

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**BIOCONTROL DE *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* A PARTIR DE
METABOLITOS ANTIMICROBIANOS DE *Bacillus thuringiensis* CON EFECTO
BIOESTIMULANTE EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

Por

M. C. DAVID FRANCISCO LAFUENTE RINCÓN

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN MANEJO Y ADMINISTRACIÓN
DE RECURSOS VEGETALES**

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L.

Mayo, 2018

**BIOCONTROL DE *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* A PARTIR DE
METABOLITOS ANTIMICROBIANOS DE *Bacillus thuringiensis* CON EFECTO
BIOESTIMULANTE EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

COMITÉ DE TESIS

DRA. DEYANIRA QUISTIÁN MARTÍNEZ
PRESIDENTE

DR MARCO ANTONIO ALVARADO VÁZQUEZ
SECRETARIO

DR. JOSÉ ELEAZAR BARBOZA CORONA
VOCAL 1

DR. RAHIM FOROUGHBAKHCH POURNAVAB
VOCAL 2

DR. JOSÉ ALBERTO VALADEZ LIRA
VOCAL 3

**BIOCONTROL DE *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* A PARTIR DE
METABOLITOS ANTIMICROBIANOS DE *Bacillus thuringiensis* CON EFECTO
BIOESTIMULANTE EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

DIRECCIÓN DE TESIS

DRA. DEYANIRA QUISTIÁN MARTÍNEZ
DIRECTOR

DRA. NORMA MARGARITA DE LA FUENTE SALCIDO
DIRECTOR EXTERNO

LUGAR DE TRABAJO

La producción y purificación de bacteriocinas de Bt se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Industrial perteneciente a la Universidad de Guanajuato, Campus Ciencias de la Vida.

La producción de quitinasas, evaluación de la actividad antifúngica de bacteriocinas y quitinasas *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Microscopía, Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Bioensayos para el biocontrol de *F. oxysporum* se realizaron en el Invernadero de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico durante los tres años del programa de Doctorado en Ciencias con Acentuación en Manejo de Recursos Vegetales. Agosto 2014-Julio 2017.

Al PAICYT-UANL 2015 por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

Al Dr José Eleazar Barboza Corona del Laboratorio de Microbiología Industrial de la División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato por las facilidades técnicas y de infraestructura durante las estancias de investigación en Julio 2015 y Julio 2016.

Al Dr Raymundo Saúl García Estrada del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. sede Culiacán Sinaloa (CIAD-Culiacán) por facilitarnos las cepas fitopatógenas en el presente estudio.

A la Dra Deyanira Quistián Martínez por compartir su experiencia profesional y sus valiosas contribuciones a mi formación como doctor en ciencias, por su compromiso en la dirección de la presente tesis y por ser una persona comprometida con la excelencia académica.

A la Dra Norma Margarita De la Fuente-Salcido por sus puntuales contribuciones en la realización de la presente tesis, su compromiso y apoyo constante en la formación de jóvenes investigadores y por su valiosa amistad.

Al Dr. José Alberto Valadez Lira por compartir su experiencia profesional, sus sobresalientes aportes técnicos durante la realización de la tesis, y por fomentar la colaboración científica.

A los compañeros del Departamento de Botánica (UANL) por su amistad y aportes técnicos durante la realización experimental

A Compañeros del laboratorio de Microbiología Industrial (UdG) por su accesibilidad y aportes técnicos durante la estancia.

Al Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL) por permitir el acceso y uso de sus instalaciones para realizar algunos experimentos.

Al Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL) por permitir el acceso a las instalaciones y proveer del invernadero para realizar los bioensayos de control biológico.

A mis padres Sr Carlos Lafuente López y Sra Rosa María Rincón por su apoyo constante, por creer en mí de manera incondicional y por las infinitas muestras de cariño y cuidado a mi persona, mil gracias.

A mis hermanos José, Eliezer, Daniel y Carlos por su apoyo constante y por demostrarme la importancia de los lazos familiares respaldando reiteradamente mis proyectos personales y profesionales.

A todos mis amigos, por compartir grandes momentos y por estar presentes cuando necesite de un consejo sincero o simplemente de su tiempo para escuchar repetidamente mis historias de éxito y fracaso en experimentos y demás jerga científica.

A Jesús Martínez Gutierrez y José Juan Torres Martínez por su valiosa amistad, por ser personas de mi mayor confianza, por atender miles de inquietudes personales con útiles consejos y sinceros puntos de vista durante este proceso de crecimiento personal y profesional.

A la familia Castillo Lafuente por recibirme en su hogar durante más de 3 años que abarcó el programa de doctorado y la culminación de tesis.

A cada una de las personas que aportaron en mayor o menor grado a mi formación como Doctor en Ciencias.

DEDICATORIA

Dedico este logro profesional a mi madre, Rosa María Rincón Quiroz (+) quien fue mi principal apoyo durante mi desarrollo y formación como persona y como ciudadano. Por ser la persona que creyó en mis sueños más que nadie mostrándose como un apoyo incondicional a mis aspiraciones profesionales. Siempre estaré agradecido por enseñarme a potenciar mis fortalezas sobre mis debilidades. Tu esencia es irremplazable y tu legado de amor fraternal, de respeto a la vida, de hospitalidad, de servicio comunitario y de justicia social, es incomparable.

Rosita, con amor hasta el cielo

¡Gracias totales!

“La razón es el orden natural de la verdad, pero la
imaginación es el órgano del sentido”

C.S. Lewis (1939) en *Bluspels and Flalansferes: A Semantic Nightmare*

ÍNDICE GENERAL

	Descripción	Pág.
	PORTADA	I
	LUGAR DE TRABAJO	III
	AGRADECIMIENTOS	IV
	DEDICATORIA	VI
	ÍNDICE GENERAL	VII
	ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
	ÍNDICE DE TABLAS	XVI
	RESUMEN	XVII
	ABSTRACT	XVIII
	INTRODUCCIÓN	1
	JUSTIFICACIÓN	2
	HIPÓTESIS	3
	OBJETIVO GENERAL	4
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
	CAPÍTULO I. Actividad antifúngica de cepas mexicanas de <i>B. thuringiensis</i> contra 3 razas fitopatógenas <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>.	
	1.1 RESUMEN	5
	1.2 ABSTRACT	5
	1.3 INTRODUCCIÓN	6
	1.4 MATERIAL Y MÉTODOS	8
	1.4.1 Material biológico.	8
	1.4.2 Actividad antagónica de cepas de Bt productoras de bacteriocinas.	8
	1.4.3 Producción de bacteriocinas de Bt.	8
	1.4.4 Actividad de bacteriocinas contra <i>B. cereus</i> 183.	9
	1.4.5 Actividad fungistática de bacteriocinas de Bt.	9

1.4.6	Actividad fungitóxicas de bacteriocinas de Bt.	10
1.4.7	Análisis estadístico.	11
1.5	RESULTADOS	11
1.5.1	Actividad antagonista de cepas de Bt productoras de bacteriocinas.	11
1.5.2	Actividad fungistática de bacteriocinas de Bt.	13
1.5.3	Actividad fungitóxicas de bacteriocinas de Bt.	15
1.5.4	Análisis de Componentes Principales de la actividad antimicrobiana de cepas de Bt productoras de bacteriocinas sobre razas fitopatógenas de Fol.	16
1.6	DISCUSIONES	17

CAPITULO II. Actividad antifúngica de Quitinasas de *B. thuringiensis* contra *Fusarium oxysporum*.

2.1	RESUMEN	23
2.2	ABSTRACT	23
2.3	INTRODUCCIÓN	24
2.4	MATERIAL Y MÉTODOS	26
2.4.1.	Material biológico.	26
2.4.2	Producción de quitinasas de <i>B. thuringiensis</i> en <i>E. coli</i> .	26
2.4.3.	Purificación de las quitinasas.	27
2.4.3.1	Purificación por columna Histrap Ni.	27
2.4.3.2	Purificación de quitinasas por columna de Ni-NTA spin.	27
2.4.4.	Cuantificación de proteína total y SDS-PAGE.	28
2.4.5.	Actividad quitinolítica.	28
2.4.6.	Efecto de las quitinasas sobre el crecimiento <i>in vitro</i> en <i>F. oxysporum</i> .	28
2.4.7.	Ensayo de actividad fungistática de las quitinasas.	29
2.5	RESULTADOS	30
2.5.1	Producción y purificación de quitinasas de <i>B. thuringiensis</i> .	31
2.5.2.	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> .	32

2.6	DISCUSIONES	33
-----	-------------	----

CAPITULO III. Bioestimulación de bacteriocinas y cepas de *B. thuringiensis* en la germinación y crecimiento de *Solanum lycopersicum* L.

3.1	RESUMEN	34
3.2	ABSTRACT	35
3.3	INTRODUCCIÓN	35
3.4	MATERIAL Y MÉTODOS	37
3.4.1	Material biológico.	37
3.4.2.	Obtención de suspensiones celulares, bacteriocinas	38
3.4.3.	Ensayo de actividad estimulante de bacteriocinas del crecimiento de Bt.	38
3.4.3.1	Desinfección de semilla.	38
3.4.3.2	Aplicación de tratamiento.	38
3.4.4	Evaluación de la germinación de semillas y vigor de plántulas.	38
3.4.5	Análisis estadístico.	39
3.5	RESULTADOS	39
3.5.1	Efecto de tratamiento biológicos basados en bacteriocinas y cepas productoras sobre el vigor de semillas de tomate <i>in vitro</i> .	39
3.6	DISCUSIONES	42

CAPÍTULO IV. Bioestimulación y protección de quitinasas de *B. thuringiensis* sobre la infección de *F. oxysporum* en *Solanum lycopersicum* L.

4.1	RESUMEN	45
4.2	ABSTRACT	45
4.3	INTRODUCCIÓN	46
4.4	MATERIAL Y MÉTODOS	47
4.4.1	Material biológico	48
4.4.2	Producción de quitinasas de <i>B. thuringiensis</i> en <i>E. coli</i> .	49

4.4.2 Evaluación de la patogenicidad de <i>F. oxysporum</i> sobre las plántulas de tomate	49
4.4.3 Ensayo de protección de quitinasas en raíces de tomate	50
4.4.3.1 Aplicación de las quitinasas en raíces	50
4.4.3.2 Inoculación del patógeno en raíces	51
4.4.3.3 Monitoreo del crecimiento y contenido de pigmentos en hojas	52
4.4.3.4 Evaluación de la severidad de la enfermedad	52
4.4.4 Estandarización de metodología para extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides en hojas de tomate bajo estrés biótico causado por <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raza 3	53
4.4.4.1 Muestreo y extracción de pigmentos de hojas de tomate cv. Rio Grande.	53
4.4.4.2 Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría UV..	53
4.4.4.3 Nivel de clorosis en hojas de tomate cv. Rio Grande	53
4.4.5 Análisis estadístico.	54
4.5 RESULTADOS	54
4.5.1 Efecto de las quitinasas sobre la promoción de crecimiento vegetativo del tomate bajo condiciones de laboratorio.	54
4.5.2 Efecto de las quitinasas de Bt sobre la estimulación de resistencia a razas de Fol en semillas de tomate cv. Rio Grande.	53
4.5.3 Efecto de las quitinasas sobre la severidad de la marchitez vascular de tomate causada por <i>F. oxysporum</i> bajo condiciones invernadero	57
4.5.4 Efecto de las quitinasas de Bt sobre el crecimiento de plantas de tomate en condiciones normales y bajo estrés biótico por <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raza 3.	62
4.6 DISCUSIONES	65
CONCLUSIONES	69
PERSPECTIVAS	70
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Descripción	Pág.
1.1	Actividad antagonista de cepas de <i>B. thuringiensis</i> productoras de bacteriocinas.	12
11.2	Cambios en crecimiento y ramificación en hifas de razas de Fol causados por cepas de Bt productoras de bacteriocinas <i>in vitro</i> .	13
1.3	Efecto de las cepas de Bt productoras de bacteriocinas sobre la producción de biomasa en cepas patogénicas de Fol <i>in vitro</i> .	14
1.4	Efecto de los extractos de bacteriocina de Bt <i>in vitro</i> sobre la viabilidad celular en cepas patogénicas de Fol.	16
1.5	Análisis de componentes principales (PCA) con Biplot del efecto <i>in vitro</i> de bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> sobre el crecimiento de cepas fitopatógenas de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .	17
2.1	Evaluación funcional de las quitinasas de Bt.	31
2.2	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de quitinasas sobre la germinación de esporas y crecimiento de micelio sobre tres cepas de <i>F. oxysporum</i> .	31
3.1	Efecto de la Thurincina H (m) de Bt-269 sobre el tiempo de germinación de semillas de tomate cv. Rio Grande.	39
3.2	Efecto de la concentración de Thurincina H (m) de Bt-269 sobre la germinación de semillas de tomate cv. Rio Grande.	40
3.3	Análisis de componentes principales (PCA) con Biplot entre los tratamientos biológicos de <i>B. thuringiensis</i> en semillas de tomate y los parámetros de crecimiento	42
4.1	Diagrama de las evaluaciones del efecto estimulante de quitinasa de Bt sobre el vigor y resistencia a patógenos en semillas de tomate cv. Rio Grande.	51
4.2	Diagrama del proceso y evaluación del efecto de las quitinasas de Bt como controlador biológico y estimulante del crecimiento vegetativo en plantas de tomate.	52
4.3	Pruebas de patogenicidad en plántulas de tomate.	55

4.4	Efecto de los tratamientos en semilla con quitinasas de Bt sobre la patogenicidad de cepas fitopatógenas de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> en plántulas de tomate cv Rio Grande.	56
4.5	Análisis de componentes principales APC del efecto de las quitinasas en semillas de tomate cv. Rio Grande sobre la severidad de la enfermedad (SE) causado por razas fitopatógenas de <i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .	57
4.6	Categorización de severidad de la marchitez vascular en tomate cv. Rio Grande causada por <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> raza 3. Raíz y tallo sanos i, ii, Raíz y tallo sintomáticos iii, iv.	58
4.7	Efecto de las quitinasas de Bt sobre tejidos y orgánogeneésis en plantas de tomate cv. Rio Grande.	59
4.8	Análisis de componentes principales APC del efecto de las quitinasas en semillas de tomate cv. Rio Grande sobre la severidad de la enfermedad (SE).	61
4.9	Análisis de componentes principales APC del efecto de las quitinasas en semillas de tomate cv. Rio Grande sobre la severidad de la enfermedad (SE) causado por razas fitopatógenas de <i>F.oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .	62
4.10	Efecto de la quitinasa ChiA74 de Bt sobre el contenido y relación de pigmentos fotosintéticos en tomate cv. Rio Grande en condiciones normales y bajo estrés biótico causado por <i>F. oxysporum</i> .	63
4.11	Efecto de la quitinasa ChiA Btt de Bt sobre el contenido y relación de pigmentos fotosintéticos en tomate cv. Rio Grande en condiciones normales y bajo estrés biótico causado por <i>F. oxysporum</i> .	64
4.12	Estandarización de metodología para cuantificación de clorofilas y carotenoides en hoja de tomate cv. Rio Grande bajo condiciones de estrés biótico.	65

INDICE DE TABLAS

No.	Descripción	Pág
1.1	Efecto de las bacteriocinas de Bt sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de razas patogénicas de Fol	15
2.1	Producción de quitinasas de Bt.	30
2.2	Actividad fungistática de quitinasas de Bt sobre cepas patogénicas de Fol.	31
3.1	Actividad promotora del crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> en semillas de tomate cv. Rio Grande.	41
4.1	Diseño experimental de ensayos de patogenicidad en plántulas de tomate cv. Rio Grande.	49
4.2	Tratamientos en plántulas de tomate var. Rio Grande obtenidas a partir de semillas tratadas con quitinasas de <i>B. thuringiensis</i> .	50
4.3	Diseño experimental de la evaluación de la aplicación de quitinasas en raíces de tomate sobre la estimulación del crecimiento de tomate en condiciones normales y bajo estrés biótico por <i>F. oxysporum</i> .	51
4.4	Descripción del diseño experimental de ensayos de patogenicidad en plántulas de tomate cv. Rio Grande.	52
4.5	Efectos fisiológicos del tratamiento de semillas de tomate cv. Rio Grande mediante imbibición con quitinasas de <i>B. thuringiensis</i> .	54
4.6	Crecimiento de plantas (cm) de tomate cv. Rio Grande en condiciones normales y bajo estrés biótico durante 56 días de ensayo bajo condiciones de invernadero.	60
4.7	Influencia de las quitinasas ChiA74 y ChiA74 Btt sobre la promoción del crecimiento de tomate bajo condiciones normales y estrés biótico.	61

RESUMEN

Recientes estudios bioprospectivos demuestran que las quitinasas y bacteriocinas de *B. thuringiensis* (Bt) pueden considerarse en el control de razas fitopatógenas de *F. oxysporum* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). En este estudio, fueron evaluados los efectos de 5 cepas mexicanas de Bt productoras de bacteriocinas y de las quitinasas de Bt: ChiA74 y ChiA Btt para inhibir el crecimiento de razas fitopatógenas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) por las pruebas de difusión en pozos y agar. El efecto de los metabolitos de Bt fue evaluado por la técnica de imbibición de semillas y raíces sobre el crecimiento vegetativo en tomate cv. Rio Grande en condiciones de desarrollo normal y bajo infección por *F. oxysporum*. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio y las variables crecimiento micelial, biomasa, viabilidad *in vitro* y los parámetros de desarrollo de tomate: vigor de semillas, crecimiento vegetativo (Peso seco, peso fresco y altura), contenido de pigmentos fotosintéticos, y % de severidad de enfermedad fueron analizados por la prueba de Fischer (LSD) con un 95% de confianza. Las medias obtenidas en cada evaluación fueron sometidas a un análisis de componentes principales (APC). Las bacteriocinas, y las cinco cepas de Bt presentaron distintos niveles de actividad antifúngica (Antagonismo, crecimiento micelial, biomasa, germinación de esporas, viabilidad celular) sobre las tres razas de Fol *in vitro*, en contraste con las quitinasas de Bt que mostraron una actividad antifúngica discreta sobre Fol. La imbibición de semillas y raíces de tomate incrementó el vigor de semillas, causó una reducción de la severidad fitopatógena de las razas de Fol en plántulas de tomate. La aplicación de la quitinasa ChiA74 incrementó desarrollo vegetativo y el contenido de pigmentos fotosintéticos en tomate bajo condiciones de desarrollo normales y bajo infección de la raza 3 de Fol.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, bacteriocinas, quitinasas, crecimiento vegetativo, *Solanum lycopersicum*.

ABSTRACT

The antimicrobial and plant stimulation properties found in chitinases and bacteriocins synthesized by the entomopathogenic microorganism *B. thuringiensis* (Bt) represent a biotechnological source for the development of protection strategies for tomato crop (*Solanum lycopersicum* L.) for decrease of economic losses and environmental risks involved in the control of *F. oxysporum*. In this study, the effects of 5 Bt Mexican strains producing bacteriocins and Bt kinases: ChiA74 and ChiA Btt were evaluated to inhibit the growth of phytopathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) *in vitro* and stimulation effect on vegetative growth in tomato cv. Rio Grande under greenhouse conditions. The five strains of Bt showed antagonistic activity against the three races of Fol. The bacteriocins synthesized by Bt showed different degrees of antifungal activity in mycelial growth (1- 21%), biomass production (5-49%), spore germination (2-14%) and / or cell viability (4-21). %. Under the evaluated conditions, the Bt chitinases showed no antifungal activity (0.75-3.0 U mL⁻¹) on the growth and germination of Fol spores. The application of cell suspensions (1x10⁷ cels · ml⁻¹) and bacteriocins (500U · ml⁻¹) of Bt enhanced the vigor index in tomato seeds. The application of chitinase ChiA74 and ChiA Btt in seeds reduced the severity caused by the strains Fol-1 (30-40%), Fol-2 (33-42%) and Fol-3 (9-23%) of *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* in tomato seedlings and increased the content of photosynthetic pigments under normal growth conditions and under infection. The application of chitinase ChiA74 by imbibition of roots caused an increase in the production of biomass, the development of root and the content of photosynthetic pigments in plants under normal growth conditions or under biotic stress caused by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Bt-bacteriocins, Bt-Chitinases. Crop

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es considerado entre los productos agroalimentarios más importantes de México, cuyo volumen de exportación a los EE.UU fue estimado durante el primer semestre del 2016 en 992,214 toneladas métricas con un valor de \$1,194 millones de dólares (SAGARPA 2016).

A nivel global, los microorganismos fitopatógenos causantes de pudriciones de raíz y la marchitez vascular, se encuentran entre los de mayor agresividad y de difícil control, debido a su capacidad de dispersión y su prolongada persistencia en el ambiente (Agrios, 2005). Particularmente, es bien conocida la severidad de la marchitez vascular del tomate causada por la presencia de razas fitopatógenas del hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, las cuales son un constante riesgo en las principales regiones tomateras de México (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008). El control en campo de esta enfermedad es desafiante, debido en gran manera al surgimiento de fenómenos de resistencia de los agentes causales, inclusive bajo el empleo de fungicidas químicos o la implementación de cultivares resistentes (Agrios 2005; Fischer 2017).

Bacillus thuringiensis (Bt) es uno de los agentes de biocontrol más utilizados mundialmente por la eficacia de sus proteínas insecticidas cry, cyt y vip, además de los péptidos antimicrobianos (bacteriocinas y quitinasas) utilizados en la protección contra plagas y como promotor del crecimiento en vegetales (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2013). En los últimos cinco años se han reportado algunas cepas de Bt con actividad antimicrobiana contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, el mayor agente etiológico de la marchitez vascular en cultivos de tomate (Akram *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2016).

El potencial antifúngico de Bt es asociado a un amplio arsenal antimicrobiano, capaz de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos en campo y post-cosecha, tales son los casos de las proteínas de unión a quitina (Aroa *et al.*, 2013; Mehmood *et al.*, 2011), quitinasas (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016; De la Vega *et al.*, 2006; Reyes-Ramírez *et al.*, 2004) y biosurfactantes (Kim *et al.*, 2004).

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es considerado un recurso vegetal de relevancia para la industria alimentaria. Su producción y comercialización contribuye en gran manera a la dinámica económica regional en los países productores como México. Sin embargo, es un cultivo frecuentemente atacado por insectos-plaga y microorganismos fitopatógenos, lo cual demerita su rentabilidad, debido a la reducción de la producción y las inversiones destinadas al control de plagas. Actualmente la marchitez vascular causada por las tres razas patogénicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* es una problemática frecuente para los productores de este insumo agrícola debido a la severidad manifestada, su persistencia por años en el ambiente, la generación de resistencias en el patógeno a pesticidas utilizados para su control y el riesgo latente de la emergencia de una nueva raza de *F. oxysporum*. La implementación de metodologías de control biológico en tomate ha tenido un relativo éxito para disminuir las repercusiones económicas y ecológicas de las distintas enfermedades de origen biótico en el cultivo. Desde hace tres décadas, la bacteria entomopatógena *B. thuringiensis* se ha utilizado exitosamente en el control de insectos-plaga. Actualmente la aplicación de este agente microbiano cuenta con reconocimiento mundial por considerada una práctica de control biológico segura, controlaba y rentable (costo-beneficio) para la producción agrícola. Recientes investigaciones revelan que las bacteriocinas y quitinasas sintetizadas por distintas cepas de Bt son un nicho biotecnológico para el desarrollo de metodologías de bicontrol de microorganismos fitopatógenos y biofertilización en el cultivo de tomate debido específicamente a sus propiedades antimicrobianas sobre agentes etiológicos del tomate y su efecto estimulante del crecimiento vegetativo

HIPÓTESIS

Las bacteriocinas y quitinasas producidas por cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* son una alternativa viable para el control de la marchitez vascular en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inhibiendo el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*.

OBJETIVO DEL TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antifúngico y bioprotector de quitinasas y bacteriocinas de *B. thuringiensis* sobre cepas fitopatógenas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro* y bajo condiciones de infección en tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la actividad antifúngica de las bacteriocinas y quitinasas de Bt sobre la inhibición de crecimiento y viabilidad celular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
2. Evaluar por bioensayos *in vivo* la capacidad de las quitinasas ChiA74 y ChiA Btt producidos por cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* para disminuir la severidad del marchitamiento vascular en *Solanum lycopersicum* L. ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
3. Evaluar el efecto de tratamientos de biocontrol extractos proteicos enriquecidos con bacteriocinas producidos por cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* sobre la germinación y crecimiento vegetativo de *Solanum lycopersicum* L.

CAPÍTULO I

Actividad antifúngica de cepas mexicanas de *B. thuringiensis* contra 3 razas fitopatógenas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

1.1 RESUMEN

La capacidad de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para producir una gran diversidad de metabolitos antimicrobianos representa una fuente biotecnológica para el desarrollo de estrategias alternativas al control químico de hongos fitopatógenos. En este estudio, el objetivo fue evaluar el efecto antifúngico de cinco cepas mexicanas de Bt contra tres razas patogénicas de Fol (Fol-1, Fol-2, Fol-3) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Las cinco cepas de Bt causaron una respuesta de estrés celular en dos vías, supresión de crecimiento y promoción de hiperramificación de las hifas en todos los hongos evaluados. Fol-3 mostró la mayor resistencia a la actividad antifúngica de las cepas de Bt. Las bacteriocinas mostraron diferentes grados de actividad antifúngica en el crecimiento miceliar (1- 21%), producción de biomasa (5-49%), germinación de esporas (2-14%) y/o viabilidad celular (4-21%). Este es el primer reporte sobre actividad antifúngica de cepas mexicanas de Bt contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, el principal agente causal de la Fusariosis vascular del tomate.

Palabras clave: Bacteriocinas, *Bacillus thuringiensis*, Biocontrol, *Fusarium oxysporum* (Fol).

Antifungal activity of Mexican strains of *B. thuringiensis* against 5 pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

1.2 ABSTRACT

The capacity of *Bacillus thuringiensis* (Bt) to produce a broad diversity of antifungal metabolites represent a biotechnological resource for development of

alternatives strategies to chemical control of plant pathogens fungi. In this study, our objective was evaluated the antifungal effect of five Mexican Bt strains against three Fol pathogenic races (Fol-1, Fol-2, Fol-3) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). The five Bt strains trigger a cellular stress response by both ways, grown suppression and hyperbranching promotion of hyphae in all fungal strain tested. Fol-3 showed the major resistance to the antifungal activity of Bt strains. Bacteriocin enriched crude fractions (BECF) showed different degrees of antifungal activity in mycelial growth (1- 21%), biomass production (5-49%), spore germination (2-14%) and/or cellular viability (4-21%). This is the first report about the antifungal activity of mexican strains of Bt against *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, the main etiological causal of Fusarium Wilt in tomato.

