

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**PRODUCCIÓN DE ANTISUEROS PARA LA DETECCIÓN DE
HONGOS FITOPATÓGENOS EN TOMATE EN EL ESTADO DE
SONORA**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

M.C. FRANCISCO ELEAZAR MARTÍNEZ RUÍZ

DIRECTORA

DRA. LOURDES CERVANTES DÍAZ

Co-DIRECTOR

DR. EDGAR OMAR RUEDA PUENTE

La presente tesis “Producción de antisueros para la detección de hongos fitopatógenos en tomate en el estado de Sonora” realizada por el C. Francisco Eleazar Martínez Ruíz, dirigido por la Dra. Lourdes Cervantes Díaz, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

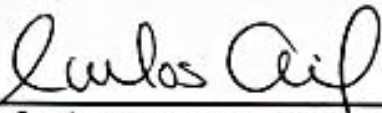
Comité Particular



Dra. Lourdes Cervantes Díaz
Director de Tesis



Dr. Edgar Omar Rueda Puente
Co-Director de Tesis



Dr. Carlos Enrique Ail Catzim
Sinodal



Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Sinodal



Dr. Onectimo Grimaldo Juárez
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por otorgarme la beca doctoral, la cual fue indispensable para la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en especial al Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA-UABC) por permitirme realizar mi investigación doctoral, ayudándome en esta etapa a cumplir con mi preparación profesional.

Al Departamento de Agricultura y Ganadería, de la Universidad de Sonora (DAG-UNISON) por permitirme utilizar sus instalaciones en el laboratorio de salinidad, para la realización de la presente investigación.

A la Dra. Lourdes Cervantes Díaz y Al Dr. Edgar O. Rueda Puente y por formar parte de la dirección y codirección del trabajo doctoral, por su apoyo y guía durante esta etapa.

Al Dr. Carlos E. Ail Catzim por su asesoría en mi comité, por sus aportaciones y consejos durante la presente investigación doctoral.

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel por su aportación y formar parte de este trabajo.

Dr. Onecimo Grimaldo Juárez por su aportación al formar parte de la presente investigación.

Al Ing. Jesús J. Reyes Pérez, Dr. Juan José Ponce, Ing. Alejandrina Becerril e Ing. Jorge León por el apoyo al acercamiento a productores agrícolas y por su aportación de material vegetal para la realización de la investigación en la presente tesis.

Lic. Sandra Luz Rojas Carranza por su apoyo en los trámites durante el proceso de aceptación en el programa hasta su conclusión.

A los proyectos de Investigación: por el financiamiento en la realización de la investigación doctoral.

1. IMPLEMENTACION DE LABORATORIOS PARA EL DIAGNOSTICO FITOSANITARIO Y MICROORGANISMOS DE INOCUIDAD ALIMENTARIA, PRODUCCION DE BIOFERTILIZANTES CON ACTIVIDAD ANTAGONICA Y PROMOTORA VEGETAL Y EXTRACTOS DE PLANTAS SILVESTRES COMO MEDIDAS PREVENTIVAS DE CONTROL FITOSANITARIO. CLAVE: USO313001210- REGISTRO POR CESPA DE LA UNIVERSIDAD DE SONORA.

2. DETECCION DE ENFERMEDADES BACTERIANAS DE IMPORTANCIA CUARENTENARIA EN MATERIAL VEGETATIVO DE IMPORTACION EN ZONAS AGROPRODUCTORAS. CLAVE AGIRE 12051. REGISTRO POR CESPA DE LA UNIVERSIDAD DE SONORA.

DEDICATORIA

A Dios principalmente, porque tuve muchos motivos que me hicieron pensar en abandonar todo, pero él siempre me tomó de su mano, a Dios le debo este gran logro, aunque a veces no esté de acuerdo con el...GRACIAS DIOS.

A mis amigos Noé Ortiz, Jesús Islas, Cristian y Armando Valenzuela, Jorge Figueroa, Esmeralda Valenzuela y Alejandrina Becerril. Gracias por su apoyo.

A mis tíos y primos que siempre tuvieron una palabra de aliento para mí.

A mi compañera y gran amiga Gabriela Andrade, a toda su familia.

Quiero resaltar que dedico un especial agradecimiento a mi familia que siempre estuvo al pendiente de que pudiera cumplir mi objetivo, gracias Papá, gracias Mamá, gracias a mi hermana Luisa, Valeria y Ramoncito por esperar a que su tío terminará por fin los estudios y poder ahora sí estar más tiempo con ustedes. Igual quiero mencionar, sobre todo, que va mi más profundo agradecimiento a mi gran colega, mi mejor amigo, mi hermano el Ingeniero Ramón Enrique Martínez Ruiz, a quien siempre admiré y respeté. A él, quien tenía mucho cariño por esta tarea que me eché auestas, creía con admiración y fe, que llegaría a cumplir mi sueño, que era también su sueño. No alcanzaste a ver que lo logramos juntos; abrazo tu recuerdo y todo lo que compartimos, gracias por creer en mí. Hermano, esto va por ti, mil gracias por estar conmigo siempre.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
CAPÍTULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
BIBLIOGRAFÍA.....	3
CAPÍTULO II.....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Importancia económica del cultivo de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	6
2.2 Detección e identificación de hongos fitopatógenos en cultivos.....	7
2.2.1 Aislamiento en medios de cultivo selectivos.....	7
2.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	8
2.2.3 Pruebas serológicas.....	9
2.2.3.1 Método por aglutinación.....	9
2.2.3.2 Método por precipitación.....	9
2.2.3.3 Método del látex.....	10
2.2.3.4 Técnica de Inmunofluorescencia.....	10
2.2.3.5 Técnica inmunoenzimática ELISA.....	10

BIBLIOGRAFÍA.....	12
CAPÍTULO III (Artículo 1).....	15
Hongos fitopatógenos asociados al tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) en la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico...	15
3.1 RESUMEN.....	15
3.1.2 ABSTRACT.....	16
3.2 INTRODUCCIÓN.....	16
3.3 El cultivo de tomate en el Noroeste de México	18
3.4 Elementos básicos del diagnóstico.....	22
3.5 Interferencia fisiológica del agente causal de enfermedad y expresión de síntomas.....	23
3.6 Los hongos como agentes causales de enfermedades.....	25
3.7 Podredumbre gris (<i>Botryotinia fuckeliana</i> (De Bary) Whetrel. Ascomycetes: Helotiales. anamorfo: <i>Botrytis cinerea</i> Pers.).....	25
3.8 Tizón temprano <i>Alternaria solani</i> (Ell. and Mart.) Jones and Grout. Clase: Deuteromycetes, Orden: Hyphales (Moniliales), Familia: Dematiaceae).....	27
3.9 Oidio, Cenicilla U Oidiopsis (<i>Leveillula taurica</i> (Lev.) Arnaud).....	28
3.10 Tizón tardío <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary. Phycomycetes: Peronosporales. Pythiaceae	30
3.11 Ahogamiento de Plántulas y Necrosis Radicular <i>Pythium aphanidermatum</i> (Edson) Fitzp. Oomycetes.....	31
3.12 Marchitez vascular <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> (Sacc.) Snyder y Hansen. Ascomycota.....	33
3.13 Podredumbre de cuello y raíz <i>Rhizoctonia solani</i> Kühn (Basidiomycetes:	34

Hymenomycetes).....	
3.14 CONCLUSIÓN.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	41
CAPÍTULO IV (Artículo 2).....	50
Producción de antisuero contra <i>fusarium oxysporum</i> f. Sp. <i>lycopersici</i> (r1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i> para su detección en el cultivo de <i>solanum lycopersicum</i> (l.) En Sonora, México.....	50
4.1 RESUMEN.....	50
4.1.1 ABSTRACT.....	51
4.2. INTRODUCCIÓN.....	51
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
4.3.1 Incremento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinérea</i>	53
4.3.2 Producción de antisuero.....	55
4.3.3 Obtención de semilla de tomate de importación que se siembra el Estado de Sonora.....	58
4.3.4 Muestreo en plantas (plántula, hoja desarrollada y fruto).....	58
4.3.5 Detección de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i> en semilla de importación en medios de cultivo.....	59
4.3.6 Detección de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i> en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto con el Antisuero Producido.....	59
4.3.7 Detección de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i> en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica ELISA.....	60

4.3.8 Pruebas de patogenicidad de aquellos muestras positivas a <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinérea</i> , con los diferentes métodos de detección.....	60
4.4 RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	60
4.4.1 Pruebas de identificación.....	61
4.4.2 Producción de antígeno contra <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinérea</i>	63
4.4.3 Detección de <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i> en el Estado de Sonora.....	64
4.4.4 Muestreo de plántula, hoja desarrollada y fruto en lotes comerciales.....	65
4.4.5 Pruebas de patogenicidad a los hongos positivos en muestras vegetativas mediante los tres métodos de detección.....	66
4.4.6 Pruebas de patogenicidad a los hongos positivos en muestras vegetativas mediante los tres métodos de detección.....	66
4.5 CONCLUSIONES.....	72
4.6 AGRADECIMIENTOS.....	72
4.6 BIBLIOGRAFÍA.....	73
CONCLUSIONES GENERALES.....	79

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Tres esquemas de inmunización utilizados en la producción de antisuero contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i> en conejos tipo Nueva Zelanda.....	56
Cuadro 2. Preparación de tubos con solución salina al 0.85% (NaCl) con adición de antígeno y antisuero para titulación.....	57
Cuadro 3. Presencia de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i> en semilla de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), proporcionada por productores de las regiones muestreadas en el estado de Sonora, México.....	68
Cuadro 4. Presencia de <i>fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (R1), <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i> en plántula, hojas y frutos de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.), muestreados en las regiones muestreadas en el estado de Sonora, México.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Hongo <i>Botrytis cinerea</i> en tallo de plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	37
Figura 2. Hongo <i>Alternaria solani</i> en hojas de plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	37
Figura 3. Hongo <i>Leveillula taurica</i> en hojas de plantas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	38
Figura 4. Hongo <i>Phytophthora infestans</i> en fruto y tallo de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	38
Figura 5. Hongo <i>Pythium aphanidermatum</i> en raíz y planta de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	39
Figura 6. . Hongo <i>Fusarium oxysporum</i> en tallo de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	39
Figura 7. Hongo <i>Rhizoctonia solani</i> en plántula de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	40

RESUMEN

En la República Mexicana, específicamente en el estado de Sonora, México, la superficie dirigida a hortalizas solanáceas, entre las que se encuentra el cultivo de tomate, ha aumentado considerablemente en los últimos años. En los últimos ciclos de producción, se ha generado una problemática de control fitosanitario, donde los síntomas de patógenos conocidos, se confundan con aquellos de fitopatógenos nuevos que están arribando a las áreas agrícolas, permitiendo que el técnico tenga incertidumbre de que patógeno se trata y por consiguiente no tenga éxito al aplicar un control en el cultivo. Acudiendo a servicios profesionales en laboratorios fitosanitarios; sin embargo, la demanda es demasiado, suele ser una vía incosteable al productor, por lo cual se realizó un muestreo en el 10% del total de la superficie cultivable de cuatro de los municipios productores de tomate. Se identificó el agente causal sobre los órganos muestreados. Se produjo antisueros, inoculando conejos con los patógenos obtenidos concentración 10^{10} esporas/mL analizando tres esquemas de inmunización y prueba de patogenicidad por medio de aglutinación. El objetivo de la presente investigación propone evaluar la producción de antisueros específicos contra fitopatógenos de importancia económica aislados del cultivo de tomate en la Costa de Hermosillo. Los resultados en el presente estudio indican que la producción de antisueros con base a los hongos evaluados (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinérea*), mediante tres vías de inmunización (intravenosa, subcutánea, intramuscular), la más eficiente fue la intravenosa, debido a la alta titulación obtenida. Los hongos utilizados en la inmunización, respondieron de similar forma a la vía intravenosa. El diagnóstico de enfermedades de plantas es un arte y una ciencia, que requiere de conocimiento científico de la fitopatología y disciplinas conexas. Se recomienda que al momento de emitir un diagnóstico fitosanitario, no omitir técnicas de diagnóstico alternativas a la de antígeno-anticuerpo.

Palabras clave: Hongos, Fruto, Raíz, Antisuero, Conejos, Diagnóstico

ABSTRACT

In the Mexican Republic, specifically in the state of Sonora, Mexico, the area directed to the cultivation of solanaceous type vegetables, among which is the tomato crop, has increased considerably in recent years. In the last production cycles, a problem of phytosanitary control has been generated, where the symptoms of known pathogens are confused with those of new phytopathogens that are arriving in the agricultural areas, allowing the technician to have uncertainty of which pathogen is treated and therefore does not succeed in applying a control to the crop. Going to professional services in phytosanitary laboratories; however, too much demand, is usually an incostable route to the producer, due to the high economic cost that requires requesting them. Sampling will take place in 10% of the total arable area of four tomato producing municipalities. The causal agent will be identified on the sampled organs. Antisera will be produced, inoculating rabbits with the pathogens obtained, concentration 10^8 spores · mL, analyzing three different immunization schedules and carrying out the pathogenicity test by means of agglutination. The objective of the present investigation is to evaluate the production of specific antisera against phytopathogens of economic importance isolated from the tomato crop in the Costa de Hermosillo. The results in the present study indicate that the production of antisera based on the assessed fungi evaluated (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*), through three immunization routes (intravenous, subcutaneous, and intramuscular), and the most efficient was intravenous, due to the high degree obtained. The fungi used in the immunization responded in a similar way to the intravenous route. The diagnosis of plant diseases is an art and a science, which requires scientific knowledge of phytopathology and related disciplines. It is recommended that when issuing a phytosanitary diagnosis, do not omit alternative diagnostic techniques to antigen-antibody

Keywords: Fungi, Fruit, Root, Antiserum, Rabbits, Diagnosis.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las enfermedades que afectan al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) constituyen una limitante para su producción en muchas partes del mundo, actualmente existen cerca de 58 enfermedades de causas y etiologías diversas que atacan a este cultivo. Entre estas, destacan las causadas por su importancia los hongos fitopatógenos, los cuales presentan una gran variación morfológica, patogénica y de adaptación a diversas condiciones climáticas, por lo cual tienen la capacidad de atacar al cultivo en diferentes etapas de desarrollo (Aguado *et al.*, 2009; Fernández-Herrera *et al.*, 2014). En México, el tomate es una de las principales hortalizas de exportación ocupando el 73% de la producción de hortalizas que se cultiva principalmente en grandes extensiones de los estados del Noroeste y Occidente (Ríos-Osorio *et al.*, 2014). En el Noroeste de México, específicamente en el Estado de Sonora, su producción se ha visto afectada por la aparición de enfermedades que causan pérdidas hasta de 100 % (Borboa-Flores *et al.*, 2009).

La utilización de fungicidas en la agricultura es la principalmente utilizada para el control de enfermedades, práctica que se ha extendido, considerada esencial para lograr mejores condiciones de cultivo. Sin embargo, la lista de productos químicos utilizados incluye algunas peligrosas con dosis cada vez más altas, creando resistencia a ciertos microorganismos (Villacís-Aldaz *et al.*, 2017). Los problemas fitosanitarios y el mal uso de agroquímicos se han acrecentado debido, en parte, a la falta de un diagnóstico certero y oportuno que permita a los productores manejar apropiadamente el impacto de las enfermedades. Tradicionalmente, la observación de síntomas por el técnico de campo o el propio productor ha sido la estrategia para diagnosticar y tratar las enfermedades, lo cual no es lo más apropiado ya que diferentes patógenos pueden provocar enfermedades con sintomatología similar, o bien ésta puede deberse a la conjunción de un patógeno con algún factor abiótico, como toxicidad de agroquímicos o deficiencia-exceso de ciertos minerales del suelo. Es decir, el diagnóstico correcto del agente causal del problema es clave para el manejo integrado de enfermedades (Borboa-Flores *et al.*, 2009; Leyva-Mir *et al.*,

2013). Entre los principales hongos fitopatógenos asociados al cultivo de tomate en la región Noroeste de México destacan algunos como *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Leveillula taurica*, *Phytophthora infestans* y *Pythium* sp. (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2013; Cordero-Ramírez *et al.*, 2012; Guzmán-Plazola *et al.*, 2011; Grijalva-Contreras *et al.*, 2014; Peñuelas-Rubio *et al.*, 2017). Actualmente existen métodos empleados para la detección e identificación de dichos patógenos entre los cuales se encuentran el aislamiento en medios de cultivo semiselectivos, los serológicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Corzo-López *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesario buscar una técnica que cumpla las características de ser práctica, económica y reproducible.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado G., del Castillo, J., Uribarri, A., de Galdeano, J. S., Sádaba S., y Astiz, M. 2009. Pepino de invernadero. Navarra agraria. España. pp. 45-48.
- Arellano-Rodríguez L. J., Rodríguez-Guzmán E., Ron-Parra J., Martínez-Ramírez J. L., Lozoya-Saldaña H., Sánchez-Martínez J. y Rogelio-Lépiz I. 2013. Evaluación de resistencia a *Phytophthora infestans* en poblaciones silvestres de *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 4(5): 753-766.
- Borboa-Flores J.; Rueda-Puente E. O., Acedo-Félix E.; Ponce J. F.; Cruz M.; Grimaldo-Juárez O. y García-Ortega A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie michiganensis en el tomate del estado de Sonora, México. Revista Fitotecnia Mexicana. 32(4): 319-326.
- Cordero-Ramírez J. D., López-Rivera R., Calderón-Vázquez C. L., Figueroa-López A. M., Martínez-Álvarez J. C., Leyva-Madrigal, K. Y., Cervantes-Gámez R. G. y Maldonado-Mendoza I. E. 2012. Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 83(3): 712-730.
- Corzo-López M., Rivero-González D., Zamora-Gutiérrez, L., Martínez-Zubiaur, Y. y Martínez-Coca B. 2015. Detección e identificación de nuevos aislados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* en cultivares de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en la provincia Mayabeque, Cuba. Revista de Protección Vegetal. 30(2): 97-103.

