser la alegría en todos
los momentos de mi vida.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Hoy expreso mi agradecimiento a todas aquellas personas que me brindaron su colaboración, conocimientos, su ayuda incondicional y sobre todo su amistad durante la realización de esta investigación; por eso infinitamente agradezco su valiosa ayuda, a cada uno de ellos: Gracias.

A Jehová Dios por darme la vida, salud y fuerzas para terminar mi maestría; el haber puesto los medios necesarios para estar en este programa y lograr cumplir mi objetivo: terminarla.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, por la oportunidad que me brindó de realizar mis estudios de maestría.

Mi enorme y sincero agradecimiento a mi director de tesis, Dr. Adolfo D. Armenta Bojórquez; por todo el tiempo dedicado y la gran paciencia tenida en estos 2 años y medio; es un gusto haberlo conocido y un privilegio haber sido su alumno; le agradezco sus conocimientos que son un tesoro invaluable. Al Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez, Director externo de tesis; por su valiosa asesoría, apoyo, guía y amistad en la realización de mi tesis; sus amplios conocimientos en el área de Fitopatología fueron y serán muy valiosos.

A mi comité tutorial y revisor: Dr. Cipriano García Gutiérrez, Juan Carlos Sainz Hernández y Dr. Manuel Mundo Ocampo; por sus sugerencias prácticas en cada tutorial y por el tiempo que me dedicaron muchas gracias.

Al Dr. Ignacio E. Maldonado M. y MC. Juan Carlos Martínez por su ayuda en la caracterización de los aislados utilizados en este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo financiero durante la realización de mis estudios de maestría; al igual de la beca PIFI.

Agradezco enormemente a Olga Sánchez Moreno y Blanca E. Santillán Olivas por haberme brindado su amistad y cariño estos 2 años; al llevarme y traerme a diario para realizar mis estudios de maestría.

A Julián Galaviz por haberme ayudarme en el Laboratorio de Nutrición Vegetal y sobre todo su gran ayuda en el campo desde el trasplante hasta la cosecha del cultivo de tomatillo. A los muchachos de la ESAVF-UAS que prestaron su servicio en mi proyecto (Yanqui, Pelón, Peinado, Cota). Por su gran ayuda también en campo. A Eustaquio Tirso, compañeros de Laboratorio (Toñita y Lic. José M. López,) Sra. Ofelia por su cariño.

Al Campo Experimental Valle del Fuerte (INIFAP) por haberme prestado el terreno para mí proyecto; al MC. Franklin Rodríguez; al Ing. Amado por ayudarme en las labores agrícolas. A Manuel (el chanate) por cuidarme mi tomatillo y haberme ayudado con los riegos a Cristóbal (jarocho) por prestarme su bicicleta a diario en el campo para trasladarme al cultivo.

A todos mis amigos; es muy larga la lista para nombrarlos, pero les agradezco la amistad que me han brindado.

A los empleados del CIIDIR-Sinaloa, Fernando Quintero, Paulino, Bertha, Alberto N, Elvira, Gabriel Barajas (Don Gaby) Lic. Dorín Ortiz, Lic. Roberto Urias, al Ing. Celestino Vargas y Lic. Ricardo Báez, por su apoyo brindado durante mi estancia en éste centro de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	PAGINA
GLOSARIO.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cultivo de tomatillo.....	3
2.1.1 Importancia y origen del tomatillo.....	3
2.1.2 Clasificación taxonómica y descripción botánica del tomatillo.....	4
2.1.3 Enfermedades del tomatillo.....	5
2.2 Marchitez por hongos del suelo.....	6
2.2.1 Síntomas de la marchitez por hongos del suelo.....	6
2.3 Aspectos generales de <i>Fusarium</i> spp.....	8
2.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	8
2.3.2 Ecología y evolución de <i>Fusarium</i>	9
2.3.3 <i>Fusarium solani</i>	11
2.4 Manejo químico de la marchitez en tomatillo.....	11
2.5 Manejo biológico de la marchitez.....	11
2.5.1 <i>Bacillus</i> spp. en el control biológico.....	13
2.5.1.1 Mecanismos de acción de bacterias del género <i>Bacillus</i> spp.....	13
2.5.1.2 Inducción de mecanismos de resistencia.....	15
2.5.1.3 Competencia por nutrientes.....	16
2.6 Solubilización de fosfatos.....	17
2.7 Bacterias promotoras de crecimiento.....	17
2.8 Nutrición del cultivo.....	18
2.8.1 Nitrógeno.....	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	21
IV. OBJETIVOS.....	22

4.1. Objetivo general.	22
4.2. Objetivos específicos.	22
V. HIPOTESIS:	22
VI. METODOLOGÍA.....	23
6.1 Origen y preparación del inóculo de <i>Fusarium</i> spp.	23
6.1.1 Patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp.	23
6.2 Muestreo de raíces de plantas y aislamiento de <i>Bacillus</i> spp.	25
6.3. Bioensayos <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Fusarium</i> spp.....	26
6.4 Selección de aislados de <i>Bacillus</i> contra <i>Fusarium</i> en Invernadero.....	27
6.5 Selección de la mejor relación de nitrato/amonio en invernadero.	29
6.6.1 Área de estudio.....	30
6.6.2 Propiedades físicas y químicas del suelo.	30
6.6.3 Descripción de los tratamientos.....	31
6.6.4 Diseño experimental.	31
6.6.5 Fertilizantes químicos sintéticos.	32
6.7 Incidencia de hongos asociados a las raíces de tomatillo en campo. ..	33
6.7.1 Aislamiento de hongos.	33
6.9 Análisis foliar nutrimental.	34
6.9.1 Nitrógeno total.	34
6.9.2 Fósforo.	35
6.10 Rendimiento de frutos.	38
6.11 Análisis Estadístico.	38
6.12 Identificación molecular de los aislados de <i>Bacillus</i> spp.....	38
6.13 Identificación molecular de los aislados de <i>Fusarium</i> spp.....	39
6.14 Prueba de hemólisis.....	40
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
7.1 Etapa de Laboratorio.....	41
7.1.1 Patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp.	41
7.2 Aislamiento de <i>Bacillus</i> spp.....	43
7.3. Bioensayos <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Fusarium</i> spp.....	43
7.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	43

7.3.2 <i>Fusarium solani</i>	44
7.4 Etapa de Invernadero.....	46
7.4.1 Selección de aislados de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>F. oxysporum</i>	46
7.4.1.2 Peso seco de follaje.....	46
7.4.1.3 Número de flores.	47
7.4.1.4 Volumen de raíz.....	47
7.4.1.5 Diámetro de tallo y peso seco de raíz.....	48
7.4.2 Selección de aislados de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>Fusarium solani</i>	49
7.4.2.1 Altura de planta.....	49
7.4.2.2 Peso Seco de follaje.	49
7.4.2.3 Número de flores.	50
7.4.2.4 Volumen de raíz.....	50
7.4.1.3 Diámetro de tallo.....	51
7.5 Selección de la mejor relación NO ₃ :NH ₄ en Invernadero.	52
7.5 Trabajo de campo.	53
7.5.1 Propiedades físicas y químicas del suelo.	53
7.6. Incidencia de hongos asociados a las raíces en plantas de tomatillo..	54
7.7 Concentración foliar de nutrientes.....	55
7.7.1 nitrógeno total.	55
7.7.2 Fósforo (P).....	55
7.7.3 Potasio (K).....	55
7.7.3.1 Calcio, magnesio y microelementos.	56
7.8 Cosecha.	57
7.9 Identificación molecular de dos aislados de <i>Bacillus</i> spp.	58
7.10 Prueba de Hemólisis.	60
VIII. CONCLUSIONES.....	61
VIII. BIBLIOGRAFÍA	62

GLOSARIO

Amonio. Cation que se encuentra adherido a las partículas del suelo y es fuente de fertilizantes nitrogenados.

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

Bacteria. Organismo unicelular procariota, mas grande que un virus que se presenta en varias formas (esférica, bastón o espiral). Algunas bacterias provocan enfermedades, pero la mayoría son benéficas.

Bacillus. Género de bacterias Gram positivas que se encuentran en el suelo y en el agua. Presentan capacidad de formar endosporas ante condiciones ambientales desfavorables.

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

Cepa. Conjunto de microorganismos de la misma especie o población celular descendientes de una única célula.

Fertilización. Practica agronómica que consiste, en agregar al suelo elementos nutritivos necesarios para incrementar el rendimiento en sus cosechas, de una forma que la planta pueda absorberlos.

Fitopatógenos. Organismos que causan enfermedades en las plantas, por medio de disturbios en el metabolismo celular, causado por la secreción de enzimas, toxinas, fitorreguladores y otras sustancias; además absorben nutrientes de la célula vegetal para su propio crecimiento.

Hemólisis. La hemólisis es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes).

Incidencia. Es la cantidad de individuos o partes contables de un individuo (plantas, frutos, etc.), afectados por una determinada enfermedad respecto al total analizado, expresada en porcentaje.

Inhibición. Acción y efecto de impedir, prohibir, estorbar ó suspender la función o actividad de cierto organismo.

Materia orgánica. Sustancias que se encuentran que suelen encontrarse en el suelo y que contribuyen a su fertilidad; esta compuesta por residuos animales y vegetales. Un suelo con alto contenido de materia orgánica, se considera apto para la producción agropecuaria.

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

Microorganismos. Especie o grupo de organismos constituidos por individuos, solo visibles al microscopio. comprende a la microflora y la microfauna.

Mineralización. Proceso de la descomposición de la materia orgánica del suelo en el cual se libera nitrógeno inorgánico. La mineralización es la transformación del nitrógeno orgánico en amonio, mediante la acción de microorganismos del suelo como lo son las bacterias Nitrobacter y Nitrosomas.

Nitratos. Aniones que se mantienen libre en la solución del suelo y son fuente de fertilizantes nitrogenados.

Nitrificación. Es la oxidación del amonio a nitratos en dos etapas realizadas por dos tipos de bacterias (Nitrosomas y Nitrobacter) bacterias que obtienen de este proceso la energía que necesitan para su crecimiento.

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

PCR. (del inglés “polymerase chain reaction”). Reacción en cadena de la polimerasa Sistema de amplificación genética que permite obtener millones de copias de un determinado fragmento de ADN o ARN, del que simplemente se conozcan dos frecuencias que lo flaqueen.

(pH). Abreviatura que indica el grado de acidez o alcalinidad de un medio. Las soluciones son ácidas cuando el valor del pH oscila entre 0-7 en orden decreciente; y alcalinas cuando el valor del pH oscila entre 7-14 en orden creciente. Las soluciones se consideran neutras cuando el valor del pH es de 7.

Rizosfera. Región del suelo que se encuentra bajo la influencia física y fisiológica de la raíz de las plantas. Es la parte del suelo inmediata a las raíces, donde tiene lugar una interacción dinámica con los microorganismos. Las características químicas y biológicas de la rizosfera, se manifiestan en una porción de apenas 1 mm de espesor a partir de las raíces.

Severidad. Es una estimación visual en la cual se establecen en una determinada planta, sobre la base de la cantidad de tejido vegetal enfermo. Es subjetiva y hace referencia a % del área necrosada o enferma de una hoja, fruto, espiga, tallo y raíz. Es el parámetro que mejor está relacionado con la gravedad de la enfermedad y con los daños causados. La severidad es más apropiada para royas, oídios y manchas porque son enfermedades localizadas, cuyo efecto en la disminución del rendimiento dependerá del área foliar afectada.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos para la selección de la mejor combinación nitratos/amonio en el cultivo de tomatillo a nivel invernadero.	28
Cuadro 2. Descripción de tratamientos en el cultivo de tomatillo en condiciones de campo	30
Cuadro 3. Volúmenes utilizados para la mezcla de reacción de PCR.....	37
Cuadro 4. Virulencia de diez aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> en plántulas de tomatillo, emergidas de semillas inoculadas con el hongo, e incubadas en arena esterilizada en Laboratorio	39
Cuadro 5. Virulencia de diez aislados de <i>Fusarium solani</i> en plántulas de tomatillo, emergidas de semillas inoculadas con el hongo, e incubadas en arena esterilizada en Laboratorio	40
Cuadro 6. Aislados de <i>Bacillus</i> spp. con mayor efecto antagonista contra <i>Fusarium oxysporum</i> . que obtuvieron el mayor halo de inhibición <i>in vitro</i>	41
Cuadro 7. Aislados de <i>Bacillus</i> spp. con mayor efecto antagonista contra <i>Fusarium solani</i> , que obtuvieron el mayor halo de inhibición <i>in vitro</i>	42
Cuadro 8. Efecto de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. en diámetro de tallo y peso seco de raíz en plantas de tomatillo inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> en invernadero.....	46
Cuadro 9. Efecto de la inoculación de <i>Bacillus</i> spp. en el diámetro del tallo en plantas de tomatillo inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> en invernadero.....	49

Cuadro 10. Efecto de cinco proporciones NO ₃ :NH ₄ sobre variables fisiológicas de las plantas de tomatillo en invernadero	50
Cuadro 11. Características físicas y químicas del suelo del área experimental, en el Campo Experimental Valle del Fuerte INIFAP ubicado en el Municipio de Guasave, Sinaloa, México.	51
Cuadro 12. Patógenos asociados a las raíces en plantas de tomatillo en el experimento en campo.....	52
Cuadro 13. Efecto de la inoculación de <i>Bacillus</i> (31 y 35) y dos proporciones de NO ₃ :NH ₄ , sobre el rendimiento del cultivo de tomatillo en campo... ..	53
Cuadro 14. Comparación de medias de micro elementos en el follaje de plantas de tomatillo (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot.) en condiciones de campo.....	54
Cuadro 15. Efecto de la inoculación de <i>Bacillus</i> (31 y 35) y dos proporciones de NO ₃ :NH ₄ , sobre el rendimiento del cultivo de tomatillo en campo.	55
Cuadro 16. Identificación molecular de los aislados <i>B.31</i> , <i>B.35</i> que se utilizaron en invernadero y campo. en plantas de tomatillo.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Germinación de semillas en los vasos de unicél	24
Figura 2. Muestra de raíces para la obtención de <i>Bacillus</i> spp	25
Figura 3. Antagonismo <i>in vitro</i> de las bacterias <i>Bacillus</i> spp. vs los hongos <i>F. solani</i> y <i>F. oxysporum</i>	26
Figura 4. Distribución de tratamientos para la selección del mejor aislado de <i>Bacillus</i> spp. en el cultivo de tomatillo en condiciones de invernadero	27
Figura 5. Distribución de tratamientos aplicados en el cultivo de tomatillo (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot.) en campo en un diseño de bloques completos al azar (BCA).....	28
Figura 6. Distribución de tratamientos aplicados en el cultivo de tomatillo.....	31
Figura 7. Efecto de cuatro aislados de <i>Bacillus</i> sobre el crecimiento del micelio de <i>Fusarium oxysporum</i> , a las 48 hr de incubación en placas con papa dextrosa agar.	43
Figura 8. Efecto de cuatro aislados de <i>Bacillus</i> sobre el crecimiento del micelio de <i>Fusarium solani</i> , a las 48 hr de incubación en placas con papa dextrosa agar	44
Figura 9. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo... ..	45
Figura 10. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo.	45
Figura 11. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo.	46
Figura 12. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo	46
Figura 13. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo.	48
Figura 14. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo.	49
Figura 15. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo	49

Figura 16. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo.	50
Figura 17. Prueba de hemólisis de los aislados <i>B. 31</i> y <i>B. 35</i> a las 24 hr	58
Figura 18. Prueba de hemólisis de aislados <i>B.31</i> y <i>B.35</i> , con 3 repeticiones a las 24 hr.	59

RESUMEN

En los últimos años Sinaloa ha tenido limitación en la producción de tomate de cascara, debido a enfermedades como la marchitez o secadera de las plantas, ocasionada por patógenos del suelo, principalmente por hongos del género *Fusarium*, los cuales ocasionan pérdidas hasta del 100%. Este trabajo se realizó con el objetivo de encontrar una alternativa biológica de control de secadera y efectuar un manejo eficiente de la fertilización en la producción de tomatillo. El trabajo se efectuó en laboratorio, invernadero y campo. El primer objetivo obtener aislados del género *Bacillus* y someterlos a pruebas de antagonismo, junto con un grupo de cepas del Laboratorio de Nutrición Vegetal, a pruebas de antagonismo contra los hongos *F. oxysporum* y *F. solani*. Se probaron un total de 50 aislados de *Bacillus* spp, se seleccionaron los que presentaron un mayor halo de inhibición contra cada uno de los hongos mencionados. Los cinco aislados que más inhibieron a *Fusarium oxysporum* fueron: B.47, B.35 B.31, B.45, B.14. y a *Fusarium solani*: B.47, B.16, B.31, B.22, B.26, estos se probaron en invernadero, en donde se observó un efecto promotor de crecimiento de las plantas tratadas con (B.35 y B.31). El experimento en campo se realizó en el campo Experimental Valle del Fuerte (INIFAP), fue en donde se probaron los aislados *Bacillus* 35 (Contra *F. oxysporum*) y *Bacillus* 31 (Contra *F. solani*). Se utilizó un diseño experimental con bloques al azar con un total de ocho tratamientos, consistentes en dos fuentes de fertilización: nitrato de calcio Ca (NO₃) y sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄. Para estimar la eficacia de los tratamientos se estimó el rendimiento de frutos, en dos únicos cortes el día 19 de enero y 8 de febrero del 2011.

