

Caracterización molecular y alternativas de control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hans., del estado de Nayarit.

Miguel Díaz-Heredia¹, Abiel Sánchez-Arizpe¹, Isidro Humberto Almeyda-León² Félix de Jesús Sánchez-Pérez¹, Carlos Rubén Carvajal-Cazola³, y Alberto Flores-Olivas¹, ¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315. ²INIFAP-Universidad Autónoma de Nuevo León, Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular, Apdo. Postal 128-F, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza Nuevo León, México CP 66450. ³ Centro Multidisciplinario de Investigación Científica de la Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, Nayarit, México CP 63190.

Resumen. Se utilizaron 21 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 18 cepas se obtuvieron de plantas de tomate cultivadas bajo condiciones de riego en el estado de Nayarit, México y tres razas de referencia fueron proporcionadas por el Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. En la amplificación de Secuencias de Transcripción Interna de los aislamientos se realizó mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizándose los iniciadores específicos CNL12 y CNS1. Los fragmentos amplificados por PCR, fueron sometidos a tratamiento con las enzimas de restricción *EcoRI*, *RsaI* y *HaeIII*. Se realizó la caracterización molecular de los diferentes aislamientos por medio de la técnica del ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD's). En todos los aislamientos se amplificó un fragmento de ADN de un tamaño molecular aproximado de 2.6 Kb. Se observaron tres perfiles de restricción, correspondiendo un perfil para cada una de las enzimas utilizadas, quedando ubicados todos los aislamientos en el Grupo de Compatibilidad Vegetativa (GCV) 0030. Por medio de RAPD's se pudieron diferenciar todos los aislamientos utilizados excepto las cepas SBS-22 y SBS-25. Los 18 aislamientos colectados se sometieron a evaluaciones *in vitro* con el extracto vegetal *Heliopsis longipes*, con una cepa de la bacteria *Pseudomonas putida* y con dos cepas de la bacteria *Bacillus subtilis*. En invernadero se repitió el mismo experimento pero solamente se utilizaron las cepas SBS-02, SBS-14 y ZCU-02. En la evaluación *in vitro*

el extracto vegetal expresó la mejor capacidad inhibitoria a dosis de 300 ppm y las dos cepas de *B. subtilis* mostraron inhibiciones superiores al 40 por ciento a dosis de 3.0 L/ha 1×10^6 UFC. En el experimento de invernadero el mayor efecto antagónico se observó con las dos cepas de la bacteria *B. subtilis*.

Palabras claves adicionales: PCR, RFLP's, RAPD's, Antagonismo, Inhibición, *H. longipes*, *B. subtilis*, *P. putida*, Tomate.

Abstract.

On 21 isolations, 18 *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* strains in tomato plants under drip tile irrigation, at Nayarit, México and three reference races were given by the Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro's Plant Breeding Department. With enlargement Internal Transcription Sequences (ITS) all isolations were detected with Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, using the specific initiators CNL12 and CNS1. Amplified fragments by PCR, were processed with enzymes of restriction *EcoRI*, *RsaI* and *HaeIII*. All isolations were characterized by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD's). All isolations an approximate 2.6 Kb molecular size of AND fragments was amplified. Were observed three restriction profiles, one profile for enzyme and isolations were located in Vegetative Compatibility Group (VGC) 0030. By RAPD's collected isolations could be differ except SBS-22 and SBS-25 strains. The collected isolations were submitted to *in vitro* evaluations with *Heliopsis longipes* vegetable extracts, with the *Pseudomonas. putida* bacterium strain and two *Bacillus subtilis* bacteria strains. Same experiment was repeated in greenhouse using only SBS-02, SBS-14 and ZCU-02 strains. At the *in vitro* evaluation, the vegetable extract expressed the best inhibitory capacity in a 300 ppm dosage and two *B. subtilis* strains showed superior 40 per cent inhibitions at 3.0 L/ha 1×10^6 CFU dosage. The antagonic effect was observed with the two *B. subtilis* bacteria in the greenhouse experiment.

Additional keywords: PCR, RFLP's, RAPD's, antagonism, inhibition, *H. longipes*, *B. subtilis*, *P. putida*, tomato.

La marchitez del tomate es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Zinder & H. N. Hans, y es una enfermedad altamente devastadora y económicamente importante en todas las regiones productoras del mundo y se ha reportado por lo menos en 32 países (Cai *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2005). En el año de 1903 en el estado de Florida de los EE.UU. causó pérdidas por \$ 500,000 dólares Gale *et al.*, 2003). En el estado de Sinaloa, principal productor de tomate en México, el cultivo es afectado por diversos agentes fitopatógenos destacando *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) que infecta las raíces y produce marchitamiento y muerte de las plantas (Núñez y Zavaleta, 2004). Carrillo *et al.*, (2003) señalan que en esa región se conocen al menos 10 enfermedades radiculares-vasculares entre las cuales destaca *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) por su impacto y distribución. En el centro y norte del estado de Nayarit, región que sobresale por agrupar el 85 % de productores de tomate del estado, se desconoce la presencia y daño potencial por dicho patógeno. Esta enfermedad es mas agresiva en climas cálidos y suelos con textura arenosa; sin embargo, fuertes infecciones en variedades susceptibles se han reportado bajo condiciones de invernaderos, donde los daños se presentan con mayor severidad cuando las plantas son sometidas a un periodo de estrés hídrico, sobre todo en la etapa de floración y fructificación (Carrillo *et al.*, 2003). Tres razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) han sido reportadas en el mundo; la raza 1 descrita en 1886; la raza 2 reportada en 1945 en Ohio (EE.UU) y la raza 3 fue observada en Australia en 1978 y posteriormente reportada en otros estados como California, Florida, Georgia, Arkansas, Carolina del Norte y Tennessee, y recientemente en México (Cai *et al.*, 2003). Infinidad de

aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) han sido detectados utilizando marcadores moleculares, para ello existe una colección mundial sobre 100 aislamientos de las tres razas agrupadas por su compatibilidad vegetativa, patrones de isoenzimas y longitud de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP's) (Gale *et al.*, 2003). Para la identificación de *Fusarium* a nivel de especies, formas especiales y razas tienen un grado de dificultad alto pero existen métodos moleculares como los RFLP's y RAPD's (Polimorfismos de ADN amplificados al azar) utilizados como herramientas para diferenciar y estudiar la filogenia en aislamientos de *F. oxysporum* (Eurya y de Souza, 2002). Así mismo, de manera particular, la técnica de PCR-RAPD's se ha empleado para diferenciar aislamientos de *F. oxysporum*; sin embargo, esta técnica ha sido cuestionada en algunas ocasiones, a consecuencia de la incapacidad de reproducir resultados bajo condiciones experimentales estándar; pero este inconveniente se ha superado con el incremento en la temperatura de alineamiento durante los ciclos térmicos (Luna, *et al.* (2004). Las técnicas moleculares son herramientas de apoyo en los trabajos de experimentación e investigación sobre la restricción en el uso de plaguicidas, lo cual se fortalece con la opción de utilizar alternativas de estrategias de combate por medio de agentes de biocontrol contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) que incluye bacterias como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. cholorarphis*, *P. alcaligenes*, *Streptomyces pulcher*, *S. canascens*, *S. citreoflorescens*, *S. corchorusii* y *S. mutabilis* (Monda, 2002). Con respecto al uso de extractos vegetales existen reportes promisorios de evaluaciones *in vitro* de diversas plantas con actividad antifúngica contra *Fusarium moniliforme*, *Phytophthora capsici* y *Sclerotinia sclerotiorum*; así mismo, dentro de este concepto el extracto vegetal *Heliopsis longipes* que resulta ser un complejo de alcaloides de las cuales se presenta primordialmente la afínina, se ha observado efecto sobre el desarrollo de *Sclerotium rolfsii* y *S. cepivorum*,

con inhibición de micelio a 50 y 75 μ L. Recientemente en nuestro país se realizaron evaluaciones de extractos de plantas de semidesierto, entre las que destacan la gobernadora y el hojasén mostrando efectos contra *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani* (Solis, 2002). Los objetivos de este trabajo de investigación fueron: Determinar la presencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) y sus razas fisiológicas a partir de aislamientos puros sobre plantas colectadas en el cultivo de tomate del estado de Nayarit, detectados y caracterizados por medio de técnicas moleculares (PCR, RFLP's y RAPD's) y evaluar *in vitro* e invernadero el efecto del extracto vegetal *H. longipes*, dos cepas de *B. subtilis* y una de *P. putida* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos de laboratorio se realizaron en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en Buenavista, Saltillo, Coahuila; México, en los laboratorios del Departamento de Parasitología Agrícola dependiente del Centro Multidisciplinario de Investigación Científica de la Universidad Autónoma de Nayarit, en Tepic, Nayarit, México y en el laboratorio de Patología Molecular de la Unidad en Investigación en Biología Celular y Molecular del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. El trabajo de invernadero se realizó en la UAAAN.

