

Antisuero vs hongos fitopatógenos en el cultivo de tomate en Sonora, México

Francisco Eleazar Martínez-Ruiz¹
Gabriela Andrade-Bustamante¹
Emmanuel Aispuro Hernández¹
Luis Guillermo Hernández-Montiel²
Ramón Jaime Holguín Peña²
Edgar Omar Rueda-Puente^{3§}

¹Instituto de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México. CP. 21705. ²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur. CP. 23090. ³Departamento de Agricultura y Ganadería-Universidad de Sonora. Carretera a Bahía de Kino km 21, Hermosillo, Sonora, México. CP. 23000.

§Autor para correspondencia: erueda04@santana.uson.mx.

Resumen

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

Palabras clave adicionales: antisuero, detección, fitopatógeno, hongos.

Recibido: enero de 2019

Aceptado: abril de 2019

Introducción

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

Fusarium oxysporum es uno de los agentes causantes de enfermedades más importantes en el cultivo del tomate ya que puede llegar a mermar 60% la producción, su síntoma inicial es amarillamiento de las hojas más viejas, esta marchitez va avanzando hasta que la planta muere; *Alternaria*, es capaz de disminuir los rendimientos entre 20-30%, dañando principalmente las hojas, en las cuales genera manchas necróticas, lo cual reduce la capacidad fotosintética de la planta, las lesiones en la fruta ocurren normalmente en la punta del cáliz, y son oscuras, correosas y hundidas (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016). Por su parte, *Botrytis cinerea* es el segundo hongo fitopatógeno de mayor importancia en tomate, durante el desarrollo del cultivo puede provocar cancro en el tallo y podredumbre de hojas, flores y frutos recién cuajados (Dal Bello *et al.*, 2012).

Para la detección de microorganismos uno de los métodos de diagnóstico es el convencional que se basa en pruebas bioquímicas. Otro de los métodos que se aplica en el diagnóstico, es el DAS-Elisa, una técnica con sensibilidad y replicabilidad, pero que no cumple uno de los requisitos de un método de diagnóstico como es el económico cuando requiere ser utilizado en un alto número de muestras; el uso constante de los kits (componentes comerciales) DAS-Elisa, resulta ser incosteable para el productor (Alvarado-Martínez *et al.*, 2013).

Basado en el principio de inmunización e interacción antígeno-anticuerpo y con base a lo anterior descrito (inviabilidad económica de la DAS-Elisa, para la detección de fitopatógenos), en la presente investigación se sugiere la producción de un antisuero contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria* sp. y *Botrytis cinerea* y su detección en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*), durante el desarrollo vegetativo en cultivos de tomate en el estado de Sonora.

Materiales y métodos

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

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

La primera etapa inicio con el incremento de inóculo. Según el protocolo establecido por Cañedo y Ames (2004), a partir del material infectado se obtuvo el hongo, ya sea por la siembra de trozos de papa-dextrosaagar (PDA).

La identificación para cada hongo se realizó de acuerdo con la monografía de Jarvis (1975), además de las claves de ‘CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria’ perteneciente a la Commonwealth Micological Institute. De igual forma se recurrió al apoyo de las claves para identificación de hongos de Barnett y Hunter (1998); Gilman (1963); Romero (1993). Para tener los hongos con la mínima variación genética, se realizaron cultivos monospóricos de todas las cepas, de los que se tomó la muestra.

Las suspensiones de conidias en tubos fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C hasta su uso. Posteriormente, con este material fueron realizadas las pruebas de patogenicidad en semilla para *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1)= (Folr1), se desarrolló en material vegetativo de tomate Bonny Best y Manapal (sin genes de resistencia y resistente a Folr1), para *A. solani* fue en hojas y *B. cinerea* en fruto realizándose en la variedad ‘Río Grande’ cuyas características es de tipo determinado y fruto tipo saladette y susceptible a ambos agentes fitopatógenos.