ABSTRACT

In the last years Sinaloa have limitation in the rind tomato production due certain kind of illness as withered or shed of the plants that are hazardous by pathogenic of the soil, mainly mushrooms of the genus *Fossarium* spp. which up to occasion loss since a 30% until the total loss or the culture. This work was made with a efficient management of the fertilization in the production of the tomatillo. This work was made in three steps 1) laboratory trial 2) winter test quarters 3) field experiment. The first objective was to isolate the bacterium of the *Bacillus* spp. and made an antagonism test of the isolate bacterium and those who exist in a little bank in the Nutrición vegetal laboratory against the mushroom rootstalk (*F. oxysporum* and *F. solani*), a total of 50 *Bacillus* sp. isolate were selected that presented a great inhibition halo against each one of the previously mentioned mushroom; the five better isolates were consider as effectives for each mushroom which were proved in a winter quarters were a promoter effect of growing were observed in the plants treated with *Bacillus* spp in appearance with the wideness, in the variables: plant height, flowers number per plant, root volume and foliage dry weight. The field experiment was made in Juan José Rios city, in the experimental field INIFAP, the isolate *Bacillus* 35 were prove (for *F. oxysporum*) and *Bacilus* 31 (for *F. solani*), a experimental design were used with hazard blocks in a total of eight treatments two different supply of fertilization Calcium nitrate (NO₃) and ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄. To a estimate the effectiveness of treatments is estimated fruit yield in only two cuts on January 19 and February 8, 2011.

I. INTRODUCCIÓN

En México el cultivo de tomate de cascara ó tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.), ocupa el quinto lugar en cuanto a superficie cultivada; en 2010 se sembraron 35,577 ha de riego y 12,898 ha de temporal (SIAP 2010). El rendimiento promedio nacional fue de 16.9 t.ha⁻¹ el cual se considera bajo con relación al potencial productivo, que se estima de 40 t.ha⁻¹ (Peña y Santiaguillo, 1999). En 2010 Sinaloa fue el principal productor de esta hortaliza, con una superficie sembrada de 11,053 ha (SIAP 2010).

Las características que presentan las zonas agrícolas en Sinaloa y los sistemas de cultivo, influyen para que la incidencia de plagas y enfermedades sea intensa. En los últimos 10 años, se han incrementado las enfermedades como la marchitez o secadera causado por hongos del suelo. Las plantas infectadas por hongos del suelo, presentan palidez o amarillamiento del follaje y en general la planta presenta aspecto “triste”, raquítico y de menor tamaño. Las hojas y los frutos cuelgan flácidos y se desprenden fácilmente. Las raíces muestran una pudrición de color café claro a café oscuro; a veces se observan tonos rosáceos, rojizos o violáceos que pueden extenderse hacia el cuello y base del tallo (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2008).

El marchitamiento o secadera es una de las enfermedades más importantes en el cultivo de tomatillo, después de la virosis, debido a que se encuentra presente en todas las zonas donde se produce tomate de cáscara. Los hongos asociados a esta enfermedad son: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. La alta incidencia de plantas enfermas puede reducir drásticamente la producción e incluso la pérdida total del cultivo (Apodaca-Sánchez, 2004).

Los hongos mencionados están muy adaptados para vivir en el suelo, son resistentes a la sequía, al exceso de agua y tolerantes a los fungicidas. En el invernadero pueden sobrevivir en los residuos de sustratos y en las charolas contaminadas. Algunos de estos hongos pueden encontrarse en el agua de riego usada en el campo o en los depósitos abastecedores de agua para el invernadero;

se diseminan también mediante el suelo contaminado que permanece pegado a los implementos durante las labores agrícolas (Apodaca-Sánchez, 2004).

En el Norte de Sinaloa se han detectado zonas infectadas con *Fusarium* spp. el cual ha sido responsable de la disminución de los rendimientos de los cultivos, causando pérdidas económicas a los productores de El Carrizo, Los Mochis, Juan José Ríos y Guasave, donde se siembra y se produce cerca de 8,862 ha de tomatillo (SAGARPA, 2010).

La siembra repetida del cultivo en las mismas parcelas, con frecuencia resultan en favor del desarrollo de patógenos del suelo, como es el caso de *Fusarium* spp. causante de enfermedades tipo marchitamiento (Minuto, *et al.* 2006).

El uso de productos químicos para el control de patógenos en las raíces de las plantas, ha sido por mucho tiempo la opción más utilizada por los agricultores. Sin embargo, se ha demostrado que el uso de estos no es la mejor alternativa, no han sido eficientes, es por eso que se buscan alternativas biológicas para el control de patógenos como es el uso de bacterias antagonistas y el buen manejo agronómico de fertilizantes que afectan el crecimiento de los patógenos sin causar daños significativos en el medio ambiente.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar aislados de *Bacillus* spp. nativos de Sinaloa y el nitrógeno amoniacal y nítrico contra *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de tomatillo.

2.1.1 Importancia y origen del tomatillo.

En México, en los últimos 20 años se ha extendido la superficie sembrada de tomatillo, ocupando el quinto lugar entre las hortalizas más cultivadas; solo es superado por el tomate, el chile, papa y cucurbitáceas. En 2010 se sembró un total de 48,475 ha (SIAP 2010). Este incremento en la superficie sembrada, se ha debido al aumento en el consumo del tomatillo en fresco y a los subproductos que de él se derivan.

Los principales Estados productores en sistemas de riego son: Sinaloa, Puebla, Sonora, Zacatecas, Michoacán, Guanajuato, Jalisco, México y Nayarit. En producción de temporal destacan: Jalisco, Morelos, Nayarit y el estado de México (SIAP 2010).

En Sinaloa es importante la producción de tomatillo, con una superficie sembrada, en el ciclo agrícola 2009-2010 de 11,053 ha (SIAP 2010).

El tomatillo es originario de México y su adaptabilidad permite que pueda estar distribuido en gran parte de la república de manera silvestre, cultivada o doméstica (Peña y Santiaguillo, 2002). Por otra parte es un cultivo importante desde el punto de vista social, ya que requiere de 150 a 200 jornaleros por hectárea durante todo su ciclo vegetativo (Armenta *et al.*, 2000).

El género *Physalis* comprende más de 80 especies, distribuidas principalmente en América y el resto en Asia, Europa, Australia y África tropical. En México existen 70 especies; de éstas, 36 se encuentran ampliamente distribuidas en 26 estados del país, sus variedades más conocidas son tomatillo piña, tomatillo morado, tomatillo morado de milpa, tomatillo verde, tomatillo verde puebla y tomatillo zuni (Peña y Santiaguillo, 1999).

El tomate de cascara en México es de trascendencia social. Su producción en el Norte del país se ha incrementado en los últimos 20 años. Sinaloa no encabezaba la producción de los estados pero hasta hoy ha sido el que se ha mantenido en los primeros lugares. Una parte considerable de la población económicamente activa, se encuentra relacionada directa o indirectamente con este cultivo (Barreras-Soto, 2005).

2.1.2 Clasificación taxonómica y descripción botánica del tomatillo.

La clasificación taxonómica del tomatillo según Peña *et al.* (1990) es:

Reino: Vegetal

Subreino: Embryophita

División: Spermatophyta

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotyledoneae

Orden: Polemoleales

Familia: Solanaceae

Género: *Physalis*

Especie: *Ixocarpa*, Brot.

Physalis ixocarpa Brot. Se conoce comúnmente como tomate de cáscara, tomate milpero, tomate verde mexicano, miltomate. Es redondo, grande y se encuentra envuelto en hojas muy finas de color amarillento, su fruto es de color verdoso amarillento; su sabor es parecido a la acidez del limón pero algo dulzón y es utilizado en gastronomía nacional (Santiaguillo *et al.*, 1996).

Es una planta de ciclo anual, su altura es de 40 a 120 cm o más, según los hábitos de crecimiento. Su raíz puede ser de forma típica o columnar y presenta ramificaciones secundarias que pueden alcanzar hasta 60 cm de profundidad. El tallo

es herbáceo o ligeramente leñosos en la base, cuyo diámetro del tronco principal es de 1.1 a 1.3 cm. Las hojas son simples y alternas. La flor es de color amarillo con manchas tenues o bien marcadas de matices azul verdoso o morado. El fruto es una baya carnosa encerrada en el cáliz el cual es amplio, vesicular y persistente. Las semillas son centiculares, pequeñas lisas y de color amarillo (Cartujano, 1984). El crecimiento del tomatillo es de tres: tipos rastrero, erecto y semierecto. El ciclo del cultivo del tomatillo va de 85 a 120 días, en función de la variedad.

2.1.3 Enfermedades del tomatillo.

Las enfermedades más importantes son: virus, micoplasmas, cenicilla (*Oidium* sp.), ojo de rana o carbón del tomate de cáscara (*Entyloma australe* Speg) y *Fusarium* sp, entre otras (Piña y Ponce, 1990; De la Torre, 1996; Rosas, 1999). La productividad de esta hortaliza es afectada actualmente por las enfermedades virales y fungosas; las cuales constituyen el principal factor limitante de la producción en todos los Estados productores de esta hortaliza (Peña y Santiaguillo, 1999).

Las enfermedades de las plantas son importantes para el hombre debido a que perjudican a las plantas y sus productos. Los marchitamientos vasculares son enfermedades destructivas producidos por diversos agentes etiológicos y se encuentran ampliamente distribuidos en poblaciones y cultivos de un sin número de especies de plantas (Agrios, 2002).

En México, el marchitamiento o secadera es después de la virosis, la enfermedad de mayor importancia. La cual puede ocasionar la pérdida de la cosecha hasta un 100% en las áreas productoras (Mendoza, 1996). La presencia de esta enfermedad en nuestro país, ha sido reportada en Sinaloa, San Luis Potosí, Baja California y Michoacán (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2004).

2.2 Marchitez por hongos del suelo.

Los principales hongos asociados al marchitamiento del tomatillo son: *Fusarium oxysporum* (Wollenw.) Gerlach, *Fusarium solani* Schlecht., *Rhizoctonia solani* (Frank) Donk, *Pythium* sp., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid y *Sclerotium rolfsii* Curzi. que dañan plantas solo en campo. Estos hongos están muy adaptados para vivir en el suelo, se presentan en cualquier etapa de desarrollo del cultivo, se diseminan en el agua de riego y algunos se transmiten por semilla. Se ignora la frecuencia e impacto de la transmisión por semilla de los hongos asociados a secadera, en los cultivos de tomatillo (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2008).

Independiente del agente etiológico que lo genere o de la planta afectada, los marchitamientos presentan un grupo común de síntomas; en un principio, las hojas pierden su turgencia, se debilitan y adquieren una tonalidad que va de verde claro a verde amarilloso, decaen y finalmente se marchitan, tomando una coloración amarillenta, luego se necrosan y mueren; estas hojas pueden enrollarse o permanecer extendidas (Gonzáles, 2006).

2.2.1 Síntomas de la marchitez por hongos del suelo.

El primer síntoma de este grupo de enfermedades que se observa en campo, es un amarillamiento en las hojas basales que posteriormente se marchitan y secan pero permanecen adheridas a la planta. Esta sintomatología va progresando hacia la parte superior de la planta a veces sólo toma un sector de la misma, es decir generalmente se vuelve una enfermedad unilateral. Al comienzo las plantas muestran marchitez en las horas más calurosas del día recuperándose al final del mismo pero finalmente se marchitan y mueren. En los estadios finales, las raíces principales y la base del tallo presentan necrosis vascular. Cuando se corta el tallo se observa el sistema vascular de color marrón (Agrios, 2002; Backer, 1978).

Los retoños y las hojas se marchitan durante el día pero ganan turgencia durante la noche. Conforme la infección progresa, los tallos palidecen debido a las toxinas producidas por el hongo que decoloran el tejido y aparece el marchitamiento

de las hojas. El xilema es entonces obstruido, causando la muerte de planta (Deacon, 1990). Las raíces y los tallos no presentan daño inicial importante, pero luego se afectan severamente con la formación de cavidades, presentándose una pudrición seca en la base de las plantas y las raíces (Agrios, 2002).

El tallo cortado transversalmente, presenta en los haces vasculares una coloración amarillenta o marrón con la muerte y deshilachamiento de los tejidos, sin afectarse la médula; este es un aspecto muy importante para diagnosticar la enfermedad y distinguirla de otras enfermedades vasculares (Agrios, 2002).

El ciclo de la enfermedad ocasionada por este hongo se inicia con la presencia del inóculo en el suelo o residuos de cosecha del inóculo constituido por hifas, esporas o clamidosporas que germinan cuando son activadas por los exudados producidos en las raíces fibrosas; los tubos germinativos del hongo penetran la epidermis de las raíces directamente o por heridas, pasan a la corteza y a la endodermis, y una vez dentro del hospedante se mueven por colonización de los vasos del xilema produciendo la oclusión del sistema vascular de planta. Su disseminación en el campo se produce a través de material de propagación infectado, fragmentos de plantas enfermas y movimiento de suelo infectado con clamidosporas de *F. oxysporum* las cuales pueden sobrevivir en éste por mas de 10 años (Haglund y Kraft, 2001).

El hongo penetra en las raíces a través de heridas y continua hacia el xilema o por los tejidos conductores de agua. Es activado solamente cuando las raíces de la planta huésped entran en contacto con el micelio o clamidosporas las cuales entonces, invaden las células radicales. La tasa de velocidad de infección depende de factores como el tiempo de la infección inicial, la virulencia y condiciones climáticas. Dependiendo de la tasa de velocidad de infección, el hongo puede ocasionar pudrición radicular y muerte, incluso en plantas muy jóvenes (Agrios, 2002).

2.3. Aspectos generales de *Fusarium* spp.

La especie *Fusarium* pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales y a la Familia Nectriaceae. El género *Fusarium* es uno de los más importantes debido a su amplia distribución mundial. Fue descrito por primera vez por Link en 1809. Martius a mediados del XIX realizó los primeros estudios sobre los problemas producidos por *Fusarium*. Sin embargo, los primeros estudios que demostraron la patogenicidad de *Fusarium* en plantas vivas, se publicaron entre 1892 y 1899 (Booth, 1984).

Fusarium pertenece a un extenso género de hongos filamentosos, muy común en los suelos cultivados. Su presencia se asocia más a suelos neutros y ligeramente ácidos. La mayoría de las especies son saprófitas y son unos miembros relativamente abundantes de la microbiota del suelo (Blancard *et al.*, 2000).

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

2.3.1 *Fusarium oxysporum*.

F. oxysporum es un hongo imperfecto, que aparentemente a perdido el estado perfecto o sexual. Estos se reproducen por medio de conidias (una espora asexual formada en el extremo de una hifa). El hongo sobrevive por largos periodos en el suelo como clamidosporas. Las variantes de *F. oxysporum* están divididas en muchas formas especiales que no pueden ser distinguidas usando criterios morfológicos (Agrios, 2002).

El micelio es generalmente aéreo, abundante, algodonoso, con diferentes coloraciones como blancas, durazno, salmón, pero usualmente con un tinte púrpura más intenso en la superficie del agar. El hongo se caracteriza por producir tres tipos de

esporas, una de ellas son las microconidias que son esporas unicelulares, aceptadas, hialinas, de forma variable, formadas sobre fiálides laterales o sobre conidioforos poco ramificados. Las microconidias tienen entre 5-12 micras de largo x 2.5-3.5 micras de ancho (Nelson, 1981). Las macroconidias son de pared delgada, fusiformes, largas y moderadamente curvas en forma de hoz, poseen de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada. Tienen un tamaño de 27-60 x 3.5 micras.

Las clamidosporas son globosas, de doble pared gruesa, se encuentran solitarias o en pares, formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y las conidias. Con esta estructura el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en ausencia de plantas hospedantes. Su tamaño varía de 5-15 micras de diámetro (Summerell *et al*, 2002; 1995, Nelson 1981).

La morfología de las macroconidias y la presencia y características de las clamidosporas son muy importantes para la identificación de las especies. Las macroconidias y microconidias se producen en los vasos del xilema, pero las microconidias son predominantes en tejidos infectados. Hasta el momento no se conoce la fase perfecta del hongo (Nelson *et al*, 1983).

Esta especie se caracteriza por producir distintas formas especiales, las cuales no se pueden diferenciar por su morfología o por las características culturales de las colonias, sin embargo, son fisiológicamente diferentes por su capacidad de parasitar y ocasionar enfermedades en plantas hospedantes específicas. Esto se debe a que solamente las plantas hospedantes y sus exudados radicales satisfacen los requerimientos nutricionales del hongo y por lo tanto, puede desarrollarse solo en ese tipo de plantas (Nelson 1981).

2.3.2 Ecología y evolución de *Fusarium*.

Las cepas de *F. oxysporum* pueden dividirse de acuerdo a su forma de interactuar con la planta o plantas huésped en cepas no patógenas y patógenas (Gordon, *et al*. 1997). Ambos tipos de cepas se encuentran distribuidas a nivel

mundial en suelos dedicados a la agricultura asociados a plantas de interés comercial.

Las cepas no patógenas de *F. oxysporum* se encuentran dentro de los hongos, más comúnmente aislados de plantas agrícolas sanas. Aunque incapaces de producir enfermedad en estas plantas, estas cepas son colonizadoras muy efectivas de la epidermis y el cortex de la raíz de dichas plantas (Schneider, 1984; Taylor, 1965). El hecho de que estas cepas no produzcan marchitamiento puede deberse a su incapacidad para penetrar en los tejidos del haz vascular, o al hecho de que estas generen una rápida respuesta del huésped a la infección (Gao *et al*, 1995).