Material biológico. Se obtuvieron 18 aislamientos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, en colectas realizadas en tres parcelas de tomate con riego por goteo con cintilla ubicadas en los municipios de San Blas, Santiago Ixcuintla y Compostela del estado de Nayarit cubriendo un total de 440 ha durante diciembre de 2004 y enero de 2005. Los muestreos

fueron realizados de manera dirigida sobre plantas con síntomas típicos de marchitamiento vascular, tales como amarillamiento unilateral, achaparramiento y marchitez, las muestras se colocaron en bolsas de polietileno previamente etiquetadas y se trasladaron al laboratorio en contenedores térmicos de 50x35x35 cm, colocándolas en refrigeración a 4 °C para su posterior procesamiento. Tres razas de referencia fueron proporcionadas por la M.C. Ada Ascencio Álvarez (Dpto. Fitomejoramiento de la UAAAN), las cuales fueron colectadas e identificadas en tallos de tomate en Culiacán Sinaloa.

Detección y caracterización molecular de las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

Aislamiento y purificación. Las plantas muestreadas se lavaron con agua potable, realizando cortes longitudinales del tallo con la finalidad de observar síntomas de necrosis interna de color café en los vasos vasculares. Se cortaron partes de raíz y tallos en secciones aproximadas de 0.5 cm y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 % por tres minutos, luego se lavaron con agua destilada estéril por cuatro ocasiones, enseguida se colocaron en cámaras húmedas para inducir su esporulación y finalmente se sembraron en cajas petri preparadas con medio de cultivo papa-dextrosa agar (PDA), las cuales se incubaron a 27 ± 2 °C durante siete días. Se seleccionaron los aislamientos donde se obtuvieron cultivos puros a partir de una spora (monospóricos), de los cuales se obtuvieron 18 aislamientos o cepas. Se utilizaron las abreviaturas SBS para ubicar las cepas colectadas en los municipios de San Blas-Santiago Ixc. y ZCU para la región de Zacualpan municipio de Compostela del estado de Nayarit.

Extracción del ADN. Para la extracción del ADN se utilizó una modificación a partir del método propuesto por Almeyda *et al.*, (2001). Las cepas fueron cultivadas en cajas petri en medio de cultivo PDA (papa dextrosa-agar), se extrajeron explantes de 5 mm

de diámetro preferentemente con abundante micelio, los cuales se maceraron con morteros estériles previamente calentados en horno de hibridación (Probito- 6 modelo H0600) a 65 °C , después se le agrego 1.5 mL de solución de extracción 2-ME/CTAB(2% p/v CTAB, 100 mM Tris- HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 0.2% v/v mercaptoethanol, 1 %p/v polivinyl-pyrrolidona) previamente calentada a 65 °C, se colectaron en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL 750 µL de las muestras maceradas y se incubaron en baño seco (Felisa, mod. FE-401) a 65 °C por una hora, posteriormente se les agregó un volumen igual de SEVAG (cloroformo- alcohol isoamilico 24:1), las muestras se centrifugaron (Centrifuga marca Eppendorf Mod. 5415-C) a 10,000 rpm durante diez minutos. El sobrenadante (400 µL) se recuperó en tubos eppendorf estériles y se les agregó un volumen de SEVAG y se centrifugó a 10,000 rpm durante diez minutos. Nuevamente se recuperó el sobrenadante (250 µL y se le agregó 0.5 volumen de acetato de amonio al 7.5 M, las muestras se dejaron reposar por diez minutos en hielo y posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm por diez minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y se le añadió 0.6 volumen de isopropanol y se dejó reposar por dos horas a -20 °C, posteriormente las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó en dos ocasiones con etanol al 70 % a 10,000 rpm durante diez minutos. Las muestras se secaron a temperatura ambiente y fueron resuspendidas en 55 µL de agua MQ estéril y se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Para la cuantificación de calidad y cantidad del ADN se utilizó un espectrofotómetro marca Bekman con UV modelo DU650, el ADN también se observó en un gel de agarosa al 0.8 % el gel se tinó con bromuro de etidio y se analizó en una cámara de luz ultravioleta.

Detección de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Fragmentos de ADN de las Secuencias de

Transcripción Interna (ITS) (figura 1), de los diferentes aislamientos del hongo fueron amplificados por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores específicos para Fol propuestos por Cai *et al.*, (2003); CNL 12 (CTGAACGCCTCTAAGTCAG) y CNS 1 (GAGACAAGCATATGACTACTG). Las reacciones del PCR se realizaron en un volumen total de 25.0 μ L, conteniendo 2.5 μ L (IX) de solución amortiguadora, 0.75 μ L (1.5 mM) de $MgCl_2$, 2.0 μ L (200 μ M) de dNTP's, 2.0 μ L (0.5 μ M) de cada iniciador, 0.3 μ L (1.5 unidades) de *Taq* DNA polimerasa y 50 ng de ADN, la reacción de la PCR se ajustaba a 25.0 μ L con agua MQ estéril. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador (MJ Reseach Mod. PTC-150) programado de la manera siguiente: un ciclo de desnaturalización a 95 °C por 2.0 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 35 seg; alineamiento a 58 °C por 55 seg; amplificación a 72 °C por 50 seg y una amplificación final por diez min. Los productos de la PCR se fraccionaban en geles de agarosa al 1.5 %, se teñían con bromuro de etidio y se analizaban bajo luz ultravioleta.

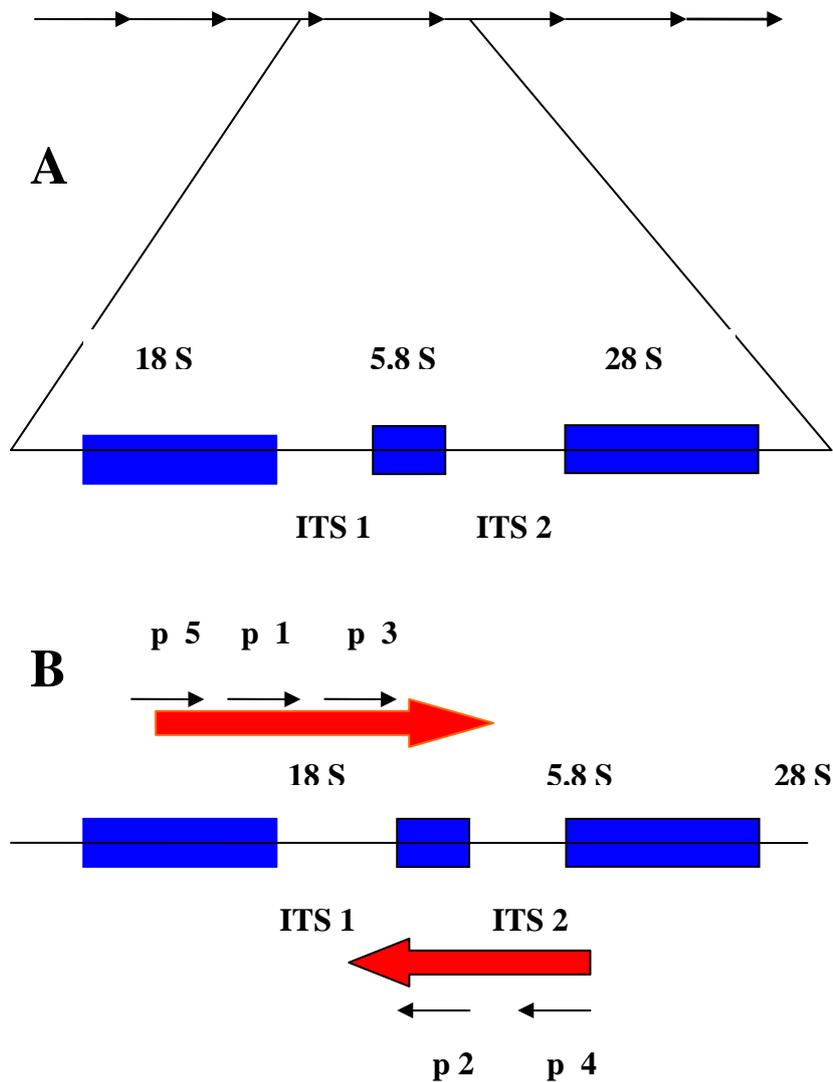


Figura 1. A) Secuencias repetidas arregladas en tandem del ADN ribosomal de hongos. Cada secuencia está constituida por los genes de la subunidad pequeña 18S, región ITS1, 5.8 S rARN, ITS 2, y la subunidad grande 28S. B) Regiones donde se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar las regiones ITS de los ARNr.

Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP's). Los fragmentos amplificados en las PCR's fueron sometidos a tratamientos con las enzimas de restricción *Eco*-RI, *Rsa*-I y *Hae*-III de acuerdo a las condiciones establecidos por el

fabricante. Los productos fueron fraccionados en geles de acrilamida al 6%, teñidas con bromuro de etidio y visualizadas bajo luz ultravioleta.

Caracterización molecular por medio del ADN Polimórfico Amplificado al Azar

(RAPD's). Para la estandarización de esta técnica se utilizaron cuatro iniciadores con diferentes concentraciones de G-C como bases selectivas, GC-4,50 %, 5' GCACATAACG 3'; GC-4 60 %, 5' GGTACTAGCG 3'; GC-4,70 %, 5' GGACTCTGCG 3'; y GC-4 80 %, 5' TCGCGCCCTG 3'. En la estandarización se seleccionó el iniciador GC-4 80 %, el cual mostró mayor número y la mejor resolución de los fragmentos amplificados. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25.0 µL, conteniendo 2.5 µL (IX) de buffer, 1.0 µL (2 mM) de MgCl₂, 2.0 µL (200 µM) de dNTP's, 2.0 µL del iniciador GC-4 al 80 % (5' TCGCGCCCTG 3') 0.5 µL (2.5 unidades) de la enzima *Taq* ADN polimerasa, 50 ng de ADN, la muestra se ajustaba a 25.0 µL con agua MQ estéril. Las amplificaciones fueron realizadas en termociclador (MJ Reseach Mod. PCT-150) con el programa siguiente: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 2.0 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 35 seg; alineamiento a 36 °C por 55 seg; amplificación a 72 °C por 50 seg y una amplificación final a 72 °C por diez minutos. Los productos de la PCR's se fraccionaron en geles de poliacrilamida al 6 %, se teñían con bromuro de etidio y se analizaban bajo luz ultravioleta.

Análisis de datos. Los geles se analizaron y las bandas monomórficas y polimórficas se contabilizaron. Se asumió que bandas del mismo peso molecular en diferentes individuos son similares. Con los fragmentos amplificados se elaboró una matriz binaria de datos, asignando el dígito 1 para el fragmento presente y 0 para el ausente. El análisis genético se realizó con el programa de análisis multivariado de taxonomía numérica 8NTSYS-pc versión 2.3. La matriz de disimilitud genética se calculó con el coeficiente

DICE y el dendograma se construyó usando el algoritmo jerárquico UPGMA (Agrupamiento de Unidades de Distancias Mínimas y Promedios Aritméticos).

Efectividad biológica del extracto vegetal y antagonismo microbiológico de bacterias contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) *in vitro* e invernadero.

Tratamientos utilizados contra los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), en laboratorio e invernadero. Los tratamientos evaluados en laboratorio e invernadero fueron; el extracto vegetal de *H. longipes* cuyo principio activo es afinina a dosis de 150, 250 y 300 ppm en 250, 150 y 125 L de agua/ha respectivamente; las cepas BS y 8BS de la bacteria *Bacillus subtilis* y la bacteria *Pseudomonas putida* a 3.0 L/ha con 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC); en invernadero se adicionaron dos tratamientos, el testigo inducido (inoculado con cepas de Fol y sin aplicación de extracto vegetal y de bacterias).

Evaluación en laboratorio. Para los tratamientos con el extracto vegetal, se empleó la técnica del medio envenenado. El proceso consistió en agregar extracto a un matraz Erlenmayer con PDA estéril a 50-60 °C en cantidad suficiente para preparar cinco cajas petri por cada tratamiento y repeticiones. Los 18 aislamientos purificados se sembraron por explante de 5 mm de diámetro tomados del margen de un crecimiento vigoroso de una colonia de diez días de edad y se colocaron al centro de cada caja petri, se incubaron a $27 \text{ }^\circ \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; se efectuaron las lecturas cuando el testigo cubrió el total de la caja petri (5-8 días) al término de este tiempo se midió el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial, tomando como referencia el testigo absoluto como 0%; para esto se midió el diámetro de crecimiento micelial de cada tratamiento con sus repeticiones en forma de cruz promediado. Los valores de diámetro de inhibición se transformaron a porcentaje de inhibición. Con respecto a los agentes antagónicos microbiológicos se colocaron cuatro explantes de 0.5 mm de diámetro a los cuatro puntos cardinales de la

caja petri y al centro un explante del hongo de los aislamientos purificados, los cuales se incubaron a 27 ± 2 °C, la evaluación de la antibiosis se realizó midiendo con un Vernier digital el crecimiento diametral de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) cuando el testigo cubrió totalmente con micelio la caja petri. Los datos del crecimiento micelial se tomaron en mm, los cuales fueron convertidos en porcentaje de crecimiento con respecto a la media en mm de las cinco repeticiones. Para obtener el porcentaje de inhibición se utilizó la fórmula; % inhibición = (media del producto) (100) entre la media del testigo. El extracto vegetal y las bacterias antagónicas se evaluaron bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones y siete tratamientos, la unidad experimental consistió en una caja petri. Se efectuaron los análisis de varianza y pruebas de medias Tukey ($P < 0.05$). Se utilizó el programa estadístico Minitab[®] 2000 versión 13.20, para la aplicación de la Normalidad estadística por medio de las pruebas de Anderson-Darling, Ryan-Joiner (similar a Shapiro-Wilk) y Kolmogorov-Smirnov.

Evaluación en invernadero. Para la producción de plántulas se sembró la variedad Río Grande (altamente susceptible) en charolas de poliuretano; transplantándose a una edad de 45 a 60 días. Se dejó de regar las plántulas con la finalidad de ocasionar un estrés hídrico la cual favoreció el proceso de infección; las plantas fueron inoculadas por separado con tres cepas de Fol seleccionadas con base al comportamiento del porcentaje de inhibición mostrado en el ensayo *in vitro*, alto (cepa ZCU-02), medio (cepa SBS-14) y bajo (cepa SBS-03). La inoculación fue hecha por medio de pequeñas heridas con tijeras desinfectadas sobre las raíces laterales y se sumergieron durante 10 minutos en suspensión de conidios a una concentración de 1×10^7 la concentración se realizó mediante conteos con un hematócmetro o cámara de Neubauer de acuerdo a la metodología propuesta por French y Hebert (1980). Las plantas se colocaron en bolsas de plástico de 3 kilos de capacidad, se utilizó como sustrato "Peat moss" libre de

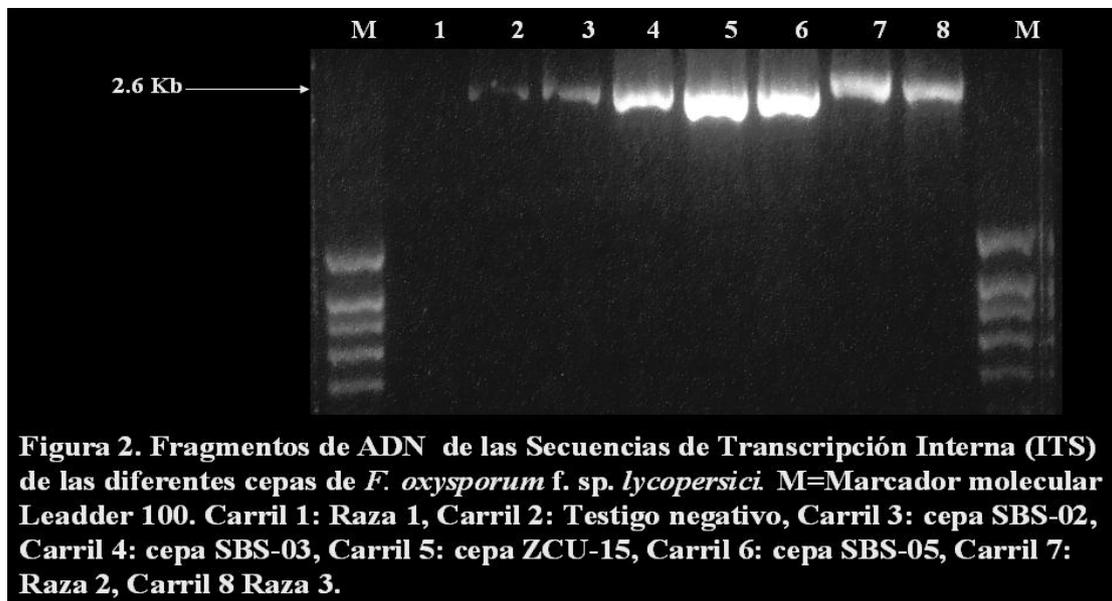
patógenos, la temperatura de incubación fue de 27 ± 2 °C. La aplicación de los diversos tratamientos se efectuó al momento del trasplante. La segunda y la tercera a los 15 y 45 días posteriores a la primera inoculación, el testigo inducido se inoculó con cada una de las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) seleccionadas y se le adjuntó al ensayo un testigo absoluto (sin inoculación y sin aplicación del extracto vegetal y de bacterias). Las dosis, tratamientos y repeticiones fueron idénticas a la evaluación realizada en laboratorio. A los 88 días posteriores al trasplante se evaluó la severidad de la enfermedad; la altura de planta expresada en cm, se midió desde el nivel del suelo hasta la yema apical; peso fresco y seco de la raíz registrada en gramos, para ello se tomó la porción radical de las plantas las cuales fueron extraídas de las bolsas de plástico, pesándose en la balanza marca Ohaus de 2,610 g de capacidad; el secado de las raíces se efectuaron en horno por 24 horas a 80 °C. El efecto de las bacterias antagonicas y del extracto vegetal se evaluaron en función a la severidad de la enfermedad, para la cual se utilizó la escala propuesta por Cai *et al.* (2003) que se describe de la siguiente manera; (1) planta sana sin síntomas; (2) clorosis, achaparramiento o marchitez ligera; (3) clorosis, achaparramiento o marchitez moderada; (4) clorosis, achaparramiento o marchitez severa y (5) planta muerta. El diseño experimental fue completamente al azar, con cinco repeticiones, la unidad experimental consistió de una bolsa de plástico de 3 kilos de capacidad. Los datos obtenidos de altura de planta, peso fresco y seco de la raíz, se sometieron al análisis de varianza y posteriormente se aplicaron las pruebas de medias Tukey ($P < 0.05$), así mismo, los datos se sometieron a la prueba de normalidad utilizando las de Anderson-Darling; Ryan-Joiner (similar a la de Shapiro-Wilk) y Kolmogorv-Smirnov realizadas por medio del programa estadístico Minitab[®]2000 versión 13.20. Cabe señalar, cuando los valores de las medias se sometieron a la normalidad y estos no se ajustaron ninguna