- Fernández-Herrera E., Guerrero-Ruiz J. C., Rueda-Puente E. O. y Acosta-Ramos M. 2013. Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Biotecnia*. 15(3): 46-50.
- Grijalva-Contreras R. L., Macías-Duarte R., Grijalva-Durón S. A., Núñez-Ramírez F., y Robles-Contreras F. 2014. Productividad de cultivares de tomate cherry bajo condiciones de invernadero en el noroeste de Sonora. *Biotecnia*. 16(2): 27-30.
- Guzmán-Plazola R. A., Fajardo-Franco M. L., García-Espinosa R. y Cadena-Hinojosa M. A. 2011. Desarrollo epidémico de la cenicilla y rendimiento de tres cultivares de tomate en la comarca lagunera, Coahuila, México. *Agrociencia*. 45(3): 363-378.
- Leyva-Mir S. G., González-Solano C. M., Rodríguez-Pérez J. E. y Montalvo-Hernández D. 2013. Comportamiento de líneas avanzadas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a fitopatógenos en Chapingo, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*. 19(3): 301-313.
- Peñuelas-Rubio O., Arellano-Gil M., Verdugo-Fuentes A. A., Chaparro-Encinas L. A., Hernández-Rodríguez S. E. y Martínez-Carrillo J. L. 2017. Extractos de *Larrea tridentata* como una estrategia ecológica contra *Fusarium oxysporum radialis-lycopersici* en plantas de tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2(2): 1-17.
- Ríos-Osorio O., Chávez-Servia J. L., y Carrillo-Rodríguez J. C. 2014. Producción tradicional y diversidad de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) nativo: un estudio de caso en Tehuantepec-Juchitán, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*. 11(1): 35-51.

Villacís-Aldaz L. A., León-Gordon O., Santana-Mayorga R., Mangui-Tobar J., Carranza G. y Pazmiño-Miranda P. 2017. Actividad anti fúngica (*in vitro*) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). Journal of the Selva Andina Biosph. 5(1): 59-64.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.).

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más cultivadas en el mundo y se ha convertido de gran importancia económica. Su producción y consumo se incrementan constantemente, teniendo en el 2013 una producción de más de 163 millones de toneladas y un área cultivada de casi 5.1 millones de hectáreas (Espinosa-Palomeque *et al.*, 2017; Rodríguez-Valdés *et al.*, 2017).

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura los diez principales productores en el mundo de tomate fresco al 2013 fueron: China, India, Estados Unidos de América (EUA), Turquía, Egipto, Irán, India, Brasil, España y México. China Continental es el mayor productor con el 40.78%, seguido de la India con el 14.70%, EUA 10.14%, México ocupa el décimo sitio con una participación en la producción del 2.65% (FAO, 2017)

En México, el cultivo de tomate se encuentra en el primer lugar entre los productos agroalimenticios de exportación, representando una oportunidad rentable de inversión por su gran valor económico y demanda agregada. En los últimos años la cantidad de hectáreas sembradas y cosechadas ha aumentado en forma paulatina, repercutiendo en el incremento de la producción en cantidad de toneladas por año, tan solo en el año 2014, la producción de tomate en México fue de aproximadamente 2, 326,000 t, de la producción total. A nivel nacional el estado de Sonora aportó un 4% (Álvarez-Medina *et al.*, 2017; SIAP, 2015).

La producción de tomate a nivel mundial se ve afectada por enfermedades que constituyen una limitante para su producción, actualmente existen cerca de 58 enfermedades de causas y etiologías diversas que atacan a este cultivo, entre los microorganismos causantes destacan por su importancia los hongos fitopatógenos, los cuales presentan una gran variación morfológica, patogénica y de adaptación a diversas condiciones climáticas, por lo cual tienen la capacidad de infectar al cultivo en diferentes etapas de desarrollo, los hongos se encuentran de forma natural en suelos agrícolas, ocasionando solos o en grupo, pudriciones de raíz y cuello en las plantas de tomate, lo que en ocasiones complica el diagnóstico en campo (Fernández-Herrera *et al.*, 2013).

2.2 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATOGENOS EN CULTIVOS

La identificación tradicional de los hongos han sido por medio de claves taxonómicas basadas en caracteres morfológicos como la reproducción vegetativa, tipo de esporulación, aspecto de colonia, etc. Estas técnicas de identificación son complejas y en algunos casos se pueden obtener clasificaciones incorrectas (Cuervo-Parra *et al.*, 2014).

Actualmente existen varios métodos de detección e identificación de hongos entre los cuales se encuentran el aislamiento en medios de cultivo semiselectivos, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y serológicos.

2.2.1 Aislamiento en medios de cultivo selectivos

Para el cultivo de hongos se utilizan los medios de cultivo los cuales son mezclas que proporcionan nutrimentos requeridos para el desarrollo, normalmente se emplean medios de cultivo sólidos con agar. El medio de cultivo que se utiliza depende de la especie de hongo que se quiere cultivar, ya que cada especie tiene sus propios requerimientos nutricionales (Domínguez-Romero *et al.*, 2013).

Los medios de cultivo se vierten en cajas petri o en tubos inclinados, los primeros ofrecen la ventaja de tener mayor superficie para el desarrollo del hongo y se utilizan para trabajos rutinarios de aislamiento, aspecto del cultivo, velocidad del crecimiento, etc. La siembra se realiza con el fin de aislar o replicar los hongos para su uso inmediato o mantenerlos viables un tiempo corto. La siembra o aislamiento del cultivo puro consiste en dejar crecer el hongo bajo condiciones que pueda desarrollar y esporular convenientemente, existen varias claves de identificación de hongos, la caractreización morfológica se basa en la descripción de la colonia (macroscópica) así como la estructura del hongo (microscópica) (Cañedo Ames, 2004). La identificación preliminar de fitopatógenos basada en estudios taxonómicos de los hongos y su patología sobre hospedero requiere tiempo y experiencia considerables (Lafuente-Rincón *et al.*, 2016; Llorens *et al.*, 1997).

2.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR permite la amplificación de ciertas regiones de ADN *in vitro* (en condiciones controladas), a partir de muy pequeñas cantidades del ADN del hongo. Los fragmentos de ADN amplificados por PCR pueden ser analizados mediante una serie de técnicas moleculares complementarias, que permiten establecer patrones únicos y estables (Llorens *et al.*, 1997). La PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: 1.-Desnaturalización del ADN de doble cadena. 2.-Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras. 3.-Extensión del iniciador por actuación de la ADN polimerasa (Rivas-Figueredo *et al.*, 2008).

La principal ventaja de la PCR es que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de una o muy pocas copias del ADN molde. Es una técnica muy robusta debido, en gran medida, a la gran capacidad de los oligonucleótidos de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de ADN discriminando fácilmente entre centenares de millares de sitios. La principal desventaja es la necesidad de estandarizar la técnica para el

organismo o la técnica de interés, lo cual puede ser tardado y costoso (Serrato-Díaz *et al.*, 2014).

2.2.3 Pruebas serológicas

El uso de inmunoensayos en la detección de patógenos de plantas ha sido rutinario en los últimos años (Alvarado *et al.*, 2015; Rivas-Figueroa *et al.*, 2008). Entre los métodos serológicos más usados están:

2.2.3.1 Método por aglutinación

Consiste en hacer reaccionar cantidades equivalentes de los reactantes (Ag y Ac). La formación de gránulos aglutinados o agregados indica una reacción positiva (Rivas-Figueroa *et al.*, 2008). Las reacciones de aglutinación y de precipitación son la base de la mayoría de las técnicas inmunológicas. Su principio se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Siendo un antígeno una sustancia de alto peso molecular, con cierta rigidez estructural y que tiene la particularidad de ser parcialmente metabolizado por células especializadas llamadas macrófagos, por lo tanto es capaz de generar una respuesta inmune en un organismo que la detecte como un agente extraño. Mientras que un anticuerpo es una glicoproteína, producida por linfocitos B activados, llamados células plasmáticas, como respuesta a la presencia de un antígeno en el organismo, a su vez los anticuerpos pueden ser producidos por líneas celulares *in vitro*, como es el caso de la producción de anticuerpos monoclonales. Dichos anticuerpos llamados también inmunoglobulinas, se presentan en cinco clases principales, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, que se diferencian entre sí por sus características físicas, químicas y biológicas (Aguilar, 2004).

2.2.3.2 Método por precipitación

Pueden ser en medios líquidos o en geles. Estos métodos han demostrado tener una notable eficacia para individualizar y purificar los antígenos dotados de

diferencias particulares. La unión del Ag y Ac se traduce por la formación de un precipitado insoluble con la condición que los reactivos se encuentren a concentración equivalente (Rivas-Figueroa *et al.*, 2008).

2.2.3.3 Método del látex

Está basado en la prueba de aglutinación. Los Ac son adheridos a partículas de látex. Al combinarse el látex sensibilizado con el Ag específico se produce la agregación entre estas esferas y los Ag. Esta prueba ha sido usada principalmente en virología (Rivas-Figueroa *et al.*, 2008).

2.2.3.4 Técnica de Inmunofluorescencia

Esta técnica se basa en la conjugación de anticuerpos específicos con moléculas teñidas con productos, como la fluoresceína, que produce un color verde amarillento. Es muy sensible para identificar bacterias fitopatógenas y útil para analizar un gran número de muestras (Rivas-Figueroa *et al.*, 2008). En la inmunofluorescencia directa (IFA), anticuerpos específicos contra el patógeno son conjugados con moléculas fluorescentes, comúnmente isotiocianato de fluoresceína (FITC) o isotiocianato de rodamina (RITC). La presencia o ausencia de antígeno en la muestra se detecta mediante microscopía de fluorescencia. Actualmente existen paquetes de detección comerciales para una gran diversidad de virus, bacterias, hongos y otros patógenos. Es un método útil en la detección y diagnóstico de enfermedades (Torres-Pacheco *et al.*, 2008).

2.2.3.5 Técnica inmunoenzimática ELISA

El ensayo se basa en la interacción específica de un antígeno (patógeno) y un anticuerpo (proteínas inmunoglobulinas producidas en un vertebrado superior,

usualmente conejos). La reacción se visualiza a través de la acción de un conjugado enzima-anticuerpo sobre un sustrato. Es un método rápido de gran sensibilidad, especificidad y bajo costo, que supera a muchas técnicas de diagnóstico empleadas con anterioridad. Existen diferentes variantes de la técnica de ELISA, todas basadas en el mismo principio. El tipo de técnica y anticuerpo a emplear dependerá del objetivo de la aplicación (campo, laboratorio), tipo de muestra (suelo, agua tejido) y nivel de sensibilidad y rapidez requerida. La técnica ELISA con sándwich de doble anticuerpo es una de las más empleadas, en este caso el antígeno es ubicado entre dos anticuerpos específicos, el de captura y el de marcaje, este último está conjugado a una enzima y puede cuantificarse en el espectrofotómetro. Esta técnica es de gran utilidad en la detección de patógenos de mezclas complejas, tales como, suelo, extractos de plantas, entre otros (Barrera *et al.*, 2016; Rivas-Figueroa *et al.*, 2008).

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar G. V. 2004. Reacciones de aglutinación. Gaceta Médica México. 140(3): 50-52.
- Alvarado P., Ostos A., Franquiz N., Roschman-González A., Zambrano E. A. y Mendoza M. 2015. Diagnóstico serológico de la esporotricosis mediante el empleo del antígeno de micelio de *Sporothrix schenckii* sensu stricto. Investigación Clínica.56(2): 111-122.
- Álvarez-Medina M. T., Núñez-Ramírez M. A. y Wendlandt-Amezaga T. R. 2017. Caracterización de la cadena de valor del tomate rojo fresco en México. Global de negocios. 5(3): 45-58.
- Barrera W. P., Miraval M. V., Bravo M. B., Andrade-Piedra J. & Forbes G. A. 2016. Pests and diseases affecting potato landraces and bred varieties grown in Peru under indigenous farming system. Revista Latinoamericana de la Papa. 19(2): 29-41.
- Cañedo V. y Ames T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. International Potato Center. Centro internacional de papa. Lima Perú. 18-35.
- Cuervo-Parra J. A., Romero-Cortes T., López-Pérez P. A. y Ramírez-Lepe M. 2014. El cultivo del cacao, enfermedades, identificación de hongos, modelado y métodos de control. Facultad de ciencias agrarias UNCUYO. 58: 1-8.
- Domínguez-Romero D., Vázquez-Rivera H., Reyes-Reyes B. G., Arzaluz-Reyes, J. I. y Martínez-Campos A. R. 2013. Aislamiento y purificación del hongo

ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 16(1): 51-59.

Espinosa-Palomeque B., Moreno-Reséndez A., Cano-Ríos P., Álvarez -Reyna V. D. P., Sáenz- Mata J., Sánchez -Galván H. y González -Rodríguez G. 2017. Inoculación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. afroditita en -invernadero. *Terra Latinoamericana*. 35(2): 170-178.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura). 2017. Statistics Report. from <http://www.fao.org/statistics/en/> y <http://faostat3.fao.org/> consulta:10 Marzo 2017.

Fernández-Herrera E., Guerrero-Ruiz J. C., Rueda-Puente E. O. y Acosta-Ramos M. 2013. Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Biotecnia*. 15(3): 46-50.

Lafuente-Rincón D., Barboza-Corona J.E., Salcedo-Hernández R., Abraham-Juárez R., Valadez-Lira J.A., Quistián-Martínez D. y De la Fuente-Salcido N. M. 2016. Identificación molercular de hongos fitopatógenos de fresa por pcr (its y ef-1 α) y susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1(1): 417-422.

Llorens V., Martín M. P. y Hidalgo E. 1997. PCR: Una nueva herramienta para el estudio de hongos ectomicorrícicos. *Revista Catalana de Micología*. (20): 187-197.

Rivas-Figueroa E., de Armas-Vargas Y., Elías-Barreto R.R., Alonso-Hernández L., Ramírez-Medina M. V., Drake-Espinosa L. y Salas R. 2008. El diagnóstico y

su papel en la fitoprotección. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 12 (35): 47 – 54.

Rodríguez-Valdés A., Florido-Bacallao M., Dueñas-Hurtado F., Muñoz-Calvo L. J., Hanson P., y Álvarez-Gil M. 2017. Caracterización morfoagronómica en líneas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Con resistencia a begomovirus. *Cultivos Tropicales*. 38(2): 70-79.

Serrato-Díaz A., Flores-Rentería Ll., Aportela-Cortez J. y Sierra-Palacios E. 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*: Cornejo-Romero A., Serrato-Díaz A., Rendón-Aguilar B. y Rocha-Munive M. G. (Eds.) Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. pp. 53-54.

SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera). 2015. Anuario agropecuario 2000-2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/> (consulta: 10 Marzo 2016).

Torres-Pacheco I., Chavira M. G. y González R. G. 2008. Las herramientas biotecnológicas para el diagnóstico de enfermedades de las plantas y para su mejoramiento genético. *Diagnóstico molecular*. 529-559

CAPITULO III

HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN LA ZONA ÁRIDA DEL NOROESTE DE MÉXICO: LA IMPORTANCIA DE SU DIAGNÓSTICO

(Publicación: Revista European Scientific Journal June 2016 edition vol.12, No.18
ISSN: 1857 – 7881 (Print) e - ISSN 1857- 7431)

3.1 RESUMEN

El cultivo de tomate se encuentra entre las hortalizas de mayor importancia a nivel mundial, encontrándose México dentro de los principales países productores. Éste cultivo se localiza en importante cantidad en estados pertenecientes a las zonas áridas del noroeste del país; la adaptación de estas regiones a la producción de hortalizas ha sido significativa con el apoyo de tecnificación en los cultivos considerando el uso de estructuras de protección para las plantas, como es el caso de invernaderos y malla sombra. No obstante, las plagas y enfermedades son un factor biótico primordial que merma significativamente la producción. Existen más de 200 enfermedades asociadas a las solanáceas de diversas etiologías. El proceso de identificar la causa de una enfermedad en plantas se denomina diagnóstico. El diagnóstico de enfermedades de plantas ha sido descrito como un arte y una ciencia, requiere de conocimiento científico de la fitopatología y disciplinas conexas. El control eficaz de las enfermedades requiere conseguir que las mejores decisiones posibles reduzcan el riesgo de pérdidas serias de producción. Las estrategias de control se basan en la prevención de las enfermedades y en métodos que ralenticen la propagación de dichas enfermedades. Por lo anterior, el adecuado manejo de las enfermedades que afectan al cultivo del tomate, el conocimiento y entendimiento del diagnóstico y de sus ciclos infectivos es de vital importancia y poder establecer medidas de control efectivas.

