



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

**RESISTENCIA SISTÉMICA A *Fusarium oxysporum*
f. sp. *lycopersici* INDUCIDA POR *Bacillus subtilis* Y
Bacillus pumilus EN *Solanum lycopersicum* L.**

TESIS

Que como requisito parcial para
obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA



Presenta:

REYNA OSORIO AGUILAR

Bajo la dirección del Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez.



Chapingo, Estado de México, diciembre de 2024



**RESISTENCIA SISTÉMICA A *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* INDUCIDA
POR *Bacillus subtilis* Y *Bacillus pumilus* EN *Solanum lycopersicum* L.**

Tesis realizada por **REYNA OSORIO AGUILAR** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

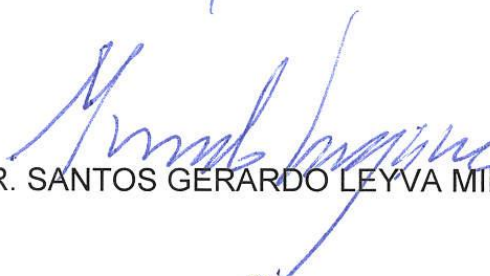
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESIDENTE



DR. JUAN ENRIQUE RODRÍGUEZ PÉREZ

ASESOR



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR



DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

ASESOR



DR. JOSÉ ÓSCAR MASCORRO GALLARDO

Diciembre, 2024

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	x
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
Importancia mundial del tomate.....	6
Impacto de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> en el cultivo de tomate	6
Resistencia Sistémica Inducida (RSI) y Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)	7
Resistencia sistémica inducida	8
Resistencia sistémica adquirida	8
<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus pumilus</i> como agentes de control biológico.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Genotipos evaluados y condiciones de crecimiento	11
Preparación de suspensiones bacterianas e inóculo fúngico	12
Bacterias benéficas.....	12
Recolección y aislamiento de la cepa de <i>Fusarium oxysporum</i>	12
Preparación del inóculo fúngico	13
Experimento 1: Confrontaciones <i>in vitro</i>	13
Experimento 2: Evaluación en invernadero	14

Diseño Experimental y Tratamientos	14
Inoculación	14
Experimento 3: Expresión génica	15
Prueba <i>in vitro</i>	15
Extracción de ARN y análisis de expresión génica mediante RT-qPCR	15
Análisis de información	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
Potencial antagonico <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus pumilus</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i>	16
Evaluación fenotípica en invernadero	19
Efecto de <i>Fusarium oxysporum</i> sobre la integridad de ARN total extraído de raíces de plántulas de tomate	24
Activación de las vías de RSI y RSA en plántulas	26
CONCLUSIÓN GENERAL	30
LITERATURA CITADA	31
ANEXOS	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Marcadores moleculares para RT-qPCR.	16
Cuadro 2. Comparación de medias del halo de inhibición entre las colonias de <i>Fusarium oxysporum</i> y las especies antagónicas de <i>Bacillus</i> a los 3, 4, 5, 6 y 7 días después de la incubación.	18
Cuadro 3. Análisis de varianza de las 18 combinaciones de tres genotipos de tomate, tratados con dos diferentes cepas de <i>Bacillus</i> e inoculados con <i>Fusarium oxysporum</i> y tres niveles de <i>Bacillus</i>	19
Cuadro 4. Comparación de medias de materia seca, hoja y tallo, área foliar, alturas a los 3, 6 y 9 días después de la inoculación con <i>Fusarium oxysporum</i> , severidad de la enfermedad (ABCPE), en plántulas de tomate inoculadas con <i>Bacillus pumilus</i> y <i>B. subtilis</i>	20
Cuadro 5. Comparación de medias de materia seca, hoja y tallo, área foliar, alturas a los 3,6 y 9 días después de la inoculación con <i>Fusarium oxysporum</i> , severidad de la enfermedad (ABCPE), en tres genotipos de plántulas de tomate.	20
Cuadro 6. Comparación de medias de materia seca, hoja y tallo, área foliar, alturas a los 3, 6 y 9 días después de la inoculación con <i>Fusarium oxysporum</i> , severidad de la enfermedad (ABCPE), en plántulas de tomate sin inocular e inoculadas con <i>Fol.</i>	20
Cuadro 7 Comparación de medias de la interacción de <i>Fusarium oxysporum</i> (<i>Fol</i>) y tres genotipos (GE) de tomate.	21
Cuadro 8 Comparación de medias en la interacción de tres genotipos de tomate y dos bacterias (<i>Bacillus subtilis</i> y <i>B. pumilus</i>).....	21
Cuadro 9 Comparación de medias, en la interacción de tres genotipos de tomate, dos bacterias (<i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus pumilus</i>) y <i>Fusarium oxysporum</i>	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Confrontaciones <i>in vitro</i> en placas de PDA.	17
Figura 2. ARN extraído de raíces 24 horas después de la inoculación con <i>Fol.</i> Tratamientos: 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (<i>Bacillus subtilis</i>); 3) 69/47 (<i>Fusarium oxysporum</i>); 4) 69/47 (<i>Bacillus subtilis</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 5) 69/47 (<i>Bacillus pumilus</i>); 6) 69/47 (<i>Bacillus pumilus</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (<i>Bacillus subtilis</i>); 9) 47/47 (<i>Fusarium oxysporum</i>); 10) 47/47 (<i>Bacillus subtilis</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 11) 47/47 (<i>Bacillus pumilus</i>); 12) 47/47 (<i>Bacillus pumilus</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (<i>Bacillus subtilis</i>); 15) Híbrido (<i>Fusarium oxysporum</i>); 16) Híbrido (<i>Bacillus subtilis</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 17) Híbrido (<i>Bacillus pumilus</i>); 18) Híbrido (<i>Bacillus pumilus</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>). 24	
Figura 3. ARN extraído de hojas 24 horas después de la inoculación con <i>Fol.</i> Tratamientos: 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (<i>Bacillus subtilis</i>); 3) 69/47 (<i>Fusarium oxysporum</i>); 4) 69/47 (<i>Bacillus subtilis</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 5) 69/47 (<i>Bacillus pumilus</i>); 6) 69/47 (<i>Bacillus pumilus</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (<i>Bacillus subtilis</i>); 9) 47/47 (<i>Fusarium oxysporum</i>); 10) 47/47 (<i>Bacillus subtilis</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 11) 47/47 (<i>Bacillus pumilus</i>); 12) 47/47 (<i>Bacillus pumilus</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (<i>Bacillus subtilis</i>); 15) Híbrido (<i>Fusarium oxysporum</i>); 16) Híbrido (<i>Bacillus subtilis</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>); 17) Híbrido (<i>Bacillus pumilus</i>); 18) Híbrido (<i>Bacillus pumilus</i> vs. <i>Fusarium oxysporum</i>). 25	
Figura 4. Plántulas de tomate en cultivo <i>in vitro</i> , después de la inoculación con <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus pumilus</i>	27
Figura 5. Plántulas de tomate en cultivo <i>in vitro</i> , después de la inoculación con <i>Fusarium oxysporum</i> en cajas Petri con medio MS.	27
Figura 6. Expresión relativa de PR1, vía de la Resistencia sistémica adquirida (RSA).	28
Figura 7. Expresión relativa de GLUB, vía de la Resistencia sistémica inducida (RSI).	29
Figura 8. Escala visual de severidad de plántulas en tomate infectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Condiciones de invernadero.	45