Key words: *Bacillus thuringiensis* (Bt); Bacteriocins; Biocontrol; *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

1.3 INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (Bt) es el bioinsecticida más exitoso en la protección de cultivos contra plagas, principalmente conferidos a sus cristales proteicos citotóxicos (Cry), citolíticos (Cyt) y proteínas vegetativas insecticidas (Vip's) en los programas de control de insectos plaga en cultivos (Mnif y Ghribi, 2015). Bt ha ganado una atención práctica en el manejo integrado de plagas (MPI), para la protección contra microorganismos como ácaros, nematodos, bacterias y atractivas aplicaciones en el control de enfermedades en plantas de origen fúngico.(Mnif y Ghribi, 2015; Jouzani *et al.*, 2017). El potencial antifúngico de Bt es asociado a un amplio arsenal antimicrobiano, capaz de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos en campo y post-cosecha, tales son los casos de las proteínas de unión a quitina (Aroa *et al.*, 2013; Mehmood *et al.*, 2011), quitinasas (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016; De la Vega *et al.*, 2006; Reyes-Ramírez *et al.*, 2004) y biosurfactantes (Kim *et al.*, 2004). Entre los metabolitos de mayor interés sintetizados por Bt, encontramos al grupo de las bacteriocinas, peptidos antimicrobianos producidos por síntesis ribosomal, activos a altas temperaturas y a un amplio rango de

valores de pH contra bacterias Gram-positivas y algunos grupos de bacterias Gram-negativas (Abriouel *et al.*, 2011; Barboza-Corona *et al.*, 2007).

Las bacteriocinas de Bt tienen una promisoriosa capacidad para inhibir cepas bacterianas de interés agronómico; como la Bacthurincin F103 activa contra *Agrobacterium tumefaciens* el agente causal del allagamiento en tomate (Kamoun *et al.*, 2005). Otro ejemplo es la Thuricina Bn1 bioactiva contra *Pseudomonas syringae* y *Pseudomona savastanoi* (Ugras *et al.*, 2013) además de los reportes de cepas mexicanas de Bt: *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 287, *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* 404, *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* 420 and *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* 524 contra *Trichoderma* sp. SH1, y *Trichoderma* sp. SD3 (Barboza-Corona *et al.*, 2007; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008). En los últimos cinco años se han reportado algunas cepas de Bt con actividad antimicrobiana contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersisci*, el mayor agente etiológico de la marchitez vascular en cultivos de tomate (Akram *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2016). Este patógeno es conocido alrededor del mundo, principalmente por su severidad en el cultivo, persistencia en suelo y repercusiones económicas hacia los productores tomateros (Agrios, 2005; Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008). Además previamente ha sido reportado la actividad antagonista de en la cepa productora de la Entomocin 9 contra *Aspergillus nidulans* y *Fusarium graminis* (Cherif *et al.*, 2003).

Como ya se ha mencionado, algunas bacteriocinas producidas por cepas mexicanas de Bt tienen un amplio rango antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas y algunos hongos (Barboza-Corona *et al.*, 2007; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008). Sin embargo, aún no existen reportes del efecto de una bacteriocina en hongos fitopatógenos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la capacidad antagonica de cinco cepas mexicanas de Bt descritas por Barboza-Corona *et al* (2007), como productoras de bacteriocinas y evaluar la efectividad *in vitro* de las bacteriocinas de Bt para inhibir el crecimiento y viabilidad celular de razas patogénicas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersisci*.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Material biológico. Las cinco cepas mexicanas de *B. thuringiensis* (Bt); Bt subsp. *morrisoni* 269, Bt subsp. *kurstaki* 287, Bt subsp. *kenyae* 404, *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* 420 y *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* 524, fueron obtenidas de la colección de cepas nativas del CINVESTAV, Irapuato, Méx. Estas cepas fueron previamente caracterizadas por Barboza-Corona *et al* (2007) y De la Fuente-Salcido *et al* (2008) como productoras de las bacteriocinas Thurincina H (m), Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 y Tolworthcina 524, respectivamente. La cepa de *B. cereus* 183 (Bc-183) obtenida del Instituto Pasteur en Francia fue utilizada como cepa sensible a la actividad de bacteriocina. El hongo fitopatógeno: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol); raza 1 (Fol-1), raza 2 (Fol-2) y raza 3 (Fol-3) fue obtenida de la colección de cepas fitopatógenas perteneciente al Centro de Investigación CIAD-Culiacán, Culiacán, Méx.

1.4.2 Actividad antagónica de cepas de Bt productoras de bacteriocinas. La actividad antagonista de cepas de Bt productoras de bacteriocinas fue determinado por un ensayo de cultivo dual en agar PDA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA; BD Bioxon, Franklin Lakes, NJ, USA) (1:1). Cada cepa de Fol fue inoculado por picadura en el centro de placas individuales previamente inoculadas con las cepas de Bt a 2.5 cm de distancia entre ellas. El radio de colonia fue medido a los 7 días de incubación a $28\pm 2^\circ\text{C}$ en los bordes cercanos a cada colonia de Bt. El efecto morfológico de micelio fue observado en cada sección de antagonismo en cada cepa de Fol usando un microscopio óptico Motic® BA210E (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) a un campo de resolución de 20X. El crecimiento del radio de la colonia de cada hongo fue medido en cada confrontación antagonista de Bt. El porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio (%ICM) fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula: $\% \text{ ICM} = ((R_c - R_{Bt}) / (R_c)) \times 100$. Donde, R_c =Diámetro de colonia (mm) en CST, R_{Bt} =Diámetro de colonia (mm) bajo el efecto antagonista de *B. thuringiensis* a los 7 días de incubación. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

1.4.3 Producción de bacteriocinas de Bt. Brevemente, 100 mL de un cultivo de 18 hrs fue obtenido en medio CST para las cepas: Bt subspp. *kenyae* 404, *entomocidus*

420 y *tolworthi* 524; y de 24 h para las cepas de Bt subsp. *morrisoni* 269 y *kurstaki* 287 bajo las mismas condiciones. El sobrenadante celular (SNC) fue obtenido del cultivo por centrifugación a 4°C/3,380 xg durante 15 minutos y entonces, el SNC fue ajustado a un pH 7.0 con 0.2N HCl. La fracción proteica fue separada por precipitación con Sulfato de Amonio (80% saturación) a 4°C/180 rpm 12 hrs aprox., entonces, el precipitado obtenido fue colectado por centrifugación a 4°C/3,380 xg durante 15 minutos para la formación de una pastilla. Las pastillas formadas fueron resuspendidas en 2 ml de Tris-HCl 50mM, pH 7.5. Las fracciones proteicas obtenidas fueron dializadas 12 hrs. aprox. a través de una membrana de mini diálisis de corte de 2.0 kDa contra Tris-HCl 50mM, pH 7.5. Las bacteriocinas dializadas fueron esterilizadas por filtración usando una membrana de celulosa con poros de 0.2 µm de apertura de poro. La concentración de proteína en cada extracto de bacteriocina fue cuantificado por el método descrito por Bradford (1976), usando suero de albumina bovina (BSA) como estándar.

1.4.4 Actividad de bacteriocinas contra *B. cereus* 183. La actividad biológica de las bacteriocinas de Bt fueron determinadas por el ensayo de difusión en pozos usando *B. cereus* 183 como cepa susceptible a la actividad de las bacteriocinas de Bt, de acuerdo al procedimiento descrito en Pacheco-Cano *et al* (2014). Brevemente, 100 µl de cada bacteriocina de Bt (1mg·mL⁻¹ de proteína total) fue cargado en pozos de 7 mm de diámetro excavados en una placa de medio nutritivo (0.15% CST, 1.2% Agar bacteriológico) para el ensayo de difusión en pozos, inoculado a una concentración final de 1x10⁷ células mg·mL⁻¹ de Bt, obtenidas previamente en CST a 28±2°C por 24 h. Las placas fueron incubadas a 28±2°C por 24 h. El área de los halos de inhibición formados se registró y la actividad antimicrobiana fue expresada en Unidades de actividad de bacteriocinas (UA), donde 1 UA es igual a 1 mm² del área de inhibición de la cepa susceptible *B. cereus* 183 en placa por mg de la bacteriocina analizada. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

1.4.5 Actividad fungistática de bacteriocinas de Bt. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de Bt fue evaluada *in vitro* sobre el crecimiento de micelio, producción de biomasa y germinación de esporas de tres cepas fitopatógenas del cultivo de tomate pertenecientes a Fol. El método de difusión en agar fue evaluado para determinar el efecto inhibitorio de las bacteriocinas de Bt sobre el crecimiento micelial y producción de biomasa de las cepas de Fol. Cada cepa de Fol fue crecida durante 7 días en PDA, entonces

se tomó una asada de cada cultivo y fue inoculado por picadura al centro en agar PDA adicionado con bacteriocinas a una concentración final de 0.1 mg/ml. El radio colonial fue registrado a las 96 h después de una incubación a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Entonces, el crecimiento miceliar fue colectado y depositado en un matraz con 20 mL de agua bidestilada. Las colonias fueron esterilizadas en autoclave durante 15 min at $1.0\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ y 120°C . T. El micelio fue extraído del medio restante por filtración a través de un filtro de $20\mu\text{m}$ de apertura de poro Whatman®, y enjuagado tres veces con agua bidestilada para eliminar el medio remanente. El micelio retenido en el filtro fue secado a 60°C hasta alcanzar un peso constante. El peso seco fue registrado y expresado como producción de biomasa. La inhibición de la germinación de esporas fue determinada por el método de difusión en agar desarrollado en placas de 96 pozos de microtitulación. Las esporas de cada cepa de Fol fueron colectadas de colonias de 10 días de crecimiento a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ en PDA. Las esporas fueron recolectadas por raspado superficial del micelio usando un palillo de madera estéril y depositada en 5 mL de buffer salino de fosfatos (PBS), 100 mM, pH 6.8. La concentración de esporas fue cuantificada usando un hematocitómetro y ajustada a una concentración final de 1×10^5 esporas $\cdot\text{ml}^{-1}$ en PBS (100mM, pH 6.8). En cada pozo de la placa de microtitulación fueron agregados 50 μl of PDA junto con bacteriocinas a la concentración expresada previamente. Cada pozo fue inoculado con 1000 esporas e incubado a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Después de 6h, fue registrado el número de esporas germinadas y no germinadas utilizando un microscopio óptico Motic® BA210E (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) a un campo óptico de 20X de resolución. El porcentaje de germinación de esporas fue calculado. Una espora fue considerada como germinada cuando el tubo germinativo alcanzó más de 1.5 veces el tamaño del diámetro de la espora.

1.4.6 Actividad fungitóxica de bacteriocinas de Bt. El efecto de los extractos de bacteriocina de Bt sobre la viabilidad celular de Fol fue evaluado basado en la actividad enzimática de oxidoreductasas dependientes de NAD(P)H en células viables, las cuales reducen el reactivo MTT a su forma insoluble (Levitz y Diamond, 1985). De cada suspensión de esporas de Fol obtenidas por el método descrito anteriormente fueron agregados 10 μL en 990 μL de caldo Dextrosa-Sabouraud diluido con 100 mM PBS pH 6.8 (1:3) colocados en tubos de 1 mL, entonces fueron incubados a $28^{\circ}\text{C}/180\text{ rpm}$ durante 24 horas. Subsecuentemente, 10 μl de las bacteriocinas de Bt fueron agregados e incubado

en agitación a 28° C/180 rpm durante 2 horas. Después del tratamiento, cada cultivo fue centrifugado durante 15 minutos a 21,900 xg y el sobrenadante fue descartado. La pastilla obtenida fue resuspendida en 200 µL de PBS 100 mM pH 6.8. Entonces, 10 µl of MTT fueron agregados e incubados en agitación y complete oscuridad a 28° C/180 rpm durante 4 horas. Cada cultivo fue centrifugado a 11,300 xg durante 15 min y el sobrenadante fue descartado. La pastilla obtenida fue resuspendida en 200 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). Los valores de absorbancia de cada tratamiento fueron determinados en una placa de 96 pozos (BioTek Inc. Winooski, VT, USA) a una longitud de onda de 570 nm. Los datos de actividad fueron registrados en valores de densidad óptica como resultado de la media de tres replicados.

1.4.7 Análisis estadístico. El efecto antagónico de las cepas de Bt y el efecto de las bacteriocinas sobre el crecimiento miceliar, producción de biomasa y viabilidad celular de Fol fueron analizados estadísticamente Microsoft Excel STAT 2018.2 .50198 (Versión de prueba). Las variables de crecimiento miceliar, producción de biomasa y viabilidad celular fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron analizados por la prueba de Fischer (LSD) con un intervalo de confianza del 95%

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Actividad antagonista de cepas de Bt productoras de bacteriocinas. La presente caracterización del crecimiento colonial en las cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* evidenciaron una mayor capacidad de crecimiento *in vitro* en la cepa Fol-3. El radio colonial de las cepas mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellas a las 48 horas de incubación, y el radio colonial máximo *in vitro* fue de 20 ± 0.5 mm, alcanzado por la cepa Fol-3 a las 96 horas, comparado a 15.5 ± 1.5 y 15.8 ± 0.8 mm correspondientes a las cepas Fol-1 y Fol-2 respectivamente (Fig. 1.1a).

La evaluación de la actividad antagonista de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* contra *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* revelo una inhibición significativa en el crecimiento *in vitro* de las cepas fitopatógenas evaluadas. Este fenómeno fue observado en cada cepa de *B. thuringiensis* con diferente nivel de actividad contra las distintas cepas

de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. En Fol-1 fueron observados valores de ICM alrededor de 37%, cuando fue expuesto a las diferentes cepas de *B. thuringiensis* (Fig. 1b); sin embargo, las cepas significativamente más efectivas ($F=19.19$) contra Fol-2 fueron Bt subsp. *morrisoni* 269 y *kenyae* 404 (ICM 43% y 51%, respectivamente). Mientras que la cepa más resistente a la presencia de *B. thuringiensis* fue Fol-3 con un valor máximo de ICM registrado en las cepas de Bt subsp. *morrisoni* 269 and *entomocidus* 420 de 33%, sin encontrar diferencias significativas ($F=19.25$; $P=0.0001$) entre las distintas cepas de *B. thuringiensis*. En general, las cepas de Bt subsp. *morrisoni* 269 y *kenyae* 404 mostraron los mayores valores de actividad antagonista sobre el resto de las cepas de *B. thuringiensis*, con un remarcado efecto contra las cepas of Fol-1 y Fol -2 (Fig. 1.1c).

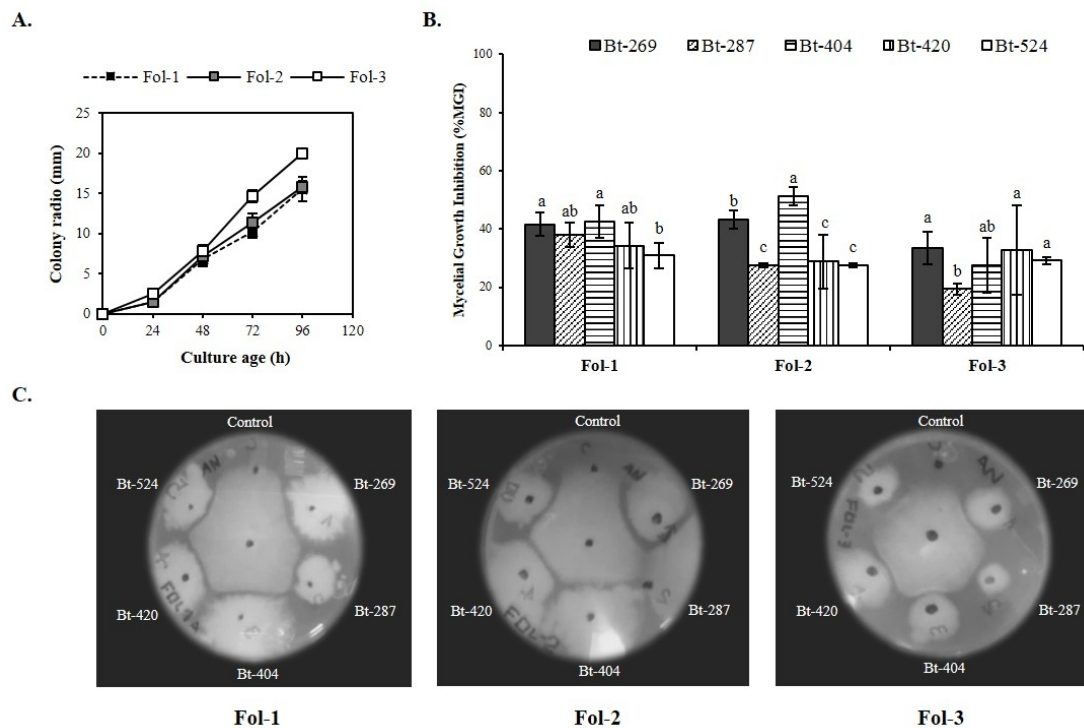


Figura 1.1 Actividad antagonista de cepas de *B. thuringiensis* productoras de bacteriocinas. A. Cinética de crecimiento de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* *in vitro*. **B.** Actividad inhibitoria de cepas de Bt productoras de bacteriocinas expresado como inhibición del crecimiento micelial (% IMC) contra razas de Fol *in vitro*. **C.** Comportamiento antagónico de cepas de Bt productoras de bacteriocinas vs razas de Fol. **Bt-269** (Bt subsp. *morrisoni* 269), **Bt-287** (Bt subsp. *kurstaki* 287), **Bt-404** (Bt subsp. *kenyae* 404), **Bt-420** (Bt subsp. *entomocidus* 420), **Bt-524** (Bt subsp. *tolworthi* 524). Las barras representan el porcentaje expresado como porcentaje y las más la desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos y cepa de Fol correspondiente después de la prueba de Fischer ($p=0.05$).

El efecto de las cepas de *B. thuringiensis* sobre el crecimiento de hifas y morfología colonial *in vitro* en las cepas de Fol durante el ensayo de antagonismo fue registrado. El crecimiento *in vitro* en hifas de Fol mostró una típica elongación en las hifas con esporádicas ramificaciones, pero cuando estas fueron expuestas al efecto antagonístico de las cepas de Bt, los cultivos mostraron hifas más cortas y con una hiperramificación abundante generando un claro incremento en la densidad celular por el efecto de hiperramificación con ciertas anomalías en la forma de los tubos y terminaciones de las hifas (Fol-2 vs. Bt subsp. *kenyae* 404) (Fig. 1.2).

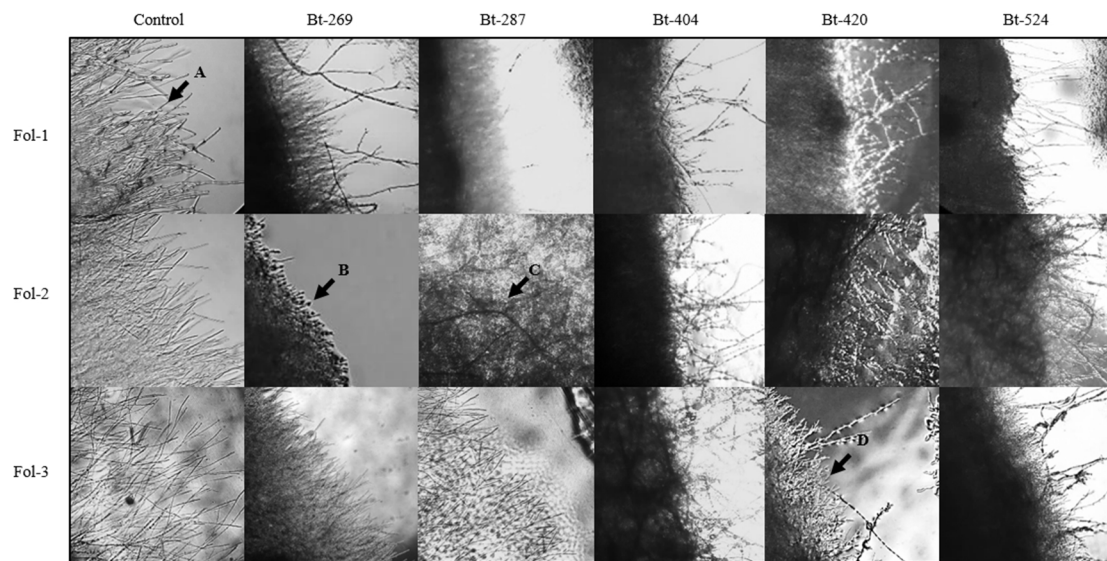


Figura 1.2 Cambios en crecimiento y ramificación en hifas de razas de Fol causados por cepas de Bt productoras de bacteriocinas *in vitro*. Razas de Fol co-cultivadas en ensayo de antagonismo con cepas de Bt productoras de bacteriocinas durante 7 días a 28° C en placas de PDA y los cambios observados en el patrón de crecimiento y ramificación de micelio fue observado en microscopio óptico (20X). **A.** Crecimiento y ramificación de hifas (control). **B.** Supresión del crecimiento de hifas. **C.** Hiperramificación de hifas. **D.** Hiperramificación y suresión del crecimiento de hifas. **Bt-269** (Bt subsp. *morrisoni* 269), **Bt-287** (Bt subsp. *kurstaki* 287), **Bt-404** (Bt subsp. *kenyae* 404), **Bt-420** (Bt subsp. *entomocidus* 420), **Bt-524** (Bt subsp. *tolworthi* 524).

1.5.2 Actividad fungistática de bacteriocinas de Bt. Las bacteriocinas de cinco cepas de *B. thuringiensis* fueron obtenidas a una concentración de 1.0 mg·ml⁻¹ mostrando un efecto inhibitorio contra *B. cereus* 183 usado como cepa indicadora. Donde el halo de inhibición es proporcional a su actividad biológica. La bacteriocina con mayor actividad fue obtenida de la cepa de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* 269 (Thuricina H) con 1,885 UA (datos no mostrados).

El porcentaje de germinación de esporas de las cepas fitopatógenas *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* fueron registrados y calculados los porcentajes de inhibición de esporas en cada cepa bajo el efecto de las bacteriocinas. Bajo estas condiciones la reducción de la germinación de esporas fue observada solamente en las cepas Fol-1 y Fol-2 en diferente proporción. El efecto más significativo sobre la inhibición de esporas fue observado por las bacteriocinas de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* 524 y *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* 420, mostrando el porcentaje más alto de inhibición de la germinación de esporas (14%) (datos no mostrados).

El principal efecto de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* fue observado sobre la producción de biomasa de *F. oxysporum*, destacando la actividad antifúngica de la bacteriocina de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* 404 mostrando una reducción significativa en la producción de biomasa (Peso seco) en las tres cepas de *F. oxysporum*, particularmente vs. La raza 3 (Fol-3) donde la reducción de la producción de biomasa fue cercana al 50% comparado con un tratamiento control (Fig. 1.3).

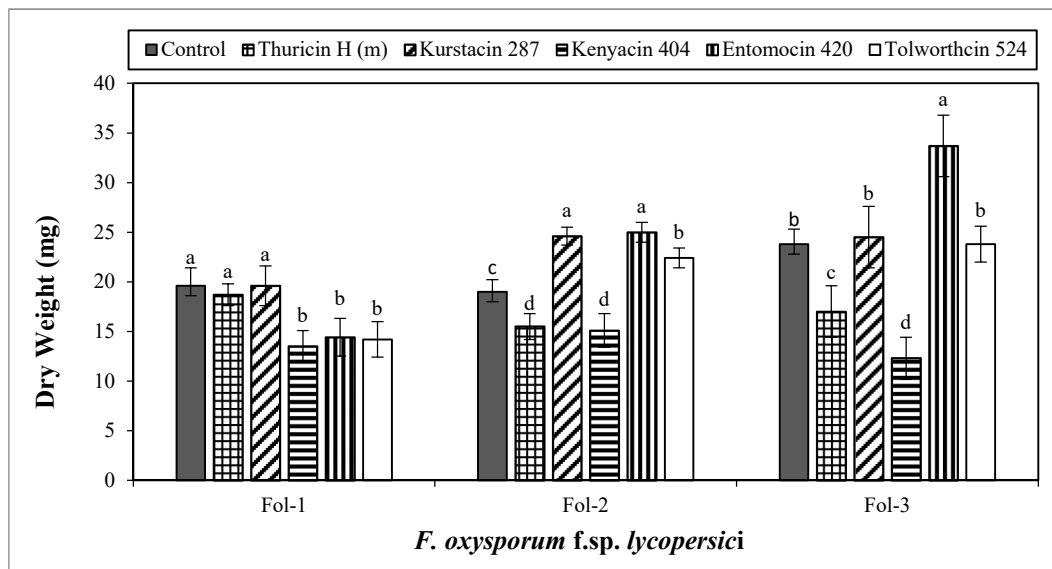


Figura 1.3 Efecto de las cepas de Bt productoras de bacteriocinas sobre la producción de biomasa en cepas patógenas de Fol *in vitro*. Peso seco del micelio de Fol crecido después de la exposición a $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de las bacteriocinas después de 7 días de crecimiento *in vitro* en placas de PDA. Las barras representan los datos experimentales como promedios más la desviación estándar. Las literales indican diferencias significativas entre los tratamientos de bacteriocinas y la cepa correspondiente de Fol después del análisis por la prueba de Fischer ($p=0.05$).

El efecto inhibitorio de las bacteriocinas de Bt sobre el crecimiento micelial fue significativo para la Tolworthcina 524 contra Fol-1 (46.9%) y Fol-3 (45.0%), Entomocina y Thurincina H(m) contra Fol-1 (46.9%) y Fol-2 (56.7%) respectivamente todos a las 96 horas de incubación (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Efecto de las bacteriocinas de Bt sobre el crecimiento *in vitro* de razas patógenas de Fol.