3.1.1 ABSTRACT

Tomato crops are among the most important vegetables cultivated worldwide, Mexico being one of the major producing countries. Large quantity of this crop is found in states belonging to the arid northwest of the country; the adaptation of these regions to vegetable production has been significant with the support of agricultural technology due to the use of protective structures for plants, such as greenhouses and shaded mesh. However, pests and diseases are a major biotic factor that significantly reduces production. There are more than 200 diseases associated with the nightshade of various etiologies. The process of identifying the cause of a disease in plants is called diagnosis. The diagnosis of plant diseases has been described as an art and a science; it requires scientific knowledge of plant pathology and related disciplines. Effective disease control requires making the best possible decisions to reduce the risk of serious production losses. Control strategies based on prevention of disease and methods that slow the spread of such diseases. Therefore, proper management of diseases affecting the tomato crop, knowledge and understanding of the diagnosis and its infectious cycle is vital and to establish effective control measures.

3.2 INTRODUCCIÓN

Las zonas áridas producen el 60% de los alimentos a nivel mundial (De Santa Olalla *et al.*, 2005). Una de las zonas de relevancia en la producción de alimentos en la República Mexicana, es el Noroeste de México el cual está conformado por los estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa y Sonora. Las condiciones que prevalecen en esta región van desde los 50 a 230 mm de precipitación anual, con temperaturas que oscilan en los meses de verano entre los 38 los 52° C; una marcada fluctuación de temperaturas diurna/ nocturna y de la velocidad del viento; baja disponibilidad de agua, debido a la alta evaporación; una radiación solar incidente; los suelos de estas zonas son variables en profundidad, textura, pH alcalinos, conductividad eléctrica altas y baja fertilidad; en ellos se acumulan carbonato y la tasa de infiltración del horizonte cálcico depende del contenido de carbonato (Mazuela, 2013); la intrusión salina se enfatiza provocando

que las conductividades eléctricas varíen entre los 2 a los 8 decisiemens, ensalitrando los pozos de agua utilizados para la agricultura y lleguen a contener hasta 8 ± 4 gr-L agua de sólidos disueltos. Las severas limitaciones que se presentan para la agricultura en las zonas áridas en el Noroeste, han promovido que los productores y técnicos busquen ser más eficientes en el uso de recursos, lo que ha implicado la adopción de nuevas tecnologías; otro factor que ha influenciado esta tendencia es la exigencia cada vez mayor del mercado globalizado por productos de alta calidad. En este tipo de zonas se ha consolidado la producción de varias hortalizas, las cuales se comercializan en su mayoría hacia Estados Unidos, la Unión Europea, Canadá y Japón (Villa y Bracamonte, 2012). Por estas razones la horticultura es una actividad de importancia tanto en el plano social como en el económico, por la captación de divisas así como por la generación de empleos al ser, en su gran mayoría, altamente demandante de mano de obra, como es el caso del tomate (Sandoval, 2004). En el año 2014, la producción de tomate en la República Mexicana fue de aproximadamente 2, 326,000 t, de la producción total. A nivel nacional el estado de Sinaloa aporta el 42.4%, Baja California 7.7%, Jalisco 6.6%, Zacatecas 6.1%, San Luis Potosí 5.9%, Michoacán 5.3%, Baja California Sur 4.9% y Sonora con 4% (SIAP, 2015). Sonora cuenta con 1705 ha de tomate: 15% en invernadero, 75% en casa sombra y 10% a cielo abierto (Borboa-Flores *et al.*, 2009). En el noroeste de México, específicamente en el estado de Sonora, su producción se ha visto afectada por la aparición de enfermedades que causan pérdidas hasta en un 100 %. Para que se desarrolle la enfermedad tiene que estar presente en el ambiente adecuado, un huésped susceptible y un patógeno virulento, de tal forma que la interacción del huésped, patógeno y ambiente tenga como resultado un daño al huésped. Los vectores de los patógenos pueden desempeñar una parte integral en el desarrollo y programación de las enfermedades, especialmente las enfermedades víricas y los marchitamientos bacterianos (Figuroa *et al.*, 2007; Rodríguez-Caro, 2009; Borboa-Flores *et al.*, 2009). Entre los factores bióticos que sobresalen como agentes de enfermedades de *Solanum lycopersicum* son las causadas por fanerógamas parasitarias, bacterias, fitoplasmas, virus, viroides, nematodos, insectos y hongos. Para el caso específico de los hongos que carecen de clorofila, normalmente están ramificados y son filamentosos. Entre los organismos que ocasionan estas enfermedades destacan los hongos como son *Botrytis cinerea*, *Alternaria dauci* f. *solana*, *Laveillula taurina*, *Phytophthora infestans*

(Mont.) de Bary, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Flores *et al.*, 2008). El objetivo del presente trabajo consiste en generar estrategias de control y un adecuado manejo de las enfermedades que afectan al cultivo del tomate en las zonas desérticas del noroeste de México, para ello el conocimiento y entendimiento del diagnóstico de los agentes causales y de sus ciclos infectivos es de vital importancia.

3.3 EL CULTIVO DE TOMATE EN EL NOROESTE DE MÉXICO.

Aproximadamente un tercio de las áreas continentales de la tierra está cubierto por zonas áridas y semiáridas. Estas regiones son afectadas por diversos procesos de degradación de tipo físicos, químicos y biológicos. Se estima que una de las causas más importantes de degradación ha sido el empleo de técnicas de agricultura intensiva, generadas para sistemas menos frágiles y con características edafoclimáticas muy diferentes a las del trópico seco americano. Las zonas desérticas han sido consideradas de bajo potencial agrícola, sin embargo, estas tierras pueden ser altamente productivas si son manejadas de forma adecuada (Díaz, 2001). Tal es el caso de la insuficiencia constante de precipitaciones, la elevada evaporación, agua de riego y suelos de baja calidad que son algunas de las causas del porqué las zonas áridas se encuentran consideradas como terrenos no aptos para la producción de alimentos. No obstante, estas restricciones, aunado a la ascendente demanda de productos agrícolas ha propiciado que la agricultura en zonas desérticas tenga un importante desarrollo (López-Aguilar *et al.*, 2008). Los altos rendimientos de producción en los cultivos agrícolas en la zona árida del noroeste de México, es consecuencia, a la eficiencia tecnológica de los productores motivada por las limitaciones climáticas, así como también al ascendente desafío propuesto por los mercados internacionales (Rodríguez, 2003). Por ejemplo, la conversión de cultivos constituidos solamente por básicos hacia productos con superior concentración en precio agregado, permite un importante crecimiento en la productividad de esta región agrícola (Rodríguez, 2013). En el noroeste de México, la producción de hortalizas específicamente la de *Solanum lycopersicum*, representa un alto valor comercial. El grado de tecnificación influye de una manera muy

considerable para el rendimiento del tomate, dentro de estos paquetes tecnológicos se incluye el uso de estructuras para proteger a las plantas de las inclemencias climáticas, prácticas de manejo como lo es la selección de variedades con potencial para la zona, así como también un adecuado manejo de plagas y enfermedades que afectan al cultivo. (Berenguer, 2003). Gracias a una alta productividad la zona semiárida es una de las zonas agrícolas de mayor importancia en el noroeste de México, conformada por alrededor de 200,000 hectáreas que con la tecnificación está permitiendo aumentar la producción, reflejándose en el derrame de divisas y generación de empleos (Rodríguez, 2003). A nivel mundial en gran cantidad de países, el tomate (*Solanum lycopersicum*), se considera como una de las hortalizas más importantes debido a su alta demanda por factores como su valor nutricional así como su uso a nivel industrial, esta producción ha ido en aumento en los últimos años, entre los principales países productores se encuentra México (Hernández-Herrera *et al.*, 2014; FAOSTAT, 2015). La producción obtenida ha incrementado mundialmente 9.5% en los últimos cuarenta años. A nivel nacional el cultivo se encuentra entre las hortalizas más importantes debido a los niveles de producción, sembrándose alrededor de 81,000 ha donde se obtienen cerca de 2 millones de toneladas. Los principales estados productores son Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Sonora, Nayarit, Morelos y Michoacán (Jiménez, 2003; SAGARPA, 2005; FAOSTAT, 2015).

Factores y la importancia del diagnóstico fitosanitario. De acuerdo a Borboa *et al.* (2009), en el ámbito de las Ciencias Agronómicas y la fitoprotección, el panorama que se ofrece a la profesión va más allá de la relación simplista patógeno-químico o patógeno-variedad resistente. Los profesionales tienen la obligación de responder como concedores del área, con una conceptualización clara y una estructura operativa funcional y ética. En la medida en que se limita la responsabilidad profesional únicamente a la detección del agente causal y a su supresión por medios físicos o químicos, el profesional se estará volviendo redundante, porque los avances tecnológicos permiten que esa función la cumpla un técnico calificado en el manejo de los instrumentos de laboratorio. El control de enfermedades con su concepción ecológica enfatiza como primer fundamento, el diagnóstico correcto del problema fitosanitario; basados en el diagnóstico, el agricultor o asistente técnico pueden seleccionar las estrategias y tácticas de manejo apropiadas. Existen por lo

menos dos grupos de técnicos que desempeñan actividades de diagnóstico: a) extensionistas en sanidad vegetal, asistentes técnicos, y funcionarios de empresas de agroquímicos, el cual es un grupo responsable del acierto o el fracaso de los profesionales de la fitoprotección a nivel del agricultor; b) profesionales dedicados a las clínicas de identificación y diagnóstico, los cuales tienen una preparación taxonómica y es un grupo exigente en la nitidez de la identificación y caracterización; llegan a tener gran experiencia en las principales enfermedades de un cultivo en particular (Bustamante y Rivas, 1999). Las decisiones más frecuentes a nivel del cultivo son las siguientes: a) con base en un diagnóstico correcto, se toman las medidas de manejo de la enfermedad; b) para diagnosticar un problema fitosanitario cuya naturaleza e identidad no es reconocida por el agricultor o asistente técnico, se recolectan muestras e información de campo y se recurre a especialistas antes de definir las tácticas de manejo y, c) aunque no se tiene conocimiento sobre la identidad de la enfermedad y las condiciones que le favorecen, se decide aplicar medidas de amplio espectro con la finalidad de acertar en su control. En los dos primeros casos se hace uso de la experiencia en diagnóstico para evitar riesgos de pérdidas en el cultivo e inversiones costosas de manejo. Sin embargo, en la tercera decisión se juega al azar por desconocimiento del agente causal y se cae en el error de la "automedicación" por propia decisión o por confiar en el consejo de otra persona con poca o ninguna experiencia en diagnóstico (Bustamante y Rivas, 1999). Según Holguín y Rueda (2007), existen consideraciones generales del diagnóstico, sus fundamentos y procedimientos con énfasis en problemas fitopatológicos: qué es el diagnóstico y cuáles son sus niveles: el diagnóstico se puede definir como el arte científico de reconocer por observaciones, estudio o experimentación, la naturaleza de la causa de un problema y los factores que inciden en su desarrollo. El diagnóstico es una etapa fundamental en el ámbito de la fitoprotección. Para realizarlo se deben analizar las condiciones en que se presenta el problema, en especial el manejo del cultivo y las interacciones planta - agente causal - organismos benéficos - condiciones agroclimáticas, es decir, se requiere de un análisis integral que conlleve a un acertado juicio sobre la etiología del problema y los factores que lo favorecen. Este enfoque tiene gran aceptación en la actualidad, donde la protección del ambiente y la salud humana son una exigencia de primer orden y la producción sostenible y el Manejo Integrado de Plagas =MIP= son incorporados a los programas agrícolas a nivel mundial (Holguín y Rueda, 2007). Asimismo, Holguín y Rueda

(2007), indican que el diagnóstico se puede llevar a cabo a través de cuatro diferentes niveles, de acuerdo con su objetivo y la experiencia, recursos físicos y técnicos a disposición del profesional.

1. Nivel de campo: Se puede realizar en condiciones precisas que permitan identificar el agente causal por sus síntomas, signos, distribución en el campo u otros factores. En este caso, la experiencia con el cultivo y sus enfermedades es fundamental. Muchos asistentes técnicos en cultivos específicos no solo pueden identificar el problema principal, sino también otros de incidencia económica importante.
2. Diagnóstico de confirmación: cuando se presentan condiciones de campo que no permiten establecer la identidad de los organismos causales, es necesario reunir información de campo y recolectar muestras para análisis de laboratorio. Esto permite además de una clasificación más exacta y útil, la elaboración de las listas y mapas de distribución de enfermedades de una región. Es importante recordar que diferentes organismos o factores abióticos pueden ocasionar un síntoma similar en la planta; por lo tanto, se deben evitar los diagnósticos precipitados carentes de información. Cuando todos los rasgos característicos de la enfermedad no están presentes para llegar a un diagnóstico preciso, se puede dar un diagnóstico presuntivo, sujeto a una confirmación posterior.
3. Diagnóstico de nuevas enfermedades: en algunos casos, el agente causal del problema fitosanitario no es conocido, y se hace necesario iniciar un estudio interdisciplinario que permita determinar la naturaleza de la plaga y establecer la identidad exacta, con el fin de orientar su manejo. Este nivel de diagnóstico exige en muchos casos la disponibilidad de equipos, la participación de diferentes especialistas y el tiempo necesario para realizar un estudio clínico minucioso y analizar las condiciones de campo en que se presenta el problema.
4. Diagnóstico regional: en este nivel se utiliza toda la información de una enfermedad para que un equipo de trabajo pueda hacer el reconocimiento, en una zona o en un país, de la presencia de ésta y las condiciones en que se da. Este diagnóstico indica además la distribución, importancia y prioridad de la enfermedad para emprender una campaña de manejo o erradicación o una investigación más amplia, y serviría de base para establecer un servicio de información geográfica de agentes causales de la enfermedad. Además de la distribución de la plaga, también se puede conocer la presencia de algún tipo de resistencia de la planta o de enemigos naturales, así como problemas de fertilidad o estructura del suelo. Cuando la enfermedad no se conoce en un área o país se realiza unos reconocimientos negativo, donde se hace

énfasis en la búsqueda del agente causal, con el fin de confirmar su ausencia o detectar su introducción. Para llevar a cabo estos cuatro niveles de diagnóstico se necesita de la participación de profesionales dedicados a diferentes actividades y de varias especialidades, lo cual confirma la importancia de la mayor integración entre funcionarios de extensión, sanidad vegetal e investigación, en una región o país.

3.4 ELEMENTOS BÁSICOS DEL DIAGNÓSTICO

De acuerdo a Hernández *et al.* (2013), el profesional que realiza actividades de diagnóstico debe disponer de los siguientes elementos básicos: racionalidad, objetividad, conocimientos técnicos, equipo adecuado y habilidad para trabajar en grupo. Estos aspectos constituyen el punto inicial que un técnico dedicado a esta actividad debe considerar, a lo cual, con el tiempo se adicionan, mayores conocimientos y experiencias que lo llevan a convertirse en un experto. La racionalidad es el elemento del diagnóstico que orienta a una organización sistemática de las labores de campo y laboratorio, acordes con el conocimiento técnico-científico, con el fin de hacerlo más ordenado y preciso. El complemento a la racionalidad es la objetividad, factor que indica la necesidad de proceder de acuerdo a la existencia de una realidad para cada diagnóstico. La ausencia de este elemento expone al profesional a cometer errores por apresuramiento o exceso de confianza en su experiencia. Los conocimientos más utilizados por los profesionales en diagnóstico son: anatomía y diagnósticos subjetivos pueden darse por parte de especialistas, con costos innecesarios de control, pérdidas de cultivos y perjuicios para la comercialización internacional, así como pérdida de credibilidad, fisiología de las plantas, factores que predisponen el ataque de las enfermedades y problemas abióticos del cultivo; fenología del cultivo y la plaga, técnicas de manejo del cultivo y metodologías de diagnóstico. Cuando el área de diagnóstico se circunscribe a uno o dos cultivos, el nivel de conocimientos y precisión en el diagnóstico se adquiere en menor tiempo. En el caso de realizar diagnóstico de enfermedades en diversos cultivos es importante el apoyo de expertos en el cultivo y especialistas en diferentes áreas de fitoprotección (Bustamante y Rivas, 1999).