Figura 9. Corrimiento electroforético de muestras de ARN de tomate tratadas con DNasa. 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (*Bacillus subtilis*); 3) 69/47 (*Fusarium oxysporum*); 4) 69/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 5) 69/47 (*Bacillus pumilus*); 6) 69/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (*Bacillus subtilis*); 9) 47/47 (*Fusarium oxysporum*); 10) 47/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 11) 47/47 (*Bacillus pumilus*); 12) 47/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (*Bacillus subtilis*); 15) Híbrido (*Fusarium oxysporum*); 16) Híbrido (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 17) Híbrido (*Bacillus pumilus*); 18) Híbrido (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*)..... 45

Figura 10. Análisis por PCR de muestras de ARN de tomate tratadas con DNasa: comprobación de la eliminación del ADN genómico mediante la amplificación del gen ACT. MPM: Marcador de peso molecular; 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (*Bacillus subtilis*); 3) 69/47 (*Fusarium oxysporum*); 4) 69/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 5) 69/47 (*Bacillus pumilus*); 6) 69/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (*Bacillus subtilis*); 9) 47/47 (*Fusarium oxysporum*); 10) 47/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 11) 47/47 (*Bacillus pumilus*); 12) 47/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (*Bacillus subtilis*); 15) Híbrido (*Fusarium oxysporum*); 16) Híbrido (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 17) Híbrido (*Bacillus pumilus*); 18 y 21) ACT control negativo; 19 y 22) ACT control positivo; 20) Híbrido (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*)..... 46

Figura 11. Amplificación por PCR del gen ACT a partir de muestras de cDNA de tomate. 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (*Bacillus subtilis*); 3) 69/47 (*Fusarium oxysporum*); 4) 69/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 5) 69/47 (*Bacillus pumilus*); 6) 69/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (*Bacillus subtilis*); 9) 47/47 (*Fusarium oxysporum*); 10) 47/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 11) 47/47 (*Bacillus pumilus*); 12) 47/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (*Bacillus subtilis*); 15) Híbrido (*Fusarium oxysporum*); 16) Híbrido (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 17) Híbrido (*Bacillus pumilus*); 18 y 21) ACT control negativo; 19 y 22) ACT control positivo; 20) Híbrido (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*)..... 46

DEDICATORIA

A **Dios** por darme fortaleza y permitirme continuar con mi formación académica.

A mis padres **Reyna Aguilar** y **Omar Osorio** por apoyarme en este proceso y ayudarme a regresar, con amor, admiración y respeto.

A mi hermana **Regina** por estar en los momentos más importantes de mi vida.

A mi hermana **Daniela** por su entusiasmo y motivación.

A **Félix Padilla** por su paciencia y apoyo en esta etapa de mi formación académica con amor, admiración y respeto.

Al **Dr. Saúl Jijón Moreno** por brindarme su sincera amistad, confiar en mí, por su apoyo y orientación, por contribuir a mi desarrollo profesional y personal.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías** (CONHACyT) por el financiamiento proporcionado para la realización de esta investigación.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por permitirme continuar con mi formación profesional.

A los miembros de mi comité asesor, por su orientación y consejos, al **Dr. Enrique Rodríguez Pérez** por su motivación y apoyo en cada etapa de esta investigación, así como sus consejos tanto académicos como personales, al **Dr. Santos Gerardo Leyva Mir** por darme orientación para mejorar esta investigación y motivación, al **Dr. Jaime Sahagún Castellanos** por sus consejos y correcciones, y al doctor **José Óscar Mascorro Gallardo** por su participación en esta investigación.