Las pruebas de patogenicidad consistió en una inoculación de Folr1 en los materiales diferenciales; para el caso de semilla, se embebieron 20 semillas en 200 ml en una suspensión de conidias (Folr1) de 10^8 conidias ml^{-1} y se sembraron las semillas en vasos de unicel (½ litro) conteniendo sustrato estéril tipo peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.); asimismo, se realizó en plántulas con un desarrollo de 20 días después de la siembra, a través de una suspensión conidial de 10^8 conidias ml^{-1} a través, de la inmersión de raíces a las cuales previamente se les hicieron pequeñas heridas con una aguja hipodérmica.

Inmediatamente se trasplantaron en vasos de unicel de ½ litro conteniendo el mismo sustrato estéril tipo peat-moss (Rueda *et al.*, 2006). Las plantas se mantuvieron con una temperatura ambiente aproximada de 30 ± 2 °C. Se utilizaron cuatro repeticiones de una planta en cada material para la toma de datos, se observó y se registró la respuesta de los materiales diferenciales para asegurar la alo y autoinfección por Folr1. El riego se llevó a cabo con agua destilada estéril, de acuerdo con las recomendaciones técnicas (INIFAP, 2005). Los síntomas de marchitamiento en plántulas inoculadas, se presentaron 30 días después de la inoculación. La evaluación se hizo nuevamente con base en la presencia o ausencia de la enfermedad.

Respecto a las pruebas en hojas y frutos, las primeras fueron inoculadas de *A. solani* con la ayuda de un rociador-aspersor de mano, de 250 ml, mientras que el fruto se inoculó con *B. cinerea* punzándolos primeramente y adicionando con un cotonete 1ml de suspensión conidial a una concentración de 10^8 ml^{-1} . Después de las inoculaciones, los órganos se colocaron en cámaras húmedas a una temperatura de 30 ± 2 °C en un período de 30 días (Jarvis y Hargreaves, 1973; Jarvis, 1975; Davised, 1988; Eckert, 1988; Tello y Lacasa, 1988; SAGARPA, 2005), las cuales son condiciones apropiadas para inducir los signos de la enfermedad. En cada prueba se incluyó un testigo (control negativo- uso de agua estéril). La confirmación de los patógenos se realizó mediante la técnica serológica Elisa siguiendo el protocolo de identificación de hongos AGDIA.

Producción de antisuero

La inmunización se realizó en conejos de raza Nueva Zelanda con un peso de 3 kg, de 9-24 meses y evitando que las hembras estuviesen preñadas (Kiralí, 1974; Bokx, 1980; Valdés, 1995; Villarreal, 1980). El plan de inmunización, fue llevado a cabo en tres esquemas, con cinco conejos por esquema (Cuadro 1), con la metodología recomendada por Flores (1994); Rueda *et al.* (2006).

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

Día	Volumen de la vacuna (ml)	Vía de la inyección
Esquema 1		
1	1	Intramuscular
7	1	Intramuscular
14	2	Intramuscular
Esquema 2		
1	0.1	Intramuscular
3	0.3	Intramuscular
7	0.3	Intramuscular
10	1	Intramuscular
15	2	Intramuscular
Esquema 3		
1	0.1	Intravenosa
3	0.3	Intravenosa
6	0.5	Intravenosa
10	1	Intramuscular
15	2	Intramuscular
20	2	Intravenosa

Obtención de semilla de tomate de importación que se siembra el estado de Sonora

Para la obtención de la semilla se contó con la colaboración de la Confederación Nacional de Productores Hortícolas (CNPH) región Sonora, donde cada productor facilitó una cantidad de 100-150 semillas para el análisis.

Muestreo en plantas (plántula, hoja desarrollada y fruto)

Para el muestreo de lotes se reprodujo el muestreo nacional de papa realizado por la SARH (1994). El muestreo se realizó en 10% del total de la superficie cultivable de tres de los municipios productores de tomate (Cuadro 2). En 10% de la superficie de cada región se realizaron divisiones de 5 ha que serían considerada como parcela hipotética a muestrear. En cada punto se trazó una línea diagonal imaginaria de esquina a esquina, y en esa recta trazada se colectaron 10 muestras, las muestras colectadas, previamente identificadas, se envolvió con papel húmedo y se colocó en una hielera para ser trasladada al laboratorio para su análisis.