3.5 INTERFERENCIA FISIOLÓGICA DEL AGENTE CAUSAL DE ENFERMEDAD Y EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS

De acuerdo a Rueda *et al.* (2009; 2013), las enfermedades y agentes abióticos que afectan las plantas pueden interferir uno o varios de los cinco procesos fisiológicos básicos: 1) absorción y transporte de agua y nutrimentos; 2) fotosíntesis y metabolismo; 3) transporte de fotosintatos; 4) desarrollo de frutos y 5) maduración y senescencia de tejidos. 1.- Absorción y transporte de agua y nutrimentos: el área de absorción (raíces y pelos absorbentes) puede ser afectada por patógenos del suelo, tales como *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Erwinia* spp., *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. Los insectos también contribuyen al deterioro de la raíz, especialmente los géneros *Phyllophaga* (Coleopt.: *Scarabaeidae*) y *Diabrotica* (Coleopt.: *Chrysomelidae*). La presencia de semilla recién germinada y plántulas desenterradas puede deberse a ratas, tuzas, ardillas o pájaros. Por su parte, las malezas pueden afectar el desarrollo radicular del cultivo por competencia y presencia de sustancias alelopáticas. Los principales factores abióticos que pueden afectar el sistema radicular son: sobre fertilización, sequía, inundación, exceso de sales solubles y herbicidas. Los síntomas más comunes asociados con esta interferencia son la necrosis, la pudrición de las raíces y tallos de las plantas ("damping off"), las agallas, el desarrollo de raíces adventicias, las decoloraciones típicas de deficiencias nutricionales en el follaje y frutos y la marchitez de la planta. Otros síntomas no fácilmente detectables son la disminución del tamaño de las hojas y su capacidad fotosintética. Los microorganismos patógenos que actúan sobre los haces vasculares, son en su mayoría hongos y bacterias tales como: *Fusarium oxysporum* (diferentes formas especiales de acuerdo con los cultivos), *Verticillium* spp., *Pseudomonas solanacearum* (diferentes razas) y *Phytophthora* spp. El taponamiento del xilema por parte de estos organismos produce el síntoma clásico de marchitamiento, el cual en el caso de las bacterias puede ser reconocido por el flujo blanquecino, que se observa a partir del corte transversal de un trozo de tallo de la planta afectada, que se sumerge en agua. 2.- Fotosíntesis y metabolismo: las hojas pueden ser interferidas en su acción fotosintética por una capa de crecimiento micelial, como es el caso del mildiu polvoso de las hojas y las fumaginas, crecimientos de color oscuro de hongos como *Capnodium* sp. La maleza como plaga de competencia, puede interferir la radiación

solar y disminuir el nivel de actividad fotosintética del cultivo. Sin embargo, el punto de intercepción más crítico, es la disminución del área foliar por la acción de insectos comedores de hojas y de patógenos que causan lesiones en el follaje e interfieren el metabolismo de proteínas y la producción de la clorofila. Mildius vellosos, royas, antracnosis, manchas y mosaicos, son algunos de los síntomas más comunes de las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y fitoplasmas. Se pueden presentar efectos similares, como efecto de deficiencias de nutrimentos y fitotoxicidad de herbicidas hormonales y de contacto.

3.- Transporte de fotosintatos: el floema es la vía de movilización de los azúcares y metabolitos a sitios de crecimiento o almacenamiento, esta vía puede ser interferida por virus, fitoplasmas y protozoarios tipo *Phytopomonas*, los cuales pueden necrosar el floema. Síntomas tales como hojas rojizas y encrespamientos se deben al exceso de azúcares en la hoja. Algunos hongos como *Rhizoctonia solani* al atacar el cuello del tallo en solanáceas como la papa, bloquea el floema e impide el desarrollo normal de tubérculos y causa la formación de tubérculos aéreos.

4.- Desarrollo de frutos: en el desarrollo de frutos se presentan dos interferencias, además del llenado incluido en el acápite anterior, que pueden generarse por elementos bióticos y abióticos. En primer lugar se puede observar la caída de frutos pequeños y flores por deficiencias nutricionales, insectos, bacterias, hongos y virus. Los patógenos más conocidos son *Botrytis cinerea* y *Erwinia amylovora*. El otro efecto conocido en frutos, es el reemplazo del tejido por crecimientos de estructuras de hongos, tales como esporas y esclerocios en granos y tubérculos.

5.- Maduración y senescencia de tejidos: las hojas y los frutos especialmente, presentan interferencias por patógenos, insectos y factores abióticos que aceleran la senescencia de los tejidos. En algunos casos, las condiciones de maduración y senescencia estimulan el ataque de hongos como *Alternaria* spp. en solanáceas, al disminuir el contenido de carbohidratos. En los frutos cualquier daño a la estructura física ocasionado por vertebrados e insectos y la acción de hongos y bacterias son los causantes de la mayoría de pudriciones y pérdida de vigor y germinación de semillas (Bustamante y Rivas, 1999). Aparte de estas cinco interferencias, es importante considerar el efecto sobre el meristemo apical que ocasionan los insectos. Asimismo, vertebrados, hongos y bacterias que atacan plántulas de monocotiledóneas y dicotiledóneas, en algunos casos, el daño es total y en otros la planta presentará deformaciones posteriormente (Bustamante y Rivas, 1999).

3.6 LOS HONGOS COMO AGENTES CAUSALES DE ENFERMEDADES

En México es importante la producción de tomate debido a que se encuentra en continuo aumento la demanda y producción del mismo. Sin embargo, en cuantiosas ocasiones su rendimiento se ve disminuido por la incidencia de diversas plagas y enfermedades (Pelegrín *et al.*, 2004). El cultivo de tomate se encuentra afectado por la presencia de diversos microorganismos patógenos los cuales son la principal causa de las enfermedades, dentro de los cuales se destaca la presencia de hongos. (Flores *et al.*, 2008). A continuación se describen las principales enfermedades y su agente causal.

3.7 PODREDUMBRE GRIS (*Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetrel. Ascomycetes: Helotiales. Anamorfo: *Botrytis cinerea* Pers.)

El hongo *Botrytis cinerea* (Figura 1) es un importante patógeno de plantas cultivadas. Ha sido citado sobre más de 200 especies vegetales y puede provocar enfermedades desde el estado de plántula hasta la poscosecha. Según una encuesta reciente, los especialistas lo ubican en segundo lugar en importancia entre todos los hongos fitopatógenos conocidos (Dean *et al.*, 2012). La enfermedad de moho gris, causada por dicho hongo, es una de las más severas, se encuentra afectando a flores, frutos y tallos. En la mayoría de los casos resulta ser uno de los principales patógenos que afectan a los frutos maduros en poscosecha (Williamson *et al.*, 2007).

Síntomas. En el tomate, su presencia puede examinarse en localizaciones muy distintas de la parte aérea de la planta provocando sintomatologías de variada naturaleza como puede ser cancro del tallo y pudrición de hojas, flores y frutos recién cuajados. Los frutos maduros pueden ser infectados en almacén, ya que *B. cinerea* es un importante patógeno de poscosecha (Dal Bello *et al.*, 2012).

Agente causal. El fitopatógeno *B. cinerea* infecta más de 200 especies vegetales, este puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo de la planta, puede infectar cualquier parte vegetativa ocasionando pérdidas en frutos tanto en campo como en almacenamiento. Con alta incidencia del patógeno, causa repercusiones económicas en cultivos de importancia tales como vid, tomate, fresa y ornamentales. En el caso de la vid, el patógeno ocasiona importantes pérdidas especialmente en zonas con climas templados y húmedos durante la cosecha (Benito *et al.*, 2000; Calvo-Araya *et al.*, 2012; Latorre *et al.*, 1997).

Ciclo de vida. Por medio de esclerocios el hongo sobrevive en el suelo, esto es parte de los ciclos secundarios que presenta, en plantas muertas también crece el micelio, otro medio de diseminación se da por medio de semilla contaminada con esclerocios. Existen varias vías de penetración de las esporas como puede ser pétalos de flores senescentes, heridas y follaje moribundo. Los periodos alargados de alta humedad relativa y de bajas temperaturas incrementa la incidencia de la enfermedad. (Latorre *et al.*, 1997). Las esporas de *Botrytis cinerea* son capaces de ser producidas sobre cualquier material vegetal y trasladadas a distancias considerables por corrientes de aire. Cuando la espora llega a la superficie del huésped comienza el ciclo de infección.

El ciclo comprende varias etapas. La primera es la adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped y la segunda, su penetración en el tejido vegetal, ya sea por aberturas naturales o por medio de heridas del tejido. La tercera etapa consta del asentamiento del patógeno en el área de penetración, provocando la muerte de células adyacentes al punto de penetración y originando una lesión primaria causada por la expresión de los mecanismos de defensa de la planta. Como cuarta etapa comienza con una fase de latencia en la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno, el cual se mantiene en las zonas de necrosis, las cuales se originaron por las lesiones primarias. Durante la quinta etapa, al transcurrir el tiempo, el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación en el tejido vegetal periférico,

determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un corto periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Benito *et al.*, 2000).

La implementación de prácticas agrícolas oportunas es muy importante para el manejo de la enfermedad, se debe evitar heridas durante las labores de cultivo, así como favorecer la ventilación. Dado que la infección de *B. cinerea* es favorecida por lesiones en la planta y humedad relativa alta (Salas y Sánchez, 2004). El hongo ha mostrado resistencia a los productos químicos empleados para su control. Además de esta situación los productos disponibles para el control de este hongo se enfrentan cada vez más a la sostenida revisión y revocación de sus usos autorizados y a la vez despiertan una creciente alarma social por los inconvenientes ambientales asociados a su uso (Greer y Diver 1999).

3.8 TIZÓN TEMPRANO *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Jones and Grout. Clase: Deuteromycetes, Orden: Hyphales (Moniliales), Familia: Dematiaceae)

Dentro de los principales patógenos que afectan el tomate se encuentra el tizón temprano (Figura 2). La severidad de esta patología es capaz de disminuir los rendimientos entre un 20-30% (Martínez *et al.*, 2002). En el cultivo de tomate esta enfermedad figura como un grave problema desde la perspectiva económica. Este patógeno tiene un ciclo de vida corto, por ello tiene una gran capacidad de reproducción y de dispersión. Para su control es imprescindible el uso de fungicidas químicos eficientes, sobre todo en los periodos de mayor incidencia de estas patologías. (Muiño *et al.*, 2010).

Síntomas. El hongo daña órganos aéreos del tomate, especialmente a las hojas, en las cuales genera manchas necróticas, lo cual reduce la capacidad fotosintética de la planta y en ocasiones puede producir una defoliación grave (Mónaco *et al.*, 2001). En el follaje más viejo se manifiestan los primeros indicios de la enfermedad presentándose áreas irregulares, de color café oscuro y necrótico.

Estas lesiones se extienden a medida de que la enfermedad avanza y finalmente desarrollan anillos negros y concéntricos. En el follaje las heridas generalmente están rodeadas por una zona amarilla y clorótica, y si las lesiones son cuantiosas, toda la hoja se torna amarilla y se seca rápidamente. La defoliación completa de la planta puede presentarse en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad. El desarrollo de las lesiones al nivel del suelo puede causar una pudrición en la copa que generalmente rodea el tallo. Las lesiones en la fruta ocurren normalmente en la punta del cáliz, y son oscuras, correosas y hundidas (López-Vásquez *et al.*, 2013). Agente causal. *Alternaría solani* presenta un micelio aéreo algodonoso, liso, blanco, que pronto se torna blanco mate a gris y, por último, es capaz de tapar el micelio negro cuando esporula. Los conidióforos son oscuros, de donde nacen los conidios en forma de cadena. Los conidios miden 12-20 X 120-296 µm, son oscuros, alargados, ovoides, con apariencia de mazo y presentan septos longitudinales y transversales. (Díaz *et al.*, 1993).

Ciclo de vida. En algunas ocasiones es posible que el hongo sobreviva sobre la semilla, sin embargo, lo más común es que el hongo perdure en el suelo encima de remanentes de cosecha infectada o en otras Solanaceas. El origen del inoculo primario es el suelo. Las condiciones climáticas que favorecen el desarrollo de la enfermedad son humedades relativas elevadas que se presentan con días lluviosos y temperaturas entre los 20 y 24 °C. La infección secundaria se provoca cuando las esporas producidas en las plantas infectadas se diseminan a otras plantas a través del aire y precipitaciones. Esta enfermedad es importante en climas áridos al utilizarse riego por aspersión (Sánchez, 2001).

3.9 OIDIO, CENICILLA U OIDIOPSIS (*Leveillula taurica* (Lev.) Arnaud)

Leveillula taurica (Figura 3), es el hongo patógeno causante de la enfermedad conocida como cenicilla, la cual tiene más de 700 hospedantes, en los cuales destaca el tomate (*Solanum lycopersicum*) (Guigón-López y González-González, 2001). En el estado de Sinaloa fue donde se identificó por primera vez en México, la

cenicilla del tomate causada por *L. taurica* y actualmente puede ser detectada en diversas regiones del país. Para su control en el cultivo del tomate se recurre a la aplicación de fungicidas de origen químico principalmente, lo que representa una proporción alta del costo de producción del cultivo, como es en el caso de la región de la Comarca Lagunera, Coahuila, en donde se realizan hasta 18 aspersiones de fungicidas por ciclo (Guzmán-Plazola *et al.*, 2011).

Síntomas. La cenicilla afecta principalmente hojas, tallos, flores y frutos. Los síntomas iniciales son lesiones que van de color verde descolorido a amarillento brillante en la parte superior de las hojas. Después de esto emergen las espuluraciones polvorientas en la parte inferior de las hojas. Conforme progresa la enfermedad las lesiones se vuelven necróticas y la hoja muere. En donde se presenta un microclima apropiado para el desarrollo del hongo causante de la enfermedad, como es el caso de las condiciones en invernadero, las manchas blanquecinas en el haz y en el envés de las hojas son más notorias debido a la mayor densidad de estomas (Elad *et al.*, 2007; Glawe, 2008).

Agente causal. El hongo *Leveillula taurica* es un parásito obligado y típicamente tiene la capacidad de crecer en ausencia de lluvias. Una humedad ambiental de 70- 80% es suficiente para el desarrollo de esta enfermedad que en climas relativamente secos pueden aparecer aprovechándose tan sólo del frescor de la noche. *L. taurica* es el único miembro de las Erysifáceas cuyo micelio se desarrolla en el parénquima, los demás lo hacen en la superficie de la epidermis. Los conidióforos de *L. taurica* del tipo oidiopsis son septados y emergen al exterior por los estomas a partir de células endofíticas existentes en los tejidos del hospedante (Venez *et al.*, 2013).

Ciclo de vida. El hongo forma un micelio interno y externo en el hospedante. Los conidios germinan en la superficie del foliolo y se introducen vía estomas; ya que se encuentra en el interior, el hongo crece intercelularmente por tres o cuatro semanas. Posteriormente el micelio emerge por los estomas y se extiende formando

conidióforos en la superficie foliar estableciendo colonias blancas las cuales son visibles. En regiones de climas semiáridos y cálidos la cenicilla es una enfermedad común, en estas zonas están presentes una amplia diversidad de hospedantes (Fujiwara *et al.*, 2002; Guzmán Plazola *et al.*, 2011). En el rango de los 10 y 37°C sucede la germinación de los conidios y la colonización en los folíolos entre los 15 y 20°C y una humedad relativa de 75 a 85%, siendo las condiciones óptimas temperaturas entre los 20 y 25 °C y una humedad relativa de 80%. (Huang *et al.*, 1998; Elad *et al.*, 2007). Uno de los métodos de control de la cenicilla más utilizados es el químico, el cual se realiza mediante aspersiones foliares de fungicidas entre los que destacan Azoxystrobin y Myclobutanil, los cuales han mostrado efectividad en la reducción de la severidad de los daños; sin embargo, los efectos varían con el ciclo del cultivo y generalmente son más costosos (Villalobos *et al.*, 2013).

3.10 TIZÓN TARDÍO *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Phycomycetes: Peronosporales. Pythiaceae

Agrios (2004), afirma que, esta enfermedad tiene la capacidad de matar las plantas de tomate en dos semanas, incluso en una, cuando las condiciones climáticas son propicias en cualquier momento durante la estación de crecimiento de las plantas y cuando no se aplica ningún método de control.

Síntomas. Presencia de lesiones acuosas en los tallos y en las hojas especialmente en el ápice y en el margen de las secciones, acompañado por el desarrollo de un micelio blanquecino. Posteriormente se marchitan y parecen plantas heladas o quemadas. En los frutos, las infecciones se caracterizan por el desarrollo de lesiones acuosas o necróticas café claro, de tamaños y formas muy variables, no llegan a madurar, empardecen y se arrugan (Castaño *et al.*, 1993).

Agente causal. Los esporangióforos son ramificados y frágiles. Una característica de la especie es que expresa hinchamientos, encima de los cuales produce las esporas. Los esporangios tienen una longitud estimada de 700 micras, estos aparecen de los estomas. Otra particularidad de los esporangios es que son

ovoides en forma de limón, papilados y hialinos. Cuando se presentan temperaturas más cálidas, es posible que se inicien nuevas infecciones penetrando directamente en el tejido mediante un tubo germinativo que produce el esporangio bajo estas condiciones (Castaño *et al.*, 1993).

Ciclo de vida. *Phytophthora infestans* (Figura 4), es atípico, al ser una de las dos únicas especies que son capaces de liberar fácilmente los esporangios al aire seco; estos pueden producir directamente tubos germinativos con temperaturas superiores a 15°C, pero con mayor frecuencia germinan directamente liberando zoosporas a temperaturas inferiores entre 12 a 15 °C. Los esporangióforos están dilatados en el punto de unión de los esporangios, cada uno de estos puede producir de 8 a 32 zoosporas las cuales diseminan con facilidad una vez que se rompe la pared esporangial (Drenth *et al.*, 2001).

3.11 AHOGAMIENTO DE PLÁNTULAS Y NECROSIS RADICULAR *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Oomycetes

El hongo *P. aphanidermatum* (Figura 5) puede atacar plantas de tomate durante los estados tempranos de crecimiento, causando muerte de plántulas en preemergencia y postemergencia, o podredumbre del tallo. El ataque puede causar grandes pérdidas y crecimiento desigual del cultivo. Las pérdidas ocurren tanto en invernadero como al aire libre (Jones *et al.*, 2001).