Cepa de <i>F. oxysporum</i>	Extractos de bacteriocina	Diferencias de crecimiento en radio colonial (mm) \pm SD			
		24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
Fol-1	Control	1.5 \pm 0.0 ^a	5.3 \pm 1.2 ^a	4.5 \pm 0.5 ^a	3.2 \pm 0.8 ^{ab}
	Thuricin H (m)	1.2 \pm 0.3 ^a	6.5 \pm 0.5 ^a	4.3 \pm 0.3 ^a	3.3 \pm 0.8 ^a
	Kurstacin 287	1.3 \pm 0.3 ^a	5.8 \pm 1.3 ^a	4.2 \pm 2.1 ^a	1.8 \pm 0.8 ^{bc}
	Kenyacin 404	1.0 \pm 0.5 ^a	6.5 \pm 1.3 ^a	4.3 \pm 1.5 ^a	2.5 \pm 0.9 ^{bc}
	Entomocin 420	1.2 \pm 0.3 ^a	5.3 \pm 0.3 ^a	5.0 \pm 0.9 ^a	1.7 \pm 0.8 ^c
	Tolworthcin 524	1.3 \pm 0.3 ^a	5.2 \pm 1.5 ^a	4.5 \pm 0.5 ^a	1.7 \pm 1.0 ^c
Fol-2	Control	1.3 \pm 0.3 ^a	5.8 \pm 0.3 ^a	4.8 \pm 0.8 ^a	3.0 \pm 0.9 ^a
	Thuricin H (m)	1.3 \pm 0.3 ^a	5.8 \pm 0.3 ^a	3.3 \pm 0.8 ^b	1.3 \pm 0.6 ^b
	Kurstacin 287	1.3 \pm 0.3 ^a	5.0 \pm 0.0 ^a	4.3 \pm 0.3 ^{ab}	2.7 \pm 0.3 ^a
	Kenyacin 404	1.2 \pm 0.0 ^a	5.2 \pm 0.6 ^a	4.2 \pm 1.0 ^{ab}	2.3 \pm 0.3 ^a
	Entomocin 420	1.2 \pm 0.3 ^a	4.8 \pm 1.8 ^a	4.7 \pm 0.3 ^a	2.7 \pm 1.2 ^a
	Tolworthcin 524	1.2 \pm 0.3 ^a	5.3 \pm 0.8 ^a	4.0 \pm 0.0 ^{ab}	3.0 \pm 0.5 ^a
Fol-3	Control	1.3 \pm 0.3 ^a	5.8 \pm 0.3 ^b	4.7 \pm 0.3 ^b	4.0 \pm 0.0 ^{ab}
	Thuricin H (m)	1.5 \pm 0.0 ^a	5.0 \pm 0.9 ^{ab}	5.2 \pm 1.0 ^{ab}	3.8 \pm 0.3 ^{ab}
	Kurstacin 287	1.5 \pm 0.0 ^a	6.0 \pm 1.0 ^{ab}	4.7 \pm 0.8 ^b	4.2 \pm 0.8 ^a
	Kenyacin 404	1.2 \pm 0.0 ^a	6.2 \pm 0.3 ^{ab}	4.5 \pm 0.0 ^b	2.8 \pm 0.3 ^{bc}
	Entomocin 420	1.3 \pm 0.3 ^a	6.5 \pm 0.9 ^a	6.2 \pm 1.0 ^a	3.0 \pm 0.5 ^{abc}
	Tolworthcin 524	1.2 \pm 0.3 ^a	6.7 \pm 0.3 ^a	5.3 \pm 0.8 ^{ab}	2.2 \pm 1.4 ^c

Longitud de radio colonial de Fol obtenido después de la exposición a 0.1 mg·ml⁻¹ de proteína de los extractos de bacteriocina después de 7 días de crecimiento *in vitro* en placas de PDA. Los datos en la tabla son expresados como las medias \pm SD. Literales diferentes en la misma columna y cepa de *F. oxysporum* indican diferencias significativas entre los tratamientos de bacteriocina con la cepa de Fol correspondiente después del análisis por la prueba de Fischer ($p=0.05$).

1.5.3 Actividad fungitóxica de bacteriocinas de Bt. Los efectos de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* sobre la viabilidad celular de *F. oxysporum* f.sp, *lycopersici* fueron determinados *in vitro* por el ensayo de MTT. La actividad fungitoxica de las bacteriocinas fue observada principalmente en Thurincina H (m) sobre Fol-1 y Fol-3 y en la bacteriocina Kurstacina 287 sobre Fol-2 con una reducción significativa de la densidad óptica durante el ensayo (Fig. 1.4).

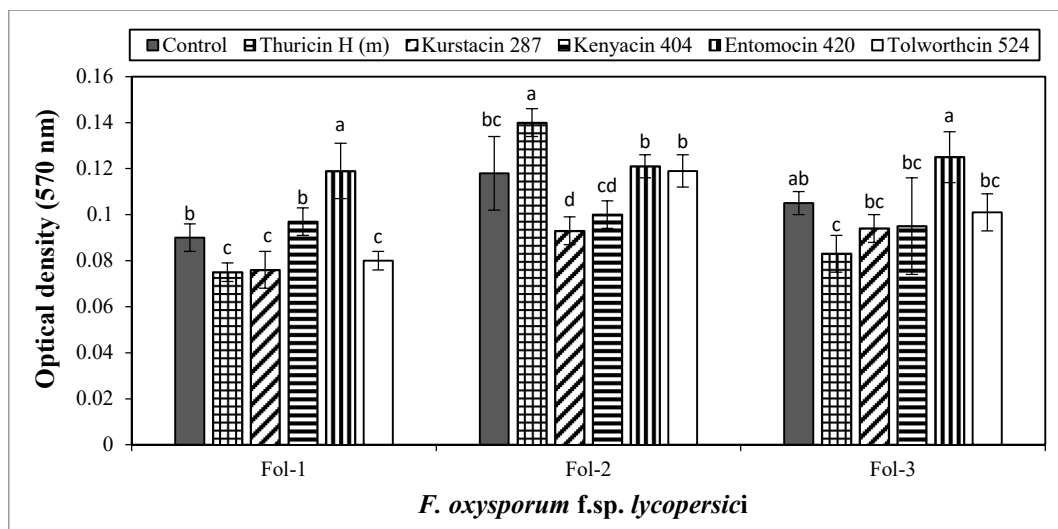


Figura 1.4 Efecto de los extractos de bacteriocina de Bt *in vitro* sobre la viabilidad celular en cepas patogénicas de Fol. Extractos de bacteriocina ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) fueron evaluados basados en su actividad enzimática oxidoreductasa dependiente de NAD(P)H en *F. oxysporum f.sp. lycopersici*. El nivel de actividad metabólica mitocondrial fue expresado como densidad óptica (570 nm). Las barras representan los datos experimentales como promedios más la desviación estándar. Diferentes literales indican diferencias significativas entre los tratamientos de bacteriocinas y la cepa correspondiente de Fol después del análisis por la prueba de Fische ($p=0.05$).

1.5.4 Análisis de Componentes Principales de la actividad antimicrobiana de cepas de Bt productoras de bacteriocinas sobre razas fitopatógenas de Fol. El ACP de los tratamientos con Bt sobre distintos parámetros de crecimiento de Fol *in vitro* explica el 69.85% de la varianza experimental en los componentes F1 (40.91%) y F2 (28.94). Los parámetros que mejor explican el comportamiento de Fol son el antagonismo y el crecimiento micelial *in vitro*. Los tratamientos con Bt-269 sobre Fol-2 (A2-El mayor efecto sobre AN y CM), Bt-404 sobre Fol-2 (C2) y Bt-440 sobre Fol-1 (D1) mostraron una correlación negativa directa a los parámetros crecimiento micelial y antagonismo, en cambio los tratamientos de Bt-287 sobre Fol-3 (B3) y Bt-269 sobre Fol-1 (A1) se correlacionaron positivamente a estos parámetros (Fig. 1.5).

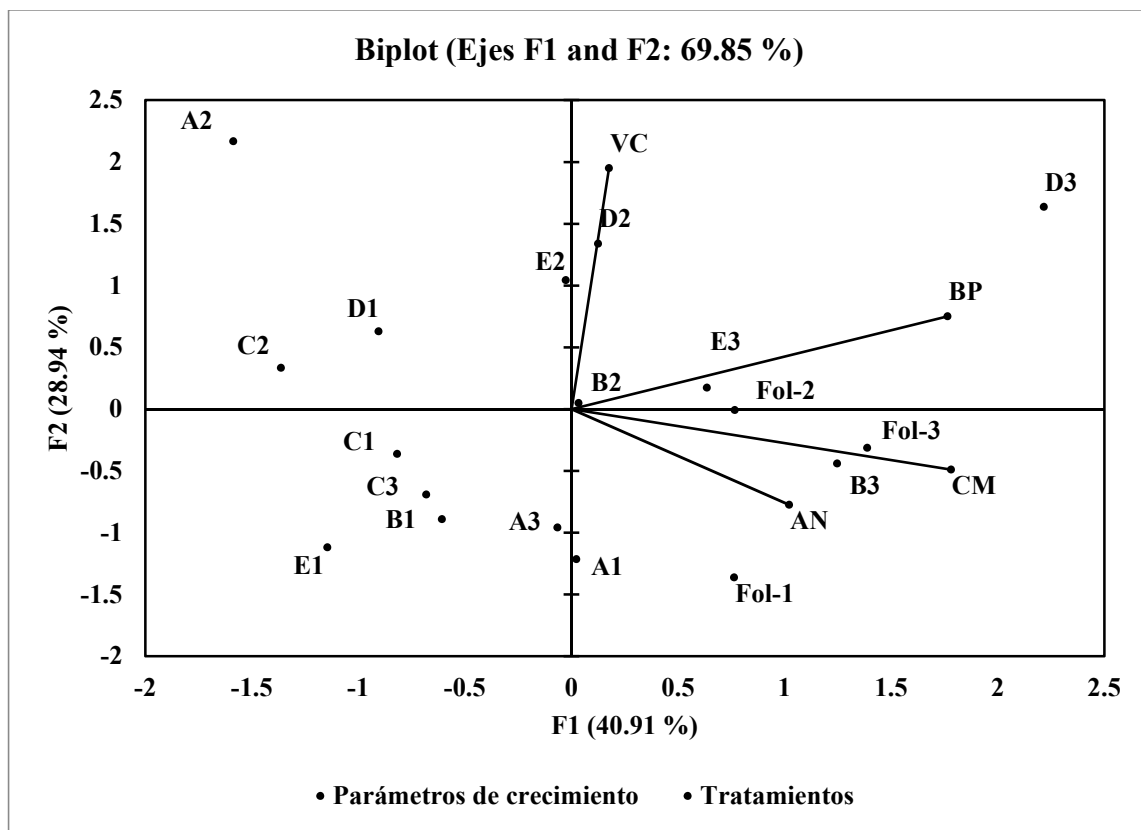


Figura 1.5. Análisis de componentes principales (PCA) con Biplot del efecto *in vitro* de bacteriocinas de *B. thurigiensis* sobre el crecimiento de cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. A. Bt-269, B. Bt-287, C. Bt-404, D. Bt-420, E. Bt-524. *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1 (Fol-1), raza 2 (Fol-2), Raza 3 (Fol-3). Parámetros evaluados: Antagonismo (AN), Crecimiento miceliar (CM), Producción de biomasa (PB), Viabilidad celular (VC).

1.6 DISCUSIONES

El desarrollo de estrategias amigables con el medio ambiente en el control de la marchitez vascular en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) causado por razas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* tiene una importante relevancia agrobiotecnológica debido a los riesgos ecológicos y de salud inmersos en la aplicación de fungicidas químicos y la aparición de fenómenos de resistencia a la enfermedad (Asencio-Álvarez *et al.*, 2008; Elias y Schneider, 1991). El biocontrol de hongos fitopatógenos involucra el uso de formulaciones biopesticidas basados en microorganismos que incluyen cepas no patogénicas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* spp., así

como el uso de cultivos bacterianos como *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* (Agrios, 2005; Larkin y Fravel, 1998) y *B. thuringiensis* (Akram *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2016).

A pesar de que las bacteriocinas del secretoma de Bt han mostrado tener un amplio espectro contra bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas, y algunos hongos (Barboza-Corona *et al.*, 2007; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008), su actividad antifúngica no ha sido extensamente estudiada, y sus efectos sinérgicos o actividad supresora de las cepas de Bt en Fol es desconocido. Este estudio evaluó el crecimiento *in vitro* de tres razas de Fol aisladas previamente de plantas de tomate sintomáticas en el Valle de Culiacán Sinaloa, México (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003) y sus susceptibilidad al potencial antagonista, fungistático y fungitóxico de cinco cepas mexicanas de *B. thuringiensis* productoras de bacteriocinas, reportados por Barboza-Corona *et al.* (2007).

Morfología. A pesar de que los aislados de *F. oxysporum* son considerados indistinguibles morfológicamente, la caracterización del crecimiento *in vitro* mostró que el desarrollo colonial es más alto en la cepa Fol-3 que en Fol-1 y Fol-2 (Fig. 1.1). Así mismo se mostraron diferencias en la pigmentación miceliar, donde Fol-1 y Fol-2 mostraron una pigmentación rojiza con bordes blancos y la raza 3 mostró una pigmentación violeta a las 96 horas de incubación (datos no mostrados). Sin embargo, se considera que las principales diferencias entre las razas fitopatógenas de Fol son relacionados a sus genes de avirulencia, no existe una correlación entre morfología colonial, crecimiento y morfología colonial, raza, grupo de compatibilidad vegetativa u origen geográfico (Elias y Schneider, 1991).

Actividad antagonista. La producción de bacteriocinas de *B. thuringiensis* como compuestos bioactivos ha sido explorado pobremente, particularmente solo ha sido estudiado contra *Fusarium graminis*, donde Bt HD9 (Productor de la bacteriocina Entomocina 9) presentó un antagonismo activo sin embargo no existen reportes de la actividad antagonista contra *F. oxysporum* de cepas de Bt productoras de bacteriocinas (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008; Cherif *et al.*, 2003). En este trabajo, la actividad antagonista de cepas de *B. thuringiensis* con actividad bactericida fue determinada contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* buscando la inhibición del crecimiento *in vitro* de las cepas fitopatógenas de Fol evaluadas por desafío en cultivo dual. En general, *B. thuringiensis*

subsp *morrisoni* y *B. thuringiensis* subsp *kenyae* mostraron el más alto efecto antagonista comparado con el resto de las cepas de *B. thuringiensis* (Fig. 1.2). Las cepas de *B. thuringiensis* subsp *morrisoni* y subsp *kenyae* fueron previamente reportadas como productores de bacteriocinas, como cepas que poseen varios genes homólogos de factores de virulencia y toxinas de *B. cereus* (Barboza-Corona *et al.*, 2007) que pueden incrementar la actividad antimicrobiana adicionalmente al efecto antimicrobiano causado por la producción de la bacteriocina y proveer características distintivas en cada cepa.

De acuerdo a sus propiedades bioquímicas, las bacteriocinas de Bt han sido clasificadas en grupo A (Morricina 269/ Thuricina H(m)) y grupo B (Kenyacina 404); cada grupo de bacteriocinas presenta diferente actividad antimicrobiana evaluada contra bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas (Barboza-Corona *et al.*, 2007), entonces es posible encontrar un diferente rango de efectividad en las cepas productoras de bacteriocina contra Fol. Se ha reportado previamente que las bacteriocinas presentan distinta actividad y/o rango de biosíntesis, donde el grupo B tienen un pico de actividad antes de 24 horas durante su producción en cultivo líquido (Barboza-Corona *et al.*, 2007), Entonces, las variaciones en la actividad antagonista pueden ser explicados en parte al nivel de producción de bacteriocinas durante el ensayo de antagonismo.

Crecimiento *in vitro*. Las observaciones hechas en el microscopio óptico en las interacciones celulares entre Bt y Fol durante el ensayo de antagonismo mostraron que las cepas de Fol exhiben una supresión del crecimiento micelial y un marcado incremento en la densidad celular resultado de la hiperramificación de las hifas causado por Bt, particularmente para Fol-2 vs. Kenyacina (comparado en la Fig. 1.3, control vs Fol-1 y Kenyacina vs. Fol-2). Ha sido mostrado previamente que la producción de ROX, los cuales son producidos y/o acumulados en las etapas tempranas de la germinación de esporas y subsecuentemente relocalizado en el ápice de la hifa en crecimiento, puede controlar la dormancia apical (Semighini y Harris, 2008) probablemente debido a la capacidad para inducir la acumulación de Ca^{2+} , la cual puede afectar la dinámica del citoesqueleto y tráfico vesicular al ápice de la hifa (Tudzynski *et al.*, 2012). Similarmente a lo que sucede en *A. thaliana* (Foreman *et al.*, 2003; Heller y Tudzynski, 2011), lo cual sugiere que el proceso está regulado por la señalización de ROS y Ca^{2+} que afecta el

crecimiento del ápice de hifas, germinación de esporas y formación de aforismo (Jackson y Heath, 1993; Silverman-Gavrila y Lew, 2003; Warwar y Dickman, 1996),

La generación y localización de ROS es necesaria para la diferenciación de estructuras como los apresorios, requeridas para la penetración de *Magnaporthe oryzae*, por acción de NADPH oxidasas (Nox), sin embargo el proceso de señalización de ROS y el control de la diferenciación celular, no ha sido identificado aún (Dagdas *et al.*, 2012). Esta dormancia apical puede evitar la hiperramificación observada por mutantes deficientes en genes que responden al estrés oxidativo en *Aspergillus nidulans*, llevando a un incremento en el número de tubos germinativo, y donde la ausencia de dormancia apical resulta de un limitado crecimiento colonial bajo los efectos de estrés (Semighini y Harris, 2008). El efecto de hiperramificación ha sido observado en hongos filamentosos inducido por fungicidas (Robson *et al.*, 1989; Wiebe *et al.*, 1990), defensinas vegetales (Terras *et al.*, 1995), tioninas endógenas de *Arabidopsis thaliana* (Epple *et al.*, 1997) y purificadas en *F. oxysporum* (Terras *et al.*, 1996), así como en péptidos antimicrobianos de *Brevibacillus parabiens* sobre *F. solani* (Rautenbach *et al.*, 2016).

Actividad de las bacteriocinas. Sin embargo, en estudios previos de la actividad antifúngica de sustancias inhibitoras tipo *B. thuringiensis* BLIS contra *Fusarium oxysporum*, estas cepas produjeron bacteriocinas parcialmente purificadas no inhibieron la esporulación *in vitro* (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008). En este trabajo, las fracciones proteicas obtenidas de las cinco cepas mexicanas de Bt presentaron actividad antimicrobiana contra *B. cereus* 183, el cual es un indicador de la presencia de bacteriocinas de Bt de acuerdo a Barboza-Corona *et al.* (2007), Nosotros reportamos que las fracciones obtenidas del cultivo de estas cepas presentaron distintas respuestas antifúngicas en tres cepas de Fol, afectando el crecimiento micelial, la producción de biomasa, la germinación de esporas y/o la viabilidad celular.

Efecto sobre la germinación. La inhibición de la germinación de esporas en *F. oxysporum* por *B. thuringiensis* se ha observado principalmente por efecto de las quitinasas (Mehmood *et al.*, 2011; Mehmood *et al.*, 2010). Previamente, en *F. oxysporum* no se ha caracterizado el efecto de las bacteriocinas de Bt, en este estudio la reducción de la germinación de esporas por el efecto directo de las bacteriocinas fue menor al 15%. Comparado con el efecto de la inhibición de germinación de esporas de las cepas de Bt

con otro mecanismo de antagonismo, el efecto de la actividad de la bacteriocina fue discreto (Mehmood *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010).

Efecto fungitóxico. Para evaluar el efecto de los extractos proteicos de *B. thuringiensis* (100µg de proteína toata/ml) sobre la viabilidad celular de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se adaptó un ensayo de actividad metabólica basado en la metodología propuesta por van der Weerden *et al* (2010), De acuerdo a la metodología utilizada, se observó un efecto significativo sobre la viabilidad celular de hifas de *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* Raza 2 (Fol-2) como resultado del efecto de la Kurstacina y Kenyacina de 21 y 16 % respectivamente. van der Weerden *et al* (2010), reporta un incremento significativo en el efecto antifúngico de péptidos antimicrobianos sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* cuando se incrementó la dosis al doble; probablemente la concentración de la bacteriocina no fue suficiente para detectar una diferencia significativa en el resto de los extractos.

El desarrollo y modo de acción de los péptidos antimicrobianos juega un papel importante en el desarrollo de estrategias de control de marchitez vascular, principalmente asociado al crecimiento del hongo (Antibiosis), la viabilidad celular, y la inhibición de germinación de esporas, los cuales son claves en el control de la diseminación y persistencia del patógeno a través del medio ambiente (Agrios, 2005). En resumen, las bacteriocinas de *B. thuringiensis* evaluadas mostraron distintos patrones de actividad antifúngica en las cepas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, donde, al menos una de ellas exhibió un efecto antifúngico significativo sobre el crecimiento miceliar, producción de biomasa, y/o viabilidad celular. Las bacteriocinas producidas por distintas cepas de Bt actúan predominantemente mediante la formación de poros y disrupción de la membrana celular en bacterias. En algunos casos, las bacteriocinas puede comprometer el crecimiento de ciertos hongos como se ha observado en *Bacillus thuringiensis* HD9 (Cherif *et al.*, 200) y las bacteriocinas producidas por las 5 cepas mexicanas de Bt en este estudio (Barboza-Corona *et al.*, 2007; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008). La actividad de las cepas mexicanas de *B. thuringiensis* y su subsecuente aplicación de sus bacteriocinas como compuestos bioactivos en biopesticidas puede contribuir a la evaluación de la funcionalidad polivalente de *B. thuringiensis* en el manejo integrado de la marchitez vascular de tomate causado por *Fusarium* como agente de biocontrol contra las tres razas

fitopatógenas de Fol, y prevenir riesgos potenciales de adquisición de resistencia en la raza 3, y su alta agresividad en cultivos (Asencio-Álvarez *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2017).

CAPITULO II

Actividad antifúngica de quitinasas ChiA74 y ChiA Btt de *B. thuringiensis* contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

2.1 RESUMEN

Las quitinasas de *B. thuringiensis* (Bt) y sus propiedades para controlar hongos fitopatógenos representan un recurso biotecnológico para la producción de cultivos de importancia alimentaria como lo es el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) libres de pesticidas químicos. En esta investigación fueron evaluadas las quitinasas de Bt: ChiA74 y ChiA Btt sobre el crecimiento de tres cepas fitopatógenas del cultivo de tomate de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* mediante la técnica de difusión en pozos. Todas las evaluaciones se realizaron bajo un diseño experimental completamente al azar. Bajo las condiciones evaluadas, las quitinasas de Bt no presentaron actividad antifúngica (0.75-3.0 U mL⁻¹) sobre el crecimiento y germinación de esporas de Fol. Las diferencias entre crecimiento entre los tratamientos fueron comparadas por la prueba estadística Fisher (LSD) con un intervalo de confianza del 95 %.

Palabras clave: quitinasas, ChiA Btt, ChiA74, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*,

Antifungal activity of ChiA74 y ChiA Btt *B. thuringiensis* chitinases against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

2.1 ABSTRACT

The *B. thuringiensis* (Bt) chitinases and its properties to biocontrol of plant pathogen fungi represent a biotechnological resource to chemical-free production of relevant alimentary crops such as tomato (*Solanum lycopersicum* L. In current research, the effect of Bt chitinases application: ChiA74 y ChiA Btt were tested against three tomato pathogenic races of *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) *in vitro*. Under the tested conditions, the Bt chitinases (0.75-3.0 U·mL⁻¹) didn't shows antifungal activity *in vitro* against growth or spore germination of Fol.

Key words: Bt-Chitinases, ChiA Btt, ChiA74, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*,

2.3 INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es considerado entre los productos agroalimentarios más importantes de México, cuyo volumen de exportación a los EE.UU fue estimado durante el primer semestre del 2016 en 992,214 toneladas métricas con un valor de \$1,194 millones de dólares (SAGARPA, 2016). Sin embargo la susceptibilidad de este cultivo a distintas plagas, conlleva una serie de repercusiones económicas por la inherente inversión destinada a la adquisición de plaguicidas y otros métodos para su control, además de las contaminaciones y daños al producto generados por organismos fitopatógenos,

A nivel global, los microorganismos fitopatógenos causantes de pudriciones de raíz y la marchitez vascular, se encuentran entre los de mayor agresividad y de difícil control, debido a su capacidad de dispersión y su prolongada persistencia en el ambiente (Agrios, 2005). Particularmente, es bien conocida la severidad de la marchitez vascular del tomate causada por la presencia de razas fitopatógenas del hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen, las cuales son un constante riesgo en las principales regiones tomateras de México (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008). El control en campo de esta enfermedad es desafiante, debido en gran manera al surgimiento de fenómenos de resistencia de los agentes causales, inclusive bajo el empleo de fungicidas químicos o la implementación de cultivares resistentes (Agrios, 2005; Fischer, 2017).

La implementación de estrategias integrales para el manejo de enfermedades, es una metodología que pretende además reducir el uso de pesticidas químicos a través del uso de labores culturales, métodos de monitoreo de la enfermedad, prevención de contaminaciones, aplicación de nuevas tecnologías para generar cultivares resistentes y el uso de microorganismos biocontroladores (Ajillogba y Babalola, 2013; McGovern 2015).

En este sentido las cepas bacterianas del genero *Bacillus* han demostrado tener un éxito relativo sobre la reducción y severidad de los síntomas causados por *F. oxysporum* en tomate (Aydi Ben Abdallah *et al.*, 2017). Esta propiedad se debe en gran parte a la capacidad de este grupo bacteriano para producir elicitores de la respuesta de defensa o inmunidad en plantas, y/o la producción de ciertos metabolitos con propiedades

antifúngicas (Aljiloba *et al.*, 2013) como ejemplo, se citan distintos tipos de biosurfactantes y enzimas líticas como las quitinasas producidas por distintos miembros del género *Bacillus* (Aydi Ben Abdallah *et al.*, 2017; Jouzani *et al.*, 2017).

Las quitinasas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), el agente bioinsecticida más empleado alrededor del mundo, han recibido una importante atención por el descubrimiento de sus propiedades sinérgicas a los cristales insecticidas (Cry) y por su capacidad para producir oligosacáridos bioactivos derivados de residuos de quitina (Barboza-Corona *et al.*, 2012). El estudio de las propiedades antifúngicas de estas enzimas en el control de hongos fitopatógenos es un campo de investigación emergente (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016; Jouzani *et al.*, 2017). Estas enzimas son clasificadas como endoquitinasas dentro del grupo de las glucosil-hidrolasas (E.C. 3.2.2.14), con actividad catalítica sobre las unidades de β -(1-4)-N-acetilglucosamina (GlcNAc) que conforman al homopolímero denominado quitina (Barboza-Corona *et al.*, 2012; Casados-Vázquez *et al.*, 2015; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016). Este polímero juega un rol crítico dentro de la estructura de la pared celular de hongos como *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, confiriéndole rigidez y protección contra las condiciones ambientales (Schoffemeer *et al.*, 1999).

En trabajos de investigación previos se ha comprobado que algunas quitinasas de Bt pueden inhibir el crecimiento de micelio y la germinación de esporas de una considerable variedad de hongos fitopatógenos (Mehmood *et al.*, 2010), además de poseer la capacidad de hidrolizar la pared celular fúngica, e incrementar el porcentaje de germinación en semillas infestadas con hongos fitopatógenos (de la Vega *et al.*, 2006). Actualmente se han estudiado los efectos sinérgicos de quitinasas de distintos orígenes por su actividad antifúngica, la estimulación del crecimiento y la respuesta inmune innata en plantas asociada a los residuos de oligosacáridos desprendidos durante la hidrólisis de la quitina y quitosana por acción de distintos tipos de quitinasas (Das *et al.*, 2013). Sin embargo el conocimiento de este efecto utilizando quitinasas de Bt es poco explorado.