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

De acuerdo con la técnica de Randhawa (1996); Rueda *et al.* (2006), cada muestra de semilla se lavó en agua corriente durante 30 min con la finalidad de eliminar productos químicos (i.e. fungicidas) y se colocó en charolas de plástico con capacidad de 2 L. A cada charola con la semilla

se le añadieron 2 ml de solución amortiguadora fosfatasa con un pH= 7. A la mezcla de agua con fosfatasa conteniendo cada muestra de semillas se le llamó ‘suspensión madre’, las charolas se incubaron durante 12 h en refrigeración a 4 °C con la finalidad de que se liberara conidias de Folr1, *A. solani* y *B. cinerea* a la suspensión madre.

Después de la incubación, se tomaron 10 ml de suspensión madre de cada una de las charolas, se le realizaron cuatro diluciones a tal suspensión (10:1, 10:2, 10:3, 10:4) y de la última dilución se tomó 0.1 ml que se sembró en medio de cultivo PDA en cajas de Petri por el método de dispersión por varilla (Roger *et al.*, 1981). Los medios se incubaron durante siete días a 34 °C. Una vez germinadas las conidias y existiese crecimiento micelial con estructuras reproductivas, éstos fueron identificados considerando las claves indicadas en la fase de incremento de las cepas.

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

Las plántulas, hojas desarrolladas y frutos muestreados, se sometieron por un proceso de cortes de 0.5 a 1 cm de diámetro e introducidas directamente en una solución salina al 0.85% de NaCl, denominada solución madre. Para la detección de Folr1, *A. solani* y *B. cinerea*, se desarrolló la técnica de aglutinación en portaobjeto según lo indica Kiraly (1974).

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

Para la detección de Folr1, *A. solani* y *B. cinerea*, con respecto a la técnica serológica Elisa, se consideró el protocolo descrito en la detección en semilla.

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

Para la reafirmación de los hongos Folr1, *A. solani* y *B. cinerea* que resultaron ser positivas en los anteriores métodos de detección, las pruebas de patogenicidad fueron llevando a cabo la técnica de Randhawa (1996) y Rueda *et al.* (2006), tal como se describió en la purificación e incremento de inóculo para producir antígeno.

Resultados y discusión

Pruebas de identificación

Al realizar las pruebas previas de incremento de inóculo, identificación (medios de cultivo específicos y ELISA) y de patogenicidad, el resultado fue igual a los indicados por Jarvis (1973); Cañedo y Ames (2004); Ascencio-Álvarez *et al.* (2008); López (2012); (CESAVEG, 2016); Robles-Carrión *et al.* (2014); Valencia *et al.* (2016a), indicando que para Folr1 son producir colonias de crecimiento rápido, presentan un micelio aéreo, algodonoso y de coloración blanca; microscópicamente muestran macroconidias, fusiformes, curvas en los extremos y septadas; las dimensiones de los macro y microconidios (29.1-45 X 2.9-4.7 µm), el desarrollo de conidias se logró observar a los nueve días, rubro que concuerda con Valencia *et al.* (2016b).

Con relación al hongo *Alternaria solani*, el desarrollo de conidias se logró obtener al cabo de 8 días; resultado que concuerda con Cazar *et al.* (2014), éste presentó un micelio aéreo algodonoso, que pronto se tornó de color negro cuando esporula. Los conidióforos son oscuros midiendo 12-20 X 120-296 μm , oscuros, con apariencia de mazo y presentan septos longitudinales y transversales (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016).

Por su parte *Botrytis cinerea*, presentó colonias grises. Al quinto día se observaron conidióforos bien diferenciados, simples, rectos, de 205-210 x 18 -20 μm , ramas de 18 - 20 x 6-8 μm . Conidios elipsoidales, lisos, casi hialinos, de 7-14 x 5 - 8 μm , frecuentemente con un apéndice de 3 μm de largo según Farrera *et al.* (2007); Robles-Carrión *et al.* (2014).