A pesar de los escasos estudios realizados en comunidades de plantas silvestres asociados a suelos no agrícolas, siempre han mostrado una asociación muy estrecha de cepas de *Fusarium* a las raíces de dichas plantas, en ningún caso dicha asociación conduce al desarrollo de patologías independiente de que en muchos casos las poblaciones de *Fusarium* asociadas a dichas plantas sean numerosas (Burgess *et al*, 1989).

La mayoría de estos hongos se transmiten por semilla, cosechada de frutos cortados de plantas enfermas o frutos que están en contacto con el suelo infestado. Estos hongos se localizan principalmente sobre la semilla, pero pueden también localizarse en su interior (Apodaca-Sánchez, 2004).

La conservación del *Fusarium oxysporum* se da en numerosos substratos en forma de clamidosporas. Su propagación se facilita por la producción de conidias (esporas muy numerosas sobre el cuello de las plantas infectadas), polvo de suelo contaminado; estos propagulos pueden ser conducidos por el agua de riego, salpicaduras y las corrientes de aire (Blancard, 2005).

En Sinaloa se han identificado suelos con presencia del hongo *Fusarium* spp. que habita en el suelo e infecta a las plantas a través de sus raíces, en las que penetra directamente o a través de heridas (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2004).

Muchos nematodos parásitos que viven en el suelo habitualmente incrementan la incidencia de los marchitamientos por *Fusarium* spp. posiblemente debido a que proporcionan un mayor número de puntos efectivos de penetración (Jarvis y Thorpé, 1976).

2.3.3 *Fusarium solani*.

F. oxysporum y *F. solani* son especies morfológicamente muy similares, distinguiéndose entre sí particularmente por la morfología y tamaño de las macroconidias. En el caso de *F. oxysporum* Las macroconidias son de pared delgada, fusiformes, largas y moderadamente curvas en forma de hoz, poseen de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada. Tienen un tamaño de 27-60 x 3.5 micras. En *F. solani* las macroconidias son de 20-50 micras de largo x 4-5.5 micras de ancho, tienen tres paredes transversales (Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1983).

2.4 Manejo químico de la marchitez en tomatillo.

El uso de productos químicos pesticidas en la agricultura inició y se acrecentó durante el siglo XX; su uso ha aumentado de modo desmedido como método predominante en el manejo de plagas y enfermedades. Su utilización se concentra en aquellos cultivos comerciales destinados a la exportación o al mercado nacional, en especial en diversas hortalizas: tomate, chile, tomate de cáscara, papa, calabaza y otros. La escasa regulación del comercio y uso de plaguicidas (combinada con el uso inadecuado de dichos productos) resulta en la contaminación ambiental, serios problemas de salud y producción anti-económica de cultivos (Jones *et al.*, 1997). Actualmente los productos que se utilizan para el control de las enfermedades son Metan sodio, Bromuro de metilo y productos de cobre no han sido eficientes en el control de *Fusarium* spp (Pérez-Moreno *et al.*, 2004).

2.5 Manejo biológico de la marchitez.

Ante esta problemática, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas de producción que impliquen bajos costos y que garanticen la preservación de los ecosistemas. La producción de agrobiológicos microbianos, pudieran ofrecer una solución, aunque para ello se requiere trabajo preferentemente con microorganismos nativos, los cuales ya han co-evolucionado con las plantas y otros microorganismos; además están adaptados a las condiciones medio ambientales propias de la región, lo cual les confiere ventajas y mayores posibilidades de éxito (Martínez-Álvarez, 1998).

Son pocos los estudios que se han realizado sobre el control biológico de fitopatógenos mediante el uso de microorganismos. Es por ello que es importante conocer a los microorganismos nativos para tratar de aprovecharlos como biofungicidas en el control de estas enfermedades y de esta manera obtener rendimientos económicamente redituables para el agricultor como también para entender más la naturaleza de la enfermedad y de la fisiología de las plantas (Zavaleta-Mejía, 1999).

La rizosfera es la zona biológicamente activa alrededor de las raíces de las plantas que contiene microorganismos, tales como bacterias y hongos, los cuales interactúan entre sí, con la planta y con el suelo (Singh *et al.*, 2004). En este sitio se generan una serie de interacciones complejas, debido a una actividad biológica intensa y a una transferencia de agua y nutrientes, que pueden resultar benéficas o dañinas a las plantas. En la rizosfera de una amplia gama de compuestos orgánicos como los exudados radicales de bajo peso molecular como secreciones, mucigeles, lisados celulares y metabolitos. En consecuencia, las raíces actúan como una fuente de carbón orgánico, y con ello, la densidad de las poblaciones de microorganismos sea considerablemente mayor en la rizosfera, comparada con otras zonas del suelo cercanas a la raíz, pero no tan inmediatas (Lynch, 1990; Bolwerk *et al.*, 2003; Martínez-Álvarez, 2003).

Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con los procesos de la edafogénesis (Wright *et al.*, 1998). En los ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el fósforo y el azufre (Madigan *et al.*, 2004); además de influir en la fertilidad de las plantas y promover la protección frente a patógenos (Whipps, 2001).

2.5.1 *Bacillus* spp. en el control biológico.

Estas bacterias se encuentran en el suelo formando parte de la rizosfera de las plantas, comportándose como colonizadores eficaces, debido a que son productoras de sustancias, tales como hormonas, antibióticos y metabolitos termoestables; atributos que le proporcionan la capacidad de conquistar determinados ambientes agrícolas y por ende, impiden el establecimiento de microorganismos patógenos (Todar, 2003). Generalmente *Bacillus* es un género numeroso y diverso de bacterias. Incluye especies tales como *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, y *B. anthracis*; de éstas especies, *B. cereus*, y *B. anthracis* han sido reconocidas como patógenos al ser humano y animales (Nakano y Zuber, 1998).

Las especies del género *Bacillus* poseen características especiales, entre las que destacan la formación de endosporas, estructuras termo resistentes a agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos grasos y los desinfectantes químicos. Estas estructuras les confiere la posibilidad de ocupar un lugar importante como agentes de control biológico (Bergey, 1986). Históricamente, *Bacillus* spp. ha sido clasificada como aerobio obligado; sin embargo, recientemente se ha demostrado que esto no es estrictamente correcto (Nakano y Zuber, 1998)

Muchas especies de *Bacillus* producen enzimas hidrolíticas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo utilice a estos como fuentes de carbono y donadores de electrones (Butt *et al.*, 1999).

2.5.1.1 Mecanismos de acción de bacterias del género *Bacillus* spp.

Los mecanismos de acción por medio de los cuales los antagonistas afectan a los fitopatógenos son la competencia, antibiosis, micoparasitismo e inducción de mecanismos de resistencia (Arshad y Frankenberger, 1998). En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad es una característica a seleccionar en un antagonista, por su versatilidad (Todar, 2003).

Bacillus spp. produce antibióticos como la bacitracina, polimixina, tiromicina, gramicidina y circulina, entre otros. Son bacterias fermentativas, principalmente de la caseína y el almidón; generalmente crecen bien en medios que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes como las únicas fuentes de carbono y el amonio como la única fuente de nitrógeno. Viven dentro de los límites de temperatura de 55-70 °C y su límite inferior de pH es de 2.0-3.0 (Butt *et al.*, 1999).

Bacillus spp. son conocidas por su antagonismo sobre muchos hongos fitopatógenos. Estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos del suelo, tales como *Fusarium oxysporum*, f. sp. *lycopersici*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*. Murphy *et al.* (2000), aplicaron en tomate rizobacterias promotoras del crecimiento (*B. subtilis* 937b, *B. pumillas* y *B. amyloliquefaciens*) a semillas en un experimento de invernadero. Se encontró que hubo una promoción de crecimiento en el fruto, así como la protección contra fitopatógenos. Gupta *et al.* (2000), encontraron que *Bacillus subtilis* produjo auxinas que promueven el crecimiento del tomate e inducen resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum*, el cual provoca marchitez y pudrición de las raíces. Además, Gonzales y Fragosó (2002) señalan que *B. subtilis* no es potencialmente patogénica. No produce endotoxinas y en cambio secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas como la subtilina la cual actúa directamente sobre la pared celular de los hongos. También produce otros antibióticos de la familia de las iturinas, como la iturina A, compuesto con actividad antifúngica útil para el control de diferentes patógenos entre ellos *Fusarium oxysporum* (Gong *et al.*, 2006). *B. subtilis*

se utiliza comercialmente como fungicida y bactericida, inhibiendo el crecimiento de los competidores y utilizando la misma fuente nutricional, e incluso posiblemente consumiendo a sus competidores (Butt *et al.*, 1999).

Muchos estudios han demostrado la habilidad de *Bacillus* de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos Murphy *et al.* (2000), específicamente cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* han sido reportadas como antagonistas a patógenos y con capacidad moderada de solubilizar fosfatos (Chaurasia *et al.*, 2005).

Rodas Junco *et al.* (2009), seleccionaron aislados nativos de *Bacillus* spp. con actividad quitino-proteolíticas, a partir de suelos tropicales, para control biológico. Ferreira *et al.* (2003), utilizaron varias especies de *Bacillus*, como lo son *B. megaterium*, *B. subtilis* y *B. cereus*; demostraron un efecto supresor de hongos patógenos del suelo. Halverson y Handelsman (1991) aislaron y obtuvieron una cepa (*Bacillus cereus* UW85), Wen-Teish *et al.*, (2006), encontraron que *Bacillus cereus* QQ308 produce enzimas hidrolíticas como quitinasas y proteasas; además inhibió el crecimiento de hongos fitopatógenos y promovió el crecimiento de la col china. Se determinó el efecto de *Bacillus* spp. sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporium* variedad *cubensis* (Brada *et al.* 1995); también se realizaron pruebas *in vitro* con *Pseudomonas* spp. y *B. subtilis* aislados de plátano y arroz respectivamente (Torres *et al.*, 2001).

Se han llevado a cabo experimentos en campo para evaluar el efecto de la aplicación de fertilizantes orgánicos enriquecidos con *Bacillus subtilis* para el control de la enfermedad marchitez en pepino (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) donde las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* fueron reducidas, debido a la sustancia amorfa y mini cadenas que eran más ricas en calcio y fósforo, pero había baja emisión de carbono y oxígeno que el micelio de vida (Shusheng-Zhang, 2008).

Arkhipova *et al.* (2005), reportaron la acumulación de citocininas en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) inoculadas con *Bacillus subtilis*, tanto al inicio como al final

del experimento. Asimismo, observaron efecto significativo en la tasa de crecimiento de yemas y raíces a los cinco días después de la inoculación.

2.5.1.2 Inducción de mecanismos de resistencia.

Muchos microorganismos de la rizosfera pueden inducir una respuesta sistémica en las plantas, resultando en la activación de mecanismos de defensa vegetal, la resistencia sistémica inducida no confiere a la planta una protección completa, pero si la puede proteger de varios tipos de fitopatógenos, incluidos los parásitos de las raíces (Raaijmakers *et al.*, 2008).

La rizosfera es el hábitat ecológico, en el cual los microorganismos están en contacto directo con la raíz de las plantas (Arshad y Frankenberger, 1998). Es también el sitio en donde se dan diversas interacciones, tales como: competencia, mutualismo, comensalismo, amensalismo, predación y parasitismo (Barea y Azcón, 1982). El término “rizobacterias” se refiere a la capacidad de dichos microorganismos para colonizar preferencialmente las interfaces suelo-raíz, donde mantienen poblaciones de individuos a un nivel que permite su efectividad (Kloepper *et al.*, 1991; Barea *et al.*, 2005).

2.5.1.3 Competencia por nutrimentos.

La competencia constituye un mecanismo de acción antagónica la cual se da principalmente por nutrientes y exclusión de sitio por espacio (Butt *et al.*, 1999). Puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de ellos, reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista la competencia es la escasez o limitación de un elemento, porque si hay exceso no hay competencia, la competencia puede ser la causa más común de la muerte de un microorganismo es por inanición, puesto que requieren de nutrientes exógenos como carbono y hierro para germinar penetrar e infectar el tejido (Fernández-Larrea, 1997).

La antibiosis es el mecanismo de antagonismo entre microorganismos, que más se ha estudiado (Mendez-Mordio, 1996). Es el fenómeno mediante el cual un microorganismo antagonista inhibe o destruye a un organismo, a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas hidrolíticas. Estas enzimas disuelven o dañan polímeros estructurales de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos; tales como quitina y α -1-3-glucanos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Goldman *et al.*, 1994).

Muchos microorganismos de la rizósfera pueden inducir una respuesta sistémica en las plantas, resultando en la activación de mecanismos de defensa de las plantas como hongos fitopatógenos y bacterias antagonistas.

2.6 Solubilización de fosfatos.

Existen estudios relacionados a la capacidad de algunas bacterias para solubilizar fosfatos. Tal es el caso de *B. subtilis*, *B. circulans* y *B. polymyxa*, lo cual permite, que el fósforo disponible en la rizosfera se incremente en beneficio para las plantas (Bashan *et al.*, 1996).

2.7. Bacterias promotoras de crecimiento.

En las últimas décadas se ha investigado exhaustivamente el papel de las bacterias de la rizosfera o rizobacterias de diversas gramíneas, como la caña de azúcar (Boddey *et al.*, 1995; Arteaga, 1997) y maíz (Seldin *et al.*, 1998); trigo, sorgo (Baldani *et al.*, 1986); cebada y pastos tropicales (Döbereiner *et al.*, 1995). Algunos de estos microorganismos se denominan bacterias promotoras de crecimiento (BPC), debido a su capacidad para estimular el crecimiento de las plantas, a través de mecanismos, tales como la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Döbereiner *et al.*, 1995; Elmerich *et al.*, 1992), producción de sustancias reguladoras del crecimiento (Arshad y Frankenberger, 1998), producción de sideróforos (Crowley *et al.*, 1991), incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999), inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van-Peer *et al.*, 1991), inhibición del crecimiento

de organismos antagónicos e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan *et al.*, 1996).

Las BPC se diferencian en dos grupos el primero incluye cepas de especies con la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, como reguladores de crecimiento, fijar nitrógeno atmosférico, además de solubilizar hierro y fósforo inorgánico; también mejorando la tolerancia de las plantas al estrés por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas. El segundo grupo incluye a las bacterias capaces de disminuir o prevenir los efectos nocivos de microorganismos patógenos (Bashan y Holguin, 1998; Lucy *et al.*, 2004). Las BPC pueden ser libres o asociativas; aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Rodríguez, 1995).

2.8 Nutrición del cultivo.

El manejo adecuado de la nutrición de los cultivos incrementa el rendimiento y la calidad de las cosechas a través de la aplicación oportuna de fertilizantes. El uso del nitrógeno en la agricultura es grande ya que la utilización de nitrógeno influye en el desarrollo y absorción de agua en las plantas (Feil, 1994).

Los agricultores aplican este elemento en dosis mayores a las requeridas por el cultivo, debido a la marcada respuesta en el desarrollo vegetativo y por considerar que es preferible tener un exceso que una deficiencia (Belanger *et al.*, 2002).

De acuerdo con Mendoza (1996), la nutrición adecuada de la planta induce resistencia a patógenos como *Fusarium* spp. en el control de la marchitez. Existen trabajos de investigación que indican que dosis crecientes de nitrógeno pueden favorecer la infección de enfermedades como el tizón tardío de la papa (Awan y Struchtemeyer, 1957). También se ha reportado el efecto contrario, es decir una deficiencia o ausencia de este elemento, incrementa la incidencia de enfermedades (Perumal-Sahota, 1986).

El efecto del nitrógeno sobre la incidencia de enfermedades en las plantas está relacionado a su función fisiológica (Marschner, 1995). Las plantas de tomate parecen ser particularmente sensibles a las enfermedades cuando necesitan nitrógeno, fósforo, calcio y cuando están sometidas a días cortos y poco luminosos (Blancard, 2000).

2.8.1 Nitrógeno.

Los cultivos hortícolas, como muchos otros, requieren de una aplicación adecuada de fertilizantes para expresar un óptimo rendimiento y calidad, y dentro de éstos, la fertilización con nitrógeno es uno de los factores de crecimiento más importantes en la expresión del rendimiento y la calidad en la producción hortícola (Willcutts *et al.*, 1998). El suministro adecuado de nitrógeno está asociado con niveles adecuados de clorofila, crecimiento vegetativo vigoroso, alta actividad fotosintética y con la síntesis de carbohidratos, de lo cual depende el rendimiento.

Respecto a la calidad, en hortalizas bien abastecidas con este nutrimento y en condiciones favorables de crecimiento, se sintetizan proteínas y protoplasma a partir de la síntesis de carbohidratos, la característica altamente hidratada del protoplasma celular da como resultado plantas con tejidos más suculentos. Contrariamente, en condiciones de insuficiencia de nitrógeno se presenta acumulación de carbohidratos en las células vegetativas, lo que ocasiona engrosamiento y endurecimiento de los tejidos (Havlin *et al.*, 1999). Esto puede resultar desfavorable para la calidad, ya que afecta la turgencia que caracteriza a este tipo de cultivos.

Los cultivos absorben el nitrógeno inorgánico en forma de nitratos (NO_3) y amonio (NH_4). La concentración de ambos iones promueve el balance catión/anión dentro de las plantas (Raven y Smith, 1976; Bloom, 1994). Balances inadecuados entre estos iones en la fertirrigación pueden causar problemas nutricionales en las plantas (Lips *et al.*, 1990).