En este estudio se evaluó la capacidad antifúngica de las quitinasas ChiA74 de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT-82 (Barboza-Corona *et al.*, 2003) y ChiA74 Btt de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016) expresadas

en *E. coli* sobre cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenidas de la región tomatera de Sinaloa (Carrillo-Fascio *et al.*, 2003).

2.4 MATERIAL Y MÉTODOS

2.4.1. Material biológico. Para la expresión y purificación de las endoquitinasas ChiA74 y ChiA Btt fue utilizada la cepas *Escherichia coli* BL21 Rosetta 2/ pCold: ChiA74 BL21-R2 (Casados-Vásquez *et al.*, 2015) y *Escherichia coli* BL21 Rosetta 2/ pCold: ChiA Btt BL21-R2 (de la Fuente-Salcido *et al.*, 2016). Estas construcciones contienen el gen de la quitinasa (sin péptido señal) fusionado a una secuencia artificial la cual incluye una cola de histidina (6x His tag) para su purificación por columna de afinidad. Las cepas fitopatógenas utilizadas para los bioensayos fueron *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* Raza 1, *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* Raza 2, *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* Raza 3, aisladas de plantas sintomáticas en la región tomatera en el valle de Culiacán Sinaloa, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología del CIAD-Culiacán. Los bioensayos en semilla y plantas fueron probados en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad. Río Grande (susceptible a *F. oxysporum* f.sp. *lycopercisi* Raza 3) adquirida de Semillas FAX hortalizas™.

2.4.2 Producción de quitinasas de *B. thuringiensis* en *E. coli*. Las quitinasas de Bt fueron producidas en la cepa de *E. coli* BL21 Rosetta 2. Las cepas de interés fueron activadas en 10 mL de LB suplementado con Ampicilina ($100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y Cloranfenicol ($34\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 24 horas/ 37°C como pre-inóculo inicial. Posteriormente se tomaron 200 μl del pre-inóculo inicial y fueron inoculados en 100 ml de LB Amp/Cm ($100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}/34\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). El cultivo fue incubado a 37°C a 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (D.O. λ_{595} nm) de 0.5 y colocado en hielo durante 15 minutos. Inmediatamente después fue agregado IPTG a una concentración final de 0.5 mM en el cultivo, seguido por una incubación a $17\pm 2^{\circ}\text{C}/20$ h. en agitación a 180 rpm para inducir la producción de quitinasas. Posteriormente fueron obtenidas las pastillas celulares de cada cultivo por centrifugación a 5,500 g durante 15 min/ 4°C y enfriadas a -20°C durante 30 min para su posterior purificación.

2.4.3. Purificación de las quitinasas. Para la purificación de las quitinasas recombinantes se evaluó el rendimiento de dos sistemas de purificación basados en la afinidad de resinas de Níquel con la cola de Histidina fusionada a la estructura de la quitinasa. Para la evaluación fueron seleccionados los sistemas de columnas HisTrap Ni (Ge Healthcare Bio-sciences AB, Upsala Sweeden) basado en la aplicación de presión hidráulica y el sistema de micro columna Ni-NTA spin (Quiagen) basado en ultracentrifugación.

2.4.3.1 Purificación por columna HisTrap Ni (Ge Healthcare Bio-sciences AB, Upsala Sweeden). La pastilla celular con la quitinasa inducida fué resuspendida en 25 ml de buffer A (100mM Tris-HCl pH 7, 500mM NaCl, 10mM Imidazol) adicionado con lisozima a una concentración final de 1 mg/ml. La pastilla resuspendida fue incubada en hielo durante 30 min y posteriormente sonicada 10 veces durante periodos de 30 segundos a una amplitud de 30 Hz con un ultrasonicador de 20kHz (Sonic and Materials. Inc., Newtown, CT 06470-1614 USA). El extracto obtenido fue centrifugado a 13,000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se pasó a través de la columna de afinidad HisTrap Ni pre-equilibrada con Buffer A. La proteína unida a la columna fue retirada mediante un lavado con 10 ml de Buffer A, después se realizaron lavados con 10 ml de buffer A-20 mM de imidazol, 10 ml buffer A-40 mM. La enzima finalmente fue eluída con 3 ml de buffer A-500mM imidazol, esta fracción fue dializada contra el Buffer A sin imidazol.

2.4.3.2 Purificación de quitinasas por columna de Ni-NTA spin (Quiagen). La pastilla celular con la quitinasa inducida fueron resuspendidas en 1.2 ml de Buffer A (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0.) adicionado con 140µl de lisozima (10mg/ml) Lysozyme (Egg White) BioBasic INC.), entonces fueron incubadas en hielo durante 30 minutos. Seguido de esta etapa, las pastillas fueron sonicadas en Bransonic® Ultrasonic cleaner por 10 periodos de 1 min de sonicación y 30 seg de descanso. El lisado celular obtenido fue centrifugado a 7000 xg durante 20 minutos. 600µl del sobrenadante obtenido fueron pasados a través de una columna de Ni-NTA spin (Quiagen), previamente equilibrada con 600µL el buffer A, por centrifugación a 1600 rpm por 5 min. Las columnas fueron lavadas dos veces con 300 µl de buffer B (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol pH 8.0.) por centrifugación 2 minutos a 3,000 rpm. La quitinasa retenida por la matriz de la columna fue eluida dos veces con 300µl de

buffer C, (50 Mm NaH₂PO₄, 300 Mm NaCl, 500 Mm imidazol, pH 8.0.) por centrifugación 2 minutos a 3,000 rpm. La purificación de las quitinasas fue evaluada utilizando una columna de afinidad de níquel Histrap Ni (Ge Healthcare Bio-sciences AB, Upsala Sweeden). Las proteínas obtenidas fueron dializadas a través de una membrana de 3.5 kD SpectralPor®3 Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories Inc.

2.4.4 Cuantificación de proteína total y SDS-PAGE. La concentración de proteína final fue determinada por el método Bradford (1976) utilizando como estándar Albumina de suero bovino (BSA) (New England BioLabs). La integridad y calidad de las proteínas purificadas fueron evaluadas por SDS-PAGE al 10% bajo condiciones desnaturalizantes (β -mercaptoetanol). 0.5 μ g de cada fracción fueron cargados en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (SDS-PAGE). El gel fue teñido con azul de coomassie G-250. Fue realizado un marcador de peso molecular SDS-PAGE Molecular (Weight Standards, Broad Range Bio-Rad).

2.4.5. Actividad quitinolítica. La capacidad de las quitinasas para hidrolizar la quitina coloidal fue evaluado mediante una prueba de difusión en pozos en agar de quitina coloidal (0.02% NaCl, 0.04% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄.7H₂O, 0.04% Na₂CO₃, 0.5% Quitina coloidal Sigma-Aldrich y 1.5% de agar bacteriológico; pH 7.0) agregando 20 μ l de quitinasa en pozos de 5mm excavados en el agar de quitina e incubado durante 48 horas a 37°C. La actividad enzimática de las quitinasas fue determinada en unidades de actividad enzimática (UA) mediante el método de espectrofotometría de fluorescencia descrito por Barboza-Corona *et al.*, (2003). Fue utilizado el compuesto fluorescente 4-metillumberiferona (4MU) Sigma-Aldrich como estándar. Se adicionó 20 mM de Na₂CO₃ para incrementar la sensibilidad del método. 1 UA se definió como la cantidad en μ g de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de 4-metilumberiferona del sustrato 4-metilumberiferil β -D-N,N',N''-triacetotriosido (4MU-GL-cNAc3/4MU QT) (Sigma) en 1h.

2.4.6 Efecto de las quitinasas sobre el crecimiento *in vitro* en *F. oxysporum*. El efecto de las quitinasas sobre la germinación de esporas y desarrollo de micelio fue evaluado de acuerdo al método de difusión en pozos propuesto por Liu *et al.*, (2010). Se colectaron esporas a partir de un cultivo de *F. oxysporum* de 10 días de crecimiento a 28°C en PDA. La concentración de esporas fue cuantificada con un hematocitómetro y se ajustó a una concentración de 1x10⁵ esporas·mL⁻¹. El experimento fue realizado en placas de

PDA, pH 7.0 se realizaron pozos de 7 mm de diámetro. Las quitinasas fueron evaluadas a concentraciones finales de 0.75, 1.5 y 3.0 U/ml en pozos con 100 µl de PBS inoculados con ~1000 esporas (1×10^5 esporas \cdot mL⁻¹). Los experimentos se evaluaron después de una inoculación a 28°C durante 24 horas a 37°C para permitir una actividad óptima de la quitinasa, y una posterior incubación a 28°C durante 48 horas para favorecer el crecimiento del hongo. Cada tratamiento fue evaluado por triplicado y se agregó un control de crecimiento positivo (LB + Fol) y se evaluó el efecto del fungicida comercial Captan 50 ADAMA Essencial a 0.001, 0.010, 0.100 mM como control positivo. Los resultados fueron expresados como presencia o ausencia de inhibición; (+) (-) de la germinación y crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

2.4.7. Ensayo de actividad fungistática de las quitinasas. La actividad fungistática de las quitinasas de Bt fue evaluado de acuerdo al método de difusión en pozos propuesto por De la Fuente-Salcido *et al.*, (2016) en placas de PDA pH 7.0. A partir de cultivos de Fol de 7 días de crecimiento fueron inoculadas placas de PDA y se dejaron crecer durante 72 horas a 28 °C. Entonces, a 2 cm de los bordes de la colonia fueron excavados pozos en el agar de 7 mm de diámetro con ayuda de un sacabocados estéril. 100µl de cada quitinasa en pozos separado a una concentración de quitinasa de 10 U \cdot mL⁻¹. Después las placas fueron incubadas durante 96 horas a 28±2°C registrando el crecimiento del borde de la colonia al pozo diariamente. Los ensayos se realizaron por triplicado por cada de Fol evaluada.

2.4.8 Análisis estadístico. Se realizó un diseño experimental completamente al azar. Los datos de crecimiento miceliar fueron analizados por la prueba estadística Fisher (LSD) con un intervalo de confianza del 95 %. Las comparaciones estadísticas realizados utilizando el complemento estadístico de Microsoft Excel STAT 2018.2 .50198.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Producción y purificación de quitinasas de *B. thuringiensis*. Se realizó la producción de las quitinasas ChiA74 y ChiA Btt de *B. thuringiensis* en un sistema de expresión heterólogo en el vector pColdI. Los fragmentos fueron purificados con dos sistemas; A: HisTrapTM HP. Y B: Ni-NTA spin column Qiagen, con un rendimiento entre

la proteína obtenida y volumen de lisado celular procesado mayor en el sistema B de 1.00 para ChiA74, sin embargo el sistema A tiene la ventaja de procesar una mayor cantidad de muestra por lo tanto una mayor cantidad de proteína obtenida (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Producción de quitinasas de Bt.

Tipo de columna	Quitinasa	Volumen del lisado celular (ml)	Total de proteína purificada (mg)	Rendimiento: proteína purificada/volumen de lisado celular
HisTrap™ HP	ChiA74	25	20.0	0.80
	ChiA74 Btt	25	18.0	0.72
Ni-NTA spin column Qiagen	ChiA74	0.9	0.90	1.00
	ChiA74 Btt	0.9	0.09	0.10

Las enzimas obtenidas mostraron una actividad hidrolítica específica de 80 U/mg⁻¹ para Chia74 y 82 U/mg⁻¹ en ChiA74 Btt. La evaluación funcional de las quitinasas recombinantes de Bt en base a su perfil proteico y actividad enzimática se muestra en la Fig. 2.1.

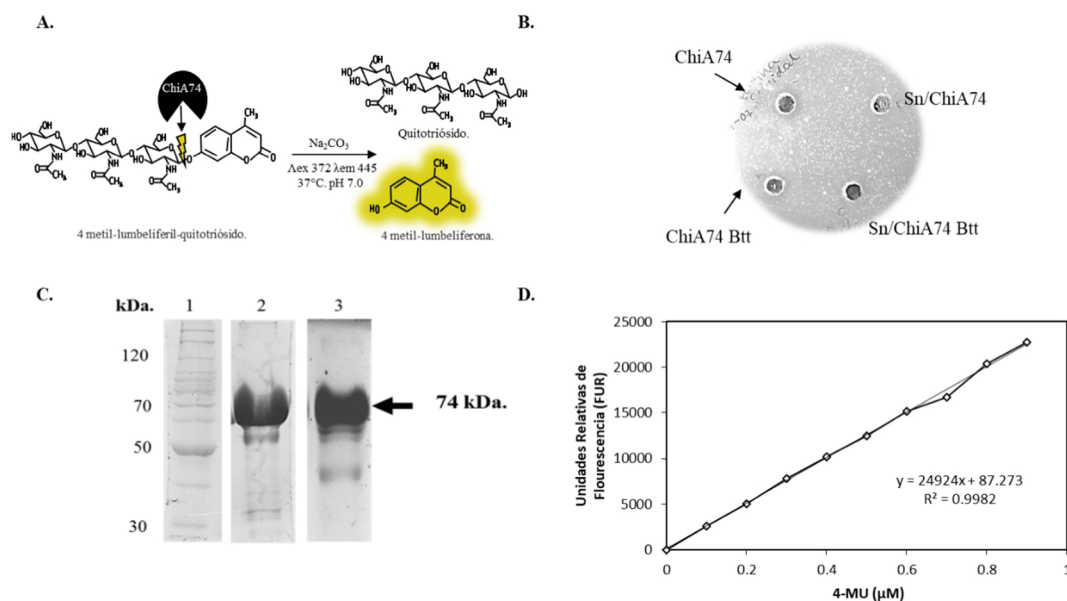


Figura 2.1 Evaluación funcional de las quitinasas de Bt. **A.** Esquema del método de fluorescencia usando como sustrato el 4MU-GL-cNAc3/4MU QT. **B.** Degradación de la quitina coloidal por las quitinasas purificadas y sobrenadante celular (Sn). **C.** Perfil proteico (SDS-PAGE 10%) de las quitinasas recombinantes de Bt; ChiA74 (1) y ChiA74 Btt (2). **D.** Actividad enzimática en U/mg de quitinasas para hidrolizar el 4MU-GL-cNAc3/4MU QT a 4-MU por el método de fluorescencia.

2.5.2. Actividad antifúngica *in vitro*. El efecto de las quitinasas de Bt sobre el crecimiento micelial *in vitro* de Fol fue evaluado por un ensayo de difusión en pozos. De

manera general, las quitinasas no mostraron afectar significativamente el crecimiento de Fol durante las 96 horas de duración del ensayo, Favoreciendo el crecimiento en Fol-1 y Fol-3 y reduciendo el crecimiento total de micelio en Fol-2, sin presentar cambios significativos (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Actividad fungistática de quitinasas de Bt sobre el crecimiento micelial cepas patogénicas de Fol.

Cepa de <i>F. oxysporum</i>	Quitinasa	Diferencias de crecimiento en radio colonial (mm) \pm SD			
		24 hrs	48	24 hrs	24 hrs
Fol-1	Control	2.7 \pm 0.6 ^a	3.0 \pm 1.0 ^b	5.7 \pm 0.6 ^{ab}	4.3 \pm 0.6 ^a
	ChiA74	3.3 \pm 0.6 ^a	6.7 \pm 0.6 ^a	7.0 \pm 1.0 ^a	3.3 \pm 1.2 ^a
	ChiA Btt	3.0 \pm 0.0 ^a	5.3 \pm 0.6 ^a	5.3 \pm 0.6 ^b	3.7 \pm 1.2 ^a
Fol-2	Control	3.7 \pm 0.6 ^{ab}	5.3 \pm 0.6 ^a	5.3 \pm 0.6 ^a	5.3 \pm 0.6 ^a
	ChiA74	3.3 \pm 0.6 ^a	5 \pm 0.0 ^{ab}	5.3 \pm 0.6 ^a	5.0 \pm 1.0 ^a
	ChiA Btt	3.3 \pm 0.6 ^a	4.0 \pm 1.0 ^b	5.3 \pm 0.6 ^a	5.0 \pm 0.0 ^a
Fol-3	Control	3 \pm 0.0 ^a	4.7 \pm 0.6 ^b	5.7 \pm 0.6 ^a	4.3 \pm 0.6 ^b
	ChiA74	3.3 \pm 0.6 ^a	5.0 \pm 0.0 ^{ab}	6.0 \pm 0.0 ^a	5.7 \pm 0.6 ^a
	ChiA Btt	3.0 \pm 1.0 ^a	5.7 \pm 0.6 ^{ab}	6.3 \pm 0.6 ^a	4.0 \pm 0.0 ^b

Longitud de radio colonial de Fol obtenido después de la exposición a 10 U·ml⁻¹ de proteína de los extractos de bacteriocina después de 7 días de crecimiento *in vitro* en placas de PDA. Los datos en la tabla son expresados como las medias \pm SD. Literales diferentes en la misma columna y cepa de *F. oxysporum* indican diferencias significativas entre los tratamientos de bacteriocina con la cepa de Fol correspondiente después del análisis por la prueba de Fischer ($p=0.05$).

La actividad antifúngica de las quitinasas de Bt fueron evaluadas sobre la germinación de esporas basados en el ensayo propuesto por Liu *et al* (2010). Las quitinasas de Bt no mostraron efectos detectables sobre la germinación de esporas y crecimiento de micelio a concentraciones de 0.75, 1.5, 3.0 U·mL⁻¹) comparados con el desarrollo de las cepas de *Fusarium oxysporum*, en cambio se determinó que la germinación de esporas y crecimiento de estos patógenos se ve afectada a partir de una dosis de 0.1 mM del fungicida Captan 50 (Fig. 2.2).

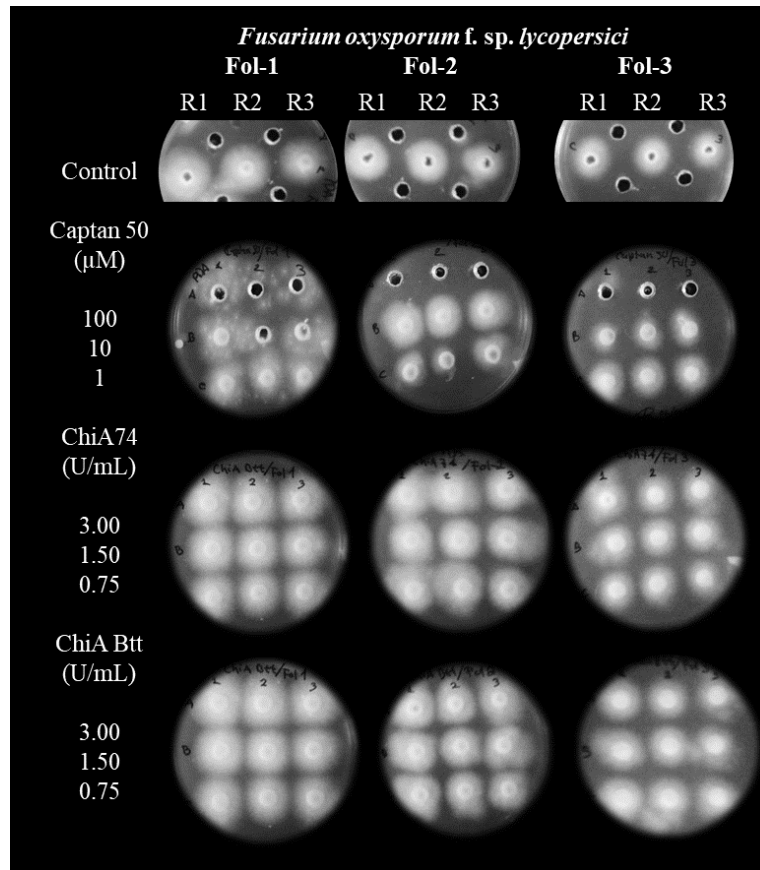


Figura 2.2 Actividad antifúngica *in vitro* de quitinasas sobre la germinación de esporas y crecimiento de micelio sobre tres cepas de *F. oxysporum*. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se utilizó PBS 100mM, pH 6.8 como control de crecimiento positivo y el fungicida comercial Captan 50 100-1 μM como control de crecimiento negativo.

2.6. DISCUSIONES

Las proteínas presentaron un peso molecular evaluado por SDS-PAGE 10% de $\sim 74\text{kDa}$ (Fig. 2.1) y una actividad enzimática de 80 y 82 U/mg además de hidrolizar la quitina coloidal (Fig. 2.2). Estas enzimas han sido caracterizadas previamente por Casados-Vázquez *et al.*, (2015) y De la Fuente-Salcido *et al.*, (2016). Ambas proteínas inhibieron el crecimiento micelial de tres cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* al ser evaluadas por difusión de pozos a 20 U/ml (Fig. 2.2). Resultados similares se han encontrado en la quitinasa rChiA Btt sobre el hongo fitopatógeno *Collectotrichum gloeosporioides* a concentraciones de 18.5 U/ml (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016). Sin embargo, las quitinasas no presentaron un efecto inhibitorio de la germinación de esporas de Fol (1×10^4 esporas/ml), al evaluarlas a una concentración de

3.0, 1.5 y 0.75 U/ml, comparado con el control sin ningún antimicrobiano y la inhibición mostrada por el fungicida Captan 50 a 100 μ M (Fig 2.2).

Se ha observado que la quitinasa ChiB de *Bacillus thuringiensis* subsp *colmeri* al perder su dominio de unión a quitina, pierde la capacidad de inhibir la germinación de esporas en *Physalospora piricola* y *Penicillium chrysogenum* sin mostrar cambios en su actividad quitinolítica (Liu *et al.*, 2010). En el caso de ChiA74 y ChiA Btt, el rol de este dominio sobre su capacidad antifungica no ha sido estudiado aun, pero se conoce que cambios en el pH y la presencia de enzimas proteolíticas pueden afectar su actividad enzimática (Gomaa, 2012; Casados-Vázquez *et al.*, 2015).

CAPITULO III

Capacidad bioestimulante de bacteriocinas y cepas de *B. thuringiensis* en la germinación y crecimiento de *Solanum lycopersicum* L.

3.1 RESUMEN

La aplicación de *B. thuringiensis* como bacteria promotora del crecimiento de plantas (BPCP) posee un éxito emergente en cultivos de importancia alimentaria como el tomate. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de las bacteriocinas y sus cepas productoras, para estimular el vigor en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Río Grande. En primera instancia, se observó un efecto negativo sobre la germinación de semillas en los componentes presentes en el sobrenadante celular de Bt. En cambio la aplicación de suspensiones celulares (1×10^7 cels·ml⁻¹) y bacteriocinas (500U·ml⁻¹) de Bt no mostraron efectos negativos sobre la germinación de semillas de tomate e incrementando el índice de vigor. El análisis de componentes principales (ACP) nos indicó el mayor efecto estimulante de los tratamientos biológicos sobre semillas de tomate tratadas con tolworthcina 524 y su cepa productora (*B. thuringiensis* subsp. *Tolworthi*), considerando su actividad por el índice de vigor de los brotes. Por el contrario, los tratamientos a partir de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* y *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* mostraron un comportamiento negativo sobre el vigor de las semillas. Los resultados obtenidos muestran que las bacteriocinas y cepas de *B. thuringiensis* poseen una versatilidad como estimuladores del vigor en semillas de tomate, sin embargo el modo de acción y las concentraciones óptimas de aplicación de los tratamientos no se han dilucidado aún.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, *Solanum lycopersicum* L., bioestimulante, Bt-bacteriocinas.

Biostimulating potential of bacteriocins and *B. thuringiensis* strains on germination and growth of *Solanum lycopersicum* L.

3.2 ABSTRACT

The application of *B. thuringiensis* as a plant-growth promoting bacterium (BPCP) has an emerging success in crops of alimentary relevance such as tomatoes. The aim of present research was to evaluate the effect of bacteriocin and their producing strains, to stimulate vigor in tomato seeds (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rio Grande. In the first instance, a negative effect on germination of seeds was observed in the components present in the extracellular components in Bt culture. Otherwise, the application of cell suspensions (1×10^7 cels \cdot ml⁻¹) and bacteriocins (500U ml⁻¹) of Bt does not shows negative results on the germination of tomato seeds and enhanced the vigor index in tomato seedlings. Principal component analysis (PCA) indicates that the greatest stimulating effect of biological treatments on tomato seeds treated with tolworthcin 524 and its product strain (Tolworthi, subversive *B. thuringiensis*), considering its activity by the vigor index of the buds In contrast, treatments from *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* and *B. thuringiensis* subsp. *entomocidius* have a negative behavior on the vigor of the seeds. The results showed that the bacteria and strains of *B. thuringiensis* have a versatility as vigor stimulators in tomato seeds, however, the mode of action and the optimal options for application of th treatments have not yet been elucidated.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Solanum lycopersicum* L., bioestimulation, Bt-bacteriocins.

3.3 INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (Bt) es uno de los agentes de biocontrol más utilizados mundialmente por la eficacia de sus proteínas insecticidas cry, cyt y vip, además de los péptidos antimicrobianos (bacteriocinas y quitinasas) utilizados en la protección contra plagas y como promotor del crecimiento en vegetales (De la Fuente-Salcido et al., 2013). La aplicación de *B. thuringiensis* como co-inoculante de bacterias nitrificantes como

Bradyrhizobium japonicum estimula el crecimiento y nodulación en plantas de soya (Bai *et al.*, 2006). La bacterización de semillas de tomate con Bt es otra aplicación con efectos estimulantes del crecimiento de tomate, incrementando el porcentaje de germinación en semillas y promoviendo la elongación de raíz y plúmula en plántulas (Qi *et al.*, 2016). La aplicación directa de suspensiones celulares de Bt sobre el sistema radicular de tomate han demostrado estimular su crecimiento bajo condiciones de crecimiento normales y bajo infección por organismos fitopatógenos, sobre los mecanismos antioxidantes en tomate (Akram *et al.*, 2013) y la inducción de genes relacionados a la defensa sistémica (Hyakumachi *et al.*, 2013). A pesar de su efectividad como un biocontrolador polivalente (bioestimulador del crecimiento y antagonista de microorganismos) sus mecanismos de acción no han sido abordados con claridad.