Con relación a las pruebas de patogenicidad, los síntomas de las semillas embebidas en la suspensión conidial de 10^8 conidias·ml⁻¹, con Folr1, 100% germinó entre los 36 y 48 h bajo condiciones favorables de la enfermedad en ambos materiales utilizados (Bonny Best y Manapal), las plántulas al cabo de 18 días presentaron una leve marchitez en tallo. Los cotiledones mostraron manchas irregulares de aspecto más oscuro y grasoso con relación al área sana. Esta misma sintomatología fue identificada en plántulas que una vez muertas se observó como el hongo fructificó sobre la superficie del tallo bajo condiciones de ambiente húmedo. Lo contrario, ocurrió con el material Manapal, donde la manifestación de síntomas no fue detectada ni al desarrollar cortes trans y horizontales a lo largo de los tejidos conductores en raíz y tallo de plántula. Los resultados obtenidos concuerdan al realizar inoculaciones en el mismo material Bonny Best y Manapal, con Ascencio-Álvarez *et al.* (2008).

Para *Alternaria solani* son los síntomas sobre hojas, a los nueve días fueron aquellos característicos de forma circular, cercano a 1.5 cm de diámetro, de color marrón conteniendo anillos concéntricos. Los resultados concuerdan con Martínez-Ruiz *et al.* (2016), indicando que los primeros síntomas, aparecen en las hojas más viejas y van progresando hacia las hojas más nuevas; de ahí también se pueden ver manchas marrones sobre los pedicelos y sobre los cálices cuando están adheridos a la flor o fruta. De esta manera, los frutos se infectan; a través, del cáliz o del pedicelo tanto cuando están verdes o maduros.

Para *Botrytis cinerea* la sintomatología inició con la formación de pequeños anillos concéntricos; los primeros olores de putrefacción fueron detectados y en el 13° día ya existían conidiosporas. Los resultados obtenidos concuerdan con Martínez-Ruiz *et al.* (2016).

Mediante la confirmación por la técnica serológica Elisa, se obtuvo un resultado positivo para los ejemplares fúngicos proporcionados por la empresa donante, así como también para las suspensiones de jugo celular y tejido infectado rico en conidias obtenidas de las pruebas de patogenicidad antes mencionadas.

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

Debido a que no todos los animales de sangre caliente reaccionan igual a un antígeno, sólo el esquema 3 (Cuadro 1) resultó ser eficiente para producir un alto contenido de anticuerpos. La aglutinación fue reafirmada realizando lecturas bajo el microscopio compuesto para observar una microaglutinación con la ayuda de un microscopio compuesto (Cuadro 2) (Bokx, 1980).

Cuadro 2. Presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en semilla de tomate *Solanum lycopersicum* (L.), proporcionada por productores de las regiones muestreadas en el estado de Sonora, México.

Región	Variedad	Sistema de producción	Superficie total en la región (ha)	Superficie muestreada (ha)	Órgano muestreado	Medio de cultivo PDA			ELISA			Antisuero producido		
						Folr1	As	Bc	Folr1	As	Bc	Folr1	As	Bc
Costa de Hermosillo	DMX1	Malla sombra	27	18	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	DMX2	Malla sombra		6	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Valle de Guaymas	DMX1	Malla sombra	478.8	22	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	RUE	Malla sombra		2	Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ZAP	Malla sombra		1.5	Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LEO	Campo abierto		34	Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valle del Yaqui	DAR	Malla sombra	954	16	Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BER	Campo abierto		54	Semilla	-	+	-	+	+	-	+	+	-
	GLO	Campo abierto		65	Semilla	-	+	-	+	+	-	+	+	-
	DMX1	Malla sombra		12	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	DMX2	Malla sombra		17	Semilla	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	Testigo positivo					Semilla	+	+	+	+	+	+	+	+
	Testigo negativo				Semilla	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ = prueba positiva; - = prueba negativa; medio de cultivo papa-dextrosaagar (PDA); *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1) = (Folr1); *Alternaria solani* = As; *Botrytis cinerea* = Bc.