de las tres pruebas anteriormente mencionadas se les realizaron transformaciones de acuerdo a la prueba de Box-Cox (Minitab[®]2000 versión 13.20) sometiéndose nuevamente a los análisis de varianza con el paquete UANL y la prueba de separación de medias utilizada fue la de Tukey ($P < 0.05$) Para la severidad de la enfermedad se le realizó estadística no paramétrica de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis que se utiliza en diseños completamente al azar, que también se aplicaron con el paquete UANL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*(Fol), mediante la técnica de PCR.

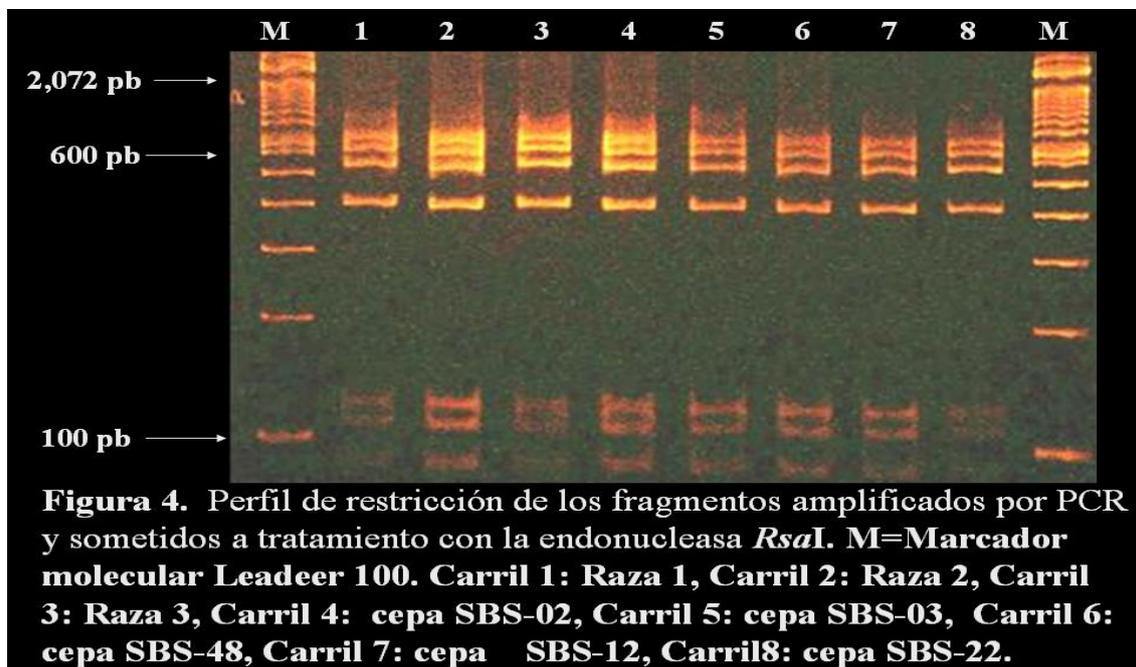
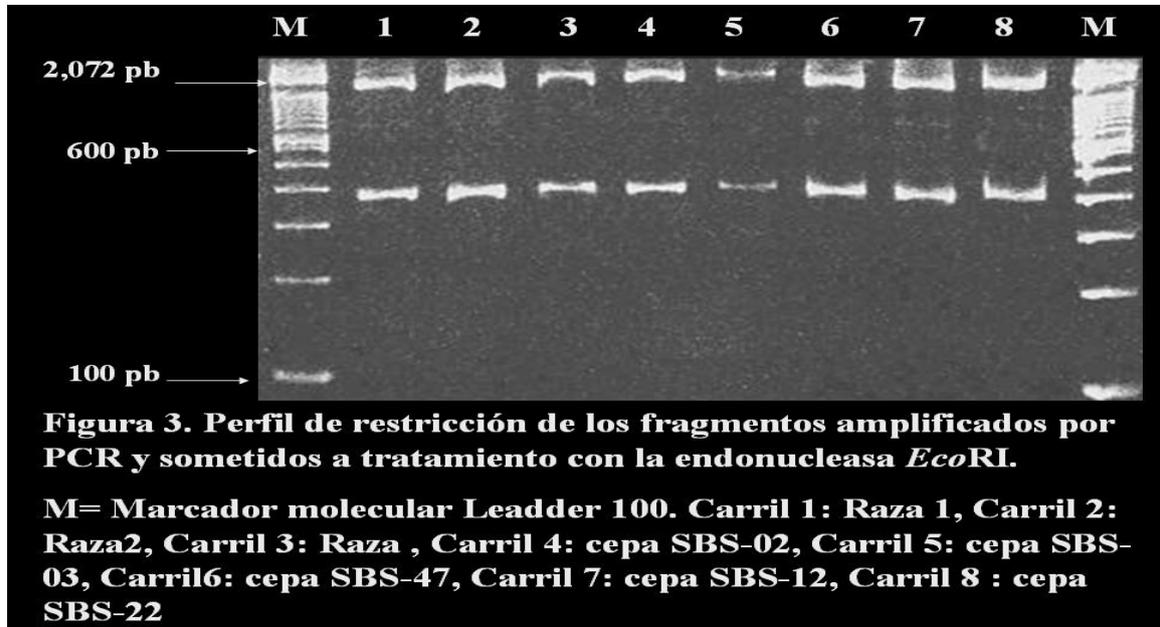
Todos los aislamientos amplificaron en las PCR's utilizando los iniciadores CNL12 y CNS1 observándose un fragmento de un peso molecular aproximado de 2.6 kb (figura 2).

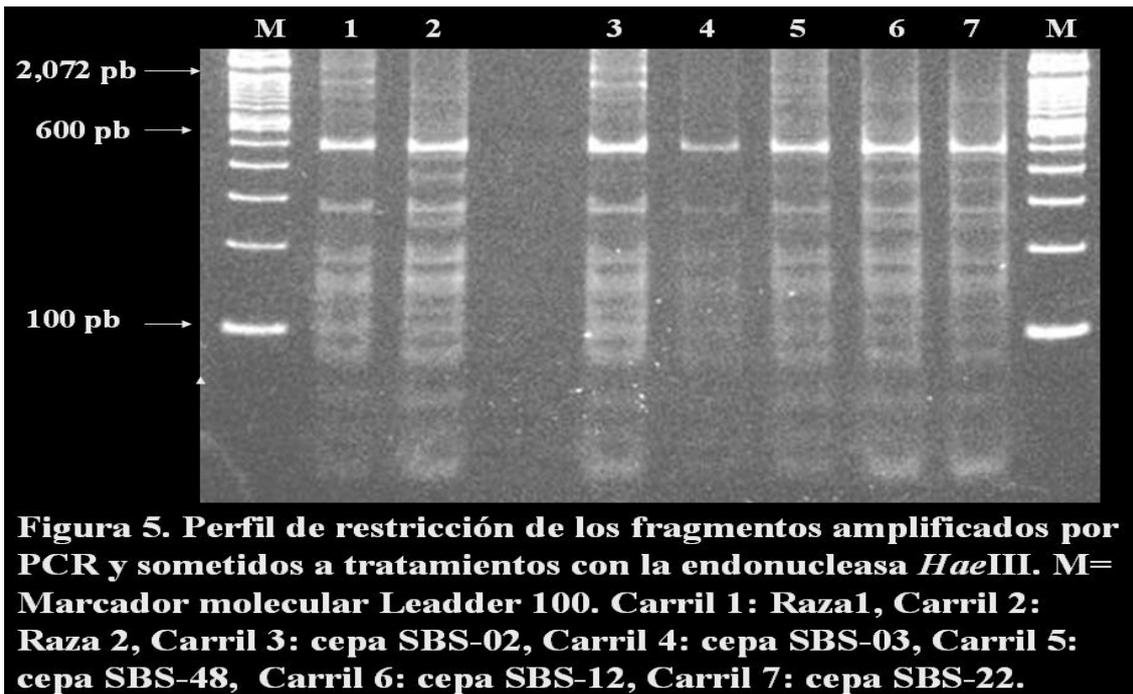


Estos resultados coinciden con lo reportado por Cai, *et al.*,(2003), Holguín (2005) y Sheu y Wang (2006).