Las bacteriocinas son un grupo de péptidos antimicrobianos producidos por la mayoría de las bacterias, como estrategia contra competidores microbianos por espacio o nutrientes. Estos metabolitos tienen una aplicación práctica como conservadores naturales en la industria alimentaria. Actualmente se han logrado aislar y purificar 18 bacteriocinas en diferentes subespecies *B. thuringiensis* (Bt), la bacteria mundialmente reconocida por su éxito como bioinsecticida (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2013). Las principales propiedades que caracterizan a las bacteriocinas de *B. thuringiensis* son: su amplia estabilidad ante cambios de temperatura y pH, además de una extenso espectro antimicrobiano, especialmente contra otras bacterias gram positivas y algunos hongos (Cherif *et al.*, 2003; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2013).

Estudios recientes, proyectan el uso de las bacteriocinas en la medicina veterinaria y en la agricultura, como bioestimulantes del crecimiento en plantas y como agentes de biocontrol (Subramanian y Smith, 2015). La thuricina 17 (Th17) es la bacteriocina más extensamente estudiada en el crecimiento en plantas (Subramanian y Smith, 2015). Th17 aplicada por aspersión en hojas o por medio de riego en raíces a concentraciones nanomolares (nM) puede incrementar el crecimiento en plantas C_3 y C_4 como es el caso de la soya (*Glycine max*) y el maíz (*Zea mays*) respectivamente (Lee *et al.*, 2009). Tanto Th17 como la cepa productora *B. thuringiensis* NEB17 no son tóxicas contra algunas bacterias nitrificantes como *Bradyrhizobium japonicum* 532C (Gray *et al.*, 2006), y pueden ser utilizadas juntas como co-inoculantes para el incremento de la nodulación de

raíces y crecimiento en soya (Bai *et al.*, 2003). Th17 pertenece a la clase II de bacteriocinas producidas por cepas pertenecientes al género *Bacillus*, las cuales son altamente efectivas como elicitores de la actividad enzimática en plantas relacionada a su defensa contra plagas, incrementando la actividad en las enzimas PAL, POD, APX, SOD y PPO en soya (Jung *et al.*, 2011).

Algunas cepas mexicanas de *B. thuringiensis* reportadas por Barboza-Corona *et al.*, (2007), producen bacteriocinas homologas a Th17, tal es el caso de la cepa *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* (Casados-Vázquez *et al* 2016) y *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* (Pacheco-Cano *et al.*, 2014) las cuales sintetizan las bacteriocinas Thuricina (H)m y Tolworthcina 524 respectivamente, estas bacteriocinas presentan interesantes propiedades antimicrobianas y de estabilidad, sin embargo su aplicación como estimulantes del crecimiento vegetal no ha sido evaluada previamente.

En esta investigación se evaluó el efecto promotor de las bacteriocinas Thuricina H (m), Kurstacina 287, kenyacina 404, entomocina 420, y tolworthcina 524 sobre la promoción de crecimiento en tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Rio Grande) así como el efecto de sus cepas productoras en términos de estimulación de la germinación de semillas y promoción del crecimiento.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Material biológico. Los bioensayos se utilizaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Rio Grande) adquiridas de Semillas FAX hortalizasTM. Las cinco cepas mexicanas de *B. thuringiensis* (Bt); Bt subsp. *morrisoni* 269, Bt subsp. *kurstaki* 287, Bt subsp. *kenyae* 404, *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* 420 y *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* 524, fueron obtenidas de la colección de cepas nativas del CINVESTAV, Irapuato, Mex. Previamente caracterizadas por Barboza-Corona *et al* (2007) y De la Fuente-Salcido *et al* (2008) como productoras de las bacteriocinas Thuricina H (m), Kurstacina 287, Kenyacina 404, Entomocina 420 and Tolworthcina 524, respectivamente. La cepa de *B. cereus* 183 (Bc-183) obtenida del Instituto Pasteur en France fue utilizada como cepa sensible a la actividad de bacteriocina.

3.4.2. Obtención de suspensiones celulares y bacteriocinas.

Las condiciones del cultivo de las cepas de Bt y el proceso de obtención de las bacteriocinas son descritas previamente en el Capítulo 1.

3.4.3. Ensayo de actividad estimulante de bacteriocinas del crecimiento de Bt.

3.4.3.1 Desinfección de semilla. Para cada tratamiento biológico fueron utilizados 5 g de semillas. Cada lote de semillas fue desinfectado durante 5 min en hipoclorito de sodio al 5%(v/v) y lavados tres veces con agua destilada estéril.

3.4.3.2 Aplicación de tratamiento. Los tratamientos biológicos consistieron en embeber un lote de semillas previamente desinfectadas, durante 60 minutos y posteriormente retirar el exceso para ser evaluado su potencial bioestimulante.

a) Suspensión celular de Bt productor de bacteriocinas. El lote de semillas se embebió a 28°C con una suspensión celular de 1×10^7 cél·mL⁻¹. Las semillas fueron embebidas con suspensiones celulares de cada cepa de Bt productora de bacteriocinas incluyendo PBS 100mM pH 7.0 como control. Después del tratamiento fue retirado el exceso de solución en las semillas y posteriormente fueron secadas en un horno a 30-35°C durante 96 horas.

b) Extracto de bacteriocinas. La semillas fueron embebidas con soluciones de cada bacteriocina a 500 U·mL⁻¹, utilizando un control con agua bidestilada estéril. Después del tratamiento fue retirado el exceso de solución y secada en un horno a 30-35°C durante 96 horas.

3.4.4 Evaluación de la germinación de semillas y vigor de plántulas. Para evaluar el vigor de las semillas posterior al tratamiento fueron colocadas 100 semillas de cada tratamiento en domos de poliestireno desinfectados sobre papel absorbente estéril embebido en agua, basados en la metodología propuesta por International Seed Testing Association (ISTA, 2018). Para las bacteriocinas las semillas fueron puestas a germinar en obscuridad total a 28°C. A las 96 horas fue registrado el porcentaje de semillas germinadas, el peso fresco (mg) y la longitud (mm) de los brotes obtenidos y se calculó el índice de vigor de acuerdo a Abdul-Baki y Anderson (1973). Los experimentos fueron realizados por triplicado.

3.4.5 Análisis estadístico. Se realizó un diseño experimental completamente al azar. Los datos de germinación de semillas e índice de vigor fueron analizados por la prueba estadística Fisher (LSD) con un intervalo de confianza del 95 %. El efecto de los

tratamientos sobre los parámetros de crecimiento fue evaluado mediante un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés *Principal component analysis*. Las comparaciones estadísticas y el PCA fueron realizados utilizando el complemento estadístico de Microsoft Excel STAT 2018.2 .50198.

3.4 RESULTADOS

3.5.1 Efecto de tratamiento biológicos basados en bacteriocinas y cepas productoras sobre el vigor de semillas de tomate *in vitro*. La toxicidad/efectividad de los tratamientos biológicos de Bt fue determinada sobre la germinación de semillas de tomate cv. Rio Grande. La evaluación se realizó utilizando la cepa productora de la Thurincina H(m), el sobrenadante celular y la bacteriocina. El sobrenadante inhibió a las 48h, la bacteriocina y cepa incrementaron la germinación temprana (48 horas), a las 96 horas la tasa más alta de germinación se encontró en la bacteriocina ~96% (Fig. 3.1).

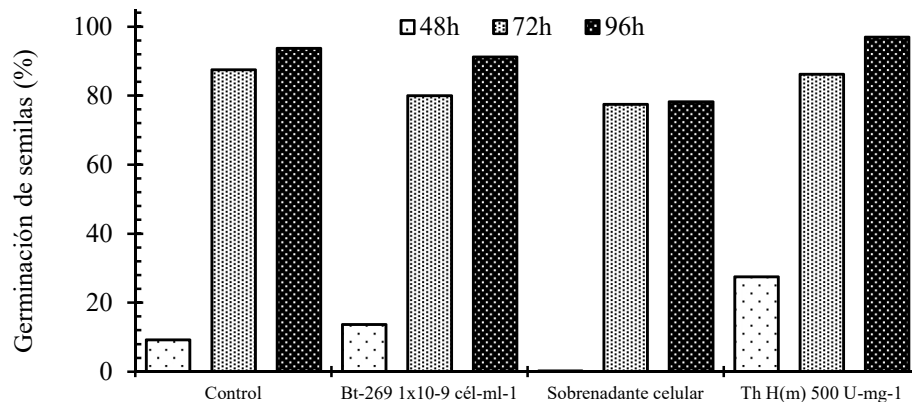


Figura 3.1. Efecto de la Thurincina H (m) de Bt-269 sobre el tiempo de germinación de semillas de tomate cv. Rio Grande.

El comportamiento de distintas concentraciones de tratamientos utilizados para el control de hongos (Captan 50) y estimulación del crecimiento en tomate (Ácido salicílico) fueron comparados con los tratamientos biológicos de la Thurincina H en la germinación de semillas de tomate cv. Rio Grande. Bajo las condiciones experimentales no se observaron diferencias estadísticamente significativas por Fischer (LSD), los tratamientos

nos dan una idea de la tendencia a reducir o incrementar la tasa de germinación de tomate bajo ciertas concentraciones (Fig. 3.2).

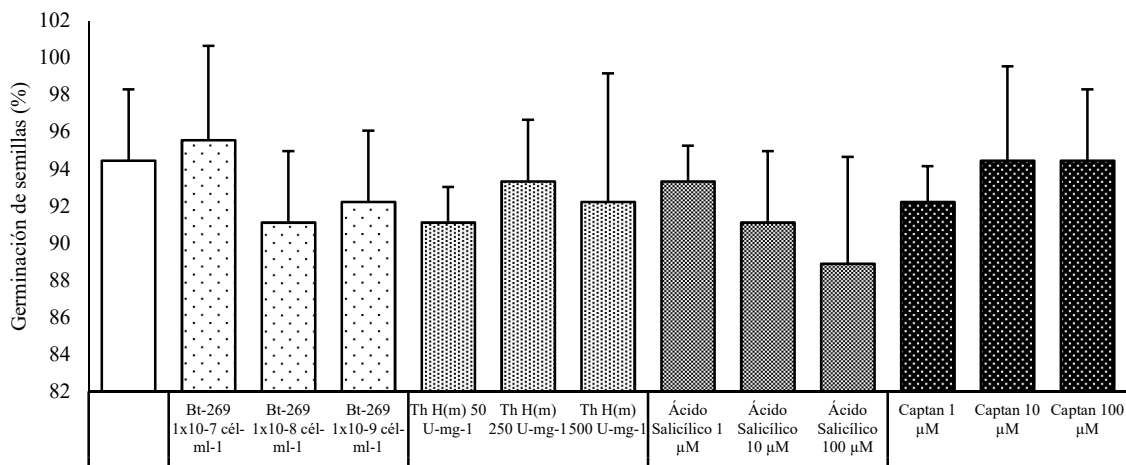


Figura 3.2. Efecto de la concentración de Thurincina H (m) de Bt-269 sobre la germinación de semillas de tomate cv. Rio Grande.

Los tratamientos biológicos (suspensiones celulares y bacteriocinas de *B. thuringiensis*) no mostraron efectos adversos sobre la germinación de semillas de tomate cv. Rio Grande El tratamiento a partir de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*, suspensión celular y bacteriocina presentaron el mayor porcentaje de germinación 98 y 97% respectivamente presentando un ligero incremento (4%) en la germinación de semillas. Respecto a la longitud índice de vigor y peso fresco de brotes no se presentaron diferencias significativas en los tratamientos biológicos con las bacteriocinas y la mayoría de las suspensiones celulares respecto al control, con excepción de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (suspensión celular y bacteriocina) que redujeron significativamente la longitud, el índice de vigor y peso fresco de los brotes de tomate. Este último parámetro de crecimiento también se vio afectado por la suspensión celular de *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* (Tabla 3.1).

El análisis multivariado mostro que el 84.81% de la varianza fue explicada por los primeros dos componentes (67.41% y 17.4%). Todos los parámetros se correlacionaron positivamente, presentado una alta correlación entre longitud de brotes y el índice de vigor (0.983), mientras los parámetros menos correlacionados fueron el peso fresco y la

germinación de semillas (0.388). El índice de vigor fue el parámetro que más contribuye al componente 1 (34.09%), mientras que el tratamiento que más contribuyó al componente 1 fue la suspensión celular de *B. thuringiensis* subsp *tolworthi* con el 19.995% del total entre los tratamientos biológicos. Los tratamientos a base de *B. thuringiensis* subsp *kenyae* y *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* mostraron una correación negativa con los parámetros de crecimiento y la mayoría de los tratamientos biológicos, lo cual se puede apreciar claramente en la Fig. 3.3.

Tabla 3.1 Actividad promotora del crecimiento de *B. thuringiensis* en semillas de tomate cv. Rio Grande.

Tratamiento	Porcentaje de germinación (%)	Longitud de brotes (cm)	Índice de vigor	Peso fresco brote (mg)
Control	94.3±2.9 ^{ab}	6.1±0.5 ^{ab}	575.7±61 ^{ab}	34.6±1.8 ^{ab}
<i>Bt-bacteriocinas</i>				
Thurincina H(m)	96.0±1.7 ^a	6.4±0.7 ^{ab}	615.6±78 ^{ab}	33.0±1.6 ^{abc}
Kurstacina 287	95.3±1.2 ^a	6.2±0.1 ^{ab}	591.1±20 ^{ab}	34.6±1.1 ^{ab}
Kenyacina 404	91.0±4.4 ^b	5.1±1.0 ^{cd}	459.4±83 ^c	26.0±0.5 ^d
Entomocina 420	95.0±2.0 ^a	5.6±0.8 ^{bcd}	534.5±66 ^{bc}	27.8±6.2 ^{cd}
Tolworthcina 524	97.7±0.6 ^a	6.8±0.1 ^a	666.7±13 ^a	32.4±2.9 ^{bcd}
<i>Suspensiones celulares</i>				
<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>morrisoni</i>	94.7±1.5 ^{ab}	6.0±0.2 ^{abc}	564.4±30 ^b	33.0±1.4 ^a
<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>kurstaki</i>	96.7±1.5 ^a	5.8±0.3 ^{bc}	555.9±37 ^b	33.8±7.0 ^{abc}
<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>kenyae</i>	95.0±1.0 ^a	4.8±1.0 ^d	451.9±93 ^c	32.2±7.0 ^{bcd}
<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>entomocidus</i>	91.0±3.5 ^b	6.2±0.1 ^{ab}	563.2±31 ^b	32.6±0.6 ^{bc}
<i>B. thuringiensis</i> subsp <i>tolworthi</i>	96.7±0.6 ^a	6.3±0.4 ^{ab}	607.9±33 ^{ab}	34.5±1.8 ^{ab}

Las medias dentro de la misma columna seguidas de distintas literales son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) evaluadas por la prueba de Fischer (LSD).

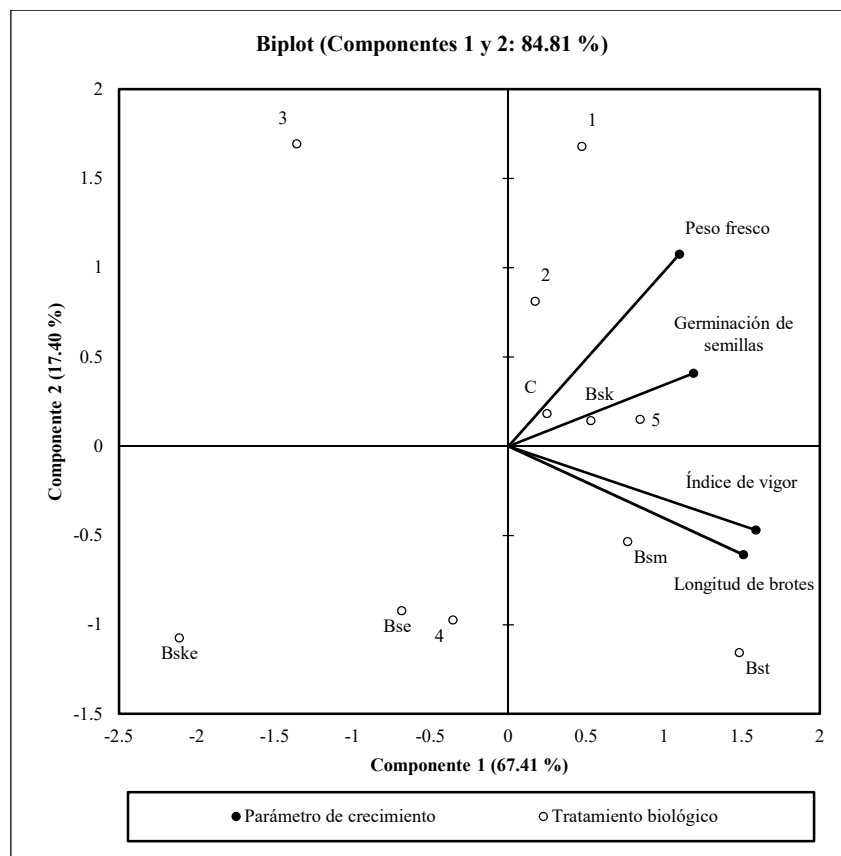


Figura 3.3 Análisis de componentes principales (PCA) con Biplot entre los tratamientos biológicos de *B. thuringiensis* en semillas de tomate y los parámetros de crecimiento. Tratamientos biológicos: C. Control, Suspensiones celulares: Bsm. *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus*, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*. Bacteriocinas: 1. Thurincina H (m), 2. Kurstacina 287, 3. Kenyacina 404, 4. Entomocina 420, 5. Tolworthcina 524.

3.5 DISCUSIONES

Las bacteriocinas producidas por cepas del genero *Bacillus* poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana y son consideradas las más extensamente estudiadas como estimuladoras del crecimiento en plantas (Subramanian y Smith, 2015). *B. thuringiensis* miembro de este género bacteriano, es productor de 18 diferentes tipos de bacteriocinas con una extensa actividad inhibitoria contra microorganismos entre los que se incluyen algunas bacterias fitopatógenas (Kamoun *et al.*, 2011) y hongos (Cherif *et al.*, 2011; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2013). Algunas de estas bacteriocinas como la bacthuricina F4 (Jung *et al.*, 2011) y la thuricina 17 (Lee *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2011;

Subramanian y Smith, 2015) presentan una actividad polivalente como promotoras del crecimiento en plantas.

En esta investigación fue evaluado la versatilidad de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* reportadas por Barboza-Corona *et al.*, (2007) para estimular el vigor en semillas de tomate cv. Rio Grande. Las bacteriocinas del cultivo de las cepas de Bt evaluadas aquí, presentaron una actividad específica contra *B. cereus* 186 de $\sim 5,000 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Previamente se ha reportado que estas bacteriocinas inhiben una amplia cantidad de especies de *Bacillus*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *listeria innocua*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *S. xylosus*, *S. flexneri*, *Salmonella sp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* y algunos hongos (revisado por De la Fuente-Salcido *et al.*, 2013).

Al evaluar la actividad promotora de crecimiento de las bacteriocinas ($500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) y sus cepas productoras de estas bacteriocinas ($1 \times 10^7 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$) sobre el vigor de semillas en tomate cv. Rio Grande, fue observado de manera general, un efecto positivo sobre el vigor de las semillas, observado un incremento en el porcentaje de germinación y vigor de las semillas tratadas respecto al control, con una ligera reducción en el peso fresco de los brotes germinados (Tabla 3.1). Los componentes 1 y 2 del PCA explicaron el 84.81% de la covarianza entre los tratamientos y parámetros de crecimiento. El diagrama Biplot del PCA (Fig. 3.2) nos muestra un comportamiento negativo sobre los parámetros de crecimiento y vigor en las semillas de tomate tratadas con *B. thuringiensis* subsp *kenyae* y *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* y las bacteriocinas producidas por estas cepas, donde la bacteriocina kenyacina 404 fue el único tratamiento correlacionado negativamente con el índice vigor y longitud de brotes (ver Tabla 3.1 vs Fig. 3.2).

Entre todos los tratamientos se destacó el cual mostro incrementar el porcentaje de germinación y vigor de las semillas de tomate cv. Rio Grande el uso de la suspensión bacteriana de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* y la tolworthicina 524. Esta última bacteriocina posee una homología en su secuencia de aminoácidos N-terminal con la bacteriocina Th-17 (Pacheco-Cano *et al.*, 2014). La actividad estimuladora del crecimiento en Th-17 es la más estudiada en bacteriocinas del género *Bacillus* (Subramanian y Smith, 2015). Posiblemente el efecto estimulador del vigor en las semillas de tomate en en la

thuricina H(m) y la tolworthicina 524 (Tabla 3.1) se deba a su similitud estructural con la bacteriocina Th-17.

Las ventajas de las bacteriocinas de *B. thuringiensis* son su versatilidad como potenciales agentes de bioprotección de cultivos (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2013), lo cual puede ayudar a mejorar la efectividad de otros organismos benéficos al eliminar ciertos competidores microbianos. La bacteria productora de Th17, *Bacillus thuringiensis* NEB17 incrementa la nodulación y crecimiento en soya (*Glycine max*) al ser co-inoculada con la bacteria biofertilizadora *B. japonicum* (Bai *et al.*, 2003), además fue comprobado que la bacteriocina Th-17 no presenta toxicidad contra distintas cepas de *B. japonicum* (Gray *et al.*, 2006). A pesar de que se conoce la aplicación directa de Th-17 sobre la estimulación del crecimiento en soya y maíz (Lee *et al.*, 2009) y su efecto inductor de la actividad enzimática de defensa en plantas de soya (Jung *et al.*, 2011), los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de las bacteriocinas Th-17 y las evaluadas en el presente estudio para estimular el crecimiento en plantas no se conocen con claridad.

CAPITULO IV

Bioestimulación y protección de quitinasas de *B. thuringiensis* sobre la infección de *F. oxysporum* en *Solanum lycopersicum* L.

4.1 RESUMEN

Las quitinasas de *B. thuringiensis* (Bt) y sus propiedades para controlar hongos fitopatógenos representan un recurso biotecnológico para la producción libre de pesticidas químicos en cultivos de importancia alimentaria como lo es el tomate (*Solanum lycopersicum* L.). En este estudio se evaluó el efecto de las quitinasas de Bt (ChiA74 y ChiA Btt) en semillas y plántulas de tomate cv. Rio Grande sobre el crecimiento vegetativo bajo condiciones normales y por estrés biótico causado por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol). La aplicación de las quitinasas ChiA74 y ChiA Btt en semillas redujo la severidad causada por las cepas Fol-1 (30-40%), Fol-2 (33-42%) y Fol-3 (9-23%) de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en las plántulas de tomate e incrementaron el contenido de pigmentos fotosintéticos en condiciones de crecimiento normales y bajo infección. La aplicación de la quitinasa ChiA74 por imbibición de raíces causó un incremento en la producción de biomasa, el desarrollo de raíz y el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas bajo condiciones de crecimiento normales o bajo estrés biótico causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

Palabras clave: Quitinasas de *B. thuringiensis*, bioestimulación, *Fusarium oxysporum*, *Solanum lycopersicum* L.

Biostimulation and protection of *B. thuringiensis* chitinases on the infection of *F. oxysporum* in *Solanum lycopersicum* L.

4.2 ABSTRACT

The *B. thuringiensis* chitinases and its properties to plant pathogen fungi biocontrol represent a biotechnological resource to free-chemical production in crops of

alimentary relevance such as tomato (*Solanum lycopersicum* L.). In this study, the effect of Bt chitinases (ChiA74 and ChiA Btt) were tested in seeds and seedlings of tomato cv. Rio Grande for stimulation of vegetative growth in normal conditions and under biotic stress caused by *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol). The application of chitinase ChiA74 and ChiA Btt in seeds cause a reduction of the pathogenic severity in tomato seedlings triggered by the strains of *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*: Fol-1 (30-40%), Fol-2 (33-42%) and Fol-3 (9-23%) and remarkable enhance of photosynthetic pigments content under in both, normal and infection growth conditions. The application of ChiA74 by root imbibition inflict an increase in biomass production, root development and photosynthetic pigment content in plants under normal growth conditions or under biotic stress caused by *F. oxysporum*. sp. *lycopersici* race 3.

Key words: *B. thuringiensis* chitinases, biostimulation, *Fusarium oxysporum*, *Solanum lycopersicum* L.

4.3 INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es considerado entre los productos agroalimentarios más importantes de México, cuyo volumen de exportación a los EE.UU (Su principal socio económico) fue estimado durante el primer semestre de 2016 en 992, 214 toneladas métricas con un valor de \$1,194 millones de dólares (SAGARPA, 2016). La susceptibilidad de este cultivo a distintas plagas, conlleva una serie de repercusiones económicas, debido principalmente a dos factores: las contaminaciones y daños al producto generados por organismos fitopatógenos, y la inherente inversión destinada a la adquisición de plaguicidas y otros métodos para su control. Mundialmente, se consideran a los microorganismos fitopatógenos causantes de pudriciones de raíz y la marchitez vascular, entre los de mayor agresividad y de difícil control, debido a su relativamente sencilla diseminación y su prolongada persistencia en el ambiente (Agrios 2005). Particularmente es bien conocida la severidad de la marchitez vascular del tomate causada por la presencia de razas fitopatógenas del hongo *Fusarium oxysporum* *Schlechtend: Fr. f. sp. lycopersici* (Sacc.) *W.C. Snyder & H.N. Hansen*, las cuales son constante riesgo en las principales regiones tomateras de México (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008). El control

en campo de esta enfermedad es desafiante, debido en gran manera al surgimiento de fenómenos de resistencia de los agentes causales, inclusive bajo el empleo de fungicidas o la implementación de cultivares resistentes (Agrios 2004, Fischer 2017).

La implementación de estrategias integrales para el manejo de enfermedades, es una metodología que pretende además reducir el uso de pesticidas químicos a través del uso de labores culturales, métodos de monitoreo de la enfermedad, prevención de contaminaciones, aplicación de nuevas tecnologías para generar cultivares resistentes y el uso de microorganismos biocontroladores (Ajillogba y Babalola, 2013; McGovern 2015). Las cepas bacterianas del género *Bacillus* han demostrado tener un relativo éxito sobre la reducción y severidad de los síntomas causados por *F. oxysporum* en tomate (Aydi Ben Abdallah *et al.*, 2017). Esta propiedad se debe en gran parte a la capacidad de este grupo bacteriano para producir elicitores de la respuesta de defensa o inmunidad en plantas, y/o la producción de ciertos metabolitos con propiedades antifúngicas (Aljiloba *et al.*, 2013) como ejemplo se citan distintos tipos de biosurfactantes y enzimas líticas como las quitinasas producidas por distintos miembros del género *Bacillus* (Aydi Ben Abdallah *et al.*, 2017; Jouzani *et al.*, 2017). Las quitinasas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), el agente bioinsecticida más empleado alrededor del mundo, han recibido una importante atención por el descubrimiento de sus propiedades sinérgicas a los cristales insecticidas (Cry) y por su capacidad para producir oligosacáridos bioactivos derivados de residuos de quitina (Barboza-Corona *et al.*, 2012).