Al **Dr. Sergio Casas Flores** y al **Dr. Saúl Jijón Moreno** del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C (IPICYT) por la orientación y facilidades otorgadas en la realización de pruebas de expresión de genes de este proyecto.

Al personal de la UACH que me brindaron su apoyo en esta investigación: **Jorge Luis Sánchez Galicia**, **Juan Feroso Ramírez** y **Mariana Romualda Calzada Millán**.

A **Efrén Cintora Portugués** por su invaluable apoyo y sus consejos en esta investigación.

A **Félix Padilla Lara** por su apoyo técnico en el laboratorio de fitopatología y su paciencia.

A **Regina Osorio Aguilar** por su apoyo en la etapa experimental en invernadero.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Reyna Osorio Aguilar
Fecha de nacimiento	Enero 22, 1999
Lugar de nacimiento	Toluca de Lerdo, México.
CURP	OOAR990122MMCSGY07
Cédula profesional	13285845



Desarrollo académico

Licenciatura	Licenciatura en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx)
--------------	---

RESUMEN GENERAL

RESISTENCIA SISTÉMICA A *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* INDUCIDA POR *Bacillus subtilis* Y *Bacillus pumilus* EN *Solanum lycopersicum* L.

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* es una enfermedad grave que conduce al retraso en el crecimiento, el marchitamiento progresivo y la muerte de cultivos de tomate. Una estrategia para reducir los efectos de esta enfermedad es el control biológico con bacterias del género *Bacillus*. En este estudio se evaluó la actividad antagónica de *Bacillus pumilus* ATCC 700814 y *Bacillus subtilis* QST-713 contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* con la técnica de cultivo dual en placas de PDA. Los ensayos de confrontación mostraron que las bacterias inhibieron el halo de crecimiento del hongo entre 31 y 42 %. Además, 24 horas después de la inoculación, el patógeno degradó el ARN de la raíz de las plántulas. Mediante RT-qPCR y la expresión relativa de PR1 y GLUB, se confirmó que, en plántulas de genotipos susceptibles al patógeno, ambas cepas activaron la expresión de genes asociados, tanto con la resistencia sistémica inducida, como con la adquirida. Los niveles más altos de expresión génica se observaron en plántulas tratadas con las cepas de *Bacillus* y posteriormente inoculadas con *Fusarium*. Estos hallazgos sugieren que ambas cepas de *Bacillus* podrían utilizarse para contrarrestar los efectos de *Fusarium oxysporum* en los cultivos de tomate.

Palabras clave. Actividad antagónica, control biológico, expresión génica.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Reyna Osorio Aguilar

Director de Tesis: Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

GENERAL ABSTRACT

SYSTEMIC RESISTANCE TO *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* INDUCED BY *Bacillus subtilis* AND *Bacillus pumilus* IN *Solanum lycopersicum* L.

Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is a serious disease that leads to stunted growth, progressive wilting and death of tomato crops. One strategy to reduce the effects of this disease is biological control with bacteria of *Bacillus* genus. In this study, the antagonistic activity of *Bacillus pumilus* ATCC 700814 and *Bacillus subtilis* QST-713 against *Fusarium oxysporum* was evaluated with the dual culture technique on PDA plates. The confrontation tests showed that the bacteria inhibited the growth halo of the fungus between 31 and 42%. Additionally, 24 hours after inoculation, the pathogen degraded the RNA of the seedling roots. By means of RT-qPCR and the relative expression of PR1 and GLUB. It was observed that on the seedlings of susceptible genotypes to *Fusarium*, both strains activated the expression of genes associated with both induced and acquired systemic resistance. The highest levels of gene expression were observed in seedlings inoculated with *Bacillus* strains and subsequently inoculated with *Fusarium*. These findings suggest that both *Bacillus* strains could be used to counteract the effects of *Fusarium oxysporum* on tomato crops.

Keywords: Antagonistic activity, biological control, gene expression.

Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Reyna Osorio Aguilar

Thesis director: Dr. Juan Enrique Rodríguez Pérez

INTRODUCCIÓN GENERAL

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza con mayor producción a nivel nacional tanto por su importancia económica como por su valor nutrimental (SIAP, 2022). Este cultivo se encuentra expuesto a diversas enfermedades, entre las que se encuentran la marchitez vascular, la pudrición de corona y raíz (Vitale et al., 2014) causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), (Jogaiah et al., 2018).

La colonización por *F. oxysporum* en la planta conduce a la necrosis de los tejidos infectados, colapso de los vasos vasculares, retraso en el crecimiento y al marchitamiento progresivo causando la pérdida del cultivo (Zhang et al., 2021). La marchitez vascular en tomate puede causar daños en cualquier etapa de producción; especialmente forma parte del complejo “damping off” caracterizado por el ataque en plántula (Chávez & Aquino-Jara 2012; Chitwood-Brown et al., 2021). La aplicación inadecuada de fungicidas para el control de *Fusarium* en cultivos de tomate representa un riesgo para el ambiente y la salud debido a sus propiedades tóxicas y a su residualidad en el suelo (Selim et al., 2023).

Una posible solución para el manejo de enfermedades es control biológico, a través de la activación de la resistencia sistémica adquirida (RSA) dependiente del ácido salicílico (AS); y la resistencia sistémica inducida (RSI) dependiente del etileno (ET) y el ácido jasmónico (JA) (Jaiswal et al., 2020), comúnmente atribuida a las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en las que se encuentra el género *Bacillus* (Choudhary & Johri, 2009).