Polimorfismos de Longitud en los Fragmentos de Restricción (RFLP's).

Se observaron tres perfiles de restricción cuando los fragmentos amplificados fueron sometidos a tratamiento con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HaeIII* y *RsaI*, correspondiendo un perfil a cada una de las enzimas utilizadas (figuras 3, 4 y 5).

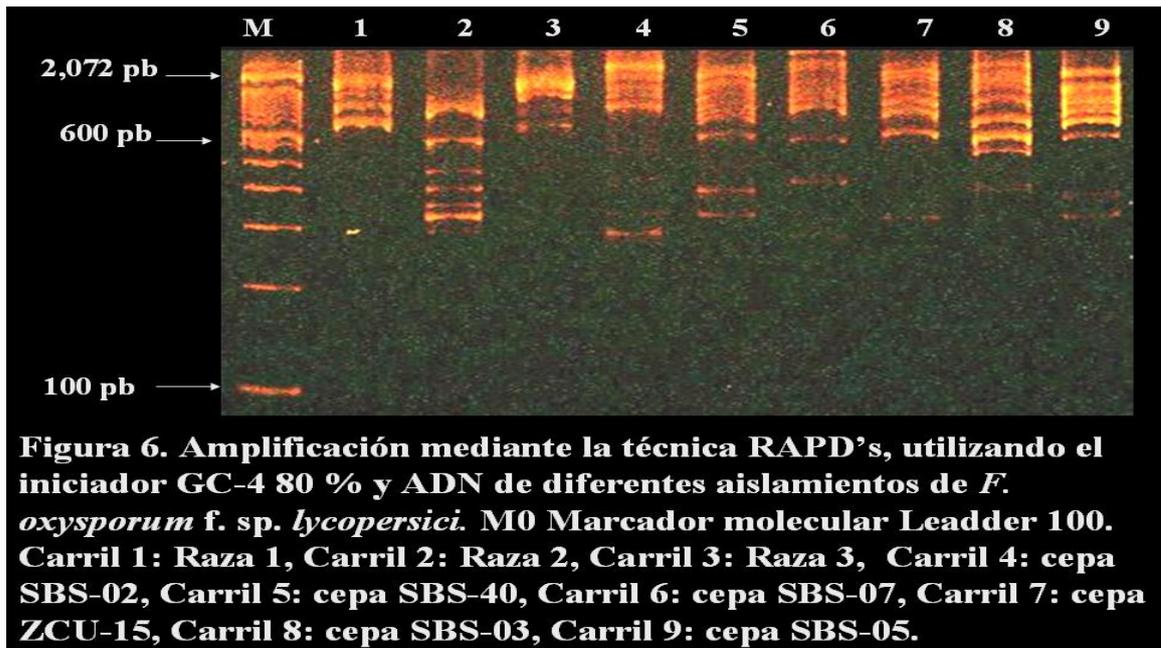




De acuerdo al perfil de restricción obtenido con cada una de las enzimas de restricción utilizadas, todos los aislamientos colectados en el estado de Nayarit corresponden al Grupo de Compatibilidad Vegetativa (GCV) 0030 descrito por Cai, *et al.*, (2003), por lo cual se puede hacer inferencia de que todos los aislamientos colectados en el estado de Nayarit pertenezcan a las razas 2 y 3, que son las razas que conforman el GCV 0030.

Caracterización molecular de los aislamientos, mediante RAPD's.

En las pruebas de estandarización de la técnica de RAPD's se utilizaron los iniciadores GC-4 50%, GC-4 60 %, GC-4 70 % y GC-4 80 %, seleccionándose finalmente el iniciador GC-4 80 %, el cual generó un mayor número y la mejor resolución de los fragmentos amplificados, cuyo peso molecular vario de 2,500 a 350 pares de bases (figura 6). Los resultados fueron consistentes y reproducibles en diferentes repeticiones realizadas y sirvieron para diferenciar las razas fisiológicas y conocer la variabilidad genética entre los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*).



Relaciones genéticas entre los diferentes aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

El dendograma generado por el método UPGMA y la dispersión de los componentes principales muestran las diferencias en la forma de agrupamiento de los distintos aislamientos o cepas (figuras 7 y 8). Se observan tres grupos diferenciales: en el grupo A se encuentran la mayoría de los aislamientos (razas 1, 2, 3 y las cepas ZCU-11, SBS-12; SBS-14, SBS-34, ZCU-07, ZCU-02 y ZCU-05). El grupo B esgta compuesto por siete aislamientos (SBS-02, SBS-05, ZCU-15, SBS-03, SBS-07, SBS-40 Y SBS-48), en este grupo se encuentra la cepa que presentó mayor porcentaje de disimilitud genética (2.8 %) y es la cepa SBS-48, el agrupamiento mostró disimilitud ascendente entre asilamientos. El grupo C esta conformado por cuatro aislamientos (ZCU-12, SBS-22, SBS-25 y SBS-13) los cuales mostraron condiciones extremas de disimilitud (2.8 % a 0.9 %). Las diferencias genómicas mostradas en los diferentes aislamientos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) procedentes del estado de Nayarit, permiten evidenciar su variación genética, así como la presencia de tres grupos filogénicos. La

disimilitud entre las cepas no se mostró en cuanto a su procedencia, sino que estas respondieron a las disimilitudes genómicas como proponen Cai, *et al.*, (2003).

Efectividad biológica del extracto vegetal y de las bacterias antagónicas *in vitro* e invernadero.

Ensayo en laboratorio. El extracto vegetal a base de afinina muestra un efecto fungistático sobre el desarrollo micelial en las 18 cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), En la figura 9, se observa que al aumentar la dosis reduce el crecimiento micelial y expresa rangos mínimos del 26.3 % al 62.1 % en las dosis de 150 y 300 ppm respectivamente.

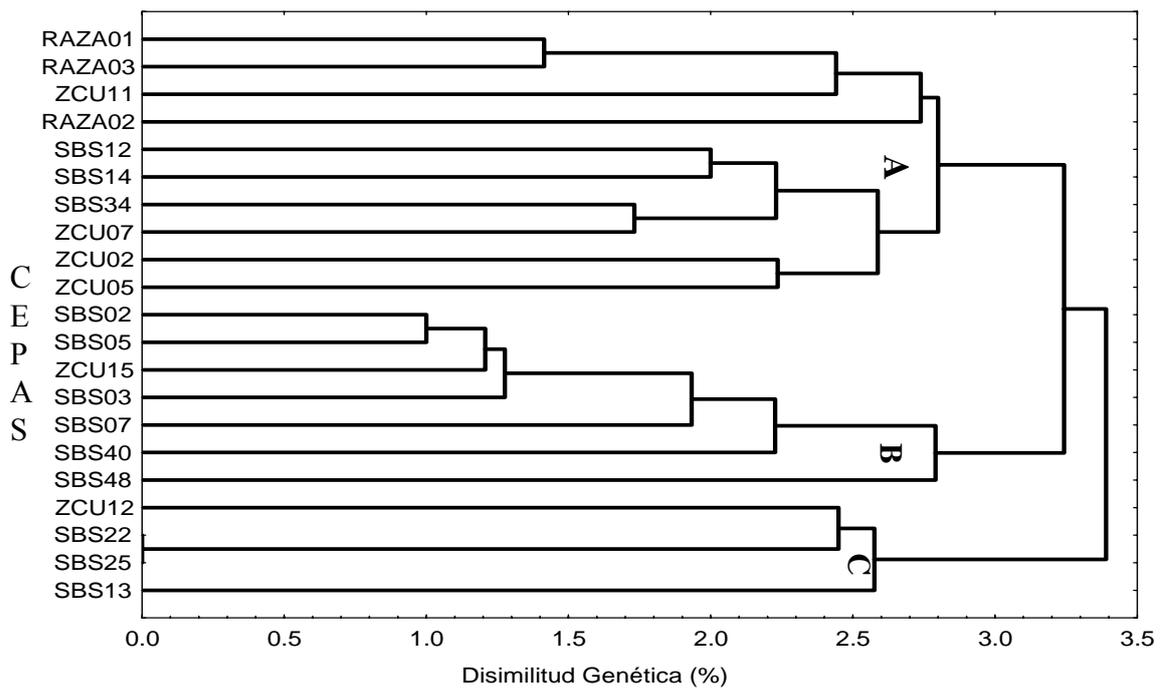


Figura 7. Conformación de tres grupos diferentes (A, B y C) de cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, analizados con RAPD's y agrupados con el método UPGMA.