El estudio de las propiedades antifúngicas de estas enzimas para su aplicación en el control de hongos fitopatógenos es un campo de investigación emergente (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016; Jouzani *et al.*, 2017). Estas enzimas son clasificadas como endoquitinasas dentro del grupo de las glucosil-hidrolasas (E.C. 3.2.2.14), con actividad catalítica sobre las unidades de β -(1-4)-N-acetilglucosamina (GlcNAc) que conforman al homopolímero denominado quitina (Barboza-Corona *et al.*, 2012; Casados-Vázquez *et al.*, 2015; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016). Este polímero juega un rol crítico dentro de la estructura de la pared celular de hongos como *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, confiriéndole rigidez y protección contra las condiciones ambientales (Schoffemeer *et al.*, 1999). En trabajos de investigación previos se ha comprobado que algunas quitinasas de Bt pueden inhibir el crecimiento de micelio y la germinación de esporas de una

considerable variedad de hongos fitopatógenos (Mehmood *et al.*, 2010), además de poseer la capacidad de hidrolizar la pared celular fúngica, e incrementar el porcentaje de germinación en semillas infestadas con hongos fitopatógenos (de la Vega *et al.*, 2006).

Actualmente se han estudiado los efectos sinérgicos de quitinasas de distintos orígenes por su actividad antifúngica, y la estimulación del crecimiento y la respuesta inmune innata en plantas asociada a los residuos de oligosacáridos desprendidos durante la hidrólisis de la quitina y quitosana por acción de distintos tipos de quitinasas (Das *et al.*, 2013). Sin embargo el conocimiento de este efecto utilizando quitinasas de *Bt* es poco explorado. En este estudio se evaluaron las quitinasas ChiA74 de *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* LBIT-82 (Barboza-Corona *et al.*, 2003) y ChiA74 Btt de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016) expresadas en *E.coli* y aplicadas en semillas y plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Río Grande) sobre la estimulación del desarrollo vegetativo y la reducción de la marchitez vascular causado por cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* obtenidas de la región tomatera de Sinaloa (Carrillo-Fascio *et al.*, 2003).

4.4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.4.1 Material biológico. Para la expresión y purificación de las endoquitinasas ChiA74 y ChiA Btt fue utilizada la cepa *Escherichia coli* BL21 Rosetta 2 (Merck Millipore, MA) transformadas con la construcción ChiA74 B121-R2-pCold/ChiA Btt B121-R2-pCold. Los cuales contienen el gen de la quitinasa (sin el péptido señal) fusionado a una secuencia artificial la cual incluye una cola de histidina (6xHis) para su purificación, según lo descrito por Casados-Vásquez *et al.*, (2015) para ChiA74 y de la Fuente-Salcido *et al.*, (2016) para ChiA Btt. Las cepas fitopatógenas utilizadas para los bioensayos fueron *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* raza 1, *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* raza 2, *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* raza 3, aisladas de plantas sintomáticas en la región tomatera en el valle de Culiacán Sinaloa, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fitopatología del CIAD-Culiacán. Los bioensayos en semilla y plantas fueron probados en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) variedad. Río Grande (Susceptible a *F. oxysporum* f.sp. *lycopercisi* raza 3) adquirida por Semillas FAX hortalizas™.

4.4.2 Producción de quitinasas de *B. thuringiensis* en *E.coli*. El proceso de purificación y caracterización de las quitinasas ChiA74 y ChiA Btt se describió previamente en el capítulo 2.

4.4.2 Evaluación de la patogenicidad de *F. oxysporum* sobre las plántulas de tomate. La fitopatogenicidad de las cepas de *F. oxysporum* fue evaluado bajo condiciones de invernadero a 28°C y una humedad relativa de 70%. Fue retirado el sustrato de las plántulas y se inocularon por imbibición en una suspensión de esporas de *F. oxysporum* 1×10^6 cél·mL⁻¹ (Obtenidas de colonias de 13 días de crecimiento en PDA) durante 1 hora. Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas por separado en tubos de polipropileno con 20 g de suelo estéril (6 plantas por tratamiento). El diseño experimental fue realizado como se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Diseño experimental de la evaluación de la patogenicidad de *F. oxysporum* sobre plántulas de tomate.

Diseño experimental	
Grupo 1.	Plántulas obtenidas de semillas embebidas en PBS pH 6.8 fueron utilizadas como control.
Grupo 2.	Plántulas obtenidas de semillas embebidas en las soluciones de quitinasa (10 U·mL ⁻¹) como control del agente de biocontrol.
Grupo 3.	Plántulas obtenidas de semillas embebidas en PBS pH 6.8 inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> como control de desarrollo de la enfermedad.
Grupo 4.	Plántulas obtenidas de semillas embebidas en las soluciones de quitinasa (10 U·mL ⁻¹) e inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .

Los tratamientos evaluados fueron las quitinasas ChiA74 (Q1) y ChiA Btt (Q2) y se desafiaron fitopatológicamente contra las cepas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1 (F1), *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 2 (F2), *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3 (F3). Las diferentes interacciones entre tratamientos se muestran en la Tabla 4.2.

Las plántulas fueron incubadas bajo condiciones de invernadero durante 21 días para evaluar la severidad de la enfermedad respecto a la manifestación de clorosis y la marchitez en plántulas y la reducción en el contenido de pigmentos fotosintéticos (Clorofilas y carotenoides) en hojas. Para la extracción de pigmentos fotosintéticos fueron perforados discos en las hojas de las plántulas. Por cada muestra fueron tomados 20 mg de tejido vegetal y puestos a incubar en acetona al 80%(v/v) a -20°C durante 24 horas para facilitar la extracción de las clorofilas y carotenoides. Entonces cada muestra fue

centrifugada y el extracto libre de los restos de tejido fue obtenido. El contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de tomate fue cuantificado basado en la metodología propuesta por Lichtenthaller (1987). Cada planta fue categorizada en base a los síntomas de la enfermedad que presento de acuerdo a la siguiente escala: **(0)** Planta sana, **(1)** Plantas con ligeramente marchitas/clorosis, **(2)** Plantas con marchitez y clorosis menor a las hojas sanas **(3)** Plantas con marchitez y clorosis mayor a las hojas sanas **(4)** Planta totalmente marchita o muerta. Los porcentajes de severidad de la enfermedad fueron convertidos usando la siguiente fórmula:

$$\text{Severidad de la Enfermedad (\%)} = [(Ax0)+(Bx1)+(Cx2)+(Dx3)+(Ex)/(\text{Número total de plantas}) * 100]$$

Las distintas etapas de evaluación de las quitinasas y sus efectos sobre germinación y resistencia a *F. oxysporum* se muestran en la Fig 4.1.

Tabla 4.2 Tratamientos en plántulas de tomate var. Rio Grande obtenidas a partir de semillas tratadas con quitinasas de *B. thuringiensis*.

	Tratamientos
C	PBS 100 mM pH 7.0
Q1	ChiA74
Q2	ChiA Btt
F1	PBS 100mM pH 7.0 + raza 1
F1/Q1	ChiA74 + raza 1
F1/Q2	ChiA Btt+raza 1
F2	PBS 100 mM pH 7.0 + raza 2
F2/Q1	ChiA74 + raza 2
F2/Q2	ChiA Btt +raza 2
F3	PBS 100mM pH 7.0+ raza 3
F3/Q1	ChiA74 + raza 3
F3/Q2	ChiA Btt + raza 3

4.4.3 Ensayo de protección de quitinasas en raíces de tomate

4.4.3.1 Aplicación de las quitinasas en raíces. Plántulas en etapa temprana (desarrollo de 5 hojas verdaderas) fueron tratadas con 10 U·mL⁻¹ de las quitinasas e incubadas durante 24 hrs y fueron retiradas del germinador retirando cuidadosamente el sustrato. Las raíces fueron lavadas con agua corriente cuidadosamente para retirar restos de sustrato. Entonces se realizó una segunda aplicación de las quitinasas a la misma concentración. El diseño experimental fue realizado como se muestra en la Tabla 4.3.

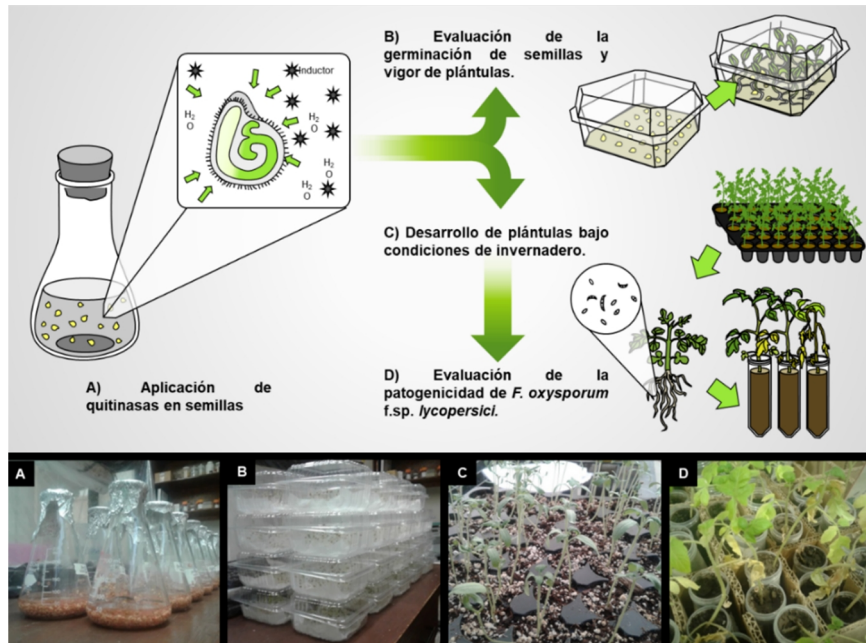


Figura 4.1 Diagrama de las evaluaciones del efecto estimulante de quitinasa de Bt sobre el vigor y resistencia a patógenos en semillas de tomate cv. Rio Grande. **A.** Imbibición de semillas de tomate. **B.** Evaluación del efecto del tratamiento sobre germinación de semillas. **C.** Desarrollo de plántulas en invernadero. **D.** Evaluación de la patogenicidad en condiciones de invernadero.

Tabla 4.3 Diseño experimental de la evaluación de la aplicación de quitinasas en raíces de tomate sobre la estimulación del crecimiento de tomate en condiciones normales y bajo estrés biótico por *F. oxysporum*.

Diseño experimental	
Grupo 1.	Plantas de tomate con imbibición de raíz con PBS pH 6.8 fueron utilizadas como control.
Grupo 2.	Plantas de tomate con imbibición de raíz en las soluciones de quitinasa ($10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) como control del agente de biocontrol.
Grupo 3.	Plantas de tomate con imbibición de raíz con en PBS pH 6.8 inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> como control de desarrollo de la enfermedad.
Grupo 4.	Plantas de tomate con imbibición de raíz con en las soluciones de quitinasa ($10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) e inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .

4.4.3.2 Inoculación del patógeno en raíces. Las raíces de las plántulas fueron inoculadas con Fol-3 (1×10^6 esporas $\cdot \text{mL}^{-1}$) por imbibición durante 60 min. Las plántulas fueron entonces trasplantadas a Vasos de poliestireno N°16 con 300g de Tierra preparada Vigoro® previamente esterilizada. Los tratamientos fueron incubados durante 24 horas a 30°C , entonces se realizó una segunda aplicación de los tratamientos directamente sobre

el suelo (10 U·mL⁻¹). Las diferentes interacciones entre tratamientos se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Descripción del diseño experimental de ensayos de patogenicidad en plántulas de tomate cv. Rio Grande.

	Tratamientos
C	PBS 100mM pH 6.8
Q1	ChiA74
Q2	ChiA Btt
F3	PBS 100mM pH 6.8+raza 3
F3/Q1	ChiA74+raza 3
F3/Q2	ChiA Btt+raza 3

4.4.3.3 Monitoreo del crecimiento y contenido de pigmentos en hojas. Las plantas fueron fertilizadas cada 7 días con 10ml de Vigoro 7-7-7 (2g·L⁻¹). Se midió la expresión de genes a las 48 horas de la inoculación de Fol y se monitoreo el crecimiento y concentración de pigmentos fotosintéticos cada 7 días durante 2 meses de ensayo.

4.4.3.4 Evaluación de la severidad de la enfermedad. A los 56 días fueron evaluados los síntomas de marchitez y se extrajeron las plantas para determinación de peso fresco y seco de raíces, hojas y tallo. Y se determinó el nivel de severidad de la enfermedad de acuerdo a los síntomas presentados. El proceso de aplicación de las quitinas como biocontrolador se muestra en la Figura 4.2.

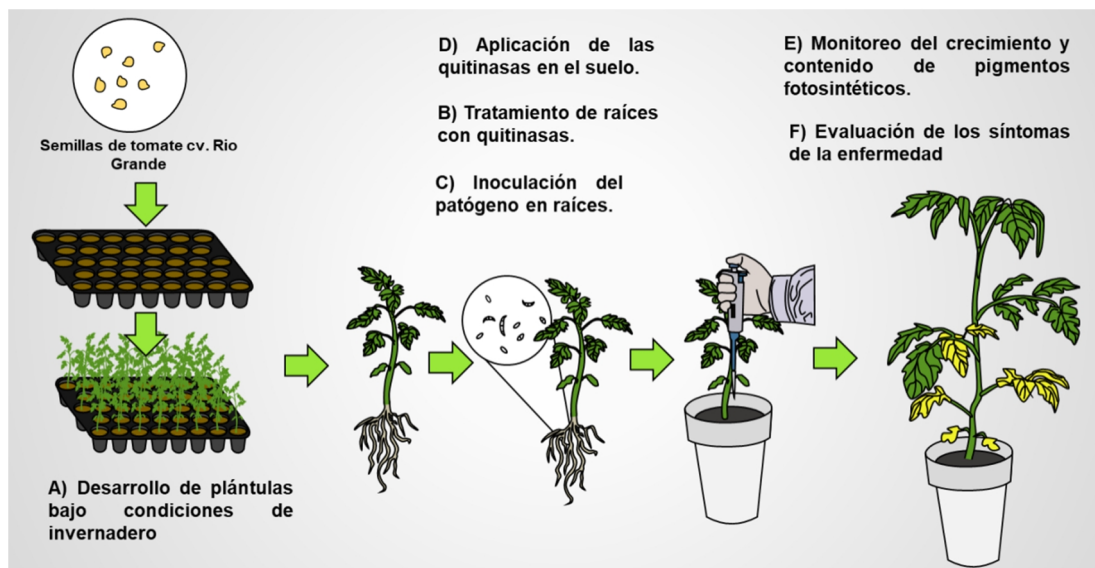


Figura 4.2 Diagrama del proceso y evaluación del efecto de las quitinasas de Bt como controlador biológico y estimulante del crecimiento vegetativo en plantas de tomate.

4.4.4 Estandarización de metodología para extracción y cuantificación de clorofilas y carotenoides en hojas de tomate bajo estrés biótico causado por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3.

4.4.4.1 Muestreo y extracción de pigmentos de hojas de tomate cv. Rio Grande. 20 mg de tejido fresco de hojas (cortes con perforadora de 5 mm de diámetro) fueron depositados en 400 µL de acetona al 80% fría e incubados en completa oscuridad a -20°C durante 24 horas. Entonces los tubos fueron centrifugados a 13,000 g durante 2 minutos para separar el tejido del extracto acetónico.

4.4.4.2 Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría UV. La cuantificación de los pigmentos fotosintéticos fue determinada de acuerdo a las condiciones de medición establecida por Lichtenthaler (1987) para determinación de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales en acetona al 80%. La medición fue adaptada a un volumen de 200µl del extracto en acetona al 80% (v/v) para su medición en espectrofotómetro EpochTM microplate spectrophotometer BioTeK en placas de microtitulaciones de 96 pozos. La concentración y contenido de clorofilas y carotenoides totales en hojas de tomate cv. Rio Grande fueron determinados de acuerdo a las siguientes fórmulas:

1. Concentración de Clorofila a [Chla] en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}=12.25A-2.79B$.
2. Concentración de Clorofila b [Chlb] en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}=12.25B-2.79^a$.
3. Concentración de Carotenoides totales [X+C] en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}=[1000C-1.82[\text{Chla}]-85.02[\text{Chlb}]]/198$.
4. Contenido de clorofila a ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF)=[Chla]/[VP]
5. Contenido de clorofila b ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF)=[Chlb]/[VP]
6. Contenido de carotenoides totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF)=[X+C]/[VP]
7. Contenido total de clorofilas ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PF)=[Chla]+[Chlb]
8. Relación de clorofilas= [Chla]/[Chlb]
9. Relación clorofilas y carotenoides=[Chla]+[Chlb]/ [X+C]

Donde:

A= Densidad óptica a 663 nm.

B=Densidad óptica a 647 nm.

C=Densidad óptica a 470 nm,

V=Volumen del extracto en mL.

P=Peso fresco del tejido en mg.

4.4.4.3 Nivel de clorosis en hojas de tomate cv. Rio Grande. El nivel de clorosis en hojas de tomate fue categorizado en 5 niveles (0-4) de acuerdo a la aparición de

manchas cloróticas en las hojas de tomate cv. Rio Grande bajo condiciones de estrés biótico causado por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3: Hojas con verdor intenso (0), hojas con verdor moderado (1), hojas verdes con clorosis inicial (2), hojas verdes con clorosis avanzada (3), hojas cloróticas (4), Hojas pardas (5).

3.4.5 Análisis estadístico. Se realizó un diseño experimental completamente al azar. Los datos de germinación de semillas, índice de vigor, contenido de pigmentos fotosintéticos, severidad de la enfermedad, crecimiento vegetativo (Peso fresco, peso seco y altura de plantas) fueron analizados por la prueba estadística Fisher (LSD) con un intervalo de confianza del 95 %. El efecto de los tratamientos sobre los parámetros de crecimiento fue evaluado mediante un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés *Principal component analysis*). Las comparaciones estadísticas y el PCA fueron realizados utilizando el complemento estadístico de Microsoft Excel STAT 2018.2 .50198.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Efecto de las quitinasas sobre la promoción de crecimiento vegetativo del tomate bajo condiciones de laboratorio. El efecto de las quitinasas ChiA74 y ChiA Btt en la etapa germinativa del tomate cv. Río Grande no afectaron significativamente los parámetros de porcentaje de germinación, longitud de brotes, índice de vigor y peso fresco respecto a un lote de semillas sin el tratamiento con las quitinasas, sin embargo se observó que el tratamiento con ChiA Btt presenta un mayor porcentaje de germinación respecto al tratamiento con ChiA74 bajo las condiciones establecidas en el experimento (Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Efectos fisiológicos del tratamiento de semillas de tomate cv. Rio Grande mediante imbibición con quitinasas de *B. thuringiensis*.

Tratamiento	Germinación (%)	Longitud de brotes (cm)	Índice de vigor	Peso fresco (g)
Control (C)	94.3±2.9 ab	6.34±0.2 a	598.3±30.8 a	3.36±0.2 a
ChiA74 (Q1)	92.3±1.5 b	6.17±0.7 a	570.6±70.3 a	3.36±0.2 a
ChiA Btt (Q2)	95.7±1.5 a	5.63±.8 a	539.3±84.2 a	3.7±0.3 a

Los datos representan la media de tres repeticiones ± la desviación estándar. Distintas letras por columna representan diferencias significativas analizadas por la prueba estadística de Fisher SLD (P<0.05).

4.5.2 Efecto de las quitinasas de Bt sobre la estimulación de resistencia a razas de Fol en semillas de tomate cv. Rio Grande. La patogenicidad de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* fue evaluada contra plántulas de tomate cv. Rio Grande (Resistente a la raza 1 y la raza 2 de Fol) bajo condiciones de invernadero. Las plántulas de tomate mostraron los primeros síntomas visibles de la enfermedad (Clorosis y marchitamiento de hojas) 14 días posteriores a la inoculación del patógeno, la cual se desarrolló plenamente a los 21 días post-inoculación con la aparición de las primeras plantas totalmente marchitas. Como se esperaba y de acuerdo a la resistencia basal del cultivar Rio Grande sobre las razas 1 y 2 de Fol, las plantas infectadas por estas cepas mostraron síntomas visiblemente menores comparados con la alta severidad mostrada por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza3 en las plántulas infectadas (Fig. 4.3).

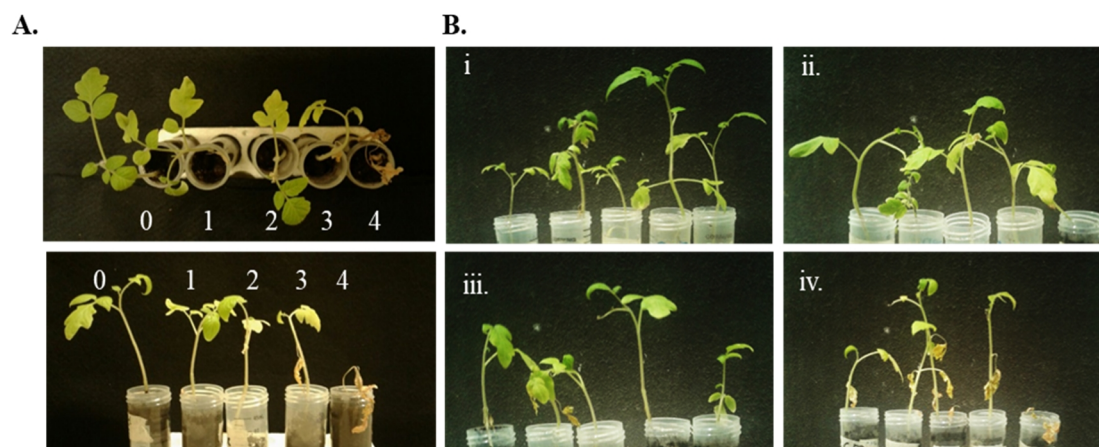


Figura 4.3. Pruebas de patogenicidad en plántulas de tomate. A. Categorización de síntomas de clorosis en plántulas de tomate cv. Rio Grande (0-4), B. Síntomas de patogenicidad de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plántulas de tomate cv Rio Grande; i. Control, ii. Fol-1, iii. Fol-2, iv. Fol-3.

El efecto estimulador de los tratamientos en semillas de tomate con las quitinasas de Bt fue evaluado sobre la respuesta de defensa en plántulas de tomate cv. Rio Grande contra la infección de *F. oxysporum*. La aplicación de las quitinasas ChiA74 y ChiA Btt en semillas redujo la severidad causada por las cepas Fol-1 (30-40%), Fol-2 (33-42%) y Fol-3 (9-23%) en plántulas de tomate a los 21 días posteriores a la infección. De manera particular, fue observada una reducción significativa en la severidad de la enfermedad en los tratamientos con ChiA74 (Q1) y ChiA Btt (Q2) sobre la raza 3 (F3) y la raza 2

respectivamente (ver figura 4: F2+Q2 y F3+Q1). AL final del ensayo fue observado que el incremento en la severidad fitopatogénica de Fol estaba directamente relacionada con el descenso en el contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas de las plántulas. las plántulas obtenidas del tratamiento de semillas con las quitinasas de Bt mostraron un mejor rendimiento en el contenido de pigmentos fotosintéticos en condiciones de crecimiento normales y bajo estrés biótico causado por las tres razas de Fol evaluadas respecto a plantas utilizadas como control (Ver C,F1,F2,F3 vs tratamientos con Q1 y Q2 en Fig. 4.4).

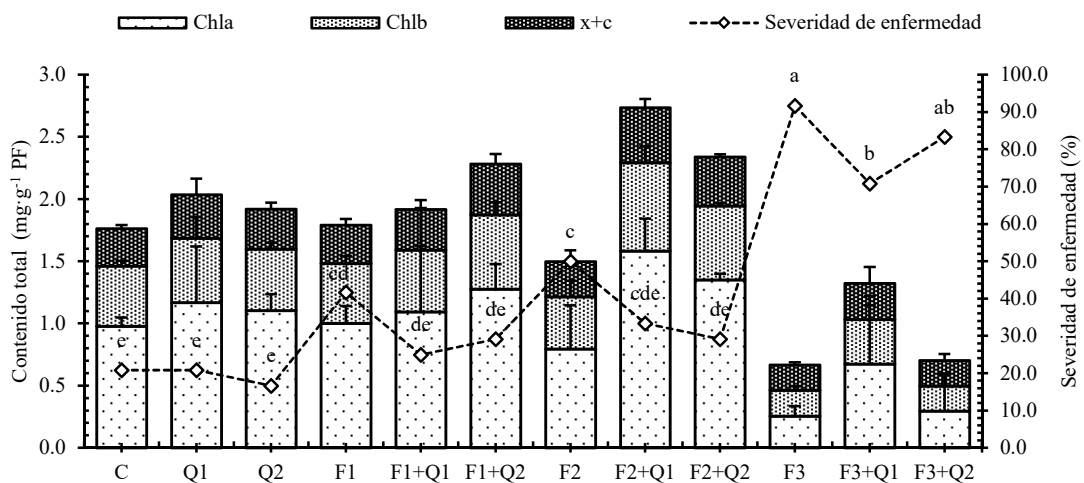


Figura 4.4 Efecto de los tratamientos en semilla con quitinasas de Bt sobre la patogenicidad de cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en plántulas de tomate cv Rio Grande. Contenido de clorofila a (Chla), Clorofila b (Chlb), Carotenoides totales (x+c), Severidad de la enfermedad.

Las plántulas mostraron una decoloración basal debido posiblemente a descensos en la luminosidad óptima para el desarrollo del tomate durante el periodo de ensayo, lo cual se vio reflejado en los valores de severidades entre 0-20% en las plantas no infectadas con el patógeno. Para el análisis de componentes principales del efecto de los tratamientos con quitinasas en semillas de tomate cv. Rio Grande sobre la severidad de la marchitez vascular causada por Fol y el contenido de pigmentos fotosintéticos (Clorofilas y carotenoides) fueron agregados los registros de peso fresco y peso seco de las plántulas en cada tratamiento. El ACP explica el 88.89% de la variabilidad experimental en dos componentes principales (CP): CP1 (71.8%) y CP2 (17.09%). El vector de severidad de enfermedad presentó una correlación negativa con los vectores del contenido de clorofila

a (Chla), Clorofila b (Chlb) y carotenoides totales (X+C). El efecto de la infección de las cepas de Fol pertenecientes a las razas 2 y 3 esta correlacionado positivamente con la severidad de la enfermedad, mientras que la infectividad causada por la raza 1 no destaca entre los tratamientos sin infección. La quitinasa ChiA74 y la ChiA Btt presentaron la mayor correlación positiva sobre el peso seco y el contenido de pigmentos fotosintéticos respectivamente bajo condiciones de desarrollo normales en plántulas de tomate (Fig 4.5).