La RSI es una resistencia de amplio espectro y de largo plazo, capaz de suprimir una enfermedad entre el 20 y 85 % (Gouda et al., 2018; Abbasi et al., 2019). Por lo cual, es de interés aprovecharla mediante la interacción directa de rizobacterias antes del comienzo de enfermedades causadas por *Fusarium* y otros patógenos, para disminuir la gravedad de los efectos de estas enfermedades (Abbasi et al., 2019).

La RSA es una respuesta de defensa de las plantas a patógenos que confiere inmunidad más allá del sitio de infección inicial (Wang et al., 2018; Holmes et al., 2019). La señalización mediada por el AS es esencial para la activación de la RSA. El AS se

acumula en las plantas después del ataque de un patógeno, los efectos de esta fitohormona pueden cambiar la actividad enzimática, activar los genes de defensa, generar radicales libres y mejorar respuestas de defensa (Shah et al., 2014; Kim & Lim, 2023), además la RSA se puede transmitir a la progenie a través de la regulación epigenética (Fu & Dong, 2013).

Se ha demostrado que varias especies del género *Bacillus* como; *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cerus*, *Bacillus mycoides* y *Bacillus sphaericus*, son capaces de activar la RSI, y esto tiene como consecuencia una disminución significativa de la severidad de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en cultivos de tomate, pimiento, melón, sandía, tabaco, *Arabidopsis*, y pepino, tanto en condiciones bajo invernadero o campo abierto (Akram et al., 2013). La RSA generalmente se considera inducida por patógenos, esta señal puede conferirse en poco tiempo, mientras que la RSI puede ser activada por infección de patógenos o por microorganismos benéficos (Yu et al., 2022; Salwan et al., 2023). En el caso del género *Bacillus* se ha detectado que activa a los genes PDF1.2, ETR4, Pti4 y PI-I involucrados en la RSI (Nie et al., 2017, Constantin et al., 2019; Pazarlar et al., 2022), esto sugiere que probablemente no son los únicos genes que puede estar activando esta especie.

Las cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* tienen la capacidad de actuar como agentes de control biológico contra hongos patógenos mediante la RSI y la RSA, la habilidad de formar endosporas y biopelículas en las superficies de las raíces y la estimulación del crecimiento de las plantas, de manera que pueden usarse para suprimir enfermedades (Kumar & Tabassum, 2019).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la resistencia sistémica inducida y la resistencia sistémica adquirida por las cepas *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* en variedades de tomate susceptibles a *Fusarium oxysporum*, a través de una prueba fitopatológica en invernadero y la realización de RT-qPCR para medir la expresión relativa de PR1 y GLUB relacionados con las vías de RSI y RSA, respectivamente, comprobando que la inoculación de raíces de tomate con *Bacillus subtilis* y *Bacillus*

pumilus inducen la resistencia sistémica a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, mediante la activación los genes.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia mundial del tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la segunda solanácea más cultivada a nivel mundial después de la papa, los países con mayor producción son China, India, Estados Unidos, México, Turquía, Rusia e Italia (Ali et al., 2020). En el año 2023, México se posicionó como el 9° productor mundial de tomate con una producción de más de tres millones de toneladas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2023).

Entre los hongos que infectan a los cultivos de tomate con mayor frecuencia son *Alternaria solani*, *Septoria lycopersici*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis – lycopersici* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Panno et al., 2021; Karačić et al., 2024). Estos patógenos representan un problema para la seguridad alimentaria, en productos perecederos como el tomate (Adedayo et al., 2022).

Impacto de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate

Los países con mayor producción de tomate han reportado enfermedades transmitidas por el suelo causadas por diversos patógenos entre ellos los hongos como *Fusarium oxysporum* y *Pythium* sp., estas enfermedades pueden representar grandes pérdidas económicas (Ma et al., 2023).

El oscurecimiento vascular, el retraso del crecimiento, el marchitamiento progresivo y la muerte de la planta son síntomas comunes en plantas infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) (Di et al., 2017). Este invade a la planta a través de heridas o aberturas en las raíces a través del xilema, las lesiones necróticas pueden provocar la pudrición de la corona y con esto desencadenar una clorosis, así como la pudrición de la raíz (Ma et al., 2023).

Los síntomas iniciales de la enfermedad comienzan con una clorosis pronunciada y marchitamiento de las hojas basales inferiores que avanza hacia las hojas apicales,

generalmente estos síntomas son asimétricos, restringidos a uno o dos tallos de la planta, a medida que avanza la enfermedad se produce oscurecimiento en el tejido vascular de los tallos, además puede conducir a una maduración acelerada de los frutos y a la muerte rápida de la planta (Chitwood-Brown et al., 2021).

El uso de fungicidas para combatir a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* genera la aparición de nuevas cepas resistentes (El-Aswad et al., 2023), debido a que, los hongos tienen una alta plasticidad genética que les permite desarrollar resistencia a fungicidas e invadir nuevos cultivos (Doehlemann et al., 2017; Almeida et al., 2023).

Las razas patogénicas de *Fol* (1,2 y 3) se identifican por sus genes de resistencia a fungicidas, las razas 1 y 2 generalmente crecen en cultivos de tomate en diferentes regiones del mundo, hay reportes de que la raza 3 se puede encontrar con mayor frecuencia en cultivos en el suroeste de Georgia y México (Srinivas et al., 2019), por lo que se requiere encontrar alternativas biológicas eficientes para controlar los efectos dañinos de *Fusarium oxysporum*.

Resistencia Sistémica Inducida (RSI) y Resistencia Sistémica Adquirida (RSA)

Las plantas reaccionan al ataque de patógenos mediante diferentes mecanismos físicos y bioquímicos, la activación de la resistencia es una estrategia con una gran capacidad para evitar pérdidas en los cultivos de tomate (Köhl et al., 2019).