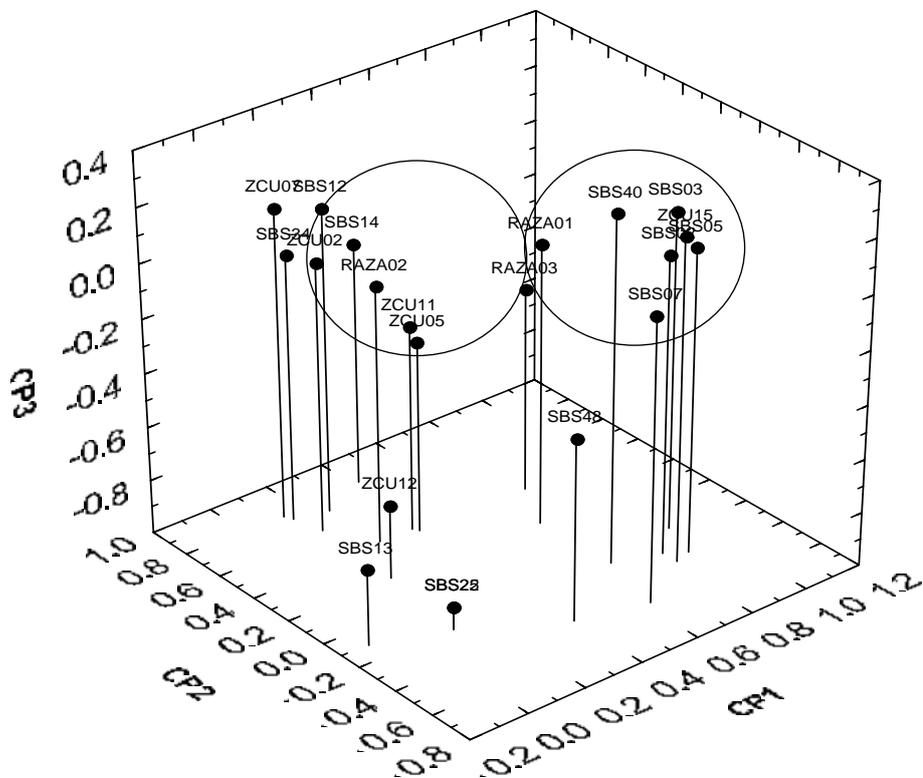


Figura 8. Dispersión de 21 cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con base en el análisis de componentes principales de datos RAPD.

La cepa ZCU-02 fue la que presentó la mayor susceptibilidad al efecto fungistático en las tres dosis evaluadas, mientras que la cepa ZCU-15, fue la que presentó la mayor resistencia (figura 9). La reducción del crecimiento micelial puede atribuirse a la inhibición de la síntesis de los ácidos grasos por la afinina tal como lo sugieren Ramírez *et al.*, (2000). El rango de inhibición del crecimiento micelial en otros aislamientos fue variable, pero el comportamiento fue similar a lo observado en las cepas ZCU-02 y ZCU-15, conforme se incrementa la dosis de afinina se incrementa la capacidad inhibitoria sobre el crecimiento micelial. Por lo anterior, los resultados de análisis de varianza reflejaron que existe una diferencia significativa para las dosis de 150, 250 y 300 ppm. En un trabajo realizado por Ramírez *et al.*, (2000) encontraron que *H. longipes* inhibe el desarrollo de *Sclerotium rolfsii* y *S. cepivorum*, *in vitro* en dosis de 50 y 75 $\mu\text{L/mL}$. Este trabajo constituye como la primera evidencia de la actividad fungistática del extracto vegetal *H. longipes* sobre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. El antagonismo microbiológico de la bacteria *P. putida* sobre las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), vario de 16.71 a 38.35 % (figura 10). La cepa SBS-48 fue la que presento mayor susceptibilidad a la bacteria *P. putida* con un 38.35 % de inhibición en el crecimiento micelial, y la cepa ZCU-15 fue la que presentó la mayor resistencia con un 16.71 % de inhibición micelial. El porcentaje de inhibición micelial en las cepas restantes fue de bajo a intermedio con valores que fluctuaron de 22.12 a 28.71 %. Sin embargo, de acuerdo a la comparación de medias, la cepa SBS-48 fue estadísticamente similar a las cepas SBS-40, y SBS-03. Núñez y Zavaleta (2004), señalan que existen buenos resultados en pruebas antagonismo *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), con microorganismos aislados de la rizosfera del tomate como actinomicetos, bacterias y hongos, que mostraron antibiosis a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Estos

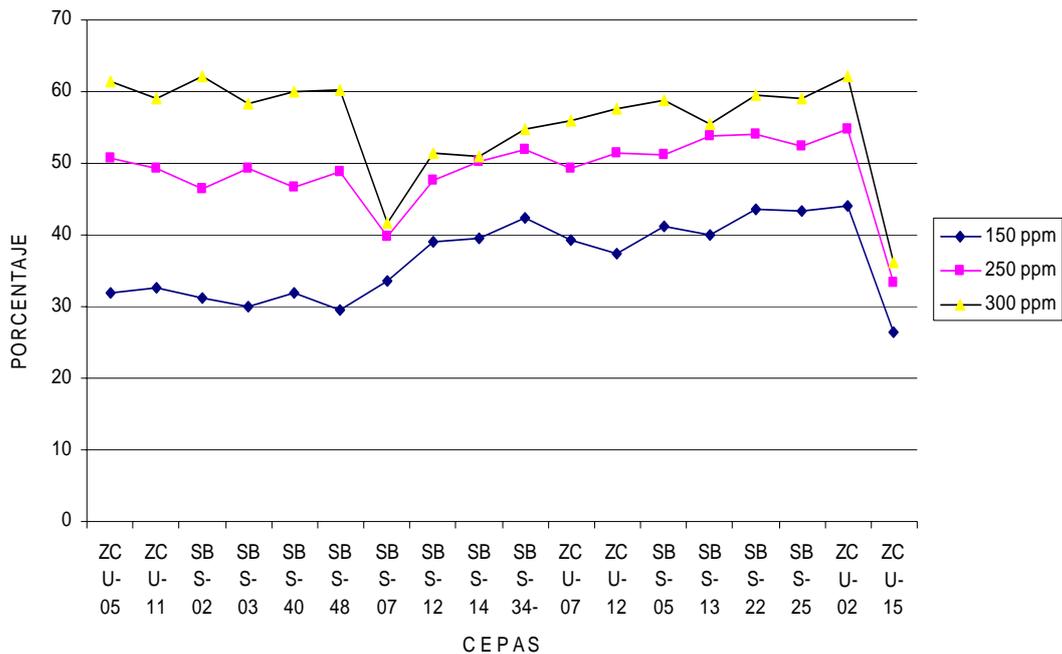


Figura. 9. Inhibición *in vitro* del extracto *Heliopsis. longipes* sobre cepas de *F.oxysporum* f. sp. *lycopersici* del estado de Nayarit.

autores observaron un área transparente en los microorganismos alrededor de la colonia del patógeno, siendo este último incapaz de invadirla y obtuvieron el grado de antibiosis midiendo el área de inhibición entre *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) y el microorganismo aislado de la rizosfera del tomate donde dos colonias de actinomicetos mostraron antibiosis, así como 13 de bacterias y siete de hongos, el número de colonias ensayadas fueron 66 y de estas 21 resultaron antagonicas. La bacteria *B. subtilis* cepa BS mostró rangos de inhibición de 23.24 a 43.06 % en la inhibición del crecimiento micelial. La cepa SBS-05 fue la que presentó la mayor resistencia con un 23.24 % de inhibición del desarrollo micelial y la cepa ZCU-05 fue la que presentó la mayor susceptibilidad con un 43.06 % de inhibición. Las cepas SBS-02, SBS-03, SBS-40 y SBS-48, presentaron un porcentaje de inhibición de 38.59, 40.64, 41.18 y 42.82 % respectivamente (figura 10). Los análisis de varianza y pruebas de medias (Tukey $P < 0.05$) mostraron diferencias significativas entre cepas. Los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial de los aislamientos de Fol con la cepa 8BS de la bacteria *B.*

subtilis fluctuaron de 26.59 a 44.94 %, sobresaliendo la cepa SBS-03 que fue la mas susceptible con el 44.94 % de inhibición, la mayor resistencia la presentó la cepa SBS-05 con el 26.59 % de inhibición (figura 10). La efectividad y capacidad antagonista de las bacterias se han mostrado en investigaciones realizadas por Sosa *et al.*, (2005) quien trabajó con 19 aislados de *Bacillus* sp. *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3, señalando que su antagonismo fue muy evidente y en medio de cultivo agar nutritivo encontraron de 3 a 17 mm de distancia de antagonismo y en PDA de 4 a 27 mm. Por otra parte, Núñez, *et al.*, (2005) en aislamientos bacterianos determinaron cinco cepas de *B. subtilis* mostraron antagonismo contra Fol, determinando el grado de antibiosis midiendo el área de inhibición entre Fol y el microorganismo aislado de la rizosfera.