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

En el caso de semilla, los resultados se muestran en el Cuadro 2. Bajo la técnica de Diagnóstico utilizando medio sólido papa-dextrosaagar (PDA), se demostró la presencia de Folr1 en la semilla donada por productores pertenecientes a la región Costa de Hermosillo, Valle de Guaymas y del Yaqui, con los materiales DMX1 y DMX2, resultados similares a las indicadas por Valencia *et al.* (2016a), Robles-Carrión *et al.* (2014). Un mismo resultado ocurrió en la semilla obtenida de Valle del Yaqui en el material BER y GLO, pero con la diferencia de que éstas resultaron ser positivas para *Alternaria solani*, ya que las conidias observadas correspondían a aquella según Robles-Carrión *et al.* (2014) y Martínez-Ruiz *et al.* (2016).

Con respecto a la técnica Elisa, los resultados indican que, mediante esta técnica, la semilla obtenida de las tres regiones con los materiales DMX1 y DMX2, resultó ser positiva a la presencia de Folr1, confirmándose con las muestras procesadas con respecto al testigo.

Con respecto a la técnica de aglutinación y microaglutinación los resultados fueron positivos para Folr1, en muestras de semilla obtenidas de productores de las regiones muestreadas (DMX1 y DMX2, BER y GLO), con excepción de la región de Guaymas con los materiales RUE, ZAP, LEO y DAR que resultaron también ser negativas. En el Cuadro 2, los resultados varían únicamente para el patógeno *A. solani*, donde la técnica de diagnóstico con el antisuero producido se logra detectar en los materiales DMX1 y DMX2, lo contrario ocurrió en la Elisa, de ahí la importancia de la diferencia de resultados y definir si esas muestras presentaban o no células conidiales pertenecientes a los hongos estudiados (Rueda *et al.*, 2006).

Muestreo de plántula, hoja desarrollada y fruto en lotes comerciales

Respecto al estudio de plántula, hoja y fruto realizado por medio de la técnica de medio de cultivo PDA, la técnica Elisa y antisuero producido para detección de Folr1, *A. solani* y *B. cinerea*, los resultados se observan en el Cuadro 3. Se puede apreciar que los materiales vegetativos de las tres regiones muestreadas que y que resultaron ser positivos a la presencia de Folr1, en semilla, al momento de detectarlo en plántula o en las subsiguientes etapas fenológicas, el resultado fue negativo; lo anterior puede deberse a que las variedades que se siembran son resistentes a Folr1 o bien a que las condiciones culturales y de manejo, así como de aquellas al interior de las áreas de producción, como alta temperatura y baja humedad atmosférica, pudiese originar que el patógeno no tenga la capacidad de sobrevivir y por lo tanto no producir una infección en la planta de tomate. *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* bajo las técnicas llevadas a cabo, varían entre las técnicas; se puede apreciar que la técnica de Elisa y de Antisuero producido, fueron sensibles a la presencia de estos dos fitopatógenos, lo contrario ocurrió el medio PDA (Cuadro 3).

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

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

Región	Variedad	Órgano muestreado	Medio de cultivo PDA			ELISA			Antisuero producido		
			Folr1	As	Bc	Folr1	As	Bc	Folr1	As	Bc
Valle del Yaqui	LEO	Plántula	-	-	-	-	+	-	-	+	+
		Hoja	-	-	-	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	DAR	Plántula	-	+	-	-	+	-	-	+	-
		Hoja	-	+	-	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	BER	Plántula	-	-	-	-	+	-	-	+	-
		Hoja	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	GLO	Plántula	-	+	-	-	+	-	-	+	-
		Hoja	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	DMX	Plántula	-	-	-	-	+	-	-	+	-
		Hoja	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	DMX	Plántula	-	+	-	-	+	-	-	+	-
		Hoja	-	+	+	-	+	+	-	+	+
		fruto	-	+	+	-	+	+	-	+	+
	Testigo positivo	Plántula	+	+	-	+	+	+	+	+	+
		Hoja	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		fruto	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Testigo negativo	Plántula	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		fruto	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = prueba positiva; - = prueba negativa; medio de cultivo papa-dextrosaagar (PDA); *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1) = (Folr1); *Alternaria solani* = As; *Botrytis cinerea* = Bc.