Del mismo modo, se ha documentado que una proporción óptima de NO_3/NH_4 favorece el crecimiento y rendimiento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*

Mill.), mientras que la absorción y acumulación excesiva de amonio puede causar toxicidad y disminuir la concentración de calcio (Ca) y magnesio (Mg) en los tejidos (Jingquan y Dewei, 1988).

Guo *et al.*, (2007) reportaron efectos negativos sobre parámetros de crecimiento de yemas y área foliar en plantas de frijol cultivadas en un medio con nitrógeno en forma de amonio; mientras que esos efectos no fueron observados al combinar amonio y nitrato como fuente de nitrógeno. Asimismo, la forma de nitrógeno afectó la tasa de absorción de agua, presentando valores más altos en medios con nitrato.

Son pocos los estudios que se han realizado sobre el efecto de estos fertilizantes sobre los patógenos del suelo, *in vitro* al adicionar nitrito (NO_2) proveniente de urea o cloruro de amonio se observó que se redujo la incidencia de *Fusarium* sp. en melón (Löffler *et al.*, 1986). También se ha visto un efecto sinérgico entre las dos formas de nitrógeno: nitrato (NO_3) y amonio (NH_4) al ser combinados con diferentes niveles de potasio en la incidencia de patógenos en las raíces de las plantas (Spiegel *et al.*, 1984).

III. JUSTIFICACIÓN

Sinaloa ocupa el primer lugar en la producción nacional de tomatillo, en los últimos 10 años se ha estado reduciendo la superficie de ha sembradas debido a enfermedades como la marchitez o secadera de la planta causada por *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, ocasionando perdidas de rendimiento de un 30% ó hasta la perdida total del cultivo.

El uso de agroquímicos para su control ha sido la opción más utilizada por los agricultores, pero no ha sido suficiente y se ha demostrado que el uso irracional de estos productos tiene un efecto negativo en la salud de los consumidores por la residualidad de algunos productos y además afecta las condiciones para los microorganismos en la rizosfera de las plantas.

En el presente estudio, se planteó como una alternativa biológica para el problema de la marchitez o secadera en tomatillo, el uso de bacterias como *Bacillus* spp. y la nutrición adecuada que impacten en la actividad de los hongos causales y disminuya la presencia de *Fusarium* spp. sin afectar significativamente el ambiente.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto de dos formas y dosificaciones de nitrógeno y aislados de *Bacillus* spp. en el control de *Fusarium* spp. en tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.)

4.2. Objetivos específicos.

1. Seleccionar aislados de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* virulentos en tomatillo.
2. Aislar y seleccionar aislados de *Bacillus* spp. que tengan un efecto inhibitor de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*.
3. Comparar el efecto de Nitrato de calcio (NO_3) y Sulfato de amonio (NH_4) sobre la severidad de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. en tomatillo en invernadero.
4. Evaluar en condiciones de campo los mejores aislados de *Bacillus* spp. y la mejor relación de NO_3/NH_4 seleccionados en invernadero para el control del marchitamiento y el rendimiento de frutos de tomatillo.

V. HIPOTESIS:

La aplicación de amonio y *Bacillus* spp. inhibe significativamente el efecto de *Fusarium* spp. en el cultivo de tomatillo.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Origen y preparación del inóculo de *Fusarium* spp.

Se evaluó la Patogenicidad *in vitro* en semillas de tomatillo de diez aislados de *Fusarium oxysporum* y diez de *Fusarium solani* proporcionados por el Dr. Miguel Á. Apodaca Sánchez. utilizando la metodología de Flores-Sánchez, (2009).

La preparación del inóculo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte (ESAVF) perteneciente a la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Estos fueron activados para correr las pruebas de Patogenicidad, ya que se encontraban mantenidos en tubos con arena esterilizada. En condiciones asépticas, se espolvoreó una pequeña porción de arena infestada (aproximadamente 0.01 gr) de cada aislado en placas Petri con medio de cultivo agar-agua. Las cajas se incubaron por siete días a 20°C, para obtener el crecimiento del hongo. Una vez que se observaron numerosas colonias que confluían sobre el Agar, se procedió a establecer el ensayo. Se utilizó como sustrato arena de río lavada con agua, la cual se confinó en doble bolsa de poli papel y se esterilizó en un autoclave a 121°C durante 30 min. con una presión 1.5 kg/cm². para eliminar posibles contaminantes.

6.1.1 Patogenicidad de *Fusarium* spp.

En vasos térmicos de unicél con capacidad de 90 ml, se depositaron aproximadamente 45 ml de sustrato esterilizado, humedecido a punto de siembra. A partir del inóculo desarrollado por siete días en placas de agar-agua, de cada aislado se tomaron cuatro rodajas de 5 mm de diámetro y se colocaron sobre la superficie del sustrato en cada vaso. Las semillas de tomatillo variedad gran Esmeralda se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ® al

5.25 %) con agua destilada estéril en una relación de 1:5 durante 1 min. Después las semillas se secaron con una servilleta de papel esterilizado (Flores-Sánchez, 2009).

Posteriormente se depositaron dos semillas de tomatillo sobre cada rodaja (ocho semillas por vaso) en los testigos se depositaron solo ocho semillas sobre el sustrato húmedo en cada vaso (Figura 1). Finalmente las semillas se cubrieron con una capa de 2 cm de arena a punto de siembra. Todos los vasos se incubaron a temperatura de 20-27°C, se cubrieron con una lámina de plástico negro, con el fin de evitar la evaporación de la humedad. Para cada uno de los aislados evaluados se tuvieron 2 repeticiones, en un diseño completamente al azar. A los cinco días después de la siembra (dds), tiempo que tardaron en germinar la mayoría de las semillas, los vasos se destaparon. Después se regaron cada tercer día con agua purificada y se mantuvieron a temperaturas que oscilaron entre 15-35 °C.

A los nueve dds, se determinó el porcentaje de germinación en todas las repeticiones. A los 20 dds se midió la altura de plántulas mediante una regla graduada, como otro parámetro para estimar el efecto de cada aislado sobre el vigor del hospedante.

A los 30 dds, se tomaron algunas plántulas que mostraron síntomas y se midió la severidad en base a una escala (0-5), considerando las siguientes categorías: 0= plántula sana; 1= pudrición de la raíz; 2= pudrición de raíz y 0.1 - 0.5 cm de necrosis externa del tallo; 3= pudrición de raíz y 0.6 -1.0 cm de necrosis externa del tallo; 4= pudrición de raíz y 1.1 - 2.0 cm de necrosis externa del tallo, y 5= planta muerta. Los datos originales se convirtieron a porcentaje, mediante la fórmula de Townsend y Heuberger (1943). Se analizaron estadísticamente las variables de porcentaje de germinación y altura de plántula. para cada variable evaluada se realizó un ANOVA y una prueba de medias Tukey ($p<0.05$), mediante el paquete SAS. En esta prueba se seleccionó el aislado más agresivo de cada hongo para pruebas posteriores.



Figura 1. Vaso de unicél con semillas de tomatillo sobre rodajas del hongo *Fusarium* spp.

6.2 Muestreo de raíces de plantas y aislamiento de *Bacillus* spp.

Para el aislamiento de las bacterias, se recolectaron muestras de suelos agrícolas de cultivos de maíz, tomate y sorgo de los Municipios de Ahome, el Fuerte y Guasave, Sinaloa. Se utilizó una pala y bolsas de plástico para recolectar el suelo que está adherido a las raíces donde se encuentra la mayor actividad de las bacterias (Figura 2). Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del CIIDIR-Sinaloa.

Se tomó 1.0 g de suelo del rizoplano de cada planta y se adicionaron 9 ml de solución salina esterilizada (NaCl 0.85%); se agitó y pasteurizó a 80°C en baño maría por 20 min. Se sembró 1 ml de este inóculo en 9 ml de infusión de papa dextrosa (IPD) estéril y se incubó a 37°C por 24 hr; se pasteurizó de nuevo a 80° por 20 minutos y después se sembró en cajas Petri conteniendo el medio de cultivo agar nutritivo (AN). Posteriormente se volvió a incubar a 37°C por 24 hr. Los aislados que presentaron características morfológicas de *Bacillus* spp. (colonia irregular plana, color crema sin brillo), se resembraron en tubos con medio inclinado conteniendo el medio de cultivo AN, estos se conservaron en refrigeración a 4°C para las pruebas posteriores de antagonismo.



Figura 2. Muestra de raíces para la obtención de *Bacillus* spp.

6.3. Bioensayos *in vitro* de *Bacillus* spp. contra *Fusarium* spp.

En este experimento se evaluaron un total de 50 aislados de *Bacillus* spp. de los cuales cinco fueron aislados en este trabajo y el resto fueron proporcionados por el banco de microorganismos del Laboratorio de Nutrición Vegetal de una colección procedentes de la región. Los hongos seleccionados de la prueba de patogenicidad se pusieron a crecer durante siete días en PDA a una temperatura de 27°C. a los cinco días después, se activaron los aislamientos en medio líquido de infusión papa dextrosa (IPD) con agitación mecánica a temperatura de 25°C durante 48 hr; en este periodo se obtuvo una concentración bacteriana de 10^7 ufc mL⁻¹. al tener los hongos y bacterias lista el mismo día se procedió a realizar los bioensayos.

En placas con medio PDA (Papa Dextrosa Agar) se realizaron las pruebas de antagonismo, en las que se probaron los 50 aislados mencionados anteriormente. En la placa de PDA se trazaron dos líneas cruzadas de 7 cm cada una y en el centro se depositó un disco de agua-agar con micelio de *Fusarium oxysporum* o *Fusarium solani* a una distancia aproximadamente de 3.5 cm con respecto al patógeno de 3.5 cm; en los extremos de las líneas en cada una se colocó 1mL de *Bacillus* spp. de tal modo que en cada placa se colocaron cuatro aislados diferentes como se señala en la (Figura 3). Se realizaron tres repeticiones de cada caja y éstas se incubaron por una semana a 25 °C, con luz constante (Benhamou *et al.*, 1997). El porcentaje de

inhibición se evaluó midiendo la distancia radial de crecimiento de cada hongo, con respecto a los diferentes aislados bacterianos colocados en la caja (Ho *et al.*, 1991).



Figura 3. Antagonismo *in vitro* de las bacterias *Bacillus* spp. contra los hongos *F. oxysporum* y *F. solani*.

6.4 Selección de aislados de *Bacillus* spp. contra *F. oxysporum* y *Fusarium solani* en Invernadero.

En este experimento se evaluaron los mejores diez aislados de los 50 probados *in vitro* de *Bacillus* spp. que presentaron mayor halo de inhibición sobre los hongos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Para realizar esta prueba se produjeron plántulas de tomatillo variedad gran Esmeralda en las instalaciones del invernadero del CIIDIR-Sinaloa. A los 30 dds se activaron los aislados preservados en refrigeración a 4°C. Se hicieron crecer en medio líquido de infusión papa dextrosa (IPD) con agitación mecánica, a temperatura de 25°C, durante 48 hr. En ese lapso de tiempo se obtuvo una concentración bacteriana aproximada de 1×10^7 ufc mL⁻¹. Se inoculó 1.5 mL de bacteria en cada plántulas de tomatillo en la charola (Figura 4).

Se utilizaron macetas de plástico de 500 g que contenían como sustrato “peat most” (turba) Kekkila ®, y suelo (relación 2:1). Inoculadas con *Fusarium oxysporum* y con *Fusarium solani* 5 macetas de cada hongo. En total surgieron 10 tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar (DCA) con 3 repeticiones, se incluyó un tratamiento testigo (sin inoculación) para cada hongo. El experimento

genero 36 unidades experimentales. Se midieron los siguientes parámetros altura de planta, materia seca, días a floración y número de flores por planta hasta floración, volumen de raíz y peso seco de raíz a nivel invernadero.



Figura 4. Plántula en charola inoculada con *Bacillus* spp. a los 20 dds.

En la etapa de floración 50 dds se evaluaron las variables altura de planta, diámetro de tallo, con el uso de una cinta métrica y un vernier, respectivamente (Figura 5); asimismo, se midió peso seco de follaje y volumen de raíces, éste último mediante el desplazamiento del volumen de agua. Para cada variable se realizó un ANOVA y una prueba de medias de Tukey ($P=0.05$), mediante el paquete SAS; el mejor aislado se utilizó posteriormente en campo.



Figura 5. Tratamientos en invernadero para la selección del mejor aislado de *Bacillus*.

Para obtener el peso seco de las plantas, las muestras obtenidas se colocaron en bolsas de papel estraza y se pasaron a un horno de secado marca Felisa® por 48 hr. a 70° C, posteriormente se pesaron en una bascula granataria digital marca OHAUS®.

Para cada variable se realizó un ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) mediante el paquete SAS; de este experimento se tomo en cuenta el mejor aislado que correspondió para *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, el cual fue utilizado posteriormente en el experimento de campo.

6.5 Selección de la mejor relación de nitrato/amonio en invernadero.

En invernadero, también se evaluó el efecto de diferentes combinaciones de nitrato (NO_3) y amonio (NH_4) (1:1, 2:1, 1:2, 0:1 y 1:0), sobre los parámetros de vigor. Los fertilizantes nitrogenados fueron: nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) como fuente de Nitratos y sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), como fuente de amonio, la aplicación fue 150 Kg de nitrógeno ha^{-1} , la cual es la dosis optima fisiológica en base a los requerimientos del cultivo en este ensayo se midieron o estimaron los parámetros de crecimiento del cultivo de tomatillo a los 60 días del trasplante en macetas: altura de planta, diámetro de tallo, peso seco de follaje y volumen de raíces. Se incluyó un testigo absoluto (regado con agua solamente).

Cuadro 1. Tratamientos para la selección de la mejor combinación nitrato/amonio en el cultivo de tomatillo a nivel invernadero.

Tratamiento	Relación $\text{NO}_3 : \text{NH}_4$	Kg de $\text{NO}_3 \text{ ha}^{-1}$	Kg de $\text{NH}_4 \text{ ha}^{-1}$
1	1:1	50.0	50.0
2	2:1	66.6	33.3
3	1:2	33.3	66.6
4	0:1	0	100
5	1:0	100	0
Testigo	0:0	0	0

Nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) Sulfato de amonio (NH_4SO_4),

Las soluciones se prepararon en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del CIIDIR-IPN unidad Sinaloa.

Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones, lo cual generó 36 unidades experimentales. Para cada variable se realizó un ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) mediante el paquete SAS.

6.6.1 Área de estudio

Este experimento de campo se llevó a cabo en las instalaciones del Campo Experimental del Valle del Fuerte (INIFAP) en Juan José Ríos, Km.1 609, Carretera México–Nogales; se ubica a 25° 25' de Latitud Norte y 108° 28' de Longitud Oeste y pertenece al municipio de Guasave se localiza al NE del Estado de Sinaloa. El clima es BW (h') seco muy cálido y cálido, con una precipitación pluvial anual media de 392.8 mm (máxima de 760.03 y mínima de 231.1 mm) (INEGI, 2005).

6.6.2 Propiedades físicas y químicas del suelo.

Previo a la siembra se realizó un muestreo de campo y un análisis posterior de las características físicas y químicas del suelo, en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del CIIDIR-Sinaloa, en base a los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000). Al terreno se le realizó un barbecho y rastreo como lo hacen normalmente los productores de la región.

Las plántulas de tomatillo se obtuvieron en las instalaciones del invernadero del CIIDIR-Sinaloa. La semilla (variedad gran Esmeralda). Se puso a germinar en charolas de poliuretano de 200 cavidades el día siete de octubre del 2010, utilizando un sustrato comercial conocido como su-Chang®. Antes de sembrar las semillas de tomatillo en las charolas, estas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex ® al 5.25% Cl⁻ agua corriente) en una relación 1:5 durante siete minutos en un barril de 200 L. Las charolas se lavaron posteriormente con

solamente agua para quitar el exceso de hipoclorito de sodio y se secaron. El día ocho de noviembre se realizó el trasplante en campo.

6.6.3 Descripción de los tratamientos.

Se establecieron ocho tratamientos, mismos que incluyeron a los dos mejores aislados de *Bacillus* spp. y las dos mejores combinaciones nitrato/amonio, a una dosis de 200 kg ha⁻¹ en el cultivo de tomatillo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Descripción de tratamientos en el cultivo de tomatillo en condiciones de campo.

No. de Tratamiento	Aislado de <i>Bacillus</i>	Relación NO ₃ -NH ₄	Patógeno
1	B.35	(1:1)	<i>F. oxysporum</i>
2	B.35	(0:1)	<i>F. oxysporum</i>
3	Testigo 1	(0:1)	<i>F. oxysporum</i>
4	Testigo 2	(1:1)	<i>F. oxysporum</i>
5	B.31	(1:1)	<i>F. solani</i>
6	B.31	(0:1)	<i>F. solani</i>
7	Testigo 1	(0:1)	<i>F. solani</i>
8	Testigo 2	(1:1)	<i>F. solani</i>

6.6.4 Diseño experimental.

En campo se utilizó un diseño BCA, ocho tratamientos y tres repeticiones. Cada unidad experimental consistió de dos surcos de 8.0 x 1.6 m. (Figura 7).

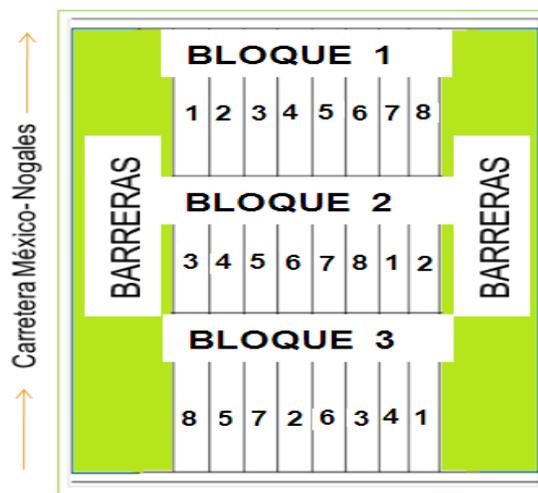


Figura 6. Distribución de tratamientos aplicados en el cultivo de tomatillo.