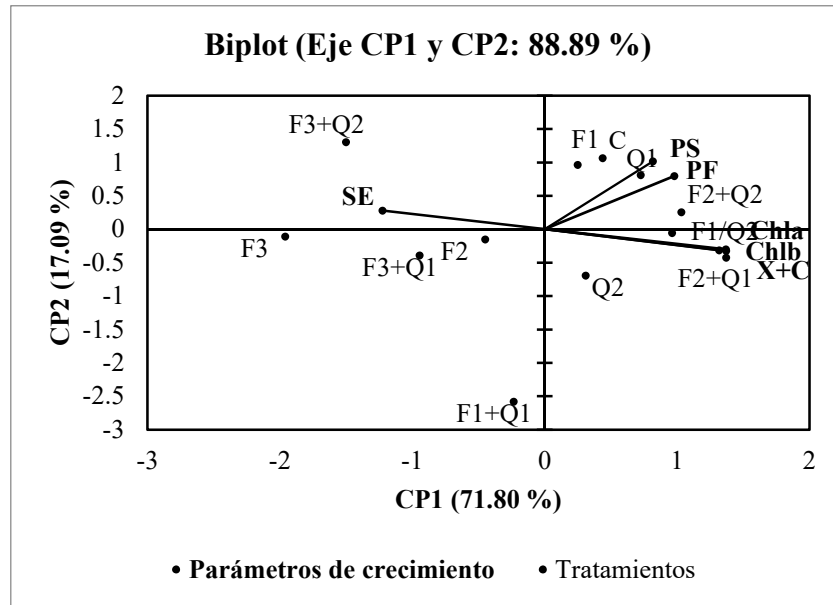


Figura 4.5. Análisis de componentes principales APC del efecto de las quitinasas en semillas de tomate cv. Rio Grande sobre la severidad de la enfermedad (SE) causado por razas fitopatógenas de *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* y su relación con el marchitez, contenido de pigmentos fotosintéticos, peso seco y peso fresco de plántulas. Tratamientos: Control (C), ChiA74 (Q1). ChiA Btt (Q2), Raza 1 (F1), Raza 2 (F2), Raza 3 (F3).

4.3 Efecto de las quitinasas sobre la severidad de la marchitez vascular de tomate causada por *F. oxysporum* bajo condiciones invernadero. En las plantas de tomate infectadas se comenzaron a observar los primeros síntomas de clorosis a los 21 días posteriores a la infección y una clorosis avanzada después de los 35 días, en los cuales fueron registradas las primeras plantas muertas (Índice de severidad de 4) y la aparición del crecimiento de micelio sobre la superficie del tejido muerto de la planta (datos no mostrados). La presencia de la infección de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Raza 3 se manifestó al interior de los tejidos vasculares en raíces y tallo como apardeamientos en los tejidos vasculares. La categorización de los síntomas causados por *F. oxysporum* f.sp.

lycopersici raza 3 en plantas y la presencia del patógeno en los tejidos vasculares se muestran en la Figura 4.6.



Figura 4.6. Categorización de severidad de la marchitez vascular en tomate cv. Rio Grande causada por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3. Raíz y tallo sanos i, ii, Raíz y tallo sintomáticos iii, iv.

Para investigar el potencial de las quitinasas para reducir los efectos fisiológicos y síntomas de la marchitez causada por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate, las raíces de tomate se trataron previamente con $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ de quitinasa 24 horas antes y 48 horas posterior a la infección. A los 56 días posteriores al inicio del bioensayo fue observado un incremento visiblemente del enraizamiento en las plantas tratadas con las quitinasas respecto a las plantas donde no fue aplicada la enzima en condiciones de crecimiento normal y bajo infección por *F. oxysporum* (Fig. 7a). La presencia del hongo se manifestó en plantas infectadas con o sin tratamiento con quitinasas mostrando apareamientos sobre los ases vasculares al nivel de corona, hipocotíleo y en el primer nodo (Fig. 4.7b).



Figura 4.7. Efecto de las quitinasas de Bt sobre tejidos y organogénesis en plantas de tomate cv. Río Grande en condiciones normales o bajo estrés biótico. A. Efecto de las quitinasas sobre enraizamiento. B. Efecto de las quitinasas sobre tejido vascular en condiciones normales y bajo infección por *F. oxysporum* f.sp *lycopersici* raza 3. i. Corona, ii. Hipocotíleo, iii. Primer nodo.

El efecto de las quitinasas de Bt fue evaluado en experimentos independientes (ChiA74 y ChiA Btt) bajo condiciones de invernadero sobre el crecimiento vegetativo de plantas tratadas con quitinasas ($10\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) en raíces en condiciones normales y bajo estrés biótico causado por Fol-3. El registro semanal del crecimiento en altura (cm) de las plantas mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales inoculados con Fol-3 y los grupos sin infectar a partir del día 21 post-emergencia, coincidiendo con la aparición de los primeros síntomas de marchitamiento y clorosis en las hojas de las plantas para el experimento con ChiA74. En contraste, la evaluación del crecimiento en el experimento con ChiABtt fue más discreta, mostrando diferencias en crecimiento hasta los 35 días del ensayo, sin embargo los síntomas de la enfermedad aparecieron a los 21 días del ensayo. Atípicamente fue observado un incremento en la tasa de crecimiento a partir de los 42 días, terminando con un dramático incremento a los 56 días, con un crecimiento en altura de plantas mayor al doble registrado durante los 7 días anteriores. De manera general se observó que las plantas tratadas con las quitinasas, incrementaron tasa de crecimiento en altura bajo condiciones normales y en presencia de Fol-3 respecto a los tratamientos sin la quitinasa (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Crecimiento de plantas (cm) de tomate cv. Rio Grande en condiciones normales y bajo estrés biótico durante 56 días de ensayo bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Tiempo de bioensayo (Días)								
	7	14	21	28	35	42	49	56	
ChiA 74	C	2.7b	3.3a	4.9b	5.0ab	6.7ab	6.7a	3.5ab	6.7a
	Q	4.8a	4.7a	7.4a	7.4a	7.8a	8.9a	2.7ab	7.6a
	F	3.8ab	4.6a	3.7b	4.4b	4.0b	3.0b	0.6c	2.5b
	F+Q	3.9ab	3.8a	5.2b	3.9b	5.2ab	3.7b	1.6bc	2.5b
ChiA Btt	C	0.5ab	2.4a	2.5a	1.3a	2.2a	2.9a	4.1ab	15.8a
	Q	1.0a	2.0a	2.6a	2.12a	2.1a	4.0a	5.5a	18.0a
	F	0.3b	2.1a	2.6a	1.2a	1.2b	2.8a	2.2b	5.3b
	F+Q	0.7ab	2.2a	2.0a	1.7a	2.2a	3.2a	2.2b	9.2b

Los valores representan las medias del triplicado de la medición de la altura. Letras diferentes por tratamiento y en la misma columna representan diferencias significativas evaluadas por la prueba de Fischer (LSD) con un intervalo de confianza del 95%.

La aplicación radicular de la quitinasa ChiA74 incremento significativamente la altura y biomasa de raíz (Peso húmedo y peso seco) y peso seco en toda la planta al ser aplicada no mostraron tener efectos negativos sobre la altura, peso húmedo y biomasa de las plantas de tomate marcando un ligero incremento en tamaño y peso respecto a plantas control tanto en tallo y hojas como en raíces a excepción de la biomasa que fue menor a las plantas control. Se evidenció un incremento significativo en el peso húmedo de las raíces de tomate tratadas con ChiA74. El efecto de la infección de *Fusarium* sobre el crecimiento, peso húmedo y biomasa fue significativamente menor en tallos y hojas de plantulas sin la presencia del hongo, sin embargo no afectó significativamente el peso húmedo y biomasa de raíces respecto al control. El porcentaje de severidad de la enfermedad en plantas de tomate infectadas con *F. oxysporum* fue alrededor de 54-63% en plantas control, mientras que en plantas tratadas con la quitinasa ChiA74 presentaron una reducción significativa de la enfermedad del 33%. De manera general las plantas tratadas con las quitinasas mostraron menores niveles de marchitez vascular, un mayor crecimiento aéreo y un mayor peso húmedo y biomasa respecto a las plantas infectadas (Tabla 4.7).

El ACP de las variables evaluadas durante el experimento de estimulación de crecimiento de tomate con ChiA74 explica el 92.88% de la variabilidad experimental en dos componentes principales (CP): CP1 (80.21%) y CP2 (12.67%). El vector de severidad de enfermedad (SE) presentó una correlación negativa (-0.961) al CP1, y sobre todos los vectores de las variables de respuesta evaluadas (altura, biomasa, contenido de clorofilas

y carotenoides). El peso fresco de las plantas fue la variable con la de mayor correlación positiva (0.983) con el componente CP1. El grupo experimental de plantas no infectadas tratadas con la quitinasa ChiA74 (Q1) fue el que presentó la mayor contribución a las observaciones (43.67%) en el componente CP1 (Fig. 4.8).

Tabla 4.7. Influencia de las quitinasas ChiA74 y ChiA74 Btt sobre la promoción del crecimiento de tomate bajo condiciones normales y estrés biótico. Los datos representan la media de tres repeticiones \pm la desviación estándar. Distintas letras por columna representan diferencias significativas analizadas por la prueba estadística de Fisher SLD ($P < 0.05$).

Tratamiento	Altura plantas (cm)	de PF-Raiz (g)	PS-Raiz (g)	PF-Tallo y hojas (g)	PS-Tallo y hojas (g)	PF-Planta (g)	PS-Planta (g)	Severidad de la Chla enfermedad (%) PF	(mg-g ⁻¹ Chlb PF)	(mg-g ⁻¹ X+C PF)	(mg-g ⁻¹ PF)	
ChiA74	C	39.58 \pm 11.16 b	2.06 \pm 0.7 b	0.19 \pm 0.04 b	12.24 \pm 3.7 a	2.36 \pm 1.75 a	14.30 \pm 4.2 a	2.48 \pm 1.77 a	0.00 \pm 0.00 c	1.94 \pm 0.52 a	0.66 \pm 0.20 ab	1.07 \pm 0.26 a
	Q	51.42 \pm 8.2 a	3.45 \pm 1.5 a	0.19 \pm 0.11 a	15.82 \pm 4.9 a	1.28 \pm 0.45 b	19.27 \pm 6.2 a	1.47 \pm 0.53 b	0.00 \pm 0.00 c	2.47 \pm 0.50 a	0.83 \pm 0.16 a	1.37 \pm 0.27 a
	F	26.58 \pm 18.9 c	1.19 \pm 0.7 c	0.08 \pm 0.05 b	5.67 \pm 7.4 b	0.33 \pm 0.35 c	6.86 \pm 8.1 b	0.41 \pm 0.38 c	62.50 \pm 37.69 a	1.08 \pm 1.15 b	0.43 \pm 0.54 b	0.62 \pm 0.54 b
	F+Q	28.58 \pm 16.5 bc	1.21 \pm 0.5 c	0.13 \pm 0.05 b	5.78 \pm 5.2 b	0.63 \pm 0.27 bc	6.99 \pm 5.6 b	0.76 \pm 0.41 bc	41.67 \pm 26.83 b	1.08 \pm 0.89 b	0.43 \pm 0.26 b	0.69 \pm 0.46 b
ChiA74 Bt	C	31.83 \pm 10.3 ab	1.32 \pm 0.4 a	0.10 \pm 0.04 a	9.06 \pm 2.3 b	0.68 \pm 0.56 ab	10.38 \pm 5.56 ab	0.78 \pm 0.60 ab	0.00 \pm 0.00 b	1.66 \pm 0.67 a	0.52 \pm 0.17 a	0.99 \pm 0.24 a
	Q	37.33 \pm 12.4 a	1.79 \pm 0.7 a	0.15 \pm 0.08 a	12.28 \pm 5.5 a	0.95 \pm 0.61 a	14.07 \pm 6.08 a	1.10 \pm 0.67 a	0.00 \pm 0.00 b	1.69 \pm 0.97 a	0.56 \pm 0.29 a	1.05 \pm 0.46 a
	F	17.75 \pm 12.7 c	1.72 \pm 0.8 a	0.13 \pm 0.08 a	5.44 \pm 5.4 b	0.47 \pm 0.50 b	7.16 \pm 5.94 b	0.60 \pm 0.57 b	54.17 \pm 36.08 a	1.40 \pm 0.87 a	0.41 \pm 0.38 a	0.78 \pm 0.41 a
	F+Q	23.17 \pm 10.9 bc	1.68 \pm 1.7 a	0.18 \pm 0.15 a	6.92 \pm 3.9 b	0.77 \pm 0.32 ab	8.60 \pm 5.19 b	0.95 \pm 0.46 ab	47.92 \pm 36.57 a	1.68 \pm 1.12 a	0.42 \pm 0.42 a	0.87 \pm 0.53 a

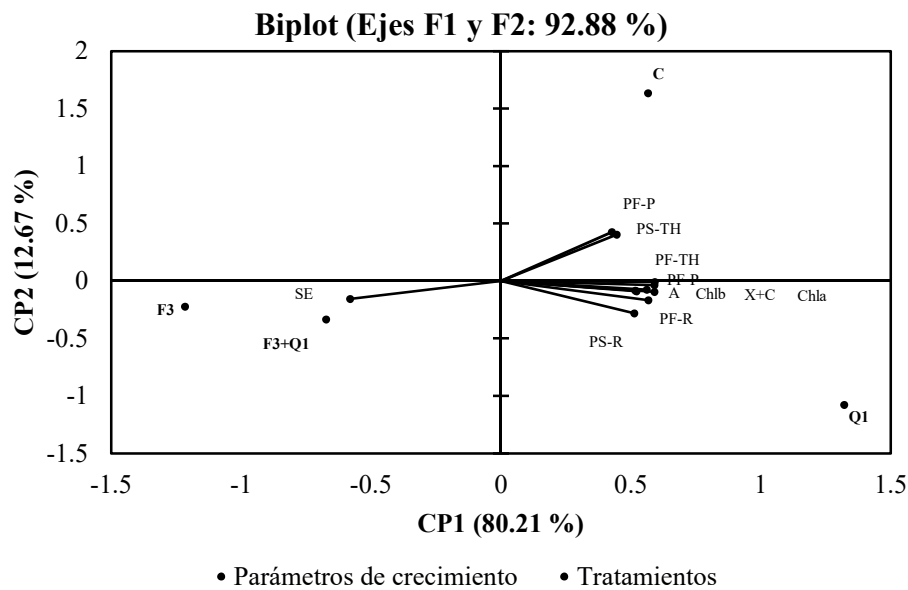


Figura 4.8. Análisis de componentes principales APC del efecto de las quitinasas en semillas de tomate cv. Rio Grande sobre la severidad de la enfermedad (SE) causado por razas fitopatógenas de *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* y su relación con el marchitez, contenido de pigmentos fotosintéticos, peso seco y peso fresco de plántulas. Tratamientos: Control (C), ChiA74 (Q1), ChiA Btt (Q2), Raza 1 (F1), Raza 2 (F2), Raza 3 (F3).

El ACP de las variables evaluadas durante el experimento de estimulación de crecimiento de tomate con ChiA Btt explica el 95.58% de la variabilidad experimental en dos componentes principales (CP): CP1 (74.23%) y CP2 (21.35%). Los vectores de severidad de enfermedad (SE) y peso fresco de raíz (PF-R) presentaron una correlación negativa de -0.878 y -0.02 respectivamente con el componente CP1, y sobre todos los vectores de las variables de respuesta evaluadas (altura, biomasa, contenido de clorofilas y carotenoides). El contenido de carotenoides total (X+C) fue la variable con la de mayor correlación positiva (0.998) con el componente CP1. El grupo experimental de plantas no infectadas tratadas con la quitinasa ChiA74 (Q1) fue el que presentó la mayor contribución a las observaciones (48.66%) en el componente CP1 (Fig 4.9).

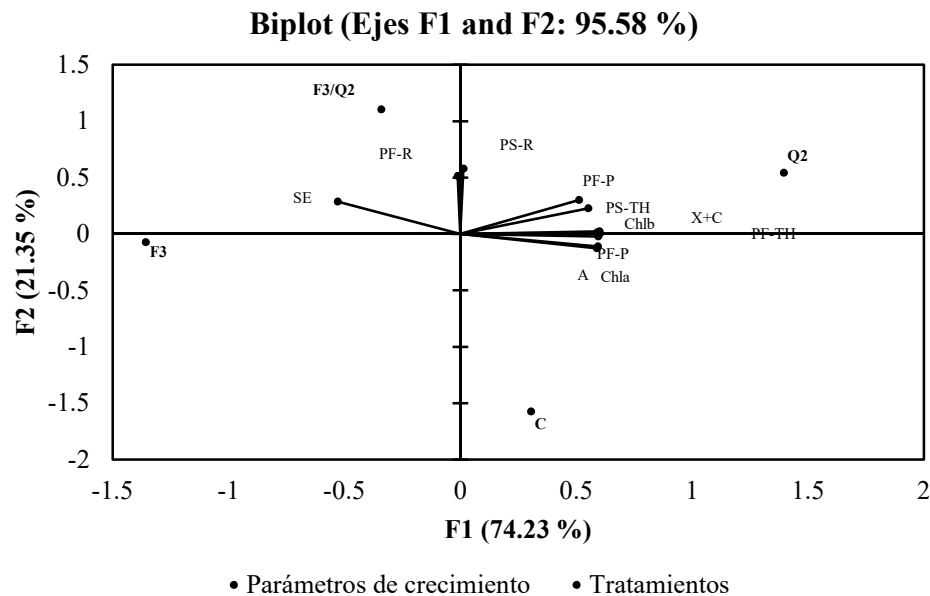


Figura 4.9. Análisis de componentes principales APC del efecto de las quitinasas en semillas de tomate cv. Rio Grande sobre la severidad de la enfermedad (SE) causado por razas fitopatógenas de *F.oxysporum* f.sp. *lycopersici* y su relación con el marchitez, contenido de pigmentos fotosintéticos, peso seco y peso fresco de plántulas. Tratamientos: Control (C), ChiA74 (Q1), ChiA Btt (Q2), Raza 1 (F1), Raza 2 (F2), Raza 3 (F3).

4.5.4 Efecto de las quitinasas de Bt sobre el crecimiento de plantas de tomate en condiciones normales y bajo estrés biótico por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3. El efecto de las quitinasas sobre plántulas sanas e infectadas con *Fusarium oxysporum* fue monitoreado semanalmente sobre el crecimiento y el contenido de clorofilas (Clorofila

a y clorofila b) y carotenoides totales (Carotenoides y Xantofilas). Se observo de manera general una reducción sobre todos los paramentros observados en las plantas infectadas con el hongo mostrando un efecto menor sobre las plantas que fueron infectadas y tratadas con las quitinasas (F3/Q1 y F3/Q2), tambien se evidencio que las plantas sanas tratadas con las quitinasas mostraron un aumento en crecimiento y contenido de clorofilas respecto al control. Durante el desarrollo de los bioensayos se observo una evidente reducción en el crecimiento que afecto tambien la concentración de clorofilas (día 49, en ChiA74 y dias 35 y 49 en ChiA74 Btt) los cuales coincidieron con una baja en la luminocidad y temperaturas ambiental exterior causado por la entrada de frentes frios y la prolongación de dias nublados (días 35 y 56) durante esas mediciones. Las diferencias en crecimiento entre los ensayos de ChiA74 y ChiA Btt se debieron a una diferencia en la luminocidad y temperatura media (Fig 4.10 y 4.11).

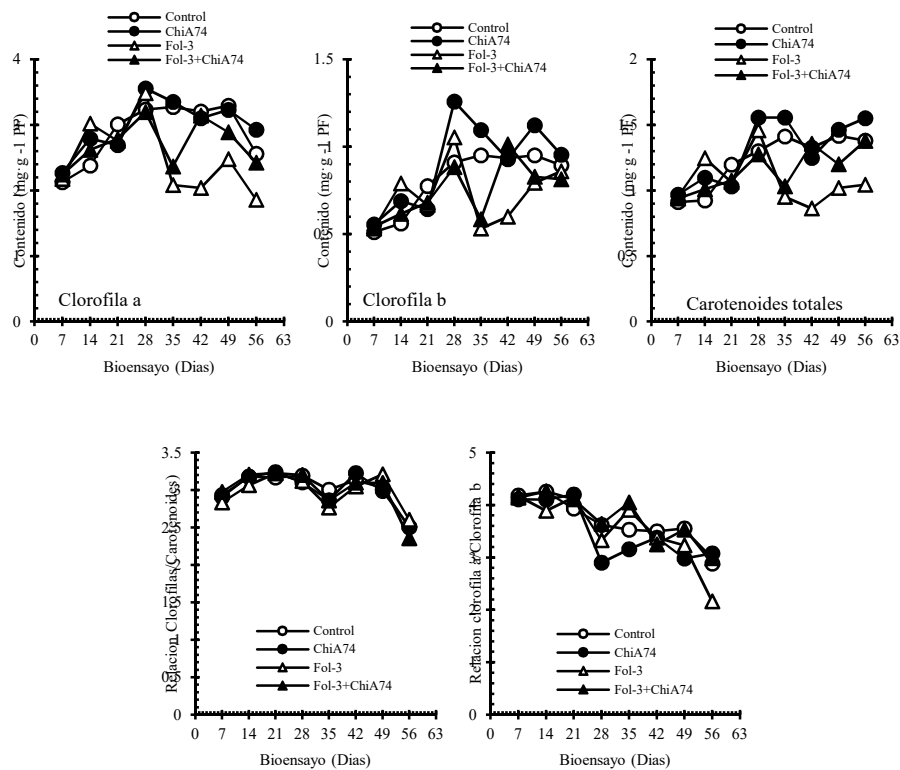


Figura 10. Efecto de la quitinasa ChiA74 de Bt sobre el contenido y relación de pigmentos fotosintéticos en tomate cv. Rio Grande en condiciones normales y bajo estrés biótico causado por *F. oxysporum*.

El efecto de *F. oxysporum* fsp. *lycopersici* sobre la relación entre el contenido de clorofilas y carotenoides fue evaluado en hojas de tomate cv. Rio Grande con distintos niveles de clorosis. Se observó una disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos al incrementar gradualmente el nivel de clorosis presente en hojas. La relación entre clorofila a y clorofila b (a/b) se mantuvo constante (~5:1) en las hojas con un grado de clorosis de 0-3, y mostrando un desenso significativo en hojas totalmente cloróticas (Nivel 4-5). La relación entre clorofilas totales y carotenoides totales [(a+b)/x] en hojas sanas mostró una relación de 5:1, la cual presentó una disminución gradual al irse incrementando el nivel de clorosis. En hojas cloróticas el contenido de carotenoides totales fue mayor al de clorofilas totales en una relación 1:2 (Fig. 4.12).

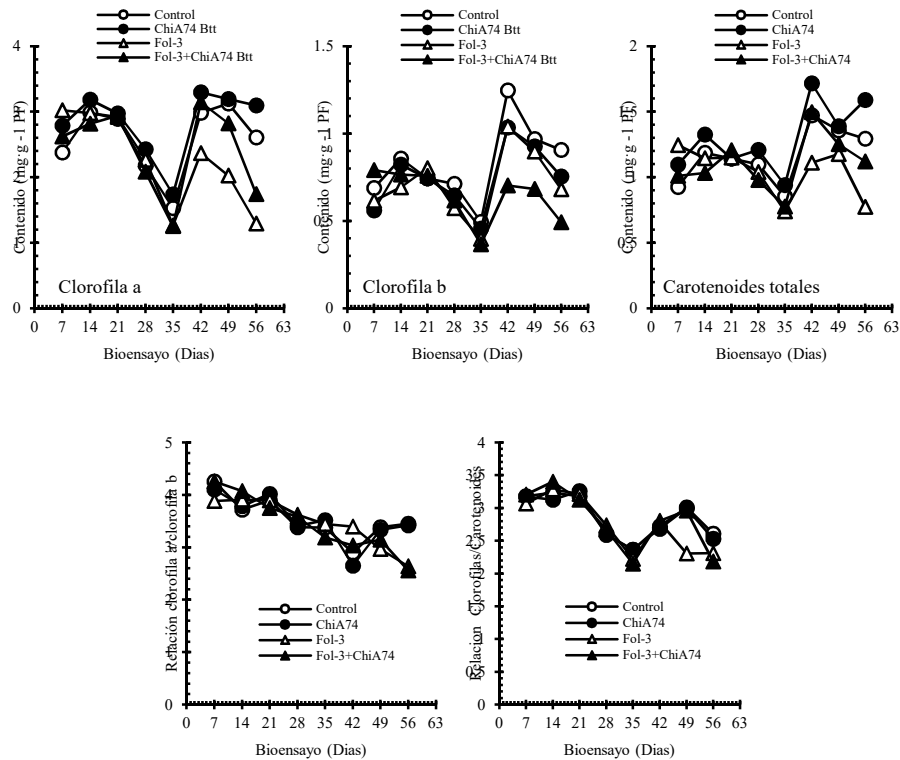


Figura 4.11. Efecto de la quitinasa ChiA Btt de Bt sobre el contenido y relación de pigmentos fotosintéticos en tomate cv. Rio Grande en condiciones normales y bajo estrés biótico causado por *F. oxysporum*.

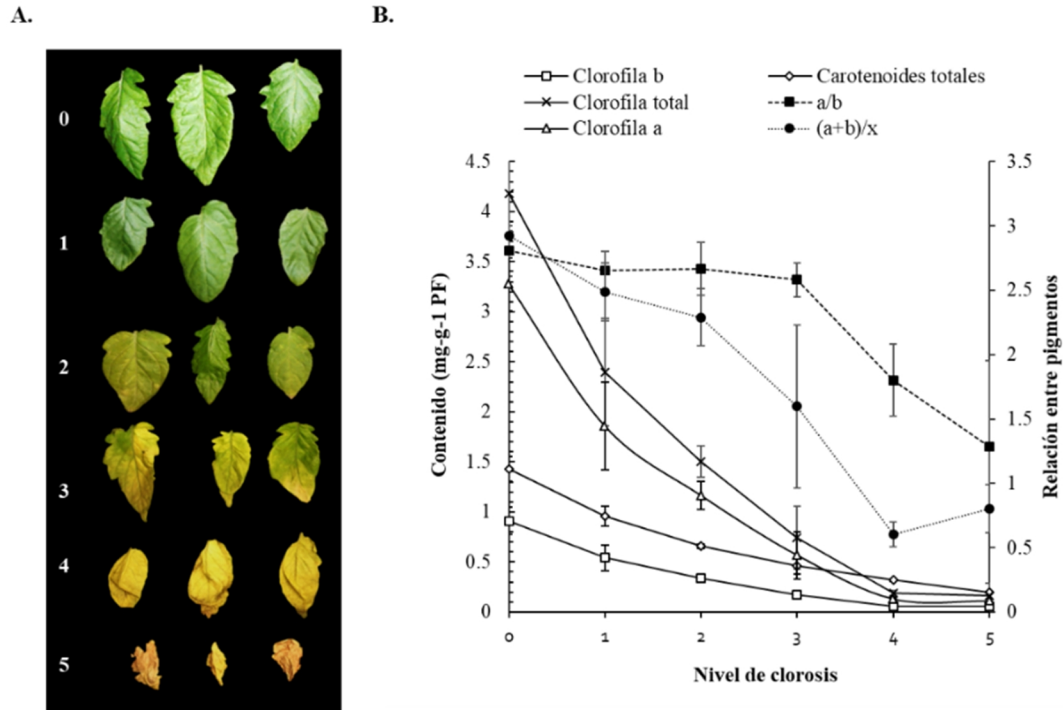


Fig 4.12. Estandarización de metodología para cuantificación de clorofilas y carotenoides en hoja de tomate cv. Rio Grande bajo condiciones de estrés biótico. A. Nivel de clorosis en hojas de tomate cv. Rio Grande bajo condiciones de estrés biótico por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3 (Fol-3), B. Relación entre el contenido de clorofilas (Clorofila a y Clorofila B) y carotenoides totales (Xantomonas y carotenoides) y el nivel de clorosis presentado en hojas de tomate cv. Rio Grande.