Las plantas colonizadas por bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden presentar la activación de la resistencia sistémica inducida (RSI) la cual usualmente otorga la capacidad de autoprotección, pero estas bacterias también pueden activar la resistencia sistémica adquirida (RSA) (Thepbandit et al., 2024).

No todas las interacciones microbianas que provocan respuestas sistémicas dan lugar a la inmunidad, procesos como las heridas mecánicas pueden dar lugar a una resistencia localizada, pero también a una susceptibilidad sistémica, en la mayoría de los casos los genes que se atacan durante la susceptibilidad son cruciales para la distinción de diferentes vías de resistencia (Wilson et al., 2023).

La resistencia sistémica está relacionada con la expresión genética relacionada con la producción hormonal, cuatro hormonas regulan la defensa de las plantas a los

patógenos: ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA) (Alazem y Lin, 2015), estas vías de señalización son indispensables para la resistencia sistémica a través de RSA o RSI (Singh et al., 2022).

Resistencia sistémica inducida

La resistencia sistémica inducida (RSI) es un término usado para las plantas que se encuentran en un estado inducido de resistencia, el cual es elicitado por inductores biológicos o químicos que protegerán a la planta contra ataques de patógenos (Pieterse et al., 2014), y está relacionado por estímulos ambientales específicos, que activan los mecanismos de defensa de la planta y se potencian contra estreses bióticos posteriores (Choudhary & Johri.,2009).

El estado inducido de resistencia se caracteriza por la activación de mecanismos de defensa latentes que se expresan después del ataque de un patógeno, la RSI no solo se expresa en el sitio de inducción sino también sistemáticamente en partes de la planta que se encuentran alejadas del inductor (Pieterse et al., 2014). Esta resistencia tiende a ser de amplio espectro y puede ser duradera, pero rara vez es completa; la mayoría de los agentes inductores reducen la enfermedad entre un 20 a 85 %, además su expresión depende del huésped por lo cual su eficacia en condiciones de campo podría verse influenciada por el ambiente, la nutrición del cultivo y el grado de activación de la RSI en la planta (Walters et al., 2013).

La RSI generalmente se activa después de la colonización por parte de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) y estas preparan a los mecanismos de defensa de la planta para la resistencia a enfermedades a través del ácido jasmónico y etileno (Constantin et al., 2019). Es eficaz contra una amplia gama de patógenos (Doornbos et al., 2012).

Resistencia sistémica adquirida

La RSA es de amplio espectro, sin especificidad para la infección inicial, un patógeno que causa muerte celular programada de manera local puede inducir RSA a través de la generación de señales móviles, la acumulación de la hormona de defensa SA y la secreción de proteínas antimicrobianas relacionadas con la patogénesis (PR), el

resultado es una planta preparada contra una infección secundaria durante semanas o meses (Fu & Dong, 2013).

Van Der Plank (1963) define la resistencia vertical como la acción de un gene que confiere inmunidad contra una raza del patógeno no y la resistencia horizontal opera contra varias razas reduciendo la tasa de infección en el hospedante. Por lo que la RSA tiene como base la acción de varios genes que se activan contra patógenos y funciona de acuerdo con la hipótesis de Van Der Plank.

Durante la resistencia sistémica adquirida la infección del tejido vegetal primario (local) produce señales móviles que se distribuyen para activar respuestas inmunes en tejidos secundarios no infectados (Holmes et al., 2019). La SAR se activa en los órganos distales libres de patógenos de una planta que han conservado la memoria de una infección previa en otro órgano, los tejidos con SAR muestran un estado de preparación que se asocia con la activación de defensas rápida y eficiente una infección posterior de patógenos (Shah et al., 2014).

El ácido salicílico es una fitohormona esencial para regular las reacciones SAR iniciadas por patógenos y varios elicitores, que se sintetiza a través de la enzima isocorismato sintasa o la fenilalanina amonio liasa (Ngou et al., 2022; Pazarlar et al., 2022). Los niveles de SA aumentan en las plantas después de la infección causada por patógenos (Pye et al., 2013). La expresión de genes como NPR1, PR1, y PR5 están asociados a la RSA por la vía de SA (Chae et al., 2020; Haghpanah et al., 2024).

***Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* como agentes de control biológico**

El control biológico es una alternativa para combatir enfermedades causadas por microorganismos patógenos en los cultivos de tomate, especies del género *Bacillus* han demostrado tener la capacidad de promover el crecimiento vegetal, así como de tener efectos antimicrobianos (Karačić et al., 2024). Lo anterior, a través de la actividad inhibitoria sobre el crecimiento de hongos patógenos al competir por nichos ecológicos e inducir la resistencia sistémica en las plantas (Fira et al., 2018), así mismo, estas especies se pueden adaptar mejor que los patógenos a condiciones extremas de pH y temperatura (Ramírez et al., 2022).

Las cepas *Bacillus* se reconocen como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal debido a su capacidad de producción de reguladores del crecimiento y una gran variedad de agentes antimicrobianos (Ramírez-Pool et al., 2024), lo cual las hace una opción viable para combatir a hongos fitopatógenos. La capacidad que tienen las bacterias de inhibir el crecimiento de hongos patógenos también puede atribuirse a que estas crecen más rápido lo cual permite que haya una competencia eficiente por los nutrientes y el espacio (Baar et al., 2023).