6.6.5 Fertilizantes químicos sintéticos.

Los fertilizantes: $[\text{Ca} (\text{NO}_3)_2]$ y $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ fueron aplicados en base a la distribución de los tratamientos de manera manual, a una profundidad de 15-20 cm.

6.6.5.2 Preparación y aplicación de *Bacillus* spp.

En campo se utilizaron los aislado *B.31* y *B.35*, los cuales presentaron los resultados más prometedores para las variables agronómicas del cultivo de tomatillo en el experimento “selección de aislados de *Bacillus* spp. en invernadero”. Para activar los aislados, éstos fueron sometidos a temperatura de 25°C durante 24 horas, posteriormente en dos matraces de 1litro, se prepararon 500 mL de IPD medio líquido. En condiciones de asepsia, se inocularon asadas del crecimiento bacteriano. Los matraces se colocaron en un agitador mecánico a 90 oscilaciones por min, durante 48 hr, hasta obtener una concentración aproximada de 1×10^6 ufc mL⁻¹ a 1×10^8 ufc mL⁻¹. Inoculando las plántulas a los 25 dds.

6.6.5.3 Preparación y aplicación de *Fusarium* spp. en campo.

Para el experimento de campo se utilizaron los aislados *Fo-18* y *Fs-38*. La preparación del inóculo se realizó en el Laboratorio de Nutrición Vegetal CIIDIR-SIN. A partir de cultivos de *F. oxysporum* o *F. solani* de siete días en PDA, se tomo una rodaja de inóculo y se sembraron en placas Petri (por separado) con medio de cultivo agar-agua con ampicilina 250 ppm para evitar el crecimiento de bacterias. Las cajas se incubaron por siete días a 20°C, para obtener el crecimiento del hongo. Se diluyeron en agua a una concentración de 1×10^7 ufc obtenida con la ayuda de la cámara Neubauer se hizo el conteo. El hongo se inóculo en las plantas en cada uno de los tratamientos a las 24hr, después de la aplicación de *Bacillus* spp. para posterior llevar a campo las plantas de tomatillo.

6.7 Incidencia de hongos asociados a la raíz en plantas de tomatillo en campo.

A los 90 ddt se arrancaron diez plantas al azar en cada tratamiento, con el fin de estimar la incidencia de planta que albergaba a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium*

solani u otros hongos del suelo. Debido al fenómeno natural presentado en el mes de febrero (helada) el muestreo de la raíces se adelantó a lo que se consideraba lo programado, las plantas presentaban un aspecto de marchitez en su totalidad, pero su sistema radicular no tenía ningún problema, se realizó un muestreo con el fin de estimar la etiología de los hongos causantes de la secadera. En cada unidad experimental se eligieron diez plantas al azar evitando dañar el sistema radicular.

6.7.1 Aislamiento de hongos.

A cada planta se le cortaron de 5-10 trozos de la raíz, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio Cloralex[®]; 5.25% de cloro activo; una parte de desinfectante por tres partes de agua, durante tres minutos, después las muestras se lavaron con agua destilada estéril para quitar el exceso de desinfectante, los trozos de raíz se secaron cuidadosamente en servilletas de papel esterilizadas y enseguida se sembraron en cajas Petri desechables (90 x 15 mm) con medio de cultivo Agar-Agua-Ampicilina 200 ppm (Ampicilina[®]).

Para la elaboración de este medio, en un matraz se agregaron 500 ml de agua destilada; se vacían 16 gr de agar (DIBICO[®]) que se diluyen en el agua. El matraz se tapa con algodón y enseguida el medio se esteriliza mediante calor húmedo, en una olla de presión (Presto[®]), a 15 libras/pulgadas durante 20 min. Al medio esterilizado, antes de ser vaciado a cajas Petri y cuando tenga aproximadamente 40°C, se le agregaron 250 ppm de ampicilina, para prevenir el desarrollo de bacterias contaminantes durante el proceso de aislamiento.

Las cajas sembradas con el material vegetal enfermo se incubaron por una semana a temperatura ambiente 22-24°C, bajo luz difusa para un adecuado crecimiento de los hongos, una vez que se detectaron las colonias de hongos en el material vegetal sembrado en las placas de cultivo, se procedió a identificar en el microscopio con el lente 40x y 10x.

6.9 Análisis foliar nutrimental.

Este se realizó en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. En la etapa de floración, a los 65 dds, se tomaron 30 hojas trifoliadas de cada unidad experimental, las cuales se secaron en un horno de secado a temperatura de 65 a 70°C por 72 horas. Las muestras secas se procesaron en un molino eléctrico marca Thomas Scientific®, con una malla de 40 cavidades, obteniendo finalmente un polvo fino, de cuál se uso posteriormente para las determinaciones.

Los elementos que se analizaron fueron: nitrógeno total, fósforo, potasio, calcio, magnesio y microelementos (Fe, Zn, Mn y Cu).

6.9.1 Nitrógeno total.

6.9.1.1 Digestión húmeda de la muestra.

La determinación de éste elemento se realizó por el **Método Kjeldahl**. La digestión húmeda consistió en colocar 0.1 g de muestra en un matraz Kjeldahl, al cual se le adicionó 1.5 mL de una mezcla de ácidos (sulfúrico-salicílico). Se agitó para homogenizar el material con la mezcla y se dejó reposar por 24 horas. Posteriormente se adicionaron 0.2 g de una mezcla de sulfatos (Na_2SO_4 , selenio metálico y CuSO_4).

Se colocó la mezcla en un digestor marca Labconco® con capacidad para 6 matraces; se calentó ligeramente a una temperatura controlada por 5 minutos; posteriormente se aumentó la temperatura hasta observar el vire de color de la muestra de negro a verde oscuro (temperatura no mayor de 360°C). Una vez que la solución presentó una coloración verde clara (aspecto acuoso), se continuó calentando por una hora más hasta obtener un volumen aproximado de 3 mL. Finalmente se dejaron enfriar las muestras digeridas y se agregaron 10 mL de agua destilada. Por último las digestiones fueron transferidas a tubos Falcón de 25 mL.

6.9.1.2 Determinación de nitrógeno total.

La solución digerida se transfirió al equipo de destilación, se adicionaron 10 mL de NaOH al 50% y se inicio el calentamiento. El destilado se recibió en 20 mL de solución de ácido bórico al 4% mas 0.2 mL del indicador verde de bromocresol-rojo de metilo, hasta alcanzar un volumen aproximado de 50 mL a la salida del refrigerante. Posteriormente, se llevo a cabo la titulación de cada muestra con la solución de H₂SO₄ al 0.05 Normal (N), hasta alcanzar un color rosa. Al mismo tiempo se realizó la titulación a una muestra blanco, anotando los mL. adicionados en cada muestra para realizar los cálculos correspondientes, mediante la siguiente fórmula:

$$\%NT = (\text{mL H}_2\text{SO}_4 \times \text{N del H}_2\text{SO}_4 \times 1.4) / \text{gramos de la muestra}$$

6.9.2 Fósforo.

6.9.2.1 Digestión húmeda de la muestra.

Se llevo a cabo mediante el **Método Kjeldahl**, y consistió en el siguiente procedimiento: se colocaron 0.5 g de muestra en un matraz Kjeldahl de 50 mL; a éste se adicionaron 10 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado y se dejó reposar por 30 minutos. Seguido de esto, se agregaron 1.5 mL de ácido perclórico (HClO₄) más 2.0 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), ambos concentrados, y se pusieron a la plancha de digestión a baja temperatura para lograr una oxidación completa por la acción del HNO₃. Después se aumentó la temperatura, sin exceder los 360°C, teniendo cuidado de que las muestras no se evaporaran totalmente. La digestión se considero completa cuando la solución presento un color totalmente cristalino, con un volumen final entre 1.5 y 3.0 mL.

Los digestados fueron transferidos a matraces volumétricos de 25 mL, los cuales se aforaron con agua desionizada; después de esto, se mezclo el contenido de cada matraz y se filtro con papel Whatman No. 42. El filtrado se guardo en frascos de vidrio, los cuales fueron sellados con parafilm para evitar la evaporación de los ácidos; posteriormente se llevo a cabo la dilución correspondiente para su lectura.

6.9.2.2 Determinación de fósforo.

Se transfirió una alícuota de 1 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 25 mL, mediante el método de Vanadato-Molibdato amarillo. Posteriormente se agregaron 0.5 mL de ácido nítrico (1:2 de agua destilada), 05 mL de solución de vanadato de amonio y 0.5 mL de solución de molibdato de amonio. Después de agregados los reactivos a la solución de filtrado, se aforo con agua destilada a la marca de 25 mL, se agito y se dejo reposar por 30 minutos. Al transcurrir ese tiempo, se transfirió la solución a tubos de colorímetro y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro de luz UV visible a 470 nm. La concentración de fosforo se determino mediante una curva de calibración en un intervalo de 0 a 25 ppm.

6.9.3 Determinación de potasio.

Los materiales filtrados obtenidos mediante la digestión húmeda para fósforo, también se utilizaron para la determinación de potasio. Para ello, se transfirió 1 mL de la solución a matraces volumétricos de 50 mL, los cuales fueron aforados con agua destilada. De ésta solución se tomó directamente la lectura de las muestras en porcentaje de transmitancia. Se utilizó el método de emisión de llama-flamometría. Previo a la lectura, el equipo de flamometría fue ajustado con las curvas de calibración 5, 15, 20, 25 y 30 ppm con longitudes de onda de 766.5 nm. Los cálculos se hicieron en base a la curva de calibración obtenida tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$\%K = \frac{\text{Lectura de transmitancia} \times \text{Vol. Digestión} \times \text{Vol. Dilución}}{\text{Pendiente} \times \text{peso de la muestra (g)} \times \text{Alícuota}} \times 100$$

6.9.4 Determinación de Calcio y Magnesio.

A partir de la digestión obtenida para la determinación de fosforo, se colocaron alícuotas de 1 mL en matraces volumétricos de 25 mL, los cuales se aforaron con agua destilada. De ésta solución se realizó una segunda dilución, la cual consistió en colocar alícuotas de 1 mL en matraces volumétricos de 10 mL, a los cuales se agregó 1 mL de reactivo de oxido de lantano y se llevó al volumen final con agua

destilada. Se mezclaron perfectamente y después se realizaron los ajustes correspondientes al espectrofotómetro de absorción atómica (Spectr AA, 50B, marca Varian) tomando en cuenta la escala de absorbancia. Las muestras tuvieron una dilución tal, que permitió ajustarlas dentro de la curva de calibración, para calcio fue de 0-10 ppm y para magnesio fue de 0-1 ppm. Los cálculos se obtuvieron mediante la siguiente fórmula:

$$\%Ca \text{ y } Mg = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{Vol. Digestión} \times \text{Vol. Dilución}}{\text{Pendiente} \times \text{peso de la muestra (g)} \times \text{Alícuota}} \times 100$$

6.9.5 Determinación de fierro, manganeso, zinc y cobre.

De la misma solución proveniente de la digestión húmeda realizada para la determinación de fósforo, se filtró y se procedió a tomar directamente (sin realizar diluciones) las lecturas en el espectrofotómetro de absorción atómica, previo a ello se utilizó una curva de calibración con las concentraciones siguientes: para (Fe) se empleó de 1-10 ppm, Mn de 1-10 ppm, Cu de 1-5 ppm y para Zn se utilizó la concentración de 0.1-1.3 ppm. Los cálculos se efectuaron mediante las curvas de calibración, utilizando un factor obtenido de la pendiente, considerando siempre las diluciones hechas durante la determinación de cada micronutriente, y se obtuvieron los resultados en base a la siguiente fórmula:

$$\%Fe, Mn, Cu \text{ y } Zn = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{Vol. Digestión}}{\text{Pendiente} \times \text{peso de la muestra (g)} \times \text{Alícuota}} \times 100$$

6.10 Rendimiento de frutos.

La cosecha se realizó manualmente en dos ocasiones: el 30 de Enero y 18 de Febrero del 2011. Se cosecharon los frutos de la parcela útil en cada unidad experimental. Se tomo en cuenta como parcela útil a los dos surcos del centro, a los cuales se les eliminaron los dos primeros metros en cada extremo (quedando,

finalmente dos surcos de seis metros cada uno). Se pesaron los frutos de cada unidad experimental en una balanza comercial marca TOR REY®.

6.11 Análisis Estadístico.

Se utilizó el paquete estadístico SAS para realizar análisis de varianza (ANOVA), con prueba de Tukey, $\alpha = 0.05$. en todos los experimentos.

6.12 Identificación molecular de los aislados de *Bacillus* spp.

Con el fin de determinar la identidad específica de los aislados bacterianos (*B.31* y *B.35*) utilizados en el ensayo de campo se procedió a su identificación molecular. Esta fase de trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología Molecular de la Rizosfera del CIIDIR-Sinaloa. Con ayuda del Dr. Maldonado-Mendoza. a partir de cultivos preservados en tubos de ensayo con Agar nutritivo, se les aplicó tratamiento térmico previo (80°C, 15 minutos) se colectó una asada y se inoculó en infusión papa, después se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL el cual contenía 100µl de DNAzol (Invitrogen, EUA). El ADN genómico fue empleado para la identificación molecular mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la identificación molecular de los *Bacillus* spp., se emplearon oligonucleótidos dirigidos a la amplificación de la región 16S del ADN ribosomal. Para lograr este objetivo, se utilizaron los oligonucleótidos F2C (5'AGAGTTTGATCATGGCTC-3') y C (5'ACGGGCGGTGTGTAC-3') (Shi *et al.*, 1997), los cuales se ubican respectivamente en las posiciones 8 a 25 y 1392 a 1406 de la secuencia del 16SrDNA de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1987).

6.13 Identificación molecular de los aislados de *Fusarium* spp.

Los aislados de *Fusarium* spp. conservados en medio de arena, estos fueron identificados molecularmente en el Laboratorio Ecología Molecular de la Rizosfera. La mezcla de reacción para la PCR se realizó en un volumen total de 25 µL, como sigue:

Cuadro 3. Volúmenes utilizados para la mezcla de reacción de PCR.

Reactivo	Volumén por muestra	Concentración final
Agua ultra pura	17.25 μ l	
Mg 10X Buffer	2.50 μ l	1X
50 μ M MgCl ₂	0.75 μ l	1.5 μ M
10 μ M Primer 1	1.0 μ l	0.2 μ M
10 μ M Primer 2	1.0 μ l	0.2 μ M
10 μ M dNTP's	1.25 μ l	0.2 μ M
ADN templado	1.0 μ l	
Taq DNA polymerase	0.25 μ l	1 U

La reacción de PCR se realizó con dos concentraciones de ADN, 1 y 10 ng, seleccionándose 10 ng, debido a que tiene una mejor amplificación del fragmento esperado. El volumen de agua agregado a la reacción fue de 5mL debido a que era el faltante para llevar el volumen a 25 mL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, anillamiento a la temperatura de cada juego de oligos por 30s, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio, bajo luz UV en un Chemidoc (BIO-RAD).

6.14 Prueba de hemólisis.

Se realizaron las pruebas de hemólisis a los 2 aislados que mostraron una mayor actividad promotora del crecimiento, ya que la actividad hemolítica se correlaciona con una probable patogenicidad al humano. La actividad hemolítica de los aislados se determinó de acuerdo a Cowan y Steel's (1993).

Esta prueba consistió en sembrar las bacterias en LB líquido en matraz de 250 mL, sin antibiótico a 37°C por 16 horas; se mantiene en agitación a 200 rpm. El medio de cultivo se centrifuga a 12000 g por 10 min. En un matraz se agregan 1.35 g de agarosa con 150 ml de agua destilada estéril, disolviendo y dejando enfriar a 37 °C; luego se agregan 7 ml de sangre humana fresca, a temperatura ambiente. Se agregan 15 mL de este medio por placa Petri y se deja gelificar.

Posteriormente con un sacabocado se hicieron orificios en el Agar y a cada perforación se le agregaron 50 µl del sobrenadante de los cultivos bacterianos crecidos en medio LB, previamente centrifugados. Como control se agrega agua destilada estéril. Por último, las placas se incubaron a 37° C por 24 hrs. para monitorear la apariencia del Agar alrededor de los orificios. La hemólisis de la sangre se puede manifestar de tres maneras: a) lisis parcial de eritrocitos que rodean una colonia, observándose un cambio de coloración del medio gris-verdoso o marrón (α hemólisis); b) lisis completa de glóbulos rojos que rodean a una colonia, dando la eliminación total de la sangre y transparentando el medio (β -hemólisis) y c) ausencia de hemólisis y en consecuencia, ninguna alteración (γ -hemólisis).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Etapa de Laboratorio.

7.1.1 Patogenicidad de *Fusarium* spp.

En esta prueba los aislados que mostraron mayor agresividad en las plántulas de tomatillo de las variables evaluadas fueron: el número 18 para *Fusarium oxysporum* (Cuadro 4) y 38 para *Fusarium solani* (Cuadro 5). Estos aislados mostraron una rápida respuesta del huésped a la infección fueron los que tuvieron la mayor capacidad de penetrar a los vasos del haz vascular y ocasionar la mayor severidad siendo los más patogénicos (Gao *et al*, 1995). Los cuales fueron utilizados posteriormente en las pruebas de antagonismo en laboratorio y campo.