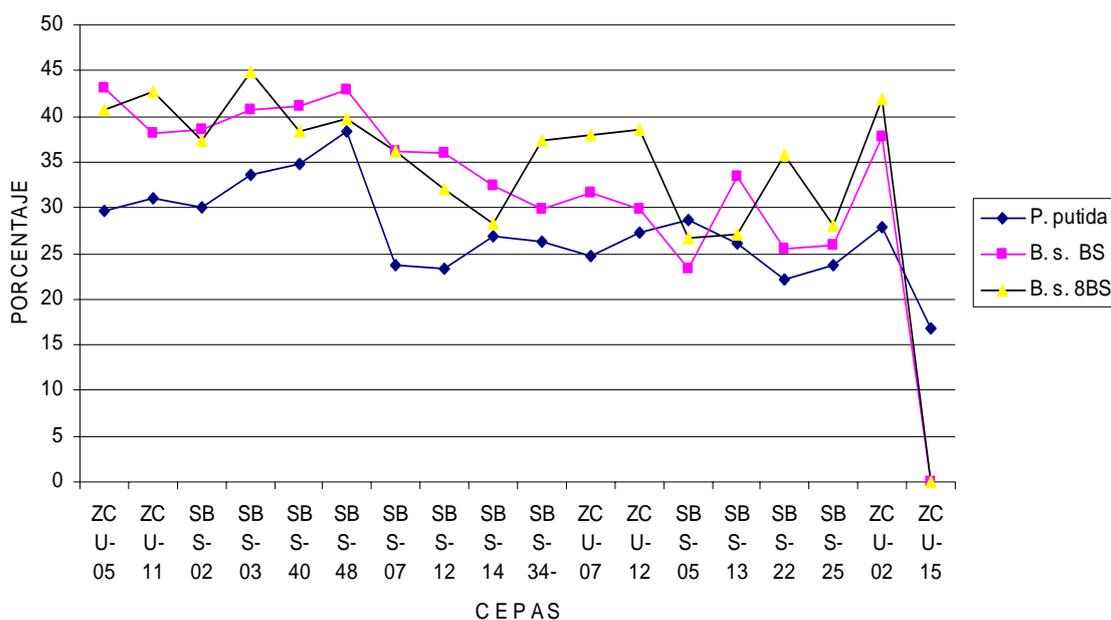


Figura. 10. Inhibición *in vitro* de aislamientos de Fol colectadas en el estado de Nayarit con las bacterias *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* cepa BS y *B. subtilis* cepa 8BS.

Ensayo en invernadero. El mejor tratamiento en relación a la altura de planta fue la cepa 8BS de *B. subtilis* con valores promedios de 45.0, 38.2y 37.4 cm cuando las

plantas se inocularon con las cepas SBS-03, ZCU-02 y SBS-14 respectivamente (figura 11).

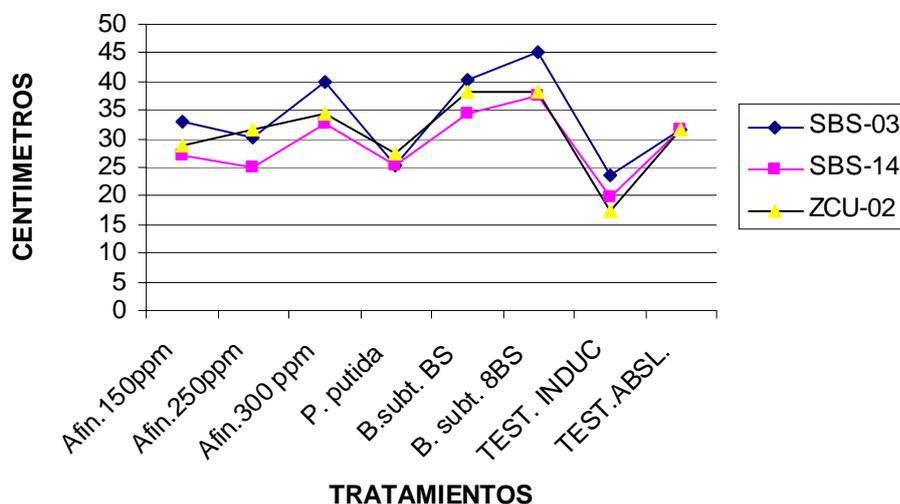


Figura 11. Efecto de altura de plantas de tomate var. Río Grande en invernadero, con cepas *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* del estado de Nayarit.

El testigo inducido, fue el peor tratamiento en relación a la altura de planta con valores promedios de 17.4, 19.9 y 23.7 cm cuando las plantas se inocularon con las cepas ZCU-02, SBS-14 y SBS-03 respectivamente. La media de altura de planta en el testigo absoluto fue de 31.5 cm, aunque fue superado por los tratamientos de las dos cepas de *B. subtilis* y el extracto vegetal en dosis 300 ppm pero estadísticamente fueron iguales. Los tratamientos con *B. subtilis* cepa 8S y *B. subtilis* cepa BS, presentaron los mejores resultados de peso fresco y seco de la raíz sobre las tres cepas de Fol evaluadas (figuras 12 y 13). El testigo inducido y el absoluto no superaron a ningún tratamiento en lo concerniente al peso fresco y seco de la raíz. Se tienen referencias de manejo integrado de enfermedades en invernadero en Marruecos donde Hanafi y Schnitzler (2004) utilizaron el hongo *Penicillium oxalicum* para reducir la incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

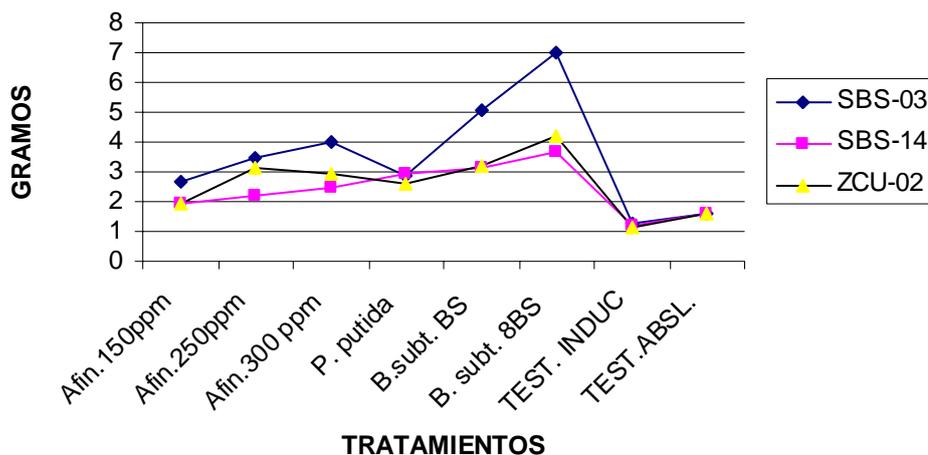


Figura 12. Efecto de peso fresco de la raíz en plantas de tomate var. Río Grande en invernadero, con cepas *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* del estado de Nayarit.