Síntomas. La muerte de plantas en preemergencia afecta a plántulas que han sido atacadas en los primeros estados de germinación pero con anterioridad a la emergencia. Una lesión castaño oscura o negra se desarrolla rápidamente y afecta toda la plántula. La muerte de plántulas en preemergencia es el síntoma más común asociado a un ataque de *Pythium*; la enfermedad inicia con una lesión oscura y acuosa en la raíz que se extiende a lo largo del tallo o por encima de la línea del suelo. Cuando esta lesión oscura y blanda se desarrolla alrededor de una porción grande del tallo (ahogamiento) o en su totalidad, la planta se dobla, marchita y

muere. En la parte de la planta afectada sometidas a una alta humedad puede generarse un crecimiento de micelio de color blanco algodonoso. El segundo tipo de enfermedad, cuya importancia se ha reconocido recientemente, es una necrosis radicular que se desarrolla con lentitud a partir del ápice de la raíz hacia atrás, con cambio de coloración a pardo o negro. Lo que ocasiona en la planta un retraso general del crecimiento, con cierto amarillamiento del follaje y pérdida de producción. (Punja *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003).

Agente causal. *Pythium aphanidermatum* forma esporangios relativamente indiferenciados, que en su mayoría no se separan del micelio parental ni se dispersan y que liberan sus contenidos a una vesícula esférica en la que se desarrollan las zoosporas. (Smith *et al.*, 2003). *P. aphanidermatum* está más asociado con la enfermedad en plántulas que otras especies, especialmente con temperaturas moderadas a altas, ataca en ocasiones a plantas de una longitud de más de 10 cm, causando una lesión húmeda castaño oscuro a negra, que puede llegar a extenderse 2-4 cm por encima del suelo. Generalmente, las plantas afectadas de esta manera se marchitan y mueren (Grijalba *et al.*, 2015).

Ciclo de vida. El hongo tiene la capacidad de crecer de forma indefinida en el suelo como micelio vegetativo sobre varios sustratos orgánicos, siempre y cuando cuente con las condiciones propicias. El crecimiento puede ser influenciado por la naturaleza de la base nutritiva, pH, humedad y actividad de microorganismos asociados. La producción de esporas del patógeno es favorecida por la presencia de agua libre en el suelo que puede ser ocasionado por un mal drenaje. Después de germinar, el patógeno puede penetrar a la planta de manera directa, sin embargo, la presencia de heridas incrementa la penetración e infección. Las plantas con exceso de nitrógeno son más susceptibles que las plantas normales. El patógeno produce oosporas de pared engrosada que le permiten sobrevivir bajo condiciones desfavorables en el suelo en ausencia de huésped por largos periodos (Persley *et al.*, 2010).

3.12 MARCHITEZ VASCULAR *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen. Ascomycota

El hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder (Figura 6) causa la enfermedad conocida como marchitez vascular la cual es una de las más importantes en el cultivo del tomate ya que puede llegar a mermar en un 60% el rendimiento (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008). Este hongo se desarrolla en una gran variedad de condiciones ambientales, desde climas templados hasta trópicos (Cai *et al.*, 2003). Se han reportado tres razas del hongo, las cuales se caracterizan por afectar materiales diferenciales de tomate que cuentan con distintos genes de resistencia. La primera vez que se describió la raza 1 fue en 1886 y la raza se reportó en 1945 en Ohio. En Australia en 1978 se observó la raza 3, después en varios estados americanos como California, Florida, Arkansas, Tennessee, entre otros. Esta raza también se ha reportado en México. En la actualidad pocas variedades comerciales con resistencia a la raza 3 están disponibles (Cai *et al.*, 2003).

Síntoma. El síntoma inicial es amarillamiento de las hojas más viejas; dichos síntomas suelen afectar solo un lado de la planta, y con frecuencia los folíolos a un lado del peciolo se vuelven amarillos antes que los del otro lado. Esta marchitez va avanzando gradualmente en todo el follaje, hasta que la planta muere. La coloración amarillenta del sistema vascular en los tallos es característica de esta enfermedad, si se realiza un corte transversal en el tallo se puede observar un oscurecimiento en los vasos (Momol *et al.*, 2008).

Agente causal. El hongo *Fusarium oxysporum* dentro de sus características morfológicas produce tres tipos de esporas asexuales en cultivo: microconidias, macroconidias y clamidosporas. Las microconidias son rectas o curvadas, hialinas, unicelulares, pequeñas y de forma oval a elipsoidal, que miden en un rango de 5-12 x 2.2-3.5 micras y son producidas en filídios laterales unicelulares y cortos; las macroconidias también son hialinas, generalmente con 3 a 5 septas, semejando una luna en cuarto creciente por su forma curvada en el centro y fina en los extremos, que miden entre 27-60 x 3-5 micras; y las clamidosporas que se producen solas o en

pares, de forma intercalar o en ramificaciones laterales cortas, que son estructuras de sobrevivencia del patógeno y tienen forma redonda y paredes delgadas. En medios de cultivo sintético se observa en colonias blancas, cremas, naranjas, pardo, pardo-rojizo, rojo carmín, rosa, púrpura e incluso azuladas dependiendo del aislamiento (Castaño *et al.*, 1994; Osorio-Gutiérrez y Castaño-Zapata, 2011; Villanueva-Arce *et al.*, 2013).

Ciclo de vida. La patología marchitez vascular del tomate se presenta generalmente en climas cálidos y en suelos arenosos. El hongo *Fusarium oxysporum* vive en el suelo, permanece muchos años en suelos infestados. La manera de introducirse a la planta es a través de heridas en la raíz. Temperaturas mayores de 28°C es una de las condiciones que beneficia el desarrollo de la enfermedad, así como también la humedad óptima para el desarrollo del cultivo. La virulencia del patógeno se ve aumentada con bajo pH del suelo así como niveles bajos de N y P y altos de K. Existen diferentes formas de diseminación como lo son los tutores de las plantas de tomate, el suelo y las plántulas para trasplante infectadas, o por medio del suelo adherido a estas, así como también por medio de la semilla. Ya establecido el cultivo en el campo la enfermedad se puede dispersar con las herramientas de trabajo, a través de suelo infestado el cual puede diseminarse por agua y viento (Zhang *et al.*, 2011). Existen productos químicos disponibles para su control que demostraron tener efecto sobre el micelio, controlando, además, la esporulación del patógeno. Sin embargo, en cuanto a *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, el uso de variedades resistentes es considerado como el método más efectivo para su control (Araujo *et al.*, 2008).

3.13 PODREDUMBRE DE CUELLO Y RAÍZ *Rhizoctonia solani* Kühn (Basidiomycetes: Hymenomycetes)

Rhizoctonia solani Kühn (Figura 7), es un patógeno habitante del suelo que ataca tomate, sobre todo cuando el sistema de producción es bajo invernadero, este hongo provoca la caída de plántulas y su posterior muerte. Las técnicas de fumigación al

suelo como medidas de control, si bien resultan aceptablemente efectivas, son altamente cuestionadas por las alteraciones a la biodiversidad del suelo que estas provocan. Por lo cual, alternativas como la solarización y el uso de biocontroladores se presentan como practicas viables y compatibles con el medio ambiente (Santander *et al.*, 2003). Síntomas. Las plantas infectadas con *R. solani* entre sus síntomas presentan la pudrición de semillas, ahogamiento y muerte de plántulas, el hongo ataca el tallo iniciando de la parte basal ocasionando pudriciones blandas y pudrición de la raíz, síntomas que resultan debilitando y causando muerte prematura de la planta, en algunos casos, el porcentaje de plántulas muertas puede llegar hasta 70% lo que ocasiona reducción de la productividad (Arcos y Zúñiga, 2015; Medeiros *et al.*, 2015).

Agente causal. *Rhizoctonia solani* subsiste especialmente en forma de micelio, en su etapa joven este es incoloro y a medida de que madura se torna en un color café claro. La hifa mide de 6 a 12 micras de diámetro, consta de largas células y produce ramificaciones que crecen casi en ángulos rectos (90°) con respecto a la hifa principal, se estrechan ligeramente a nivel de la bifurcación y poseen un septo cerca de ella. Produce esclerocios los que al principio son de color blanco los cuales van obscureciendo a distintos tonos; son irregulares, grandes, miden en un rango de 1 a 8 mm siendo visibles a simple vista, variables en forma según las condiciones en que se producen, de consistencia dura y en cortes microscópicos muestran una constitución de hifas entrelazadas de diámetro variable (Agrios *et al.*, 2003).

Ciclo de vida. Este hongo *R. solani* requiere de una temperatura óptima para desarrollo en medio de cultivo que oscila entre 25-30 °C con un mínimo de 8 °C y un máximo de 31-35 °C. Los esclerocios germinan en un rango de 8-30° C con una temperatura óptima de 23° C y a nivel del suelo la temperatura óptima para el ataque del patógeno es de 18 °C. El hongo desarrolla esclerocios negros, los cuales son estructuras de resistencia, los esclerocios germinan, produciendo el micelio cuando se presentan las condiciones favorables, este puede crecer en el suelo, en tallos y en los brotes del cultivo. La penetración de *R. solani* consiste en el crecimiento de cordones de micelio a lo largo de la superficie del brote, las hifas pueden crecer inter

o extracelularmente. *Rhizoctonia solani* se propaga por medio del agua, ya sea por la lluvia o el riego, también por medio de los órganos de propagación infectados. (Mendoza, 1996; Díaz, 2002).

3.14 CONCLUSIÓN

Una de las zonas de relevancia en la producción de alimentos en la República Mexicana, es el noroeste de México, el cual está conformado por los estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Sinaloa y Sonora. Su producción se ha visto afectada por la aparición de enfermedades que merman su productividad hasta en un 65% bajo condiciones favorables para los agentes causales de enfermedades. No obstante la alta incidencia de enfermedades presentes en solanáceas como lo es *Solanum lycopersicum* L., aun no se encuentran suficientemente estudios y documentos en los que las reporten como agentes causales de enfermedades que atacan al cultivo del tomate además de la importancia del diagnóstico fitosanitario en el cultivo del tomate para así poder establecer mejores técnicas de control. Una enfermedad de una planta puede definirse como cualquier alteración ocasionada por un agente patógeno que afecta la síntesis y la utilización de alimentos, los nutrientes minerales y el agua, de tal forma que la planta afectada cambia de apariencia y tiene una producción menor que una planta sana de la misma variedad. El diagnóstico de enfermedades en cultivos agrícolas, requiere de conocimiento científico de la fitopatología y disciplinas conexas, del arte de la observación aguda y la búsqueda de claves adecuadas, pues de ello dependerá, en gran medida, la eficacia de las prácticas de regulación que se diseñen y la sostenibilidad económica, social y ambiental de las mismas.



Figura 1. Hongo *Botrytis cinerea* en tallo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).



Figura 2. Hongo *Alternaria solani* en hojas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)



Figura 3. Hongo *Leveillula taurica* en hojas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

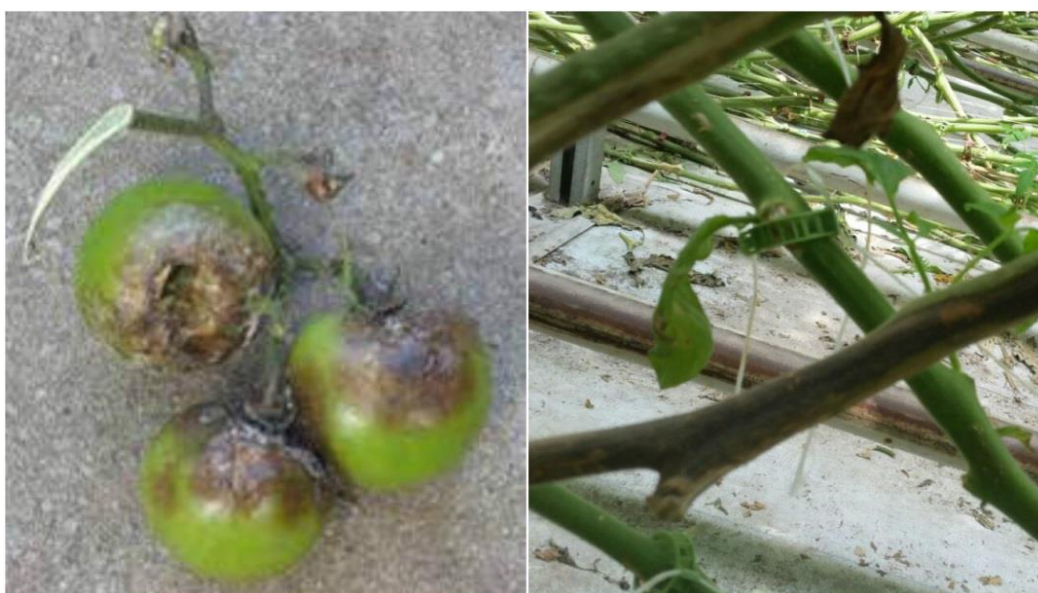


Figura 4. Hongo *Phytophthora infestans* en fruto y tallo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).



Figura 5. Hongo *Pythium aphanidermatum* en raíz y planta de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)



Figura 6. Hongo *Fusarium oxysporum* en tallo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).



Figura 7. Hongo *Rhizoctonia solani* en plántula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G. 2004. Plant pathology. Quinta edición. Editorial Limusa, México. 310 p.
- Araujo D., Rodríguez D. y Sanabria M. E. 2008. Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, causante del Mal de Panamá, a algunos extractos vegetales y fungicidas. Fitopatología venezolana. 21(2): 2-8.
- Arcos J. y Zúñiga D. 2015. Efecto de rizobacterias en el control de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. Ecología Aplicada. 14(2): 95-101.
- Ascencio-Álvarez A., López-Benítez A., Borrego-Escalante F., RodríguezHerrera S. A., Flores-Olivas A., Jiménez-Díaz F. y Gámez-Vázquez A. J. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 26 (2): 114-120.
- Benito E. P., Arranz M. y Eslava A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista Iberoamericana de Micología. 17: 43-46.
- Berenguer J.J. 2003. Manejo del cultivo de tomate en invernadero. En: Curso Internacional de Producción de Hortalizas en Invernadero (Castellanos J.Z. y Muñoz R.J.J. Edit). Celaya, Guanajuato, México. 147-174 pp.
- Borboa-Flores J., Rueda-Puente E. O., Acedo-Félix E., Ponce J. F., Cruz, M., Grimaldo-Juárez O. y García-Ortega A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. Revista Fitotecnia Mexicana. 32(4): 319-326.

- Bustamante, R. E. y Rivas P. G. 1999. Elementos e importancia del diagnóstico de problemas fitosanitarios. *Rev. Manejo Integrado de Plagas*. (52): 1-15.
- Cai G., Gale I. R., Scheider R.W., Kistler, H. C., Davis, R. M., Elias, K. S. & Miyao E. M. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology*. 93:1014–1022.
- Calvo-Araya J. A., Rivera-Coto G., Orozco-Cayasso S. y Orozco-Rodríguez R. 2012. Aislamiento y evaluación in vitro de la antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*. 23(2): 225-231.
- Castaño J. y Mendoza L. D. R. 1994. Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. 120-269 pp.
- Dal Bello G. y Nico A.; Mónaco, C. I. 2012. Hongos saprófitos como herramientas de control biológico de '*Botrytis cinerea*' en tomate. *Horticultura global*. (303): 64-68.
- De Santa Olalla M. F., López F. P. y Calera B. 2005. Agua y Agronomía. Editorial Mundi-Prensa. España 330p.
- Díaz B. V . 2002. Principales enfermedades del frijol ejotero (*phaseolus vulgaris* L.) en las principales regiones productoras del estado de Morelos. INIFAP. Folleto técnico 17. 34 p.

- Díaz F. A., Rocha P. M. y Castrejón S. A. 1993. Enfermedades infecciosas de los cultivos. Editorial trillas. México 146p.
- Díaz M. 2001. Ecología experimental y ecofisiología: bases para el uso sostenible de los recursos naturales de las zonas áridas no-tropicales. *Interciencia*. 26 (10): 472-478.
- Drenth A. & Sendall B. 2001. Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection, Indooroopilly Research Centre Plant Pathology Building. Australia. 1-41pp.
- Elad Y., Messika Y., Brand M., David, D. & Sztejnberg A. 2007. Effect of microclimate on *Leveillula taurica* powdery mildew of sweet pepper. *Phytopathology*. 97:813-824.
- FAOSTAT. 2015. Estadísticas datos agrícolas. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S> (Consultada el 15 septiembre de 2015).
- Figueroa L.P., Moreno B. A., Valenzuela V. J. M., Tamayo E. L. M. y Armenta C. I. 2007. Etiología, epidemiología y manejo de enfermedades virales en papa y chile en el sur de Sonora. Memoria día del agricultor, Campo experimental Valle del Yaqui INIFAP. Sonora, México. 14: 74-76
- Fujiwara K. y Fujii T. 2002. Effects of spraying ozonated water on the severity of powdery mildew infection on cucumber leaves. *Ozone Science and Engineering*. 24:463-469.