Cuadro 4. Virulencia de diez aislados de *Fusarium oxysporum* en plántulas de tomatillo, emergidas de semillas inoculadas con el hongo, e incubadas en arena esterilizada en Laboratorio.

Tratamientos	Altura Plántula (cm)	Germinación (%)	Peso seco (g)	Severidad (Escala 0-5)
Fo 18	6.2 c	56.2 e	31.5 b	4a
Fo 26	6.3 bc	93.7 a	77.5 a	3b
Fo 20	6.7 bc	87.5 b	50.0 ab	3b
Fo 17	7.1 abc	75.0 d	67.0 a	3b
Fo 7	7.1 abc	93.7 a	49.0 ab	3b
Fo 14	7.1 abc	81.2 c	68.0 a	3b
Fo 11	7.1 abc	87.2 b	40.0 ab	2c
Fo 13	7.2 abc	75.0 d	49.5 ab	2c
Fo 3	7.3 abc	87.5 b	66.0 a	2c
Fo 25	7.7 ab	81.2 c	67.0 a	2c
Testigo	8.5 a	93.7 a	97.5 a	0d

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 5. Virulencia de diez aislados de *Fusarium solani* en plántulas de tomatillo, emergidas de semillas inoculadas con el hongo, e incubadas en arena esterilizada en Laboratorio.

Tratamientos	Altura plántula (cm)	Germinación (%)	Peso seco (g)	Severidad (escala 0-5)
Fs 38	4.0 c	12.5 g	20.5 b	4a
Fs 25	6.1 ab	37.5 f	46.5 ab	4a
Fs 28	6.6 ab	68.7 e	47.0 ab	3b
Fs 14	6.6 ab	75.0 d	50.0 ab	3b
Fs 26	6.7 ab	81.2 c	45.0 ab	2c
Fs 11	6.5 ab	81.2 c	65.5 a	2c
Fs 43	6.9 ab	81.2 c	66.5 a	2c
Fs 31	7.7 ab	87.5 b	68.5 a	3b
Fs 16	8.4 a	87.5 b	77.5 a	2c
Fs 22	8.7 a	93.7 a	69.5 a	3b
Testigo	9.5 a	93.7 a	97.5 a	0d

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

7.2 Aislamiento de *Bacillus* spp.

Se obtuvieron un total de cinco aislados de *Bacillus* spp. a partir de las raíces de plantas de: maíz, tomate, chile y sorgo de diferentes regiones del Valle del Fuerte, Sinaloa. (Juan José ríos, 2 de abril, Téroque viejo y campo 35) lo que muestra que éstos microorganismos se encuentran presentes en los suelos que predominan en el Norte del Estado y están adaptados a las condiciones ambientales.

7.3. Bioensayos *in vitro* de *Bacillus* spp. contra *Fusarium* spp.

7.3.1 *Fusarium oxysporum*.

De las pruebas de antagonismo se muestra la lista de los 10 mejores aislados de 50 probados que tuvieron el mayor halo de inhibición para el hongo *Fusarium oxysporum*, como se observa en el siguiente (cuadro 7). De igual manera de las pruebas de antagonismo contra hongo *Fusarium solani* se muestran los 10 mejores aislados que obtuvieron el mayor halo de inhibición (Cuadro 8).

Cuadro 7. Aislados de *Bacillus* spp. con mayor efecto antagonista contra *Fusarium oxysporum*. que obtuvieron el mayor halo de inhibición *in vitro*.

Aislados de <i>Bacillus</i>	Halo de inhibición (cm)
<i>B. 47</i>	2.0 a
<i>B. 35</i>	2.0 a
<i>B. 31</i>	1.5 ab
<i>B. 45</i>	1.5 ab
<i>B. 14</i>	1.4 ab
<i>B. 19</i>	1.3 b
<i>B. 21</i>	1.1 b
<i>B. 17</i>	1.0 bc
<i>B. 44</i>	1.0 c
<i>B. 23</i>	1.0 c
Testigo	0 d

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

7.3.2 *Fusarium solani*.

Cuadro 8. Aislados de *Bacillus* spp. con mayor efecto antagonista contra *Fusarium solani*, que obtuvieron el mayor halo de inhibición *in vitro*.

Aislado de <i>Bacillus</i>	Halo de inhibición (cm)
<i>B.47</i>	3.0 a
<i>B.16</i>	2.0 ab
<i>B.31</i>	2.0 ab
<i>B.22</i>	1.8 b
<i>B.26</i>	1.8 b
<i>B.11</i>	1.5 bc
<i>B.46</i>	1.5 bc
<i>B. 1</i>	1.0 c
<i>B. 9</i>	1.0 c
<i>B.29</i>	1.0 c
Testigo	0 d

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

Los aislados de *Bacillus* spp. (*B. 47* y *B. 35*) evaluados *in vitro*, inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum* con (3.0 y 2.0 cm) de halo de inhibición y (*B. 47* y *B. 16*) de *Fusarium solani*, con halo de inhibición de (2.0 cm). Este rango de inhibición concuerda con el potencial, donde obtuvieron rangos de inhibición de 30 a 60 %, al igual que Gong *et al.*, quienes registraron un rango de inhibición *in vitro* de 32%.

7.4 Etapa de Invernadero.

7.4.1 Selección de aislados de *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum*.

7.4.1.1 Altura de planta.

El valor más alto en altura de planta se obtuvo con el tratamiento B.35 (107 cm), el cual fue estadísticamente mayor ($p \leq 0.05$) al testigo presentando los valores mas bajos (59.6 cm).

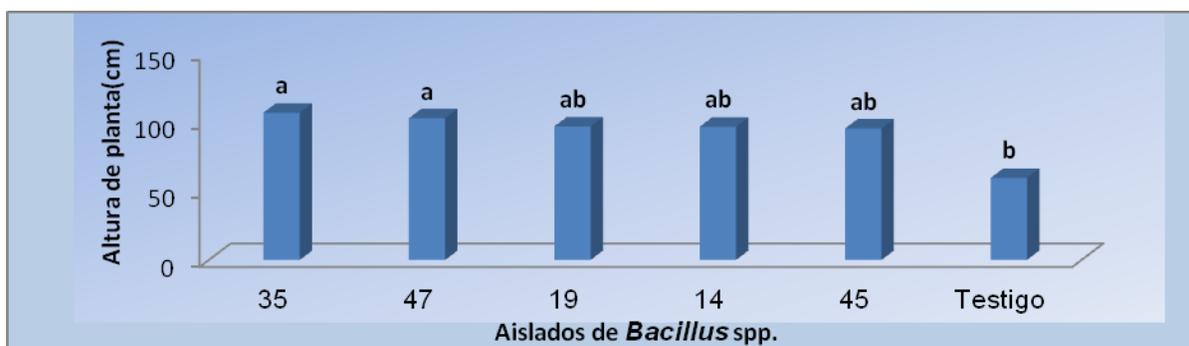


Figura 9. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.4.1.2 Peso seco de follaje.

Para la variable peso seco de follaje (tallos y hojas), se encontró que la mayor acumulación de materia seca de la parte aérea fue obtenida con el tratamiento B.35 (6.1 g); no hubo diferencias estadísticamente entre los tratamientos bacterianos solamente el testigo, ($p \leq 0.05$) el cual presento el valor más bajo (2.39 g.)

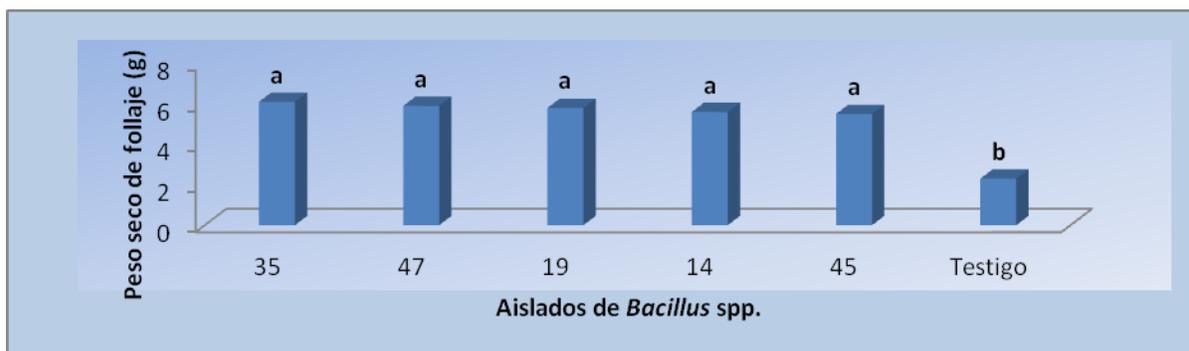


Figura 10. Efecto de los aislados bacterianos en peso seco de follaje de plantas de tomatillo. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.4.1.3 Número de flores.

Las plantas inoculadas con *B.35* presentaron el mayor número de flores (24 flores por planta) superando estadísticamente ($p \leq 0.05$) al testigo (11 flores por planta).

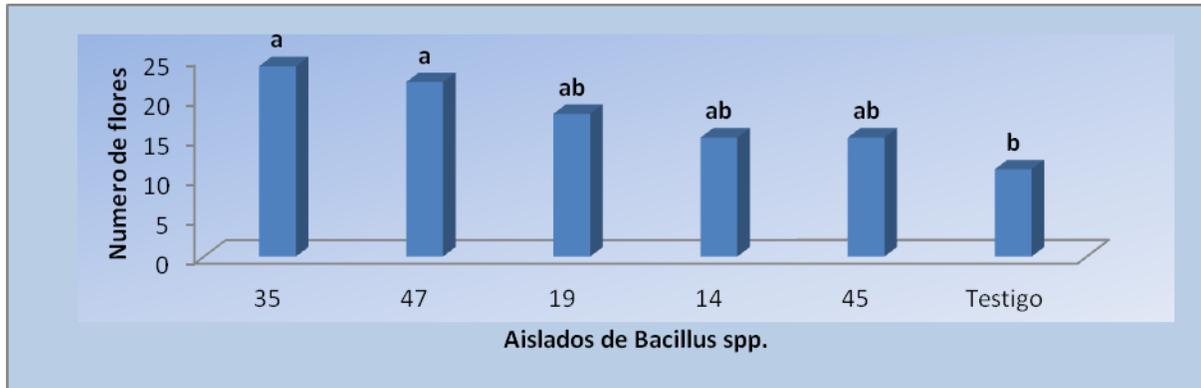


Figura 11. Efecto de los aislados bacterianos en número de flores. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.4.1.4 Volumen de raíz.

En volumen de raíz se observó una mayor expansión con el tratamiento *B.35* (6.1 g) no presentando diferencias estadísticamente entre los tratamientos solamente en el testigo, ($p \leq 0.05$) el cual presentó el valor más bajo (2.39 g).

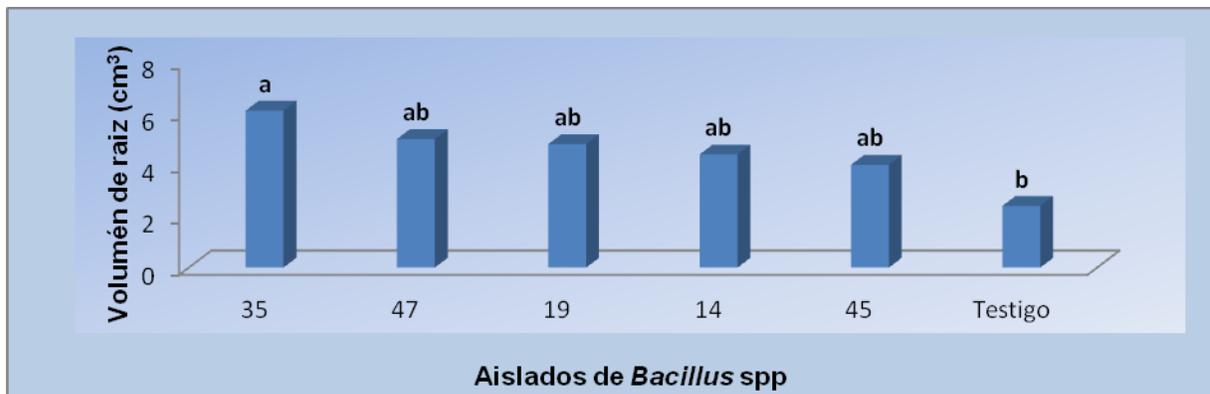


Figura 12. Efecto de los aislados bacterianos en volumen de raíz de tomate. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.4.1.5 Diámetro de tallo y peso seco de raíz.

Para diámetro de tallo no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$) (Cuadro 8).

Los resultados de éste experimento no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para: peso seco de raíz. Sin embargo, el tratamiento B.35 obtuvo el mayor valor numérico de ésta variable (Cuadro 8).

Cuadro 9. Efecto de la inoculación de *Bacillus* spp. en diámetro de tallo y peso seco de raíz en plantas de tomatillo inoculadas con *Fusarium oxysporum* en invernadero.

Aislados de <i>Bacillus</i>	Diámetro de tallo (cm)	Peso seco Raíz (g)
B. 35	0.58 a	5.9 a
B. 47	0.57 a	4.8 a
B. 19	0.57 a	4.7 a
B. 14	0.55 a	3.0 ab
B. 45	0.55 a	3.1 ab
Testigo	0.54 a	3.0 ab

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

El aislado B.35 fue el que presentó el valor más alto en las variables de altura de planta, peso seco de follaje, número de flores y volumen de raíz. Por lo anterior, este aislado se eligió para probarse en el experimento de campo.

7.4.2 Selección de aislados de *Bacillus* spp. contra *Fusarium solani*.

7.4.2.1 Altura de planta.

El valor más alto en altura de planta se obtuvo con el tratamiento B.31 (98.67 cm), el cual solo superó estadísticamente ($p \leq 0.05$) al testigo presentando los valores más bajos (66.67 cm).

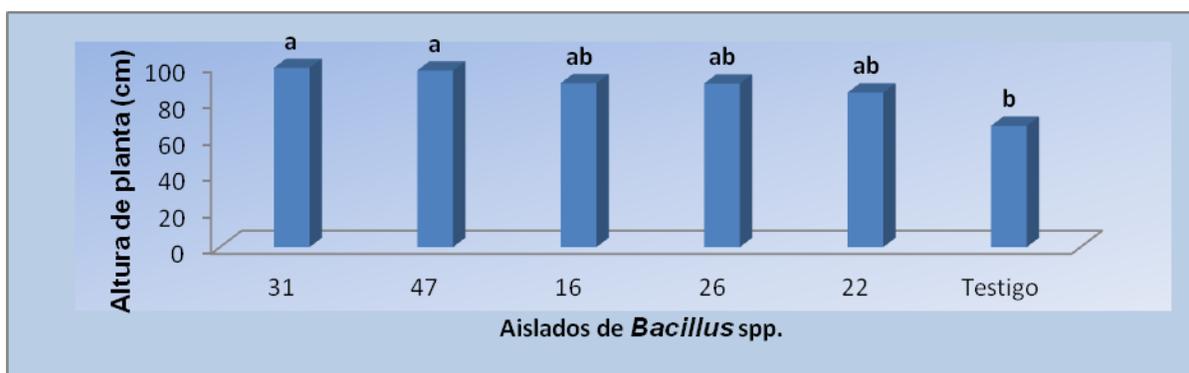


Figura 13. Efecto de los aislados bacterianos en altura de las plantas de tomatillo. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.4.2.2 Peso seco de follaje.

Para la variable peso seco de follaje (tallos y hojas), se encontró que la mayor acumulación de materia seca de la parte aérea fue obtenida con el tratamiento B.35 (6.0 g) no hubo diferencias estadísticamente entre los tratamientos solamente en el testigo, ($p \leq 0.05$) el cual presentó el valor más bajo (2.4 g).

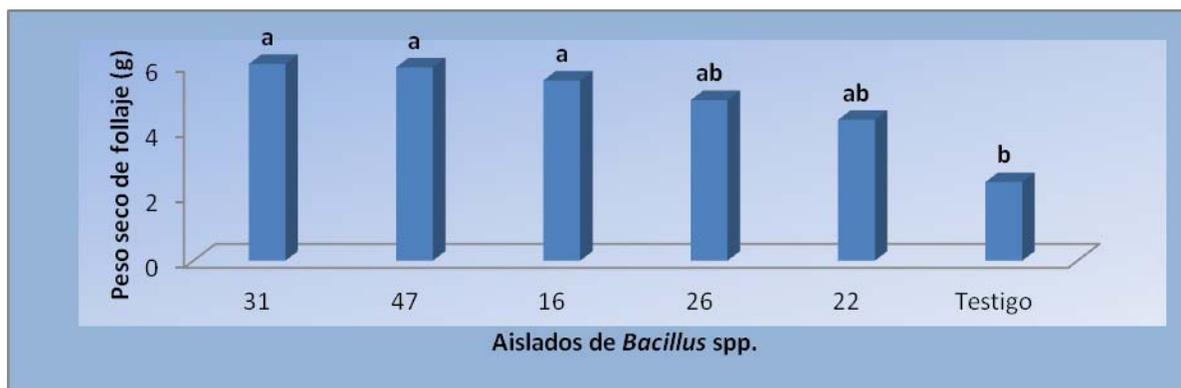


Figura 14. Efecto de los aislados bacterianos en peso seco de follaje de las plantas de tomatillo. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.4.2.3 Número de flores.