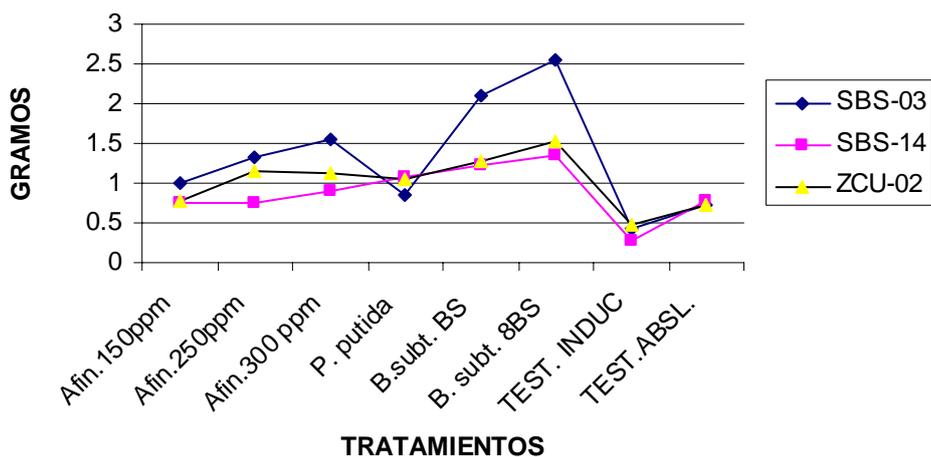


Figura 13. Efecto peso seco de la raíz, en plantas de tomate var. Río Grande en invernadero, con cepas *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* del estado de Nayarit.

El testigo inducido presentó los mayores valores en la escala de severidad con las tres cepas de Fol; el testigo absoluto fue el que presentó los menores valores en la escala de severidad; las bacterias *P. putida* y *B. subtilis* cepa BS y cepa 8BS y el extracto vegetal en dosis 300 ppm, mostraron promedios similares en la escala de severidad (figura 14). En la cepa SBS-03 de Fol todos los tratamientos se comportaron de manera similar a

excepción del testigo inducido que presentó un valor de 3.8 en la escala de severidad. En la cepa ZCU-02 de Fol, el tratamiento extracto vegetal en dosis 250 ppm fue el que tuvo menos efecto sobre la cepa, siendo solamente superado por el testigo inducido. A todos se les aplicó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal- Wallis y el valor estadístico no supero la ji cuadrada tabulada de esta forma las poblaciones tienen la misma distribución y no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

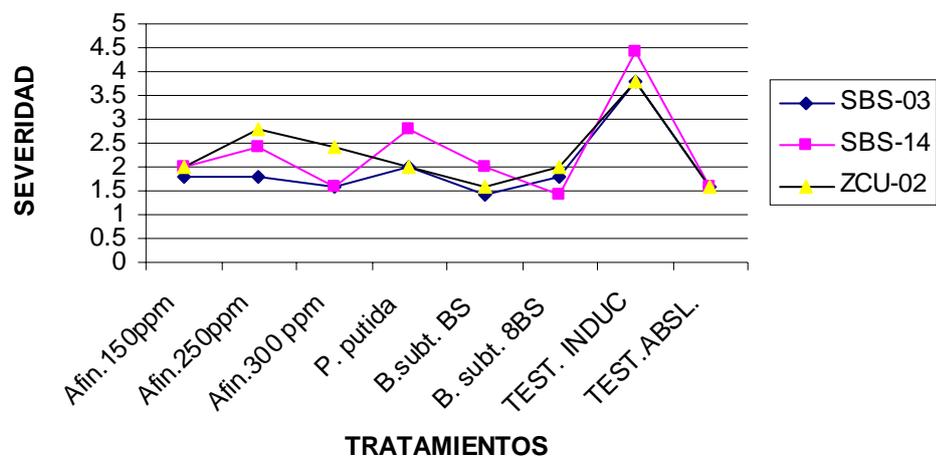


Figura 14. Efecto severidad de la enfermedad de aislamientos de Fol sobre plantas de tomate var Río Grande bajo condiciones de invernadero..

Los resultados del ensayo en invernadero no fueron estadísticamente satisfactorios, la causa puede atribuirse a que los productos aplicados al sustrato no fueron plenamente absorbidos por las raíces y traslocarse eficientemente hacia la planta de tomate, por medio de los vasos del xilema; o bien, los tratamientos aplicados no tuvieron el efecto esperado sobre los propagulos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol).

CONCLUSIONES

Con la técnica de la PCR fue posible detectar los 18 aislamientos y 3 razas de referencia pertenecen de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Mediante la técnica de RFLP's fue posible ubicar a los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) en el Grupo de Compatibilidad Vegetativa (GCV) 0030 y se puede inferir que pertenecen a las razas 2 y 3.

Mediante la técnica de RAPD's, fue posible diferenciar todos los aislamientos colectados, excepto las cepas SBS-22 y SBS.25.

El efecto inhibitorio *in vitro* del extracto vegetal *H. longipes* fue superior al antagonismo producido por las bacterias *P. putida* y *B. subtilis*, contra las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) colectadas en el estado de Nayarit.

La bacteria *B. subtilis* cepa 8BS fue la que mostró mejor efecto antagónico en el experimento invernadero.

LITERATURA CITADA

- Almeyda, L I.H., Rocha, P. M.A., Piña, R.J. y Martínez, S. J.P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of Phytoplasma sp. in different plant species in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 1-9.
- Cai G; Gale L.R.; Schenider R.W.; Kistler H.C.; Davis R.M.; Elias K.S. and Miyao E.M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology 93: 1014-1022.
- Carrillo-Fasio José Armando, Montoya-Rodríguez Teofilo de Jesús, García-Estrada Raymundo Saúl, Cruz-Ortega Jacobo Enrique, Márquez-Zegueria Isidro y Sañudo-Barajas Adriana Josefa. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. Volumen 21, Número 2, 123-127.
- Eurya K.E. e Luiz de Souza N. (2002) Variabilidade genética entre *formae speciales* de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* a través de RAPD e seqüências de regiões ITS e rDNA. Acta Scientiarum. Maringá, V. 24, N. 5 P. 1481-1485. Sao Paulo, Brasil.

- Gale, L.R.; Katan, T. and Kistler, H.C. 2003. The probable center of origin of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* VCG 0033. Plant Disease 87: 1433-1438
- Hanafi A. y Schnitzler W.H. (2004). Integrated Production and Protection in Greenhouse Tomato in Morocco. Proc. VII on Prot. Cult. Mild Winter Climates. Eds. D.J. Cantliffe, P.J. Stoffella & N. Shaw. Acta Hort. 659, 295-300.
- Holguín-Peña R.J. 2005. Fusarium Wilt of Tomato Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 in Baja California Sur, México. Plant Disease 89:1360, 2005.
- French, R.E., and Hebert, T.T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Ed. IICA. San José, Costa Rica. Pp.176-177.
- Luna-Paez A., Silva-Rojas H.V., Marbán-Mendoza N. y Valadez-Moctezuma E. Variabilidad Genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. :Fr. f.sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato Mediante PCR-RAPD's en el Bajío, México. Revista Mexicana de Fitopatología. Volumen 22, Número 1, 44-51.
- Monda E.O. 2002. Biological control of *Fusarium* wilt of tomato-A review. Journal of Tropical Microbiology. Vol. 1.2002. 74-78.
- Núñez-Cebreros Rey David y Zavaleta-Mejía Emma. 2004. Antagonismo *in vitro* de microorganismos de la rizósfera de tomata contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* . XXXI Congreso Nacional de Fitopatología, VI Congreso Internacional de Fitopatología. Resumen largo no. 65. Veracruz, Veracruz, México. 25-28 de julio de 2004.
- Núñez-Cebreros R. D., Félix-Castro G. y Soto-Carrillo M.A. (2005) Antagonismo *in vitro* Tukey ($\alpha= 0.05$) de microorganismo de la rizósfera de tomate contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Memorias. XXXII Congreso Nacional de Fitopatología. VII Congreso Internacional de Fitopatología. Resumen largo No. 36. Chihuahua, Chih. México. 26 al 29 de septiembre de 2005.
- Ramírez-Chávez R., Lucas-Valdez L., Virgen-Calleros G. y Molina-Torres J. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. Revista Científica Agrociencia 34: 207-215.
- Reis Ailton; Costa Helcio; Boiteux Leonardo S. y Lopes Carlos A. 2005. First report of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. Fitopatologia Brasileira Vol- 30. No. 4. Brasilia July-Aug. 2005. sociedad Brasileira de Fitopatologia.
- Sheu Z.M. and Wang T.C. 2006. First Report of Race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici*, the Causal Agent of Fusarium Wilt on Tomato in Taiwan. Plant Disease 90:111, 2006.
- Solis Gaona Susana. 2002. Efecto del extracto vegetal de *Heliopsis longipes* sobre hongos fitopatógenos e índices de crecimiento del cultivo de papa. Tesis de

Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila México Diciembre 2002.

Sosa P. R., Cárdenas C. H.M., Siordia G. M., Berrelleza A. T.J. y Velarde F. S. (2005) Antagonismo “ *in vitro* ” de aislados de *Bacillus* contra la raza 3 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Control Biológico. San Miguel de Allende; Gto. México 17 y 18 de noviembre de 2005. Pags. 327-329.