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

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

Conclusiones

Sólo uno de los esquemas de inmunización utilizados fue conveniente para la producción de antígeno contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. Se detectó la presencia del agente causal de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1) y *Alternaria solani* en semilla que se dirige a la siembra en el estado de Sonora. Esta presencia se comprobó mediante las tres técnicas de detección que se usaron: medios nutritivos, Elisa, antisuero producido y pruebas de patogenicidad, en los distintos materiales utilizados en el diagnóstico.

Asimismo, se identificó a *Botrytis cinerea*, presente en las áreas de producción de las tres regiones muestreadas; sin embargo, es importante indicar que la presencia de los patógenos estudiados, no eran reflejados sintomáticamente, este resultado se atribuye a que las prácticas culturales que se aplican en esos sistemas de producción, no presentan las condiciones necesarias para el desarrollo de la enfermedad.

Al ser positiva la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (R1), *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* en la semilla de siembra y muestras vegetativas durante el desarrollo del cultivo, representan un riesgo de una eventual manifestación de enfermedad, por lo que es necesario que todas las regiones productoras continúen realizando actividades de prevención; las pruebas de detección por separado no deben ser utilizadas como un método único de detección, es necesaria la conjunción de las mismas al realizar pruebas de diagnóstico para aplicar los controles adecuados y preventivos y así disminuir grandes cantidades de productos químicos y disminuyendo la resistencias genética y contaminación al medio ambiente.

Agradecimientos

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

Literatura citada

- Ascencio-Álvarez, A.; López-Benítez, A.; Borrego-Escalante, F.; Rodríguez-Herrera, S. A.; Flores-Olivas, A.; Jiménez-Díaz, F. y Gámez-Vázquez, A. J. 2008. Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Rev. Mex. Fitopatol. 26:114-120.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 (Ed.). APS. The Am. Phytopathol. Soc.). USA. 258 p.
- Bokx, J. 1980. Virosis de la papa y de la semilla de papa. Hemisferio Sur, SA. Buenos Aires, Argentina. 303 p.
- Cañedo, V. y Ames, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP) ©Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 62 p.