Para la variable: número de flores el tratamiento B.35 obtuvo el mayor número (21 flores) superando estadísticamente ($p \leq 0.05$) al testigo (10 flores).

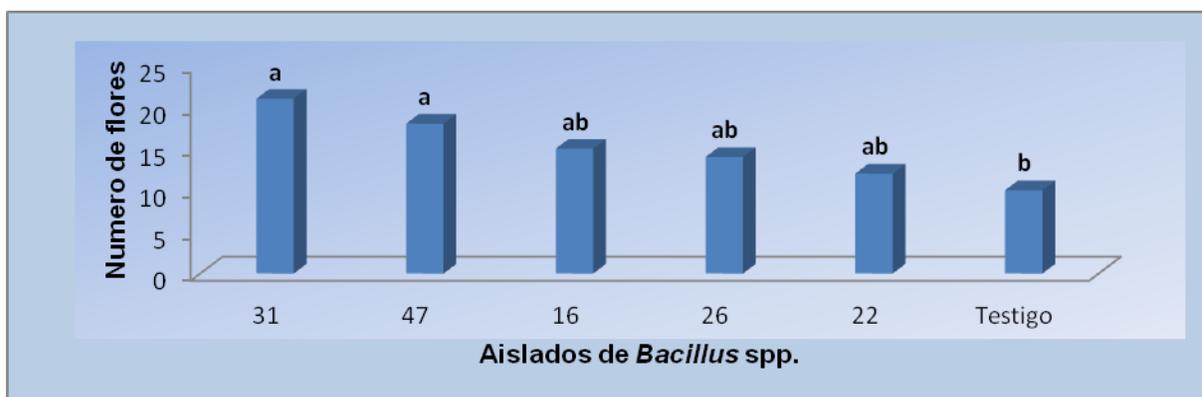


Figura 15. Efecto de los aislados bacterianos en número de flores por planta de tomatillo. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.4.2.4 Volumen de raíz.

En volumen de raíz la mayor acumulación de esta fue obtenida con el tratamiento B.35 (11.1 cm^3) no hubo diferencias estadísticamente entre los tratamientos solamente en el testigo, ($p \leq 0.05$) el cual presento el valor más bajo (6.1 cm^3).

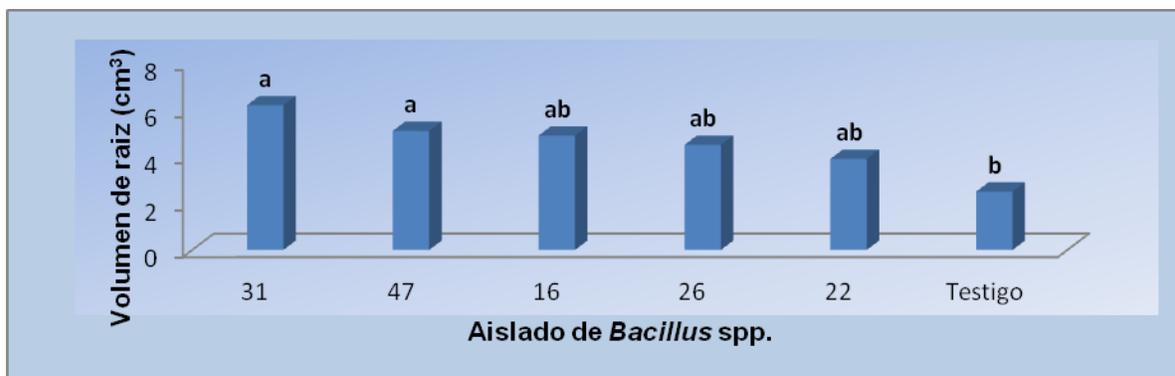


Figura 16. Efecto de los aislados bacterianos en volumen de raíz en las plantas de tomatillo. Medias con letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre tratamientos. Tukey, $p \leq 0.05$.

7.4.1.3 Diámetro de tallo.

Para diámetro de tallo, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para esta variable ($P \leq 0.05$) (Cuadro 9).

Cuadro 10. Efecto de la inoculación de *Bacillus* spp. en el diámetro del tallo en plantas de tomatillo inoculadas con *Fusarium oxysporum* en invernadero.

Aislados de <i>Bacillus</i>	Diámetro de tallo (cm)
<i>B. 31</i>	0.58 a
<i>B. 47</i>	0.57 a
<i>B.16</i>	0.57 a
<i>B.26</i>	0.55 a
<i>B.22</i>	0.55 a
Testigo	0.54 a

Letras iguales sobre las barras son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

En invernadero se observó un efecto de promoción de crecimiento en las plantas tratadas con *Bacillus* spp. en cuanto a altura de planta, peso seco de follaje, número de flores, volumen de raíz y peso seco de raíz, aunque no con diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. El aislado *B.31* fue el que presentó el valor más alto en las variables evaluadas, por lo tanto este fue elegido para ser usado en el experimento de campo. el cual es seleccionado para el experimento en campo.

7.5 Selección de la mejor relación NO₃:NH₄ en Invernadero.

Cuadro 11. Efecto de cinco proporciones NO₃:NH₄ sobre variables fisiológicas de las plantas de tomatillo en invernadero.

Tratamientos (NO ₃ : NH ₄)	Altura (cm)	Peso Seco Follaje (g)	Diámetro Tallo(cm)	Flores (No.)	Peso Seco Raíz (g)	Volumen Raíz(cm ³)
1:1	40.0 a	3.5 a	0.25 a	14.3 a	2.4 a	5a
0:1	29.0 ab	1.8 ab	0.25 a	11.6 ab	1.6 ab	3b
1:2	28.3 ab	1.1 ab	0.25 a	8.0 ab	1.6 ab	3b
1:0	26.3 ab	1.5 ab	0.25 a	6.0 ab	1.1 ab	3b
2:1	25.6 ab	1.0 ab	0.25 a	4.3 b	1.1 ab	3b
Testigo	18.6 b	0.4 b	0.25 a	3.6 b	0.5 b	2c

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

La relación 1:1 y 0:1 (nitratos/amonio) presentaron los valores más altos en las variables de: altura de planta, mayor peso seco de follaje, número de flores y volumen de raíz, superando estadísticamente al testigo, ($p \leq 0.05$); por lo tanto estas relaciones son las elegidas en el experimento de campo.

7.5 Trabajo de campo.

7.5.1 Propiedades físicas y químicas del suelo.

El resultado del análisis del suelo indicó que se trata de un suelo de textura arcillosa, con pH neutro, sin problemas de sales (CE inferior a dos mmhos cm^{-1}), con bajo contenido de materia orgánica (como es el caso de la mayoría de los suelos de la región), con alto contenido de fósforo, potasio, calcio y magnesio (Cuadro 11).

En cuanto al contenido de elementos menores (Hierro, Cobre, Zinc y Manganeso), el suelo contenía las cantidades necesarias para el buen desarrollo del cultivo.

Cuadro 12. Características físicas y químicas del suelo del área experimental, en el Campo Experimental Valle del Fuerte INIFAP ubicado en el Municipio de Guasave, Sinaloa, México.

Determinación	Resultados
Materia orgánica	0.72 %
pH	7.0
CE	0.18 mmhos cm^{-1}
Fosforo asimilable (P)	22.90 ppm
Textura	Franco arcilloso
Potasio (K)	3.5 Cmol kg^{-1}
Calcio (Ca)	41.56 Cmol kg^{-1}
Magnesio (Mg)	10.70 Cmol kg^{-1}
Sodio (Na)	2.37 Cmol kg^{-1}
Hierro (Fe)	12.73 ppm
Cobre (Cu)	5.16 ppm
Cinc (Zn)	5.03 ppm
Manganeso (Mn)	1.20 ppm

7.6. Incidencia de hongos asociados a las raíces en plantas de tomatillo.

Se recolectaron al azar ocho plantas por tratamiento, se realizó el análisis de los patógenos asociados a las raíces de las plantas y se encontró que los tratamientos inoculados con la bacteria poseían una menor cantidad de estos en las raíces debido que las bacterias del genero *Bacillus* inhiben la asociación de patógenos en el suelo.

Cuadro 13. Patógenos asociados a las raíces en plantas de tomatillo en el experimento en campo.

Tratamientos	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>R. solani</i>	<i>Phythium</i> spp.	Total de patógenos
<i>B.35 +NO₃/NH₄(1:1) F. o</i>	1	0	1	0	2
<i>B.35+NO₃/NH₄ (0:1) F. o</i>	1	0	2	1	4
<i>Testigo1+NO₃/NH₄ (0:1) F. o</i>	3	2	2	1	8
<i>Testigo2 +NO₃/NH₄(1:1) F. o</i>	4	2	1	0	7
<i>B.31+ NO₃/NH₄ (1:1) F. s</i>	1	2	2	1	6
<i>B.31+NO₃/NH₄ (0:1) F. s</i>	0	1	2	1	4
<i>Testigo1+NO₃/NH₄(0:1) F. s</i>	1	3	2	1	7
<i>Testigo2+NO₃/NH₄ (1:1) F. s</i>	2	4	1	0	7

7.7 Concentración foliar de nutrimentos.

7.7.1 nitrógeno total.

Los tratamientos inoculados con *Bacillus* spp. no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos. (Cuadro 14).

7.7.2 Fósforo (P).

No hubo diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos, (Cuadro 14), sin embargo en donde se aplicó *Bacillus* presentaron valores numéricos más altos de concentración foliar de fósforo, esto se atribuye a la capacidad que tienen éstas bacterias de solubilizar fosfatos inorgánicos, mediante la producción de ácidos orgánicos (Rodríguez y Fraga, 1999; Vázquez *et al.*, 2000).

7.7.3 Potasio (K).

En concentración foliar de potasio no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. (Cuadro 14).

Cuadro 14. Efecto de la inoculación de *Bacillus* (aislados B.31 y B.35) y dos proporciones de NO₃:NH₄, sobre el rendimiento del cultivo de tomatillo en campo.

Tratamientos	Nitrógeno (%)	Fósforo (%)	Potasio (%)
<i>B.35</i> + NO ₃ /NH ₄ (1:1) + <i>F. o</i>	6.51 a	0.27a	4.77 a
<i>B. 35</i> + NO ₃ /NH ₄ (0:1) + <i>F. o</i>	5.55 a	0.24 a	4.58 a
Testigo1+ NO ₃ /NH ₄ (0:1) + <i>F. o</i>	4.31 a	0.26 a	4.65 a
Testigo2+NO ₃ /NH ₄ (1:1) + <i>F. o</i>	4.71 a	0.27 a	4.44 a
<i>B. 31</i> + NO ₃ /NH ₄ (1:1) + <i>F. s</i>	5.71 a	0.26 a	4.61 a
<i>B.31</i> + NO ₃ /NH ₄ (0:1) + <i>F. s</i>	5.31 a	0.25 a	4.87 a
Testigo1+ NO ₃ /NH ₄ (0:1) + <i>F. s</i>	4.12 a	0.26 a	4.77 a
Testigo2+ NO ₃ /NH ₄ (1:1) + <i>F. s</i>	3.94 a	0.25 a	4.63 a

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

7.7.3.1 Calcio, magnesio y microelementos.

La mayor concentración foliar de calcio se encontró con el tratamiento $\text{NO}_3/\text{NH}_4 + F. o$ (1:0) (2.84%), pero éste valor no superó estadísticamente al testigo (2.44%), lo cual se atribuye a que el suelo en el que se estableció el experimento contenía cantidades suficientes de calcio para abastecer las necesidades del cultivo. El valor más alto en Magnesio también se obtuvo en este tratamiento que fue (1.14%).

Para el caso del hierro (Fe), el valor numérico más alto (236.5 ppm) se encontró en el tratamiento $\text{NO}_3/\text{NH}_4 + F. o$ (1:0) pero no superó estadísticamente a los demás tratamientos ni a los testigos. Lo anterior se atribuye a que algunas especies de *Bacillus* han demostrado ser capaces de producir compuestos sideróforos, los cuales incrementan la disponibilidad de hierro para las plantas (Wilson *et al.*, 2010; Wahyudi *et al.*, 2011).

Para zinc, manganeso y cobre, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$) (Cuadro 15).

Cuadro 15. Comparación de medias de micro elementos en el follaje de plantas de tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) en condiciones de campo.

Tratamientos	Ca (%)	Mg (%)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)
B.35 + NO_3/NH_4 (1:1) + F. o	2.84 a	1.14 a	236.5 a	114.1 a	63.5 a	29.2 a
B. 35 + NO_3/NH_4 (0:1) + F. o	2.78 a	1.00 a	224.9 a	107.7 a	59.8 a	28.1 a
Testigo1+ NO_3/NH_4(0:1) + F. o	2.48 a	0.98 a	194.7 a	97.9 a	55.1 a	24.1 a
Testigo2+NO_3/NH_4(1:1) + F. o	2.44 a	0.91 a	170.2 a	96.6 a	54.2 a	23.1 a
B. 31 + NO_3/NH_4 (1:1) + F. s	2.49 a	1.02 a	226.1 a	101.5 a	57.8 a	25.7 a
B.31 + NO_3/NH_4 (0:1) + F. s	2.75 a	0.97 a	208.2 a	101.3 a	56.5 a	24.9 a
Testigo1+ NO_3/NH_4(0:1) + F. s	2.36 a	0.91 a	167.3 a	89.7 a	53.1 a	23.7 a
Testigo2+ NO_3/NH_4(1:1) + F. s	2.23 a	0.83 a	160.7 a	92.2 a	44.3 a	20.9 a

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

7.8 Cosecha.

Se realizó de manera manual en dos ocasiones el día 19 de enero del 2011 (primer corte relimpia) y ocho de febrero, tomando los frutos de la parcela útil 4 m. antes de realizar el segundo corte se presentó un fenómeno de baja temperatura (hasta -4°C), lo cual afectó de manera uniforme el rendimiento en todos los tratamientos del experimento, debido a eso se recolectaron los frutos evaluados como listos para la comercialización y se pesaron en una bascula digital marca OHAUS®.

Cuadro 16. Efecto de la inoculación de *Bacillus* (aislados B.31 y B.35) y dos proporciones de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$, sobre el rendimiento del cultivo de tomatillo en campo.

Tratamientos	Rendimiento de fruto Kg ha^{-1}		
	Primer corte	Segundo corte	Total
B.35 + NO_3/NH_4 (1:1) + <i>F. oxysporum</i>	5000 a	13940 ab	18940 a
B. 35 + NO_3/NH_4 (0:1) + <i>F. oxysporum</i>	5000 a	13523 ab	18523 a
Testigo1+ NO_3/NH_4(0:1) + <i>F. oxysporum</i>	4557 a	13203 ab	17760 a
Testigo2+NO_3/NH_4(1:1) + <i>F. oxysporum</i>	3515 ab	14039 ab	17554 a
B. 31 + NO_3/NH_4 (1:1) + <i>F. solani</i>	4375 ab	15898 a	20273 a
B.31 + NO_3/NH_4 (0:1) + <i>F. solani</i>	5078 a	12771 ab	17849 a
Testigo1+ NO_3/NH_4(0:1) + <i>F. solani</i>	4296 ab	12432 ab	16728 ab
Testigo2+ NO_3/NH_4(1:1) + <i>F. solani</i>	2526 b k	10396 b	12922 b

Medias con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey ($P \leq 0.05$).

7.9 Identificación molecular de dos aislados de *Bacillus* spp.

Los dos aislados bacterianos que promovieron un mayor crecimiento de las plantas de tomatillo en campo pertenecen al género *Bacillus*; los dos presentaron homología del 100% y 99 % con la especie *Bacillus cereus*.

Cuadro 17. Identificación molecular de los aislados *B.31*, *B.35* que se utilizaron en invernadero y campo. En plantas de tomatillo.

Aislado	# Bases	Acceso	Máx. Ident	Descripción
<i>B.31</i>	556	JF915703.1	100%	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B.35</i>	540	JF915703.1	99%	<i>Bacillus cereus</i>

Fuente: Base de datos de NCBI

7.10 Prueba de Hemólisis.

Los dos mejores aislados (*B.31*, *B.35*), no mostraron halos hemolíticos, a las 24 hr. de incubación a 37°C en placas Petri con Agar-sangre.

Figura 17. Prueba de hemólisis de los aislados *B. 31* y *B. 35* a las 24 hr.

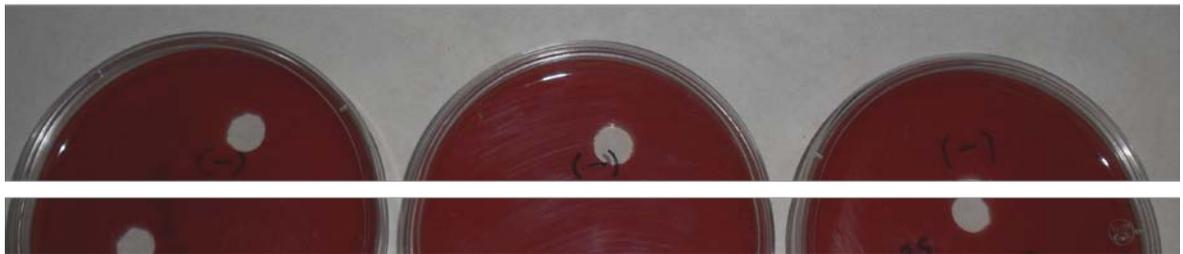


Figura 18. Prueba de hemólisis de aislados *B.31* y *B.35*, con 3 repeticiones a las 24 hr.