La capacidad antagónica *in vitro* por parte de las PGPR (Baar et al., 2023), puede deberse a la producción de enzimas líticas como quitinasas y proteasas, que degradan las paredes celulares de hongos y evitan su crecimiento (Baar et al., 2023). Este tipo de antagonismo se comprueba mediante el cultivo del patógeno y una PGPR de prueba en cajas Petri con la técnica de cultivo dual, mecanismos que han sido identificados en *Trichoderma* (Khan et al., 2018).

Las PGPR pueden controlar la proliferación de *Fol* mediante la producción de ácido indol acético, producción de sideróforos, solubilización de fosfatos, producción de volátiles antifúngicos y la inducción de resistencia sistémica (Ajilogba & Babalola, 2013). Una vez que las bacterias de biocontrol se establecen en la rizosfera, una variedad de mecanismos puede dar como resultado la supresión de patógenos de las plantas (Doornbos et al., 2012).

Bacillus subtilis presenta mecanismos de biocontrol indirectos como la estimulación del crecimiento de la planta y la inducción de la resistencia sistémica, para suprimir enfermedades causadas por patógenos (Hashem et al., 2019). Esta bacteria es un agente de biocontrol y promotora del crecimiento eficiente, capaz de contrarrestar los efectos de *Rhizoctonia solani* y *Fol* (Rashad et al., 2022; Pandey et al., 2023). Cepas de *B. pumilus* son capaces de suprimir fitopatógenos como *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Fagopyrum esculentum*, además *B. pumilus* puede promover el crecimiento de las plantas independientemente de si altera la microbiota nativa o no (Dobrzyński et al., 2023).

Con base en estas interacciones beneficiosas entre plantas y microorganismos, ha sido posible desarrollar biofertilizantes comerciales para su uso en la biotecnología

agrícola a base del género *Bacillus*. Estos contienen cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cerus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, entre otras (Berg, 2009; Abriouel et al., 2011; Miljaković et al., 2020).

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos evaluados y condiciones de crecimiento

Se evaluaron tres híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.); dos de ellos (69/47 y 47/47) susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, desarrolladas por el proyecto de Mejoramiento Genético de tomate para Invernadero de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) y el híbrido comercial “Ramsés” con resistencia al patógeno, de la empresa HM Clause®.

Las semillas se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades con sustrato de turba, se usó la solución nutritiva de Cadahia (2000) modificada para etapa de plántula. El trasplante se realizó 14 días después de la siembra en vasos de poliestireno con capacidad de 330 mL con roca volcánica porosa (tezontle), en condiciones de invernadero.

La preparación de las plántulas para los experimentos de RT-qPCR comenzó con la desinfección de las semillas, la cual, se realizó en tubos Falcon estériles de 50 mL de capacidad, en condiciones de esterilidad se adicionó una solución de etanol al 70 %, después de agitar por tres minutos se decantó, se agregó hipoclorito de sodio al 20 % y finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril. Las semillas se sembraron en placas de Petri de 150 mm de diámetro con medio Murashige & Skoog (MS) y se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 28 °C, las plántulas se trasplantaron en tubos de cultivo con 4 mL de medio MS líquido. Las plántulas se mantuvieron a 22 °C con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, todas las plántulas se utilizaron cuando tenían 11 días de crecimiento.

Preparación de suspensiones bacterianas e inóculo fúngico

Bacterias benéficas

Bacillus pumilus cepa ATCC 700814 fue donada por el Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Se resembró en placas petri de medio LB solido durante 24 horas a 28 °C, para el caso de *Bacillus subtilis* cepa QST-713 fue aislada del producto comercial Serenade® producido por Bayer. Posteriormente se sembraron en medio líquido, se mantuvieron en agitación constante a 120 rpm durante 24 horas. La biomasa se recolectó en una solución de caldo LB y glicerol, esto se ajustó a la concentración 1×10^8 UFC/ mL.

Recolección y aislamiento de la cepa de *Fusarium oxysporum*

Se recogieron muestras de plantas de tomate con síntomas de marchitez y pudrición de raíz en el invernadero del Campo Experimental del departamento de Fitotecnia, de la Universidad Autónoma Chapingo. Para el aislamiento de *Fusarium*, los tejidos infectados de la raíz se lavaron con agua potable para eliminar los restos de sustrato, se cortaron trozos entre 10 y 20 mm, los cuales fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante un minuto, se enjuagaron con agua destilada tres veces, se secaron en papel filtro estéril.

Los trozos se transfirieron a placas de agar papa dextrosa (PDA), la cuales se incubaron a temperatura ambiente por siete días, a partir del crecimiento micelar se volvió a resembrar la cepa con la técnica de punta de hifa en una placa nueva de PDA, se dejaron incubar durante 12 días para su posterior uso.

Se extrajo ADN del patógeno para su identificación, la empresa Humanizing Genomic Macrogen se encargó de obtener las secuencias de la especie, las cuales fueron registradas en la base de datos de GenBank; donde fueron sometidas a una búsqueda de secuencias altamente similares en la base de datos NCBI, con la herramienta BLAST, con lo cual se corroboró que el aislado secuenciado pertenece a la especie de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* con identidad del 99-100 %; y registrado con el número de acceso PP949794.1.

Preparación del inóculo fúngico

Las placas con el patógeno se hidrataron con agua estéril para la recolección de conidias, las cuales fueron disueltas en una solución con medio papa dextrosa y glicerol, ambos al 50 %. La concentración de esporas conidiales se calculó con una cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de 1×10^4 esporas conidiales/mL para inocular plántulas.