- Glawe D. A. 2008. The powdery mildews: A review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathology*. 46: 27- 51.
- Greer L. & Diver S. 1999. Integrated pest management for greenhouse crops. Pest management systems guide. *Appropriate Technology Transfer in Rural Areas ATTR*). Publicación IP. 144. 34 p.
- Grijalba P. E., Zapata R. L., Palmucci H. E. y Baron C. 2015. Podredumbre basal de plantas adultas de tomate causada por *Pythium aphanidermatum* (Oomycota). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 50(1):11- 15.
- Guigón-López C. y González-González P. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annum*, L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19: 49-56.
- Guzmán-Plazola R. A., Fajardo-Franco M. L., García-Espinosa R. y Cadena-Hinojosa M. A. 2011. Desarrollo epidémico de la cenicilla y rendimiento de tres cultivares de tomate en la comarca lagunera, Coahuila, México. *Agrociencia* 45(3): 363-378.
- Hernández-Herrera R. M., Santacruz-Ruvalcaba F., Ruiz-López M. A., Norrie J. & Hernández-Carmona G. 2014. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of applied phycology*. 26(1): 619-628.
- Huang C. C., Groot T., Meijer-Dekens F., Niks R. E. & Lindhout, P. 1998. The resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon* species

is mainly associated with hypersensitive response. *European J. Plant Pathology* 104(4):399-407.

Jiménez D. F. 2001. Enfermedades del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Ed. Limusa. México, D.F. 2003. 102 p. Jones, J.B.; Stall, R. E.; Zitter, T. A. Plagas y enfermedades del tomate. Ediciones Mundi-Prensa. México, D.F. 74 p.

Latorre B. A., Agostín E., San Martín R. y Vázquez G. S. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection*. 16 (3):209-214.

López-Aguilar R., Murillo-Amador B. y Rodríguez-Quezada, G. 2008. El forraje verde hidropónico (FVH): Una alternativa de producción de alimento para el ganado en zonas áridas. *Interciencia*. 34 (2): 121-126.

López J. M., Marulanda M. L. y López A. M. 2013. Factores climáticos y su influencia en la expresión de enfermedades fúngicas en cultivares de Heliconias. *Universitas Scientiarum*. 18(3), 331-344.

Martínez B., Bernal A., Pérez S. y Muñiz Y. 2002. Variabilidad patogénica de aislamientos de *Alternaria solani* Sor. *Rev Protección Vegetal*. 17(1):45- 53.

Mazuela Á. P. C. 2013. Agricultura en zonas áridas y semiáridas. *Idesia (Arica)*. 31(2): 3-4.

Medeiros A. C., Melo D. R. M. D., Ambrósio M. M. D. Q., Nunes G. H. D. S. & Costa J. M. D. 2015. Methods of inoculation of *Rhizoctonia solani* and

Macrophomina phaseolina in melon (*Cucumis melo*). Summa Phytopathologica. 41(4): 281-286.

Mendoza Z. C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Chapingo México. 55 p.

Mónaco C., Nico A., Rollán M. y Urrutia, M. 2001. Efecto in vitro de dos fungicidas sobre la micoflora antagonista al tizón temprano del tomate. Investigación agraria. Producción y protección vegetal. 16 (3): 326- 332.

Muiño B. L., Almádoz P. J. y Triane, E. M. 2010. Efecto in vitro del fungicida iprodione sobre *alternaria* spp. y prospección para su inclusión en estrategias de manejo en papa, tomate, ajo y cebolla. Fitosanidad. 14 (3): 171-176.

Osorio-Gutiérrez L. A. y Castaño-Zapata J. 2011. Caracterización del agente causante de la Pudrición de raíces de la arveja (*Pisum sativum* Linneo), enfermedad endémica en el municipio de Manizales-Caldas (Colombia). Agronomía. 19 (2): 33-43.

Pelegrín L. S., Arias A.P., Fajardo J. P. y Vega, C. T. 2004. Diferenciación de variedades de tomate frente al tizón temprano (*Alternaria solani*) en dos épocas de siembra en el Valle del Caucho. Granma Ciencia. 8 (2): 1-3.

Persley D., Cooke T. y House S. 2010. Diseases of Vegetable Crops in Australia. CSIRO Publishing. 304 p.

Polanco J. 2012. Uso de alternativas de reemplazo a los ditiocarbamatos en la prevención de *Phytophthora infestans* causante del tizón tardío en el cultivo

de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*), cultivado a campo abierto en el sector de Cuambo cantón Ibarra. Tesis Doctoral. Saltillo, Coahuila, México. 93 p.

Punja Z. K. y Yip R. 2003. Biological control of damping-off and root rot caused by *Pythium aphanidermatum* on greenhouse cucumbers. Canadian Journal of Plant Pathology. 25:4, 411-417.

Rodríguez-Caro M.A., Serrano-Cely P.A. y Forero-Ulloa F. 2009. Evaluación del desarrollo de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo dos tipos de cubiertas plásticas en Piedecuesta, Santander. Ciencia y Agricultura. 7(2): 17-30.

Rodríguez J. M. M. 2003. Acuíferos y agroquímicos en una región fronteriza: retos y oportunidades del TLCAN para la agricultura mexicana, Hermosillo, Son., Red Fronteriza de Salud y Ambiente, Universidad de Sonora, Comisión de Cooperación Ambiental. 35 p.

Rodríguez A. O. V. y Sierra, Á. B. 2013. Procesos de aprendizaje y modernización productiva en el agro del noroeste de México: Los casos de la agricultura comercial de la Costa de Hermosillo, Sonora y la agricultura orgánica de la zona sur de Baja California Sur. Estudios Fronterizos, Revista de Ciencias Sociales y Humanidades. 14(27): 217-254.

SAGARPA. 2005., Análisis Agropecuario del Tomate. Boletín Informativo. Culiacán, Sinaloa, México. 9 p.

Salas B. W. y Sánchez G. V. 2004. Avances en el control biológico de *Botrytis cinerea* en chile y tomate cultivados bajo techo. Semana Científica 2004. Memoria. 6. Semana Científica. 111-112.

- Sánchez C. M. 2001. Manejo De enfermedades del tomate. Curso del INCAPA “Manejo integrado de plagas y enfermedades en tomate, chile y papa”. Guadalajara, Jalisco, México. 22-39.
- Sandoval B. C. 2004. Manual Técnico. Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropónicos Agricultura y la Alimentación. FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. 53 p.
- Santander C., Montealegre J. y Herrera R. 2003. Control biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y bromuro de metilo. Ciencia e Investigación Agraria. 30 (2): 107-112.
- SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera). 2015. Anuario agropecuario 2000-2014. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/> (consulta: 10 Marzo 2016).
- Smith I. M., Phillips J., Lelliott D. H. y Archer S. A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa. España. 671p.
- Venez F., Cedeño L., Rodríguez L. A. y Quintero K. 2009. Primer reporte en Venezuela de mildiú polvoriento causado por *Leveillula (oidiopsis) taurica* en lisiantus. Fitopatología Venezuela. 22:23-24.
- Villa R. A. O. y Bracamonte S. A. 2012. Procesos de aprendizaje y modernización productiva en el agro del noroeste de México: Los casos de la agricultura comercial de la Costa de Hermosillo, Sonora y la agricultura orgánica de la zona sur de Baja California Sur. Estudios Fronterizos. 14 (27): 1-27.
- Villalobos R., Reyes S., González R., Pérez E., Dorantes G. A. y Bobadilla M. 2015. Prevención de cenicilla con azufre sublimado en pimiento y tomate en

invernadero. INIFAP (instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias). [http:// biblioteca .inifap. gob. mx: 8080/jspui/bitstream/handle/123456789/ 3944/ CIRCE _0102 08 221600049272 ok.pdf? sequence=1](http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3944/CIRCE_0102_08221600049272_ok.pdf?sequence=1) (Consulta: 13 octubre 2015).

Villanueva-Arce R., Aguilar-Pompa C. A., Gómez V. D., Piña-Guzmán A. y Bautista-B. 2013. Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Agrociencia* 47 (7): 691-705.

Villa R. A. O. y Bracamonte S. Á. 2013. Procesos de aprendizaje y modernización productiva en el agro del noroeste de México: Los casos de la agricultura comercial de la Costa de Hermosillo, Sonora y la agricultura orgánica de la zona sur de Baja California Sur. *Estudios fronterizos*. 14 (27): 217-254.

Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. y Van Kan J. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol*. 8: 561–580.

CAPÍTULO IV

PRODUCCIÓN DE ANTISUERO CONTRA *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* Y *Botrytis cinerea* PARA SU DETECCIÓN EN EL CULTIVO DE *Solanum lycopersicum* (L.) EN SONORA, MÉXICO.

Enviado: Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas (REMEXCA).

4.1 RESUMEN

Los problemas fitosanitarios son en gran medida la causa de pérdidas económicas a nivel mundial dentro de los cultivos agrícolas, los cuales son causados principalmente por hongos. En la República Mexicana, específicamente en el estado de Sonora, México, la superficie dirigida al cultivo de tomate, ha aumentado considerablemente en los recientes años. En los últimos ciclos de producción, se ha generado una problemática de control fitosanitario, donde los síntomas de patógenos conocidos, se confunden con aquellos de fitopatógenos “nuevos” que están arribando a las áreas agrícolas, permitiendo que el técnico tenga incertidumbre de que patógeno se trata y por consiguiente no tenga éxito al aplicar un control en el cultivo. Acudiendo a servicios profesionales en laboratorios fitosanitarios; la demanda en demasía, suele ser una vía incosteable al productor. El objetivo de la presente investigación fue identificar a los agentes causantes de enfermedades: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Raza 1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* sobre los órganos muestreados para conocer el status fitosanitario actual del cultivo de tomate en el estado de Sonora, a semilla, plántula, follaje y madurez fisiológica, aislándolos e identificándolos mediante la conjunción de técnicas de diagnóstico (producción de antisueros en conejos raza Nueva Zelanda, técnicas de uso de medios de cultivo, ELISA y pruebas de patogenicidad). El muestreo para la identificación de los hongos fitopatógenos se realizó de forma representativa en regiones productoras de tomate. Los resultados obtenidos muestran la identificación de tres hongos representativos de importancia económica en el cultivo de tomate

distribuido en el estado de Sonora. Se concluye que las pruebas de detección por separado no deben ser utilizadas como un método único de detección.

4.1.1 ABSTRACT

Phytopathological problems are to a large extent the cause of global economic losses within agricultural crops, which are mainly caused by fungi. In the Mexican Republic, specifically in the state of Sonora, Mexico, the area directed to the tomato crop, has increased considerably in recent years. In the last production cycles, there has been a problem of phytopathological control, where the symptoms of known pathogens are confused with those of "new" phytopathogens that are arriving in the agricultural areas, allowing the technician to have uncertainty of which pathogen tries and therefore does not succeed in applying a control in the crop, going to professional services in phytopathological laboratories; the demand too much, is usually an unbeatable way to the producer. The objective of the present investigation was to identify the causative agents of diseases: *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* (Race 1), *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* on the sampled organs to know the current phytopathological status of the tomato crop in the state of Sonora, at seed, foliage and physiological maturity, isolating them and identifying them through the conjunction of diagnosis (production of antisera in New Zealand breed rabbits, culture media techniques, ELISA and pathogenicity tests). Sampling for the identification of phytopathogenic fungi was performed representatively in tomato producing regions. The results obtained showed the identification of three representative fungi of economic importance in the tomato crop distributed in the state of Sonora. It is concluded that separate screening tests should not be used as a single detection method.

4.2 INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*), en Sonora, México, es una de las hortalizas más rentables en el mercado local, nacional e internacional. Sin embargo, la producción se hace cada vez más difícil; una de las razones es la incidencia de enfermedades que afectan la productividad de este cultivo (Grijalva-Contreras *et al.*,

2010). Dentro de los hongos causantes de enfermedades encontrados en cultivos de tomate se mencionan a *Fusarium oxysporum* causante de la enfermedad de marchitez vascular, *Alternaria* causante de la enfermedad tizón temprano y *Botrytis cinerea* causante de moho gris (Grijalva-Contreras *et al.*, 2011; Grijalva-Contreras *et al.*, 2014; SAGARPA, 2015).

Fusarium oxysporum es uno de los agentes causantes de enfermedades más importantes en el cultivo del tomate ya que puede llegar a mermar en un 60% la producción, su síntoma inicial es amarillamiento de las hojas más viejas, esta marchitez va avanzando hasta que la planta muere; *Alternaria*, es capaz de disminuir los rendimientos entre un 20-30%, dañando principalmente las hojas, en las cuales genera manchas necróticas, lo cual reduce la capacidad fotosintética de la planta, las lesiones en la fruta ocurren normalmente en la punta del cáliz, y son oscuras, correosas y hundidas (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016). Por su parte, *Botrytis cinerea* es el segundo hongo fitopatógeno de mayor importancia en tomate; durante el desarrollo del cultivo puede provocar cancro en el tallo y podredumbre de hojas, flores y frutos recién cuajados (Dal Bello *et al.*, 2012). Para la detección de microorganismos uno de los métodos de diagnóstico es el convencional que se basa en pruebas bioquímicas. Otro de los métodos que se aplica en el diagnóstico, es el DAS-ELISA, una técnica con sensibilidad y replicabilidad, pero que no cumple uno de los requisitos de un método de diagnóstico como es el económico cuando requiere ser utilizado en un alto número de muestras; el uso constante de los kits (componentes comerciales) DAS-ELISA, resulta ser incosteable para el productor (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013). Basado en el principio de inmunización e interacción antígeno-anticuerpo y con base a lo anterior descrito (inviabilidad económica de la DAS_ELISA para la detección de fitopatógenos), en la presente investigación se sugiere la producción de un antisuero contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria* sp. y *Botrytis cinerea*, y su detección en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*), durante el desarrollo vegetativo en cultivos de tomate en el Estado de Sonora.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en dos fases. La primera consistió en la producción de antisuero para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* y la segunda en la obtención de semilla comercial, muestreo de plántulas, hoja desarrollada y fruto de tomate en tres regiones del Estado de Sonora, y su análisis fitopatológico para la detección de los citados hongos en el Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora en Hermosillo, Sonora, México.

4.3.1 Incremento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*.

La primera etapa inicio con el incremento de inóculo. Según el protocolo establecido por Cañedo y Ames (2004), a partir del material infectado se obtuvo el hongo, ya sea por la siembra de trozos de papa-dextrosaagar (PDA), o bien promoviendo la esporulación y transfiriendo los conidios directamente al medio de cultivo. La identificación para cada hongo se realizó de acuerdo con la monografía de Jarvis (1975), además de las claves de "CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria" perteneciente a la Commonwealth Micological Institute, donde se encuentran descritas las especies de hongos; ésta caracterización se basa en la descripción de la colonia (macroscópica) así como de las estructuras del hongo (microscópica). De igual forma se recurrió al apoyo de las claves para identificación de hongos de Abad (2002), Barnett y Hunter (1998), Gilman (1963) y Romero (1993). Para tener los hongos con la mínima variación genética, se realizaron cultivos monospóricos de todas las cepas, de los que se tomó la muestra. De acuerdo con la técnica descrita por Kiraly (1974), se obtuvieron 100 tubos de ensaye en solución salina al 0.85% de NaCl con una concentración de 10^8 conidios·mL⁻¹, verificada con ayuda de un hematocímetro (Kiraly, 1974). Las suspensiones de conidios en tubos fueron almacenadas en refrigeración a 4°C hasta su uso. Posteriormente, con este material fueron realizadas las pruebas de patogenicidad en semilla para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1)=(Folr1), se desarrolló en material vegetativo de tomate Bonny Best y Manapal (sin genes de resistencia y resistente a Folr1, respectivamente); para *A. solani* fue en hojas y *B. cinerea* en fruto realizándose en la variedad "Rio Grande" cuyas características es que es de tipo determinado y fruto tipo saladette y

susceptible a ambos agentes fitopatógenos. Los ejemplares fúngicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* fueron aislados de muestras vegetativas obtenidas de un muestreo inicial en lotes de campo productores de tomate. Asimismo, identificadas mediante claves de identificación, que son descritas en el siguiente apartado. Se realizaron los postulados de Koch, considerando las condiciones ambientales para cada patógeno en estudio. Se re-aisló cada microorganismo y re-caracterizado nuevamente. Las condiciones se describen en la siguiente sección. Cabe indicar que para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1)=(Folr1), su identificación fue llevada a cabo en el laboratorio de biotecnología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora considerando a Jarvis (1973), Cañedo y Ames (2004), Ascencio-Álvarez *et al.* (2008), López (2012), Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. (CeSaVeg, 2016), Robles-Carrión *et al.* (2014); Valencia *et al.* (2016). La inoculación de Folr1 en los materiales diferenciales para el caso de semilla, se embebieron 20 semillas en 200 mL en una suspensión de conidias (Folr1) de 10^8 conidias·mL⁻¹, y se sembraron las semillas en vasos de unicel (½ litro) conteniendo sustrato estéril tipo peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.), asimismo se hizo en plántulas con un desarrollo de 20 días después de la siembra, a través de una suspensión conidial de 10^8 conidias·mL⁻¹ a través de la inmersión de raíces a las cuales previamente se les hicieron pequeñas heridas con una aguja hipodérmica. Inmediatamente se trasplantaron en vasos de unicel de 0.5 L litro conteniendo el mismo sustrato estéril tipo peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.) (Rueda *et al.*, 2006). Las plantas se mantuvieron en suelo húmedo durante todo el período de la evaluación en un invernadero, con una temperatura ambiente aproximada de $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Se utilizaron cuatro repeticiones de una planta en cada material para la toma de datos, se observó y se registró la respuesta de los materiales diferenciales para asegurar la alo y autoinfección por Folr1. El riego se llevó a cabo con agua destilada estéril, de acuerdo con las recomendaciones técnicas (INIFAP, 2005). Los síntomas de marchitamiento en plántulas inoculadas, se presentaron 30 días después de la inoculación. La evaluación se hizo nuevamente con base en la presencia o ausencia de la enfermedad.