VIII. CONCLUSIONES

- De 50 aislados de *Bacillus* spp. nativos probados *in vitro* solo dos aislados mostraron efecto antagonista ante ambas especies.
- El efecto inhibitor que induce *Bacillus* spp. en el control de *Fusarium* spp. depende de la especie que se trate *in vitro* no todos mostraron el mismo resultado en la inhibición.
- Los aislados 31 (*Bacillus cereus*) y 35 (*Bacillus cereus*) evaluados en invernadero fueron los más eficaces como promotores del crecimiento y desarrollo de las plantas de tomatillo.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 2002. Fitopatología. 2da. Edición. Editorial Limusa. México, D.F. 428 pp.
- Apodaca, S. M. A., Zavaleta, M. E., García, E. R., Osada, K. S., y Valenzuela, U. J. G. 2002. Frecuencia de campos infestados con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* en Sinaloa, México, y su control. Revista Mexicana de Fitopatología 20,1-7.
- Apodaca, S. M. A., Zavaleta, M. E., García, E. R., Osada, K.S. y Valenzuela, U.J.G. 2004 Hospedantes Asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. F. sp. *Radicislycopersici*. W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. México: 2004.
- Apodaca Sánchez, M.A. 2004. Memoria Jornada de Tecnología de Producción de Tomatillo, Fundación Produce Sinaloa pág. 7
- Apodaca-Sánchez, M. A., Barreras-Soto, M. A., Cortez-Mondaca, E. y Quintero-Benítez, J. A. 2008. Enfermedades del Tomate de Cascara en Sinaloa. Folleto técnico No. 31. Campo Experimental Valle del Fuerte. CIRNO-INIFAP. Los Mochis, Sinaloa, México. 32 pp.
- Armenta-Castro, C. M., Armenta-Cárdenas, I. y Borbón-S, J. T. 2000. Guía para producir tomatillo en el Sur de Sonora. Folleto técnico No. 18. Campo Agrícola Experimental Valle del Mayo, CIRNO-INIFAP. Navojoa, Son., México. 24 pp.
- Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.I., Martynenko E.V., and Kudoyarova G.R. 2005 Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant and Soil 272: 201-209.
- Arshad, M., and Frankenberger Jr., W.T. 1998. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. Advances in Agronomy 62:45-51.
- Arteaga, L.C. 1997. Bacterias fijadoras de nitrógeno de la rizosfera, caulosfera y filosfera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 135 p.

- Awan, A.B. y R.A. Struchtemeyer. 1957. The effect of fertilization on the susceptibility of potatoes to late blight. *J.* 34: 315-319.
- Backer, R.P.1978. Inoculum potencial. In. J.D. Horsfall and E.B. Cowling (eds). *Plant Pathology: an advance treatise*. Vol II. Academic Press. New York. 137-157pp
- Barea J.M., y Azcón-Aguilar, C. 1982. La rizósfera: interacciones microbio planta. *Anales de Edafología y Agrobiología* 12:1517-1532.
- Barreras-Soto, M. A. 2005. Susceptibilidad de cultivares de tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.), al complejo viral predominante en el Norte de Sinaloa. Tesis de Maestro en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa. 3-24 pp.
- Bashan, Y., Holguín G., y Ferrera-Cerrato, R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos II: Bacterias asociativas de la rizósfera. *Terra* 14:195-210.
- Bashan, Y., and Holguin, G. 1998. Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol plant growth promoting bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 30:1225-1228.
- Bélangier, G., J.R. Walsh, J.E. Richards, P.H. Milburn y N. Ziadi. 2002. Nitrogen fertilization and irrigation affects tuber characteristics of two potato cultivars. *Am. J. Potato Res.*79: 269-279.
- Ben-Omar, N., Merroun, M.L., Arias Peñalver J.M., and Gonzalez Muñoz, M.T.1997. Comparative heavy metal biosorption study of brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. *Chemosphere* 35:2217-2283.
- Bergey's Manual Editorial Board. 1986 Genus *Bacillus* spp. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 9th edition, Williams & Wilkins Company, 1105-1139 p.
- Blancard, D., Lecoq, H., y Pitrat, M. 2000. Enfermedades de las cucurbitáceas: observar, identificar, luchar. Ediciones Mundi-Prensa Libros. Barcelona, España. 187pp.
- Blancard, Dominique. 2005. Enfermedades del tomate. Observar, identificar, luchar. Grupo Mundi-Prensa. España

- Boddey, R.M., de Oliveira O.C., Urquiaga, S., Reis, V.M., de Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., and Döbereiner, J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil* 174:195-209.
- Booth, C. 1984. The *Fusarium* problem: historical, economic, and taxonomic aspects. *The applied mycology of Fusarium*, pp. 1-13. Moss, M. O. and Smith, J. E. (eds.). Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Bowen, G. D., and Rovira A. D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* V 66: 1-102.
- Brada, I.E., Quintana, E., Pelaya, E. y Araujo, T. 1995. Efecto de *Bacillus* spp., sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum*. Resúmenes Bioplaguicidas INIFAT. Habana, Cuba. p. 11.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. R. 1987. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia Coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 7:4801-4805.
- Burgess, L.W., Nelson, P.E., Summerel., B.A.1989. Variability and stability of morphological characters of *Fusarium oxysporum* isolated from Soils in Australia. 96:780-84 pp
- Butt T. M., Harris J. G. and Powell K. A. 1999. Microbial biopesticides: the european scene. In: *Biopesticides. use and delivery*. In: F.R. Hill and J. J. Menn. (eds). Humana Press, NJ: 23-44 p.
- Cartujano, E.F. 1984. Desarrollo y fenología del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) var. Rendidora. Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia UACH. Chapingo, México. 79 p
- Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L., Trivedi, P., Kumar, B., Colvin, N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiological research* 160:75-81

- Cowan, ST. and K.J. Steel's 1993. Manual for the identification of medical bacteria. Third Edition. Cambridge University Press, London. 89 pp.
- Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P.P., and Szaniszlo, P.J. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil* 130:179-198.
- Deacon, Jim. 1990. Institute of Cell and Molecular Biology, the University of Edinburgh. (en línea): <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/panamá.htm>
- De la Torre A., R. 1996. Caracterización histológica y molecular de un complejo de virus en el tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en los valles altos de México. Tesis de Doctorado en Ciencias. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo Edo. de México. 93 p.
- Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R.M., and Ahmad, N. 1995. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. nitrogen economy in tropical Soil. *Fertilizer Research* 42:339-346.
- Elmerich, C., Zimmer, W., and Vieille, C. 1992. Associative nitrogen fixing bacteria. In: Stacey, G., Burris, R. H. and Evans, H. J. (eds.) *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall. N.Y. London. 212-258 p.
- Feil, B. 1994 Growth and ammonium: Nitrate uptake ratio of spring wheat cultivars under a homogeneous and a spatially separated supply of ammonium and nitrate. *Plant Nutrition* 17: 717 – 728.
- Fernández-Larrea, O. y Cenjas, A.1997. Producción y conservación de productos de *Trichoderma* por vía fermentativa. Habana, Cuba. 26 p.
- Ferreira, L.H.P.L., Molina J.C., Brasil C. and G. Andrade. 2003. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticidal proteins effects on soil microorganisms. *Plant and Soil* 256:161-168.
- Flores-Sánchez, J.L., 2009. Respuesta de 13 Genotipos de tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.) a virosis y marchitamiento fungoso en Sinaloa, México. Tesis de licenciatura. Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuete. Universidad Autonoma de Sinaloa. 45 p.
- Gao, H., Beckman, C.H., Mueller, W.C., 1995. The rate of vascular colonization as a measure of the genotypic interaction between various cultivars of tomato and

- various formae especiales of *Fusarium oxysporum*. *Physiol. Mol. Plant Pathology*. 46:29-43 pp
- González, P. 2006. Enfermedades del tomate. Facultad de Agronomía. Montevideo Uruguay. En línea Noviembre 2010:
http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Fusarium_tom.html
- Goldman, G. H., Hayes, C. and Harman, G. E. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Trends in Biotechnology* 12:478-482.
- Gong, Q., Wang, L. Q., Tu, K. In situ polymerization of starch with lactic acid in aqueous solution and the microstructure characterization. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 64, No. 4, 2006, pp. 501-509.
- González, V., y Fragoso, S. 2002. *Bacillus subtilis*. [En - línea]. Disponible en <http://www2.cbm.uam.es/microali/pdfs/Bsubtilis.pdf>.
- Gordon, T. R. y Martyn, R. D. 1997. The Evolutionary Biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology* 35:111-128.
- Guo S., Kaldenhoff R., Uehlein N., Sattelmacher B., Brueck H. 2007 Relationship between water and nitrogen uptake in nitrate- and ammonium-supplied *Phaseolus vulgaris* L. plants. *Journal of Plant Nutrition* 170: 73-80.
- Gupta, V.P., Bochow, H., Dolej, S., and Fischer, I. 2000. Plant growth-promoting *Bacillus subtilis* strain as potential inducer of systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 107:145-154.
- Haglund, W.A.;Kraft, J.M. 2001. *Fusarium* wilt. en: Kraft, J.M.; Pfleger, F.L. (ed.). *Compendium of pea diseases and pests*. the American Phytopathological society press. St. Paul, Minesota USA. 14-84 pp
- Handelsman, J., E. M. Mester, and S. Raffel. 1988. Mechanism of biocontrol of *Phytophthora* by *Bacillus cereus* UW85. In R. Palacios, and D. P. S. Verma (eds.) *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. APS Press, St.Paul, Minn. 303-308 pp.
- Havlin, J. L., Beaton, J. D., Tisdale, S. L., Nelson, W. L., 1999. *Soil Fertility and Fertilizers an Introduction to Nutrient Management*. Sixth edition. Prentice Hall Inc. New Jersey, USA. 499 p.

- Ho, S. L., Yong, S. K., and Sang, D. K. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Applied and Environmental Microbiology* 57:510-516.
- Kloepper, J.W., Zablotowicz, R.M., Tipping, E.M., and Lifshitz, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: *The rhizosphere and plant growth*, Keister D.L., Cregan P.B. (eds). Kluwer academic Publishers, Netherlands, 315-326 p.
- Jarvis, W. R. y Thorpe, H. 1976. Susceptibility of *Lycopersicon* species and hybrids to the foot and root rot pathogen *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease Reports* 60:1027-1031.
- Lips S.H., Leidi E.O., Silberbush M., Soares M.I.M., and Lewis O.E.M. 1990. Physiological aspects of ammonium and nitrate fertilization. *Journal of Plant Nutrition* 13: 1271-1289.
- Lucy, M., Reed, E., and Glick, B.R. 2004. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86:1-25.
- Lynch, J. M. 1990. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 191-196.
- Jingquan, and., Dewei, C. 1988 Effects of different nitrogen forms on tomato grown in carbonized rice hull. *Soiless Culture* 51-61.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E., and Zitter, T. A. 1997. *Compendium of tomato diseases*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 73 p.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M. y Parker, J. 2004. *Biología de los microorganismos*. 10 th Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid. 1096 p.
- Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition in higher plants*. 2nd ed. Academic press. London, UK.
- Martínez-Álvarez. J. C. 1998. Selección de cepas de *Pseudomonas fluorescens* con potencial de biocontrol hacia *Sclerotium rolfsii* en rizosfera de tomate. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México, pp.

- Mendoza, Z.C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de parasitología Agrícola. Chapingo, México. 88p.
- Minuto, A., Spadaro, D, Daribaldi, A., and Gullino ML. 2006. Control of soilborne pathogens of tomato using a comercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. 25:468-475.
- Nakano, M.M., Zuber., A.L. 1998. Anaerobic regulation of *Bacillus subtilis* krebs cycle genes bacteriol. 180:3304-3311
- Nelson, P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *F. oxysporum* M.E. Mace, A.A. bell and C:H. Beckamn (eds.) Fungal wilt diseases of plants. Academic press. New York. 51-80 pp
- Nelson, P.E, T.A. Toussoun and W.F.O. Marasas. 1983. *Fusarium* species and illustrated manual for identification. the Pensylvania University press. University park and London.
- Peña, L. A., Márquez, S. F., y Pérez, G. M. 1990. Mejoramiento genético de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 380 pp.
- Peña-Lomelí, A. y Santiaguillo-Hernández, J. F. 1999. Variabilidad genética del tomate de cáscara en México. Boletín técnico No. 3. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo, de México. 16 pp.
- Peña, L., Molina, G. F., Márquez, S. J., Sahagún C. J., Ortiz C., y Cervantes, S., 2002. Respuestas estimadas y observadas de tres métodos de selección en tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Fitotecnia Mexicana 25; 171-178.
- Pérez-Moreno, L., Duran-Ortiz, L.J., Ramírez-Malagon, R., Sánchez-Pale, J.R. y Olalde-Portugal, V.2004. Sensibilidad *in vitro* de aislados del hongo *Phytophthora capsici* a fungicidas. Memorias primera convención Mundial del chile. León, Guanajuato, México. Resumen, pp. 144-150
- Perumal, N.K. y T.S. Sahota. 1986. Investigations on growth and tuberization of potato at different planting dates and nitrogen levels. Int. J. Trop. Agric. 4: 63-72.

- Piña A., J. y F. Ponce G. 1990. Etiología y control del carbón del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Luvianos y Villa Guerrero, México. *Revista Chapingo*, 67/68: 22-25.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C. and Loccoz, and. M. 2008. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 10 pág.
- Raven J.A., and Smith F.A. 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol* 76: 415–431.
- Rodas-Junco, B. A., Quero Bautista, M., Magaña Sevilla, H. F. Reyes Ramírez, A. 2009. Selección de cepas nativas con actividad quitino-proteolítica de *Bacillus spp.*, aislada de suelos tropicales. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11:107-113.
- Rodríguez, M. N. 1995. Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. En: Ferrera-Cerrato R. y Pérez M.J. (eds). *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Estado de México. 105-126 p.
- Rodríguez H., Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances, Research review paper* 17: 319-339.
- Rosas M., A. 1999. Respuesta de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis spp*) a virus 10 que provocan la enfermedad “chino del tomate”. Tesis de Maestría en Ciencias. Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 72 p.
- Samuels, G. J., and Blackwell, M. 2001. Pyrenomycetes, fungi with perithecia. *The Mycota. Systematics and evolution Part A*. pp. 221-255. McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G. and Lemke, P. A. (eds). Springer-Verlag. Berlin.
- Sánchez-Castro, M. A. 1998. Manejo de enfermedades del tomate. Memoria del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Tomate, Chile y Papa. INCAPA.
- Santiaguillo, H. J.F., Cervantes, S.T., Peña, L. A., Molina, G.J., y D. Sahagún. J. 2002. Heterosis en híbridos intervarietales en tomate de cascara (*Physalis*

- ixocarpa* Brot.) XIX Congreso Nacional de Fitogenética. Saltillo, Coahuila, México. 115 p.
- Singh, B. K., Millard, P., Whiteley, A. S. and Murell, J. M. 2004. Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology* 12:386-393.
- Shusheng, Z. Waseem, R. 2008. Control of *Fusarium* wilt disease of cucumber plants with the application of a bioorganic fertilizer.
- Schneider RW. 1994. Effects of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *Fusarium oxysporum* f sp. appi and a novel use of the lineweaver-Burk double reciprocal plot technique. *Phytopathology*. 74: 646-53 pp
- Summerell A.B, Leslie F.J, Backhouse D., Bryden L. Wayne, Burgess W.L. 2002. *Fusarium* paul E. Nelson memorial symposium. second printing. the American Phytopathological society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 15-23 pp
- Taylor GS. 1965. Studies on fungi in the root region. IV Fungi associated with the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Plant soil*. 22:1-20 pp
- Todar, K. 2003. The genus *Bacillus*. University of Wisconsin. Madison, Department of Bacteriology 35 p.
- Torres, L.A., Wong, W., Miguel, A., Fernández, A., y Amat, Z. 2001. Actividad antagonista de especies de *Bacillus* spp. contra *Rizhoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. *Revista Fitosanidad*. 25:12-17 p.
- Towsend, G. R., and Heuberger, J.W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Rep.* 27:340-343.
- Trapero Casas, A., Jimenez Diaz, R.M. 1983. La marchitez y Podredumbre de Raíz del Garbanzo en el Valle del Guadalquivir: Importancia, distribución, etiología, epidemiología y medios de lucha. Tesis doctoral ,E.T.S.I.A, Universidad de Córdoba. 295 pp.
- Van Peer, R., Niemann, G. J. and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81:728-734.

- Vázquez C.G., Sáenz E.O., Alvarado R.V., García F.Z. 2000. Absorción de nitrato y amonio por plantas de nopal en hidroponía. *Terra Latinoamericana*, Universidad Autónoma de Chapingo 18: 133-139.
- Wahyudi A.T., Astuti R.P., Widyawati A., Meryandini A., Nawangsih A.A. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3: 34-40.
- Wen-Teish, C., Yu-Chung, C., and Chia-Ling, J. 2006. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology* 98:1224-1230.
- Willcutts, J. F., Overman, A. R., Hochmuth, G. J., Cantliffe, D. J., Soundy, P. 1998. A comparison of three mathematical models of response to applied nitrogen: A case study using lettuce. *HortScience* 33(5): 833-836.
- Wilson, M.K., Abergel R.J., Arceneaux J.E.L., Raymond K.N., Byers B.R. 2010. Temporal production of the two *Bacillus anthracis* siderophores, petrobactin and bacillibactin. *Biometals* 23: 129-134.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52:487-511.
- Wright, S. F., and Upadhayaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198:97-107.
- Zavaleta, M. E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra Latinoamericana* 17:201-207.