Experimento 1: Confrontaciones *in vitro*

Las confrontaciones *in vitro* de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* contra el hongo, se realizaron usando la técnica de cultivo dual (cajas de Petri, 90×15 mm) con PDA, que consistió en colocar en un lado de la caja, un círculo de papel filtro de seis mm de diámetro, impregnado con una suspensión de conidias y micelio del inóculo del patógeno y en el lado opuesto de la caja de Petri, se colocó otro círculo de papel filtro con biomasa de *B. pumilus* y *B. subtilis* (Ríos-Velasco et al., 2016).

Las cajas de Petri inoculadas se incubaron a 28 °C por ocho días en una cámara ambiental. El crecimiento radial de las colonias de hongos se midió cada 24 h para ambos microorganismos patógenos y antagonistas. El halo de inhibición, entre las colonias de fitopatógenos y antagonistas en confrontación, se midió hacia los puntos cardinales de la caja Petri a los ocho días después a la incubación (Aquino-Martínez et al., 2008).

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, con 10 repeticiones, teniendo como unidad experimental una caja Petri con agar PDA. Se evaluaron seis tratamientos: *F. oxysporum*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *F. oxysporum* vs. *B. subtilis*, *F. oxysporum* vs. *B. pumilus* y el blanco, el cual, se tomó como referencia para descartar alguna contaminación por bacterias u hongos distintos a los que se evaluaron.

Experimento 2: Evaluación en invernadero

Diseño Experimental y Tratamientos

Se utilizó el diseño experimental en bloques completamente al azar con arreglo factorial de 2x3x3 con tres repeticiones. La unidad experimental consistió en ocho vasos con capacidad de 330 mL, con tezontle estéril como sustrato y una plántula en cada uno de ellos.

Los factores evaluados fueron: dos parcelas una inoculada con *F. oxysporum* y otra sin el patógeno, tres genotipos de tomate y tres tratamientos de control biológico inoculados con las cepas de *B. subtilis* y *B. pumilus*, y sin bacteria.

Inoculación

Se realizó la inoculación con *B. subtilis* y *B. pumilus* a una concentración de 1×10^7 UFC/mL, en plántulas con dos semanas de edad y a las 72 horas se volvió a inocular con las mismas cepas bacterianas.

Las plántulas de tomate de dos semanas de edad se extrajeron del sustrato, a la raíz de cada plántula se le hizo un corte de la raíz tres cm y se colocaron en una solución de *Fol* a una concentración de 1×10^7 conidias/mL durante 24 horas. Posterior a esto, las plantas se colocaron en las macetas con tezontle.

Las plantas se observaron diariamente durante nueve días después de la inoculación para registrar la altura inicial y final, el desarrollo de síntomas, severidad e incidencia de la enfermedad. A partir de los valores de severidad se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) (Campbell & Madden, 1990) con la siguiente ecuación:

$$ABCPE = \sum_i \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

Y_i = porcentaje de severidad en el tiempo i

t_i = días después de la inoculación i

$$i = 1, 2, 3, \dots, n; n = \text{número de muestreos}$$

Al finalizar la evaluación, se midió el área foliar separando las láminas foliares del tallo, posteriormente los órganos de tallo y hoja se colocaron en una estufa de calor seco a 50 °C por 72 horas para registrar su masa seca en g.

Experimento 3: Expresión génica

Prueba *in vitro*

El diseño experimental fue similar a la evaluación en invernadero, modificado para aplicarse en condiciones *in vitro*. Las plántulas se colocaron en tubos de cultivo de seis mL con medio MS líquido, en donde se inocularon con dos cepas benéficas de *Bacillus*, después de 48 horas se inocularon con el hongo patogénico, las raíces se expusieron a este por un minuto, para posteriormente pasarlas a una placa con medio sólido MS donde se incubaron con el patógeno por 24 horas hasta la extracción de ARN.

Extracción de ARN y análisis de expresión génica mediante RT-qPCR

Después de 24 horas de la inoculación con el patógeno se recolectaron todas las hojas de cada tratamiento para la investigación molecular. La extracción de ARN se llevó a cabo por el método CTAB. El ARN que se extrajo se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop, luego se almacenó a -20 °C. Para la síntesis de ADNc se utilizó una mezcla de reacción de con un volumen total de 10 µL, la cual contenía 1 µL de ADNc molde, 3.6 µL agua libre de nucleasas, 0.2 µL de cada cebador específico directo e inverso (Cuadro 1) con una concentración de 10 µM y un 5 µL del kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), se utilizó el termociclador Piko Real 96, Thermo Scientific, con número de serie PR0961400539 para realizar la RT-qPCR. Los cebadores fueron diseñados por el Dr. Saúl Jijón Moreno del Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Los datos brutos fueron analizados usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001) y normalizados al nivel de transcripción del gen actina, los datos de ARN de las plántulas control fueron fijados a 1.0. Los niveles de transcripción de

genes analizados en cada muestra de ARN fueron medidos para dos experimentos de inoculación independientes con tres réplicas.

Cuadro 1.. Marcadores moleculares para RT-qPCR.

Marcador	Secuencia 5´-3´	Longitud	GC	Tm
SI ACT Fw	CATCGTCCTCAGTGGTGGTA	20 pb	55%	55 °C
SI ACT Rv	AGATCCTCCGATCCAGACAC	20 pb	55%	57 °C
SI_GluB_Fw	TCTTCTGGGATGGAACACGC	20 pb	55%	59 °C
SI_GluB_Rv	GAAGTGCCAGTAACAGGGCT	20 pb	55%	59 °C
SI PR1a at+181 Fw	ATCAAAGAGCTGGGGACTGC	20 pb	55%	59 °C
SI PR1a at +289 Rv	CCCACATCTTCACAGCACCA	20 pb	55%	57 °C

GC: Contenido total de guanina y citosina, Tm: Temperatura de amplificación.