Respecto a las pruebas en hojas y frutos, las primeras fueron inoculadas de *A. solani* con la ayuda de un rociador-aspersor de mano, de 250 mL, mientras que el fruto se inocularon con *B. cinerea* punzándolos primeramente y adicionando con un cotonete 1mL de suspensión conidial a una concentración de 10^8 mL⁻¹. Después de las inoculaciones, los órganos se colocaron en cámaras húmedas a una temperatura de 30 ± 2 °C en un período de 30 días (Jarvis y Hargreaves, 1973; Jarvis, 1975; Davised, 1988; Eckert, 1988; Tello y Lacasa, 1988; SAGARPA, 2005), las cuales son condiciones apropiadas para inducir los signos de la enfermedad. En cada una de las pruebas se incluyó un testigo (control negativo- uso de agua estéril). La confirmación de los patógenos se realizó mediante la técnica serológica ELISA siguiendo el protocolo general de identificación de hongos AGDIA. Los kits de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (R1)*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*, fueron adquiridos y llevada la técnica según AGDIA y Rueda *et al.* (2006). El criterio que se utilizó para decidir si las muestras eran positivas a la presencia de los fitopatógenos estudiados fue considerando las reglas indicadas por el Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario de la D.G.S.V., la cual consiste en: sacar una media de tres valores testigos negativos y multiplicar el resultado por dos. A partir del valor del resultado obtenido de esta operación (Valor de decisión), las muestras fueron consideradas como positivas. $VD = (T1+T2+T3) / 3 * 2$ (VD= Valor de decisión; T1= testigo negativo uno; T2= testigo negativo dos; T3= testigo negativo tres) (Rueda *et al.*, 2006).

4.3.2 Producción de antisuero.

Para este efecto uno de los primeros pasos realizados fue la de crecer suficiente inóculo conidial de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (R1)*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en medio sólido papa-dextrosaagar (PDA), y así poder preparar suficientes tubos con suspensión conidial de 10^8 conidia·mL⁻¹ en solución salina al 0.85%, ayudándose de una hematocímetro, (Kiraly, 1974). Una vez obtenida, las suspensiones conidiales en tubos, se almacenaron en refrigeración a 4°C para estabilizar las conidias y evitar un shock en el animal. La inmunización se realizó en conejos de raza nueva zelanda con un peso de 3 kg, una edad de 9-24 meses y

evitando que las hembras estuviesen embarazadas (Bokx, 1980; Valdés, 1995 y Villarreal, 1980). El plan de inmunización, fue llevado a cabo en tres esquemas, con cinco conejos por esquema (Cuadro 1). De acuerdo con la metodología recomendada por Flores (1994) y Rueda *et al.* (2006), con la finalidad de potenciar la producción de anticuerpos de cada tratamiento, a los 24 días después de la última serie de inyecciones se realizó una nueva aplicación de dosis de antígeno (2 mL vía intramuscular), denominada como dosis de recuerdo, la cual es utilizada en pruebas experimentales o incluso en la producción de anticuerpos por vacunas, con la función de impulsar y promover el proceso de síntesis de producción de anticuerpos contra el antígeno inyectado, reacción que es corroborada con una prueba de titulación antes y después de la inyección del recuerdo. La prueba de titulación fue aquella acorde a Kiraly (1974); para cada conejo y tratamiento se prepararon 10 tubos de ensaye independientes con solución salina al 0.85% para mezclarles el antígeno y el antisuero en la forma en que se describe en el Cuadro 2. Cabe indicar que una titulación (formación de anillo) se considera positiva para un determinado antígeno si presenta un título mayor ó igual a 1:640 con el antisuero homólogo según Flores (1994) y Rueda *et al.* (2006).

Cuadro 1. Tres esquemas de inmunización utilizados en la producción de antisuero contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en conejos tipo Nueva Zelanda.

Esquema 1		
Día	Volumen de la vacuna (mL)	Vía de la inyección
1	1	Intramuscular
7	1	Intramuscular
14	2	Intramuscular

Esquema 2		
Día	Volumen de la vacuna (mL)	Vía de la inyección

1	0.1	Intramuscular
3	0.3	Intramuscular
7	0.3	Intramuscular
10	1.0	Intramuscular
15	2.0	Intramuscular

Esquema 3

Día	Volumen de la vacuna (mL)	Vía de la inyección
1	0.1	Intravenosa
3	0.3	Intravenosa
6	0.5	Intravenosa
10	1.0	Intramuscular
15	2.0	Intramuscular
20	2.0	Intravenosa

Cuadro 2. Preparación de tubos con solución salina al 0.85% (NaCl) con adición de antígeno y antisuero para titulación.

Tubo	Solución salina mL	Dilución antisuero mL	Dilución	Dilución antígeno	Dilución final
1	0.9	0.1	1:10	0.5	1:20
2	0.5	0.5 T-1	1:20	0.5	1:40
3	0.5	0.5 T-2	1:40	0.5	1:80
4	0.5	0.5 T-3	1:80	0.5	1:160
5	0.5	0.5 T-4	1:160	0.5	1:320

6	0.5	0.5 T-5	1:320	0.5	1:640
7	0.5	0.5 T-6	1:640	0.5	1:1280
8	0.5	0.5 T-7	1:1280	0.5	1:2560
9	0.5	0.5 T-8	1:2560	0.5	1:5120
10	0.5	0.5 T-9	1:3120	0.5	1:6240

Si la titulación del suero resulta superior a 640 ó 1280 (sexto o séptimo tubo) significa que el antisuero producido es rico en anticuerpos.

4.3.3 Obtención de semilla de tomate de importación que se siembra el Estado de Sonora. Para la obtención de la semilla se contó con la colaboración de la Confederación Nacional de Productores Hortícolas (CNPH) región Sonora, donde cada productores facilitó una cantidad de 100-150 semillas para el análisis. La semilla fue proporcionada en sobres sellados no describiendo la variedad y/o híbrido (protegidos por leyes de secrecía).

4.3.4 Muestreo en plantas (plántula, hoja desarrollada y fruto). Para el muestreo de lotes se reprodujo el indicado por el manual de muestreo nacional de papa realizado por la SARH (1994). El muestreo se realizó en el 10% del total de la superficie cultivable de tres de los municipios productores de tomate (Cuadro 3). En el 10% de la superficie de cada región se realizaron divisiones de 5 ha que serían considerada como parcela hipotética a muestrear. Se obtuvieron donaciones de 13 productores. En las áreas de producción se realizó lo siguiente: cada lote se dividió a su vez en hectáreas, cada ha de superficie fue considerada un punto de muestreo. En cada punto se trazó una línea diagonal imaginaria de esquina a esquina, y en esa recta trazada se colectaron 10 muestras. Terminado el muestreo en cada punto, la colecta se repitió en los puntos restantes hasta completar el número de hectáreas (puntos) del lote. Cada una de las muestras colectadas, previamente identificada, se envolvió con papel húmedo y se colocó en una hielera para ser trasladada al laboratorio para su análisis.

4.3.5 Detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en semilla de importación en medios de cultivo.

De acuerdo con la técnica de Randhawa (1996) y Rueda *et al.* (2006), cada muestra de semilla; consistente en 20 semillas provenientes de cada uno de los lotes de los productores cooperantes, se pesó por separado, se lavó en agua corriente durante 30 min con la finalidad de eliminar productos químicos (i.e. fungicidas), y se colocó en charolas de plástico con capacidad de 2 L. Cada charola, con su respectiva muestra de semilla se dejó con una cantidad de 100 mL de agua destilada, y a cada una de estas charolas se le añadieron 2 mL de solución amortiguadora fosfatasa con un pH = 7. A la mezcla de agua con fosfatasa conteniendo cada muestra de semillas se le llamó “suspensión madre”. Las charolas se incubaron durante 12 h en refrigeración a 4° C con la finalidad de que se liberara conidias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* a la suspensión madre. Después de la incubación, se tomaron 10 mL de suspensión madre de cada una de las charolas, se le realizaron cuatro diluciones a tal suspensión (10:1, 10:2, 10:3, 10:4), y de la última dilución se tomó 0.1 mL que se sembró en medio de cultivo PDA en cajas de Petri por el método de dispersión por varilla (Roger *et al.*, 1981). Los medios se incubaron durante siete días a 34°C. Una vez germinadas las conidias y existiese crecimiento micelial con estructuras reproductivas, éstos fueron identificados considerando las claves indicadas en la fase de incremento de las cepas.

4.3.6 Detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto con el Antisuero Producido

Previo a la detección con el antisuero producido, las plántulas, hojas desarrolladas y frutos obtenidos, se sometieron por un proceso de cortes de 0.5 a 1 cm de diámetro e introducidas directamente en una solución salina al 0.85% de NaCl, denominada solución madre. Para la detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1),

Alternaria solani y *Botrytis cinerea*, se desarrolló la técnica de aglutinación en portaobjeto como lo indica Kiraly (1974), la cual consiste en poner en un portaobjetos cóncavo, 0.1mL de antisuero producido y posteriormente disolver 0.1 mL de la soluciones madres obtenidas de semilla, plántula, hoja y fruto. Las preparaciones fueron observadas al microscopio con la finalidad de ver la reacción de aglutinación visual y al microscopio óptico.

4.3.7 Detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica ELISA

Para la detección de *Fusarium solani*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*, con respecto a la técnica serológica ELISA, se consideró el protocolo descrito en la detección en semilla.

4.3.8 Pruebas de patogenicidad de aquellos muestras positivas a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinérea*, con los diferentes métodos de detección.

Para la reafirmación de los hongos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* que resultaron ser positivas en los anteriores métodos de detección, las pruebas de patogenicidad fueron llevando a cabo la técnica de Randhawa, (1996) y Rueda *et al.* (2006), tal como se describió en la purificación e incremento de inóculo para producir antígeno.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.4.1 Pruebas de identificación.

Al realizar las previas pruebas de incremento de inóculo, e identificación (medios de cultivo específicos y ELISA) y de patogenicidad, el resultado fue igual a los indicados por Jarvis (1973), Cañedo y Ames (2004), Ascencio-Álvarez *et al.* (2008), López (2012), Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. (CeSaVeg, 2016), Robles-Carrión *et al.* (2014); Valencia *et al.* (2016), indicando que para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), las características son producir colonias de crecimiento rápido, presentan un micelio aéreo, algodonoso y de coloración blanca; microscópicamente muestran macroconidias, fusiformes, curvas en los extremos y septadas; las dimensiones de los macro y microconidios (29.1–45 X 2.9–4.7 μm), el desarrollo de conidias se logró observar a los nueve días; rubro que concuerda con Valencia *et al.* (2016). Con relación a al hongo *Alternaria solani*, el desarrollo de conidias se logró obtener al cabo de 8 días; resultado que concuerda con Cazar *et al.* (2014); éste presentó un micelio aéreo algodonoso, liso, blanco, que pronto se tornó blanco mate a gris y, por último, fue capaz de tapar el micelio de color negro cuando esporula. Los conidióforos son oscuros, de donde nacen los conidios en forma de cadena. Los conidios miden 12-20 X 120-296 μm , son oscuros, alargados, ovoides, con apariencia de mazo y presentan septos longitudinales y transversales (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016).

Por su parte *Botrytis cinerea*, presentó colonias grises. Esclerocios pequeños y delgados. Al quinto día se observaron conidióforos bien diferenciados, simples, rectos, de 205 -210 x 18 -20 μm , ramas de 18 - 20 x 6-8 μm , notablemente hinchadas en sus extremos para formar ámpulas conidiógenas. Conidios elipsoidales, lisos, casi hialinos, de 7 - 14 x 5 - 8 μm , frecuentemente con un apéndice de 3 μm de largo según Farrera *et al.* (2007); en masa los conidios se observaron con tonalidades de color gris-café. *B. cinerea*, se caracteriza por el tamaño de sus conidióforos, de más de 1000 μm , llegando incluso hasta los 2000 μm , aspecto que concuerda con (Robles-Carrión *et al.*, 2014).

Con relación a la Pruebas de patogenicidad por efecto de las inoculaciones de los ejemplares donados y con la finalidad de corroborar y de familiarización, los síntomas de las semillas embebidas en la suspensión conidial de 10^8 conidias·mL⁻¹, con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1)=(Folr1), el 100% germinó entre los 36 y 48 h bajo condiciones favorables de la enfermedad en ambos materiales utilizados (Bonny Best y Manapal); sin embargo para el primero, las plántulas de Folr1 al cabo de 18 días presentaron una leve marchitez en tallo e iniciando un amarillamiento ascendente. Los cotiledones mostraron manchas irregulares de aspecto más oscuro y grasoso con relación al área sana, y finalmente se presentó la muerte de la plántula a los 30 días. Las raíces al realizar un corte mostraron una pudrición donde los tejidos conductores se tornaron de color café cuya necrosis interna se extendió a lo largo del tallo hasta las primeras hojas verdaderas a los 40 días. Esta misma sintomatología fue identificada en plántulas que una vez muertas se observó como el hongo fructificó sobre la superficie del tallo bajo condiciones de ambiente húmedo. Lo contrario ocurrió con el material Manapal, donde la manifestación de síntomas no fue detectada ni al desarrollar cortes trans y horizontales a lo largo de los tejidos conductores en raíz y tallo de plántula. Los resultados obtenidos concuerdan al realizar inoculaciones en el mismo material Bonny Best y Manapal, con Ascencio-Álvarez *et al.* (2008).

Para *Alternaria solani* son los síntomas sobre hojas, a los nueve días fueron aquellos característicos de forma circular, cercano a 1,5 cm de diámetro, de color marrón conteniendo anillos concéntricos. Las manchas producidas por este hongo, ocurrieron de forma aislada o coalescente. Al cabo de 20 días cuando el ataque fue muy intenso y severo, las manchas fueron marrones a negras y alcanzaron hasta casi 2,5 cm de diámetro. Los resultados concuerdan con Martínez-Ruiz *et al.* (2016), indicando que los primeros síntomas, aparecen en las hojas más viejas y van progresando hacia las hojas más nuevas; de ahí también se pueden ver manchas marrones sobre los pedicelos y sobre los cálices cuando están adheridos a la flor o fruta. De esta manera, los frutos se infectan a través del cáliz o del pedicelo tanto cuando están verdes o maduros. En las hojas con un grado de severidad medianamente alta, las manchas son generalmente marrones a negras y alcanzan hasta casi 4,5 cm de diámetro. Las manchas son firmes, deprimidas y tienen halos concéntricos en su interior. Las lesiones sobre fruta, pueden estar cubiertas por una

masa de esporas de color negro las que por las tareas comunes de manejo son diseminadas. Este síntoma en fruta, es muy común observarlo en los meses más cálidos en los invernaderos de climas cálidos. No es una enfermedad grave hasta el momento, pero puede en algunas situaciones producir pérdidas importantes de fruta y hojas (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016).

Para Botrytis cinerea la sintomatología inició con la formación de pequeños anillos concéntricos redondeando al punto de infección, al inicio del 5º día. A los nueve días el fruto presento una acuosidad y sobre ella la presencia de micelio característico de color grisáceo. Los primeros olores de putrefacción fueron detectados y en el 13º día ya existían conidiosporas. Los resultados obtenidos concuerdan con Martínez-Ruiz *et al.* (2016), Ya que indican que *Botrytis cinerea* también pueden ser parte causante de la podredumbre no nada más en fruto sino también en tallo; aunque los anillos son característicos de *Botrytis* spp., éstos pueden confundirse con los anillos causados por algunos virus, pero con la diferencia que en el caso de virosis, los anillos se ven acompañados por malformaciones de los frutos.

Mediante la confirmación por la técnica serológica ELISA, se obtuvo un resultado positivo para los ejemplares fúngicos proporcionados por la empresa donante, así como también para las suspensiones de jugo celular y tejido infectado rico en conidias obtenidas de las pruebas de patogenicidad antes mencionadas. Entre otra de las finalidades de la confirmación de los patógenos en estudio mediante pruebas de patogenicidad, era la de familiarizarse con los síntomas, ya que sería de gran utilidad con respecto al segundo objetivo que consistió en un muestreo de partes vegetativas del cultivo de tomate y su detección de los hongos en el estado de Sonora.

4.4.2 Producción de antígeno contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*.

Debido a que no todos los animales de sangre caliente reaccionan igual a un antígeno, sólo el esquema 3 (Cuadro 1) resultó ser eficiente para producir un alto contenido de anticuerpos, ya que una vez que se realizó la prueba de título antes de

la inyección del recuerdo, la aglutinación y precipitación fue observada en el séptimo tubo, lo que no ocurrió con los conejos tratados con los esquemas 1 y 2 (Cuadro 1). La aglutinación fue reafirmada realizando lecturas bajo el microscopio compuesto para observar una microaglutinación con la ayuda de un microscopio compuesto (Cuadro 2) (Bokx, 1980). Después de la inyección del recuerdo, en los conejos bajo tratamiento con este esquema, la aglutinación fue observada hasta el noveno tubo lo que indicó un alto contenido de anticuerpos. Las pruebas de confirmación por aglutinación resultaron ser positivas, obteniendo que las diluciones conidiales de 1×10^4 para *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (R1), y 1×10^3 para *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* fueran las diluciones más bajas para su detección. Una vez realizada esta actividad, se obtuvo la sangre total, se separó el suero del plasma y el antisuero rico en anticuerpos contra *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*, se almacenó en tubos de ensaye bajo congelamiento.