4.6. DISCUSIONES

La aplicación de las quitinasas de *B. thuringiensis* como agente de biocontrol de hongos fitopatógenos es considerada un área de estudio emergente, cuyas propiedades antifúngicas *in vitro* e *in vivo* han sido reportadas recientemente contra hongos patógenos de cultivos de importancia agroalimentaria (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2013; Jouzai *et al.*, 2017).

En este estudio fueron evaluadas las enzimas quitinolíticas de Bt: ChiA74 reportada por Barboza-Corona *et al.*, (2003) y ChiA Btt reportada por De la Fuente-Salcido *et al.*, (2016) fue evaluado en tomate cv. Rio Grande bajo condiciones de crecimiento normal y bajo estrés biótico causado por *F. oxysporum*. La aplicación de las quitinasas en semillas no interfirió con el porcentaje de germinación y el desarrollo

vegetativo de las plántulas de tomate comparado con el grupo control (Tabla 4.5). Durante el proceso de imbibición de semillas de tomate son producidas algunas enzimas hidrolíticas como β -1,3-glucanasa y quitinasas en el endosperma previo a la emergencia de la raíz, sin embargo no hay evidencia suficiente para vincular estas enzimas con la modificación celular o con el letargo en los tejidos (Wu *et al.*, 2001). En contraste, nuestros resultados sugieren la estimulación de una respuesta de defensa en las plántulas de tomate obtenidas de semillas tratadas previamente con las quitinasas ChiA74 y ChiA Btt. Estas plántulas mostraron una menor susceptibilidad a la severidad fitopatológica causada por tres razas fitopatógenicas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* y un destacado incremento en el contenido de clorofilas y carotenoides en condiciones normales y bajo la infección con *F. oxysporum* (Fig 4). Algunos estudios de control biológico de hongos fitopatógenos en semillas de soya han demostrado que las quitinasas de *Bacillus thuringiensis* mejoran la tasa de germinación de semillas bajo condiciones de infestación y poseen actividad antifúngica *in vitro*, sobre crecimiento miceliar e hidrólisis de la pared celular fúngica (Reyez-Ramírez *et al.*, 2004; De la Vega *et al.*, 2006; Gomaa, 2012).

Los beneficios de la imbibición de semillas de tomate son asociados principalmente al incremento de la tasa de germinación, el vigor de los brotes, en mejoramiento del desarrollo fisiológico y sobre el incremento de la tolerancia a estrés biótico, mediado principalmente por la activación de mecanismos de defensa (Delian *et al.*, 2017). Abdeljalil *et al.*, (2016) demostró mediante un análisis de correlación de Pearson la asociación negativa de la infección de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia* en el sistema radicular del tomate sobre parámetros de crecimiento vegetal como la altura de plantas y biomasa de tallo, hojas y raíces. El efecto de la infección de las tres razas de Fol que evaluamos, tiene un efecto negativo directo sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de plantas de tomate cv. Rio Grande como se observa en los análisis de componentes principales (ACP) del efecto de las quitinasas de Bt en los bioensayos de bioprotección contra Fol (Fig. 4.5; Fig. 4.8; Fig. 4.9).

Las clorofilas a y b son un componente primordial para la fotosíntesis y se encuentran frecuentemente en una relación (a/b) de 3:1 aproximadamente, sin embargo ciertas condiciones de crecimiento y factores ambientales pueden modificar este radio (Lichtentheller 1987) El incremento en la relación a/b puede ser relacionado a un

agrandamiento del fotosistema I mientras que el ratio de clorofilas y carotenoides es un indicador del verdor en planas. Valores bajos de $a+b/x+c$ son un indicador de senescencia, estrés o daños en plantas y en el aparato fotosintético, donde el monto de reducción de clorofilas es más rápido que en carotenoides (Lichtenthaler and Buschmann, 2001). Nogués *et al.*, (2002) reporta que el efecto deletéreo de la actividad fotosintética en las hojas de tomate cv. Roma causado por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 1 es producido por trastornos fisiológicos similares a los descritos en plantas bajo estrés hídrico, por consiguiente se genera en las plantas infectadas una reducción en altura, biomasa y desarrollo de tejidos.

En este estudio reportamos un efecto reductor de los estragos fisiológicos causados por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* Raza 3 sobre el crecimiento vegetativo (Tabla 4.6), biomasa de raíz, concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas y la severidad de los síntomas causados por la enfermedad (Tabla 4.7) en plantas de tomate cv Rio Grande tratadas con la quitinasa ChiA74 aplicadas en raíces. Akram *et al.*, (2013) reportan la capacidad de la cepa *B. thuringiensis* 199 para activar una respuesta de defensa en tomate y para reducir los efectos de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* tas de tomate. Efectos similares se encontraron en los componentes del sobrenadante celular de Bt, que actúan como inductores de la expresión de genes relacionados a la defensa como PR-1, quitinasa acidica y beta-1,3 glucanasa en tallo y hojas en plantas de tomate (Hyakumachi *et al.*, 2013). *B. thuringiensis* produce ciertos metabolitos que contribuyen a su efecto estimulador del crecimiento en plantas como bacteriocinas y sideróforos (Jouzani *et al.*, 2017).

En el caso de las quitinasas de Bt, además de la actividad antifúngica directa sobre el crecimiento del hongo, estas a su vez pueden liberar fragmentos de oligosacáridos (OGS) de la quitina presente en la pared celular del hongo. Los OGS son considerados como señalizadores de la respuesta de defensa en plantas. La aplicación de hexámeros de OGS en suspensiones celulares de tomate generan una respuesta de alcalinización del medio extracelular y la activación del estrés oxidativo (de Jonge *et al.*, 2010). Previamente se ha comprobado la capacidad de las quitinasas de Bt para hidrolizar la pared celular fúngica (Reyez-Ramírez *et al.*, 2004; De la Vega *et al.*, 2006).

Posiblemente la quitinasa ChiA74 liberó este tipo de inductores moleculares durante el ensayo, generando una respuesta de defensa y reduciendo significativamente

los daños causados por Fol-3 en tomate (Ver tabla 4.7). Esta quitinasa puede generar OGS de la hidrólisis de la quitina (OGS), con 3, 5 y 6 grados de polimerización y con actividad antibacterial (Ortiz-Rodríguez *et al.* 2010). Sin embargo se ha profundizado muy poco en la comprensión de los mecanismos implicados en las quitinasas de Bt en la promoción de crecimiento de tomate, relacionados a la estructura modular de las quitinasas (Dominios estructurales y catalíticos) sobre su interacción con la pared celular del hongo o las células vegetales.

CONCLUSIONES

1. Las bacteriocinas de Bt poseen un diferente grado de actividad antifúngica sobre el crecimiento micelial (1-21%), producción de biomasa (5-49%), germinación de esporas (2-14%) y/o viabilidad celular (4-21%) contra *F. oxysporum*, actuando principalmente como inhibidor del crecimiento de micelio.
2. La actividad estimulante del crecimiento de tomate encontrada en cepas *B. thuringiensis* es una importante contribución para la proyección de esta bacteria como biofertilizante sin embargo es necesario dilucidar los mecanismos de acción involucrados en este comportamiento.
3. Las bacteriocinas Thurincina H(m), Kurstacina 287 y Tolworthcina 524 incrementan la germinación y vigor de semillas de tomate cv. Rio Grande.
4. En contraste, la bacteriocina Entomocina 440 posee propiedades no deseadas para la protección del tomate y efectos tóxicos en semillas de tomate cv. Rio Grande.
5. La aplicación de las quitinasas ChiA74 y ChiA74 Btt en semillas de tomate cv. Rio grande, reducen la patogenicidad en la raza 2 y la raza 3 de Fol e incrementan el contenido de pigmentos fotosintéticos.
6. ChiA74 incrementa la producción de biomasa, el desarrollo de raíz y el contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas bajo condiciones de crecimiento normales o bajo estrés biótico causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.
7. Las quitinasas ChiA74 y ChiA Btt pueden ser aplicadas como estrategia de protección de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) contra cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, debido principal a su actividad quitinolítica y antifúngica *in vitro*, el incremento en el rendimiento en la producción de biomasa, crecimiento vegetativo y contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas bajo condiciones de crecimientos normales o bajo estrés biótico causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

PERSPECTIVAS

En esta investigación se establecieron condiciones metodológicas para la evaluación funcional de las bacteriocinas, quitinasa y cepas de *B. thuringiensis* y se demostró la capacidad de estos agentes para inhibir el crecimiento de las cepas fitopatógenas de *F. oxysporum* así como estimular el crecimiento del cultivo del tomate durante la etapa de germinación y desarrollo vegetativo. Estas propiedades deben ser investigadas a profundidad para determinar los mecanismos bioquímicos y fisiológicos implicados en su bioactividad e interacción planta patógeno. Para su uso práctico es recomendado incrementar la eficiencia de producción, escalamiento y purificación de metabolitos de Bt a cantidades suficientes para su evaluación funcional en campo. De la misma forma, es necesario avaluar las concentraciones, mínimas y máximas efectivas para su aplicación como agentes bioactivos en formulaciones plaguicidas experimentales, determinar la estabilidad de estas propiedades bajo condiciones de almacenamiento y diseñar estrategias de aplicación en campo para mejorar la relación costo-beneficio de los tratamientos a base de Bt. En este sentido, habría que considerar un tiempo de 10 años para que se encuentre disponible comercialmente un bioplaguicida y biofertilizante a base de Bt (enriquecidos con bacteriocinas o quitinasas) como agente bioactivo frente a la posible emergencia de nuevas razas fitopatológicas de *F. oxysporum* en el cultivo del tomate y contar con un recurso biotecnológico para atender las nuevas tendencias de producción agrícola libre de productos de síntesis química.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdul Baki, A.A. and Anderson, J.D. 1973. Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Sci.*, 13: 630- 633.
2. Abdeljalil N.O.B., Vallance J., Gerbore J., Bruez E., Martins G., Rey P., Daami-Remadi M. 2016. Biocontrol of *Rhizoctonia* Root Rot in Tomato and Enhancement of Plant Growth using *Rhizobacteria* Naturally associated to Tomato. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*. 7:356. doi:10.4172/2157-7471.1000356
3. Abriouel, H., Franz, C.M., Ben, O.N., Gálvez, A., 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 201-232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
4. Agrios, G.N., 2005. *Plant Pathology*, fifth ed. Elsevier Academia Press. Oxford.
5. Ajillogba, C.F., Babalola O. (2013). Integrated Management Strategies for Tomato *Fusarium* Wilt. *Biocontrol Science*. 18(3): 117-127.
6. Akram, W., Mahboob, A., Javed, A.A., 2013. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 3, 275-280. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.3.2013.4.7>
7. Arora, N., Sachdev, B., Gupta, R., Vimala, Y., Bhatnagar, R.K., 2013. Characterization of a chitin-binding protein form *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Plos ONE.* 8, e66603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066603>
8. Ascencio-Alvarez, A., Lopez-Benitez, A., Borrego-Escalante, F., Rodriguez-Herrera, S.A., Flores-Olivas, A., Jimenez-Diaz, F., Gamez-Vazquez, A.J., 2008. Marchitez vascular del tomate: II. Herencia de la resistencia a la raza 3 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en tres especies del género *Lycopersicon*. [Vascular wilt on tomato: II. Inheritance of resistance to race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen in three species of the genus *Lycopersicon*]. *Rev. Mex. Fitopatol.* 26, 180-183. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000200011&lng=es
9. Aydi Ben Abdallah R., Stedel C., Garagounis C., Nefzi A., Jabnoun-Khiareddine H., Papadopoulou K.K., Daami-Remadi M., 2017. Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Protection* 99:45-58. <Http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.008>

10. Bai Y., D'Aoust F., Smith D.L., Driscoll B.T., 2002. Isolation of plant growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology* 48:230–238.
11. Bai Y., Zhou X., Smith D.L., 2003. Enhanced soybean plant growth resulting from co-inoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Science*. 43:1774–1781
12. Barboza-Corona, J.E., Vazquez-Acosta, H., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernandez, R., 2007. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch Microbiol*. 187: 117-126. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0178-5>
13. Barboza-Corona J.E., Nieto-Mazzocco E., Velázquez-Robledo R., Salcedo-Hernandez R., Bautista M., Jiménez B., Ibarra J.E., 2003. Cloning, Sequencing, and Expression of the Chitinase Gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(2):1023-1029. DOI: 10.1128/AEM.69.2.1023.2003.
14. Barboza-Corona J.E. de la Fuente-Salcido N.M., León-Galván M.F., 2012. Future Challenges and Prospects of *Bacillus thuringiensis*. En: E. Sansinenea (ed.), *Bacillus thuringiensis* Biotechnology, (387-384). N.Y., USA: Springer. DOI 10.1007/978-94-007-3021-2_19.
15. Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 7(72):248-54. PMID:942051
16. Carrillo-Fasio, J.A., Montoya-Rodríguez, J.T., García-Estrada, R.S., Cruz-Ortega, J.E., Márquez-Zequera, I., Sañudo-Barajas, A.J., 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(2): 123-127. <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221205>>
17. Casados-Vázquez L.E., Avila-Cabrera S., Bideshi D.K., Barboza-Corona J.E. 2015. Heterologous expression, purification and biochemical characterization of endochitinase ChiA74 from *Bacillus thuringiensis*. *Protein Expression and Purification* 109: 99-105. <http://dx.doi.org/10.106/j.pep.2014.11.015>.
18. Casados-Vázquez L.E., Bideshi D.K., Barboza-Corona J.E., 2016. The *thnR* gene is a negative transcription regulator of the thurincin H genetic cassette in *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni*. *Arch Microbiol*. 199(2): 385-390. Doi: 10.100/s00203-016-1298-1.
19. Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B.M., Hendriksen, N.B., Daffonchio, D., Boudabous, A., 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* HD9 A. J. Appl. Microbiol. 95, 990–1000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02089.x>

20. Dagdas, Y.F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L.S., Bielska, E., Steinberg, G., Talbot, N.J., 2012. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science*, 336, 1590-1595. <https://doi.org/10.1126/science.1222934>
21. Das S.N., Madhuprakash J., Sarma P.V.S.R.N., Puroshotham P., Suma K., Manjeet K., Rambabu S., Gueddari N.E.E., Moerschbacher B.M., Podile A.R. 2013. Biotechnological approaches for field applications of chitooligosaccharides (COS) to induce innate immunity in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1-15. DOI:10.3109/07388551.2013.798255
22. de Jonge R., van Esse H.P., Kombrink A., Shinya T., Desaki Y., Bours R., van der Krol S, Shibuya N., Joosten M.H.A., Thomma V.P.H.J. 2010. Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science* 329:953-955. DOI: 10.1126/science.1190859
23. De la Fuente-Salcido, N.M., Alanis-Guzman, M.G., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R.S., Bautista-Justo, M., Barboza-Corona, J.E., 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Arch. Microbiol.* 190, 633-640. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0414-2>
24. De la Fuente-Salcido, N.M., Casados-Vazquez, L.E., Garcia-Perez, A.P., Barboza-Perez, U.E., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernandez, R., Garcia-Almendarez, B.E., Barboza-Corona, J.E., 2016. The endochitinase ChiA Btt of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Collectotrichum gloeosporioides*. *MicrobiologyOpen*. <https://doi.org/10.1002/mbo3.372>
25. De la Fuente-Salcido N.M., Casados-Vázquez L.E., Barboza-Corona J.E. 2013. Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. *Can. J. Microbiol.* 59: 515-522.
26. De la Vega L.M, Barboza-Corona, J.E., Aguilar-Uscanga, M.G., Ramirez-Lepe M., 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Can. J. Microbiol.* 52, 651-657. <https://doi.org/10.1139/w06-019>
27. Delian E., Badulescu L., Dobrescu A., Chira L., Lagunovschi-Luchian V., 2017. A brief overview of seed priming benefits in tomato. *Romanian Biotechnological Letters*. 22(3): 12505-12513
28. Elias, K.S., Schneider, R.W., 1991. Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology*. 81: 159-162.

29. Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H., 1997. Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*. 9, 509-520. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.509>
30. Fisher, M., 2017. California's canning tomato industry weighs management options for *Fusarium* wilt race 3. *Crops Soils* 50:10-13. <https://doi.org/10.2134/cs.2017.50.0210>
31. Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M., Dolan, L., 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*. 422, 442-446. <https://doi.org/10.1038/nature01485>
32. Gomaa E.Z., 2012. Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in Antifungal Biocontrol. *The Journal of Microbiology*. 50(1): 103-111. DOI 10.1007/s12275-012-1343-y.
33. Gray, E.J., Lee, K.D., Souleimanov, A.M., Di Falco, M.R., Zhou, X., Ly, A., Charles, T.C., Driscoll, B.T., and Smith, D.L., 2006. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 545-554. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02822.x.
34. Heller, J., Tudzynski, P., 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 369-390. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095355>
35. Hyakumachi M., Nishimura M., Arakawa T. Asano S., Yoshida S., Tsushima S., Takahashi H. 2013. *Bacillus thuringiensis* Suppress Bacterial wilt Disease Caused by *Ralstonia solanacearum* with Systemic Induction of Defence-Related Gene Expression in Tomato. *Microbes and Environments*. 28(1): 128-134. DOI:10.1264/jsme2.ME12162
36. ISTA, 1999. International Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technol.*, 27: 31.
37. Jackson, S.L., Heath, I.B., 1993. Roles of calcium ions in hyphal tip growth. *Microbiol. Rev.* 57, 367-382. <http://mibr.asm.org/content/57/2/367.short>
38. Jouzani, G.S., Valijanlian, E., Sharafi, R., 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 2691-2711. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y>
39. Jung W., Mabood F., Souleimanov A., Smith D.L., 2011. Induction of defense-related enzymes in soybean leaves by class II bacteriocins (thuricin 17 and bacthuricin F4) purified from *Bacillus* strains. *Microbiological Research* 167: 14-19. Doi: 10.1016/j.micres.2011.02.004.

40. Kamoun, F., Mejdoub, H., Aouissaoui, H., Reinbolt, J., Hammami, A., Jaoua, S., 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. 98, 881-888. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02513.x>
41. Kamoun, F., Ben Fguira, I., Ben Hassen, N.B., Mejdoub, H., Lereclus, D., Jaoua, S., 2011. Purification and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* bacteriocin active against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens*. Appl. Biochem. Biotechnol. **165**: 300–314. doi:10.1007/s12010-011-9252-9.
42. Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., Chi, Y.T., 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. J. Appl. Microbiol. 97, 942-949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x>
43. Larkin, R.P., Fravel, D.R., 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. Plant Dis. 82, 1022-1028. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.9.1022>.
44. Lee, K.D., Gray, E.J., Mabood, F., Jung, W., Charles, T., Clark S.R.D., Ly A., Souleimanov A., Zhou X. 2009. The class IId bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. Planta 229: 747-755. DOI 10.1007/s00425-008-0870-6.
45. Levitz, S.M. Diamond, R.D., 1985. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. J. Infect. Dis. 152:938-94. <https://doi.org/10.1093/infdis/152.5.938>
46. Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic membranes. Meth. Enzym. 148, 350-382.
47. Lichtenthaler, K.H., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. p. F4.3.1-F4.3.8. In R.E. Wrolstad (ed.) Current protocols in food analytical chemistry. John Wiley and Sons, New York, USA.
48. Liu, D., Cai, J., Xiea, Ch., Liua, Ch., Chena, Y., 2010. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. Enzyme Microb. Technol. 46, 252–256 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.007>.
49. McGovern, R.J., 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection. 73: 78-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.021>.
50. Mehmood, M.A., Xiao, X., Hafeez, F.Y., Gai, Y., Wang, F., 2010. Molecular characterization of an endochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian*. World J. Microbiol. Biotechnol. 26: 2171–2178. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0401-z>

51. Mehmood, M.A., Xiao, X., Hafeez, F.Y., Gai, Y., Wang, F., 2011. Molecular characterization of the modular chitin binding protein Cbp50 from *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 100, 445–453. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9601-2>
52. Mnif, I., Ghribi D., 2015. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop. Prot.* 77, 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.017>
53. Nogués, S., Cotxarrera, L., Alegre, L., Trillas, M.I., 2002. Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytologist*. 154: 461-470.
54. Ortiz-Rodríguez, T., De la Fuente-Salcido, N., Bideshi, D.K., Salcedo-Hernández, R., Barboza-Corona, J.E., 2010. Generation of chitin-derived oligosaccharides toxic o pathogenic bacteria using ChiA74, an endochitinase native to *Bacillus thuringiensis*. *Letters in Applied Microbiology*. 51: 84-190. Doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02876.x
55. Pacheco-Cano, R.D., De la Fuente-Salcido, N.M., Salcedo-Hernández, R., León-Galván, F., Bideshi, D.K., Hernández-Guzmán, G. Barboza-Corona, J.E., 2014. Characterization, N-terminal sequencing and classification of Tolworthcin 524: A bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Microbiol. Res.* 169: 948-953. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.04.005>
56. Qi, J., Aiuchi, D., Tani, M., Asano, S., Koike, M., 2016. Potential of entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* as plant growth promoting rhizobacteria and biological control agents for tomato *Fusarium* Wilt. *IJOEAR*. 2, 55-63. <http://dx.doi.org/10.25125/agriculture-journal>
57. Reyes-Ramírez, A., Escudero-Abarca, B.I., Aguilar-Uscanga G., Hayward-Jones P.M., Barboza-Corona, J.E., 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *J. Food Sci.* 69, 131–134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10721.x>
58. Rautenbach, M., Troskie, A.M., Vosloo, J.A., Dathe, M.E., 2016. Antifungal membranolytic activity of the tyrocidines against filamentous plant fungi. *Biochimie*. 130, 122-131. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.06.008>
59. Robson, G.D., Kuhn, P.J., Trinci, A.P.J., 1989. Effect of validamycin A on the inositol content and branching of *Rhizoctonia cerealis* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* 135, 739-750. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-4-739>
60. SAGARPA, 2016. Coordinación General de Asuntos Internacionales. Disponible en:http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/sagarpa/Documents/2016_08_18_Balanza_Agroalimentaria_enero_junio_EU.pdf. Fecha de acceso: Agosto de 2017.
61. Schoffelmeer, E.A., Klis, F.M., Sietsma, J.H., Cornelissen, B.J., 1999. The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 275-282.

62. Semighini, C.P., Harris, S.D., 2008. Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. *Genetics*. 179, 1919–1932. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.089318>
63. Silverman-Gavrila, L.B., Lew, R.R., 2003. Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* hyphal growth. *Microbiology*. 149, 2475-2485. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26302-0>
64. Schoffelmeer, E.A. Klis F.M., Sietsma J.H. Cornelissen B.J. (1999). The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 275-282.
65. Subramanian S., Smith, D.L., 2015. Bacteriocins from the rhizosphere microbiome-from an agriculture perspective. *Frontiers in Plant Science*. 6:909. Doi: 10.3389/fpls.2015.00909.
66. Terras, F.R.G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S., van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F., 1995. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell*. 7, 573-588. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.5.573>
67. Terras, F.R.G., Torrekens, S., Van Leuven, F., Broekaert, W.F., 1996. A six-cysteine type thionin from the radish storage organ displays weak *in vitro* antifungal activity against *Fusarium culmorum*. *Plant Physiol. Biochem*. 34, 599-603.
68. Tudzynski, P., Heller, J., Siegmund, U., 2012. Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol*. 15, 653-659. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.10.002>
69. Ugras, S., Sezen, K., Kati, H., Demirbag, Z., 2013. Purification and characterization of the bacteriocin thuricin Bn1 produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bn1 isolated from a hazelnut pest. *J. Microbiol. Biotechnol*. 23, 167-176. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1209.09056>
70. van der Weerden, N.L., Hancock, R.E.W., Anderson, M.A., 2010. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NAD1 occurs through a cell wall-dependent process. *J. Biol. Chem*. 285, 37513-37520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134882>
71. Warwar, V., Dickman, M.B., 1996. Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in *Colletotrichum trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol*. 62, 74-79. <http://aem.asm.org/content/62/1/74>
72. Wiebe, M.G., Robson, G.D., Trinci, A.P.J., 1990. Edifenphos (Hinosan) reduces hyphal extension, hyphal growth unit length and phosphatidylcholine content of *Fusarium graminearum* A3/5, but has no effect on specific growth rate. *J. Gen. Microbiol*. 136, 979-984. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-6-979>

73. Wu C.T., Leubner-Metzger G., Meins F., Brandford K.J. 2001. Class I β -1,3-Glucanase and Chitinase Are Expressed in the Micropylar Endosperm of Tomato Seeds Prior to Radicle Emergence. *Plant Physiology*. 126: 1299-1313

RESUMEN BIOGRÁFICO

David Francisco Lafuente Rincón

Candidato para el Gradp de

Doctor en Ciencias con Asentuación en Manejo y Administración de Recursos
Vegetales.

Tesis: **BIOCONTROL DE *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* A PARTIR DE METABOLITOS ANTIMICROBIANOS DE *Bacillus thuringiensis* Y SU EFECTO BIOESTIMULANTE EN TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

Campo de Estudio: Biotecnología.

Datos Personales: Nacido en Agua Prieta, Sonora el 23 de Agosto de 1989, hijo de Carlos Lafuente López y Rosa María Rincón Quiroz.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Coahuila. Grado obtenido Ingeniero Bioquímico en 2011 y Maestro en Ingeniería Bioquímica 2014 con mención honorífica.