- Cázar, M. E.; Villena, P.; Parra, J.; Espinoza, V.; Larriva G. y Caldas, A. 2014. Eficacia de extracto etanólico de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) en el control de *Alternaria* sp. en cultivos de col y patata. *Maskana*. 5(1):33-41.
- CESAVERG. 2016. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, AC. Manual de plagas y enfermedades en jitomate. *In: SAGARPA- SENASICA*. 29 p.
- Dal Bello, G.; Nico, A. y Mónaco, C. I. 2012. Hongos saprófitos como herramientas de control biológico de '*Botrytis cinerea*' en tomate. *Horticultura global*. 303:64-68.
- Davised, C. L. 1988. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and resistance. *In: fungicides resistance in North America*. Delp. J Ch. Ed. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul Minnesota, USA. 25-27 pp.
- Eckert, J. W. 1988. Historical development of fungicide resistance in plant pathogens. *In: fungicides resistance in North America*. Delp, J. Ch. Ed. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 1-3 pp.
- Farrera, R. E.; Zambrano, A. E. y Ortiz, F. A. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Rev. Fac. Agron*. 24(2):269-281.
- Flores, O. A. 1994. Producción de antisuero contra *Agrobacterium tumefaciens*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 9 p.
- Gilman, J. C. 1963. A manual of soil fungi. Compañía Editorial Continental. México. 873 p.
- Grijalva-Contreras, R. L.; Macías-Duarte, R. y Robles-Contreras, F. 2011. Comportamiento de híbridos de tomate bola en invernadero bajo condiciones desérticas del noroeste de Sonora. *Trop. Subtrop. Agroecosyst*. 14(2):675-682.
- Grijalva-Contreras, R. L.; Macías-Duarte, R.; Grijalva-Durón, S. A. y Robles-Contreras, F. 2010. Evaluación de densidades y arreglos de plantación en tomate bola en condiciones de invernadero en el Noroeste de Sonora. *Biotecnia*. 12(2):20-28.
- Grijalva-Contreras, R. L.; Macías-Duarte, R.; Grijalva-Durón, S. A.; Núñez-Ramírez, F. y Robles-Contreras, F. 2014. Productividad de cultivares de tomate Cherry bajo condiciones de invernadero en el noroeste de Sonora. *Biotecnia* 16(2):27-30.
- INIFAP. 2005. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Manejo integrado del cultivo del jitomate en el estado de San Luis Potosí. Fundación Produce. Folleto técnico núm. 22. 18 p.
- Jarvis, W. R. 1975. Tolerance of *Botrytis cinerea* and rose powdery mildew to benomyl. *Plant. Dis*. 55:44-49.
- Jarvis, W. R. and Hargreaves, A. J. 1973. Tolerance to benomyl in *Botrytis cinerea* and *Penicillium corymbifenum*. *Plant Pathol*. 22:139-141.
- Kiraly, G. Z. 1974. Methods in plant pathology. Elsevier Scientific Publishing Company. New York, USA. 509 p.
- Martínez-Ruiz, D. E.; Cervantes-Díaz, L.; Aíl-Catzím, C. E.; Hernández-Montiel, L. G.; Sánchez, C. L. D. T. y Rueda-Puente, E. O. 2016. Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. *Eur. Sci. J*. 12(18):232-256.
- Randhawa, P. 1996. Fruit blotch testing protocol. California Seed and Plant Lab. Inc. Roseville, California, USA. 5 p.
- Robles-Carrión, A.; Salinas-Serrano, D.; Armijos-Armijos, W.; Sánchez-Rodríguez, A. y Torres-Gutiérrez, R. 2014. Estudio de la variabilidad morfológica de aislados fúngicos asociados con la enfermedad de la marchitez vascular del babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*) en Loja, Ecuador. *Centro de Biotecnología*. 2(2):33-44.

- Roger, Y.; Stainer, Doudoroff, M. y Adelberg, E. 1981. Microbiología. Segunda (Ed). Prentice-Hall Inc. Madrd, España. 932 p.
- Romero, C. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México, DF. 347 p.
- Rueda-Puente, E. O.; Tarazón-Herrera, M. A.; García-Hernández, J. L.; Murillo-Amador, B.; Holguín-Peña, R. J.; Flores-Hernández, A.; Sánchez-Arizpe, A.; Flores-Olivas, A. y Preciado-Rangel, P. 2006. Producción de antisuero contra la mancha bacteriana del fruto (*Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley) y su detección en el cultivo de sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad.) en la Comarca Lagunera, México. Rev. Mex. Fitopatol. 24(2):129-136.
- SAGARPA. 2005. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Análisis Agropecuario del Tomate. Boletín informativo. Culiacán, Sinaloa, México. 9 p.
- SAGARPA. 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Agenda Técnica Agrícola de Sonora. Segunda edición. México. 244 p.
- SARH. 1994. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Manual de muestreo y procesamiento para la identificación de los principales patógenos de la papa. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, México, DF. 16 p.
- Tello, J. C. y Lacasa, A. 1988. Evolución racial de poblaciones *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas. 14:335-341.
- Valdés, D. R. 1995. Cría y explotación del conejo. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Secretaría de Fomento Agropecuario de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 115 p.
- Valencia, S.; Hurtado, G.; Pérez, K. y Vilaplana, R. 2016b. Evaluación de las cepas fúngicas más agresivas de banano (*Musa acuminata* L.) en la poscosecha. Agron. Colomb. 34(1):702-705.
- Valencia, S.; Pérez, K.; Hurtado, G. y Vilaplana, R. 2016a. Evaluación de la severidad de las podredumbres causadas por hongos aislados de piña (*Ananas comosus* L.) en poscosecha. Agron. Colomb. 34(1):763-766.
- Villarreal, G. L. A. 1980. Supervivencia, Dispersión y Patogenicidad de *Erwinia carotovora* y su Relación con *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. México. 92 p.