4.4.3 Detección de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en el Estado de Sonora.

En el caso de semilla, los resultados se muestran en el Cuadro 3. Bajo la técnica de Diagnóstico utilizando medio sólido papa-dextrosaagar (PDA), se demostró la presencia de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (R1) =(Folr1), en la semilla donada por productores pertenecientes a la región Costa de Hermosillo, Valle de Guaymas y del Yaqui, con los materiales DMX1 y DMX2. Lo anterior debido a que las características que presentaban las conidias observadas bajo el microscopio fueron similares a las indicadas por Valencia *et al.* (2016), Robles-Carrión *et al.* (2014). Un mismo resultado ocurrió en la semilla obtenida de Valle del Yaqui en el material BER y GLO, pero con la diferencia de que éstas resultaron ser positivas para *Alternaria solani*, ya que las conidias observadas correspondían tener la forma alargada, ovoides y oscuros con apariencia de mazo y presentan septos longitudinales y transversales con medidas de 12-20 X 120-296 μm , según Robles-Carrión *et al.* (2014) y Martínez-Ruiz *et al.* (2016). Con respecto a la técnica ELISA, los resultados indican que mediante esta técnica, la semilla obtenida de las tres

regiones con los materiales DMX1 y DMX2, resultó ser positiva a la presencia de Folr1, confirmándose con las muestras procesadas con respecto al testigo, asimismo, en los materiales BER y GLO, del Valle del Yaqui resultaron positivas; lo contrario ocurrió con las muestras pertenecientes a la región de Guaymas con los materiales RUE, ZAP, LEO y DAR resultaron ser negativas. En la detección de *B. cinerea*, mediante la ELISA, el resultado fue negativo.

Con respecto a la técnica de aglutinación y microaglutinación en portaobjeto con el antisuero producido, los resultados fueron positivos para Folr1, en muestras de semilla obtenidas de productores de las regiones muestreadas (DMX1 y DMX2, BER y GLO), con excepción de la región de Guaymas con los materiales RUE, ZAP, LEO y DAR que resultaron también ser negativas. En el Cuadro 3, los resultados varían únicamente para el patógeno *A. solani*, donde la técnica de diagnóstico con el antisuero producido, se logra detectar en los materiales DMX1 y DMX2; lo contrario ocurrió en la ELISA, pudiéndose deber probablemente al criterio tomado para considerar una muestra positiva a partir del valor de decisión, ya que hubo valores de muestras procesadas por debajo, pero cercanos al valor de decisión, de ahí la importancia de la diferencia de resultados y definir si esas muestras presentaban o no células conidiales pertenecientes a los hongos estudiados (Rueda *et al.*, 2006).

4.4.4 Muestreo de plántula, hoja desarrollada y fruto en lotes comerciales.

Respecto al estudio de plántula, hoja y fruto realizado por medio de la técnica de medio de cultivo PDA, la técnica ELISA y antisuero producido para detección de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*, los resultados se observan en el Cuadro 4. Se puede apreciar que los materiales vegetativos de las tres regiones muestreadas que y que resultaron ser positivos a la presencia de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (R1) (Folr1), en semilla, al momento de detectarlo en plántula o en las subsiguientes etapas fenológicas, el resultado fue negativo; lo anterior puede deberse a que las variedades que se siembran son resistentes a Folr1 o bien a que las condiciones culturales y de manejo, así como de aquellas al interior de las áreas de producción, como alta temperatura y baja humedad atmosférica, pudiese originar que el patógeno no tenga

la capacidad de sobrevivir y por lo tanto no producir una infección en la planta de tomate. *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* bajo las técnicas llevadas a cabo, varían entre las técnicas; se puede apreciar que la técnica de ELISA y de Antisuero producido, fueron sensibles a la presencia de estos dos fitopatógenos; lo contrario ocurrió el medio PDA (Cuadro 4).

4.4.5 Pruebas de patogenicidad a los hongos positivos en muestras vegetativas mediante los tres métodos de detección.

Estas pruebas solamente se realizaron en aquellas muestras obtenidas de los lugares de muestreo y que resultaron ser positiva en las técnicas de diagnóstico utilizadas. Las pruebas de patogenicidad mostraron que al inocularse en semilla, plántulas de 20 días, hojas y fruto; semilla y plántula para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), hoja para *Alternaria solani* y fruto para *Botrytis cinerea* con un respectivo testigo positivo y negativo, bajo condiciones favorables de la enfermedad, resultaron ser positivos acorde a las características que describe Ascencio-Álvarez *et al.* (2008), en material vegetativo Bonny Best y Manapal. Por su parte *A. solani* fue en hojas y *B. cinerea* en fruto realizándose en la variedad "Rio Grande".

4.4.6 Pruebas de patogenicidad a los hongos positivos en muestras vegetativas mediante los tres métodos de detección.

Estas pruebas solamente se realizaron en aquellas muestras obtenidas de los lugares de muestreo y que resultaron ser positiva en las técnicas de diagnóstico utilizadas. Las pruebas de patogenicidad mostraron que al inocularse en semilla, plántulas de 20 días, hojas y fruto; semilla y plántula para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), hoja para *Alternaria solani* y fruto para *Botrytis cinerea* con un respectivo testigo positivo y negativo, bajo condiciones favorables de la enfermedad, resultaron ser positivos acorde a las características que describe Ascencio-Álvarez *et al.* (2008), en material vegetativo Bonny Best y Manapal. Por su parte *A. solani* fue en hojas y *B. cinerea* en fruto realizándose en la variedad "Rio Grande".

Cuadro 3. Presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en semilla de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), proporcionada por productores de las regiones muestreadas en el estado de Sonora, México

Simbología utilizada en cuadro 3 y 4

+ = Prueba positiva

- = Prueba negativa.

Medio de cultivo papa-dextrosaagar (PDA),

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* (R1)=(Folr1)

Alternaria solani=As

Botrytis cinerea=Bc

Cuadro 3. Presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en semilla de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), proporcionada por productores de las regiones muestreadas en el estado de Sonora, México.

Región	Variedad	Sistema de Producción	Superficie (ha ⁻¹) en la región	Superficie muestreada (ha ⁻¹)	Órgano	Medio de cultivo PDA			ELISA			Antisuero producido		
						Folr1	As	Bc	Folr1	As	Bc	Folr1	As	Bc
Costa de Hermosillo	DMX1	Malla sombra	27	18	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	DMX2	Malla sombra		6	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Valle de Guaymas	DMX1	Malla sombra	478.8	22	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	RUE	Malla sombra		2	Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZAP	Malla sombra		1.5	Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LEO	Campo abierto		34	Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valle del Yaqui	DAR	Malla sombra		16	Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VER	Campo abierto	954	54	Semilla	-	+	-	+	+	-	+	+	-
	GLO	Campo abierto		65	Semilla	-	+	-	+	+	-	+	+	-

DMX1	Malla sombra	12	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	+	-
DMX2	Malla sombra	17	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Testigo +			Semilla	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Testigo -			Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 4. Presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en plántula, hojas y frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), muestreados en las regiones muestreadas en el estado de Sonora, México

Región	Variedad	Órgano muestreado	Medio de cultivo PDA			ELISA			Antisuero producido			
			Folr1	As	Bc	Folr1	As	Bc	Folr1	As	Bc	
Costa de Hermosillo	DMX	Plántula	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
		Hoja	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
	DMX	Plántula	-	-	-	-	+	-	-	+	+	
		Hoja	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
	Valle de Guaymas	DMX	Plántula	-	+	-	-	+	-	-	+	-
			Hoja	-	+	-	-	+	+	-	+	+
			fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
RUE		Plántula	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
		Hoja	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
		fruto	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
ZAP		Plántula	-	+	-	-	+	-	-	+	-	
		Hoja	-	+	-	-	+	+	-	+	+	
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
LEO	Plántula	-	-	-	-	+	-	-	+	+		
	Hoja	-	-	-	-	+	+	-	+	+		
	fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+		
DAR	Plántula	-	+	-	-	+	-	-	+	-		
	Hoja	-	+	-	-	+	+	-	+	+		
	fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+		

Valle del Yaqui	BER	Plántula	-	-	-	-	+	-	-	+	-
		Hoja	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	GLO	Plántula	-	+	-	-	+	-	-	+	-
		Hoja	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	DMX	Plántula	-	-	-	-	+	-	-	+	-
		Hoja	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	DMX	Plántula	-	+	-	-	+	-	-	+	-
		Hoja	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	Testigo positivo	Plántula	+	+	-	+	+	+	+	+	+
		Hoja	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		fruto	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Testigo negativo	Plántula	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		fruto	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.5 CONCLUSIONES

Sólo uno de los esquemas de inmunización utilizados fue conveniente para la producción de antígeno contra *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (R1)*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. Se detectó la presencia del agente causal de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (R1)* y *Alternaria solani* en semilla. Esta presencia se comprobó mediante las tres técnicas de detección: medios nutritivos, ELISA, antisuero producido y pruebas de patogenicidad, en los distintos materiales utilizados en el diagnóstico. Asimismo, se identificó a *Botrytis cinerea*, presente en las áreas de producción de las tres regiones muestreadas; sin embargo es importante indicar que la presencia de los patógenos estudiados, no eran reflejados sintomáticamente. Se concluye que las pruebas de detección por separado no deben ser utilizadas como un método único de detección. Sin embargo, al ser positiva la presencia de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (R1)*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en la semilla, y muestras vegetativas durante el desarrollo del cultivo, representa un riesgo de una eventual manifestación de la enfermedad, por lo que es necesario que todas las regiones productoras continúen realizando actividades de prevención para evitar que la enfermedad se desarrolle, y más aún, realizar pruebas de diagnóstico para aplicar los controles adecuados y preventivos y así disminuir grandes cantidades de productos químicos y disminuyendo la resistencias genética y contaminación al medio ambiente.

4.6 AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer su apoyo a la Confederación Nacional de Productores Hortícolas del Estado de Sonora, así como a las instituciones la Universidad de Sonora, Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y el Centro de Investigaciones en Alimentos (CIAD)- Hermosillo; se agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con clave Cvu 391439, durante los estudios de grado doctoral en el Instituto d Cs´ Agrícolas de la UABC: Matricula UABC 1139133.

BIBLIOGRAFÍA

Abad, G. 2002. Revisión del Genero Fusarium. Primer Taller Internacional sobre "Identificación de Hongos y Stramenopilas Transmitidos por Semillas" North Carolina State University. México. 339 p.

Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S.A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F. y Gámez-Vázquez, A.J. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 26:114-120

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4 ed. APS (The American Phytopathology Society). USA. 258 p.

Bokx, J. 1980. Virosis de la Papa y de la Semilla de Papa. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 303 p.

Cañedo V. y Ames T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p. © Centro Internacional de la Papa (CIP).

Cázar M. E., Villena P., Parra J., Espinoza V., Larriva G. y Caldas A. 2014. Eficacia de extracto etanólico de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) en el control de *Alternaria* sp. en cultivos de col y patata. Maskana 5(1): 33-41.

Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. (CESaVeg). 2016. Manual de Plagas y Enfermedades en Jitomate In: SAGARPA- SENASICA. 29 p.

- Dal Bello, G.; Nico A.; Mónaco, C. I. Hongos saprófitos como herramientas de control biológico de '*Botrytis cinerea*' en tomate. *Horticultura global*. 2012. (303): 64-68.
- Davised, C. L. 1988. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and Resistance, pp 25-27. In: *Fungicides Resistance in North America*. Delp. J Ch. Ed. American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota, USA.
- Eckert, J. W. 1988. Historical development of fungicide resistance in plant pathogens, pp. 1-3. In: *Fungicides Resistance in North America*. Delp, J. Ch. Ed. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Farrera R. E., Zambrano A. E. y Ortiz F. A. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 24(2): 269-281.
- Flores, O.A. 1994. Producción de Antisuero contra *Agrobacterium tumefaciens*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 9 p.
- Gilman, J. C. 1963. *A Manual of Soil Fungi*. Compañía Editorial Continental. México. 873 p.
- Grijalva Contreras, R. L., Macías Duarte, R., y Robles Contreras, F. 2011. Comportamiento de híbridos de tomate bola en invernadero bajo condiciones desérticas del noroeste de Sonora. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 14(2): 675-682.

Grijalva-Contreras R. L., Macías-Duarte R., Grijalva-Durón S. A., y Robles-Contreras F. 2010. Evaluación de densidades y arreglos de plantación en tomate bola en condiciones de invernadero en el Noroeste de Sonora. *Biotecnia*. 12(2):20-28.

Grijalva-Contreras R. L., Macías-Duarte R., Grijalva-Durón S. A., Núñez-Ramírez F., y Robles-Contreras F. 2014. Productividad de cultivares de tomate cherry bajo condiciones de invernadero en el noroeste de Sonora. *Biotecnia*. 16(2): 27-30.

INIFAP. 2005. Manejo Integrado del Cultivo del Jitomate en el Estado de San Luis Potosí., Folleto Técnico No. 22. Fundación Produce. 18 p

Jarvis, W. R. 1975. Tolerance of *Botrytis cinerea* and rose powdery mildew to benomyl. *Plant. Dis.* 55: 44-49.

Jarvis, W. R.; Hargreaves, A. J. 1973. Tolerance to benomyl in *Botrytis cinerea* and *penicillium corymbifenum*. *Plant Pathol.* 22: 139-141.

Kiraly, G.Z. (Editor). 1974. *Methods in Plant Pathology*. Elsevier Scientific Publishing Company. New York, USA. 509 p.

Martínez-Ruiz F. E., Cervantes-Díaz L., Aíl-Catzím C. E., Hernández-Montiel L. G., Sánchez C. L. D. T. y Rueda-Puente E. O. 2016. Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal*, 12(18): 232-256.

Martínez-Ruiz F. E., Cervantes-Díaz L., Aíl-Catzím C. E., Hernández-Montiel L. G., Sánchez C. L. D. T. y Rueda-Puente E. O. 2016. Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal*. 12(18): 232-256.

Randhawa, P. 1996. Fruit Blotch Testing Protocol. California Seed and Plant Lab. Inc. Roseville, California, USA. 5 p.

Robles-Carrión A., Salinas-Serrano D., Armijos-Armijos W., Sánchez-Rodríguez A. y Torres-Gutiérrez R. 2014. Estudio de la variabilidad morfológica de aislados fúngicos asociados con la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*) en Loja, Ecuador. *Centro de Biotecnología*. 2(2), 33-44.

Roger Y., Stainer, Doudoroff M. y E. Adelberg. 1981. *Microbiología*. Segunda edición. Ed. Prentice_Hall Inc. Madrd, España. 932 p.

Romero, C. 1993. *Hongos Fitopatógenos*. Universidad Autónoma Chapingo. México. 347 p.

Rueda-Puente, Edgar Omar; Tarazón-Herrera, Mario Antonio; García-Hernández, José Luis; MurilloAmador, Bernardo; Holguín-Peña, Ramón Jaime; Flores-Hernández, Arnoldo; Sánchez-Arizpe, Abiel; Flores-Olivas, Alberto; Preciado-Rangel, Pablo. 2006. Producción de Antisuero Contra la Mancha Bacteriana del Fruto (*Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley) y su Detección en el Cultivo de Sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad.) en la Comarca Lagunera, México *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24 (2) pp. 129-136

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), 2015. Agenda Técnica Agrícola de Sonora, Segunda edición. México. 244 p.

SAGARPA. 2005., Análisis Agropecuario del Tomate. Boletín Informativo. Culiacán, Sinaloa, México. 9 p. Tello, J.C. y Lacasa, A. 1988. Evolución racial de poblaciones *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Boletín de Sanidad Vegetal –Plagas. 14:335-341.

SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos). 1994. Manual de muestreo y procesamiento para la identificación de los principales patógenos de la papa. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, D.F., México. 16 p.

Tello, J.C. y Lacasa, A. 1988. Evolución racial de poblaciones *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Boletín de Sanidad Vegetal -Plagas 14:335-341.

Valdés, D.R. 1995. Cría y Explotación del Conejo. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Secretaría de Fomento Agropecuario de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 115 p.

Valencia S., Hurtado G., Pérez K. y Vilaplana R. 2016a. Evaluación de las cepas fúngicas más agresivas de banano (*Musa acuminata* L.) en la poscosecha. *Agronomía Colombiana*. 34(1): 702-705.

Valencia S., Pérez K., Hurtado G. y Vilaplana, R. 2016. Evaluación de la severidad de las podredumbres causadas por hongos aislados de piña (*Ananas comosus* L.) en poscosecha. *Agronomía Colombiana*. 34(1):763-766.

Villarreal, G.L.A. 1980. Supervivencia, Dispersión y Patogenicidad de *Erwinia carotovora* y su Relación con *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. México. 92 p.

CONCLUSIONES GENERALES

Se concluye que el diagnóstico de enfermedades de plantas es un arte y una ciencia, que requiere de conocimiento científico de la fitopatología y disciplinas conexas. En el presente estudio la producción de antisueros con base a los hongos evaluados (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*), mediante tres vías de inmunización (intravenosa, subcutánea, intramuscular), se concluye que la más eficiente fue la intravenosa, debido a la alta titulación obtenida. Los hongos utilizados en la inmunización, respondieron de similar forma a la vía intravenosa. Se recomienda que al momento de emitir un diagnóstico fitosanitario, no omitir técnicas de diagnóstico alternativas a la de antígeno-anticuerpo.