Análisis de información

En las tres evaluaciones, actividad antagonica, prueba de patogenicidad y expresión de genes, se realizaron análisis de varianza y comparaciones múltiples de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el programa SAS-studio ©.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Potencial antagonico *in vitro* de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* frente a *Fusarium oxysporum*

Los análisis de varianza del diámetro de crecimiento indicaron diferencias estadísticas en las cinco oportunidades de medición (3, 4, 5, 6 y 7 días después de la incubación). Los coeficientes de variación fueron mayores que 36 %, causado por la variación aleatoria observada entre las repeticiones de cada tratamiento.

En la prueba de confrontación *in vitro* realizada durante siete días (Figura 1), el tratamiento “blanco”, con ausencia del patógeno no tuvo crecimiento de ningún tipo, en el caso de *Fol* como único elemento no tuvo restricciones para su crecimiento, por lo que siempre mostró el mayor diámetro, Bs y Bp (en ausencia de *Fol*) mostraron un crecimiento menor que el patógeno y similar entre ellos (Cuadro 2).

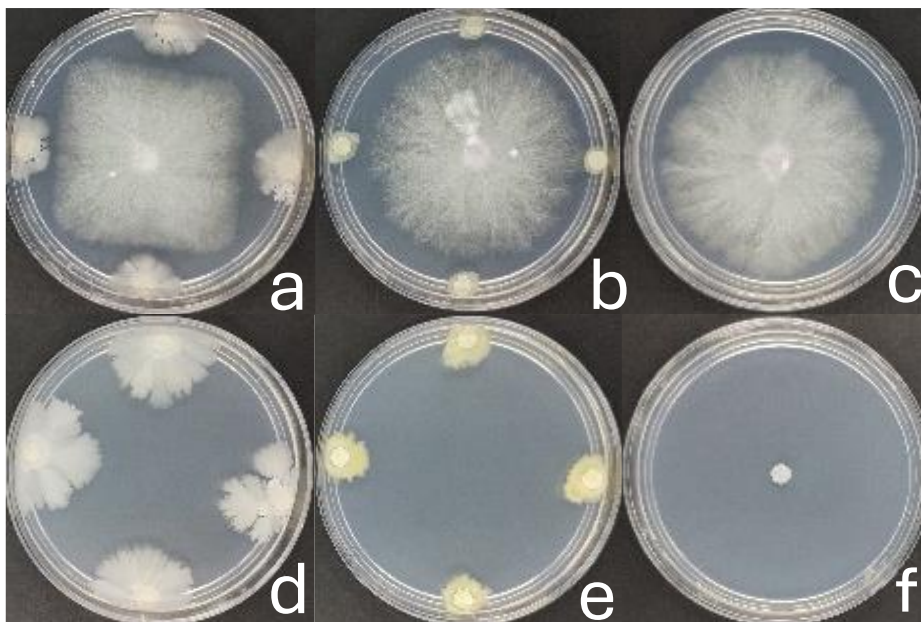


Figura 1. Confrontaciones *in vitro* en placas de PDA. a) *Bacillus subtilis* vs *Fusarium oxysporum*; b) *Bacillus pumilus* vs *Fusarium oxysporum*; c) *Fusarium oxysporum*; d) *Bacillus subtilis*; e) *Bacillus pumilus* y f) control.

Los tratamientos que evaluaron el antagonismo mostraron reducciones significativas en el crecimiento de *Fol* con ambas cepas, las cuales mostraron un desempeño similar al inhibir el crecimiento de este patógeno durante los siete días de evaluación (Cuadro 2).

Bacillus pumilus redujo el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, aunque de acuerdo con la Figura 1, su efecto no fue igual de contundente que *Bacillus subtilis*, las colonias de esta cepa se observan con mayor crecimiento, el tratamiento de *B. subtilis* vs. *Fol* tuvo una disminución de crecimiento del patógeno del 42 %, el tratamiento con *B. pumilus* vs. *Fol* mostró una disminución menor del patógeno la cual fue del 31 %. Aun así, esto no excluye la posibilidad de que tenga la capacidad para activar genes de resistencia a enfermedades, como en el caso de la investigación realizada por Kim et al. (2023); quienes encontraron que la bacteria *Brevibacillus* cepa B-4359 no antagonizó directamente a hongos patogénicos como *Fol* y *Colletotrichum*, tampoco inhibió la germinación de esporas, pero sí indujo la expresión del gen de respuesta sistémica de la planta CaPR1 (Kim et al., 2023).

Cuadro 2. Comparación de medias del halo de inhibición entre las colonias de *Fusarium oxysporum* y las especies antagónicas de *Bacillus* a los 3, 4, 5, 6 y 7 días después de la incubación.

Tratamiento	Diámetro de crecimiento (mm)									
	3 días		4 días		5 días		6 días		7 días	
Blanco	6.00	D ^z	6.00	E	6.00	D	6.00	D	6.00	D
<i>Fol</i>	34.77	A	40.72	A	50.38	A	60.94	A	70.16	A
Bs	20.81	B	24.06	BC	26.78	B	29.21	B	30.87	B
Bp	8.59	CD	9.27	DE	10.55	CD	11.68	CD	12.73	CD
Bs vs. <i>Fol</i>	20.77	B	24.54	B	26.37	B	28.12	B	29.65	B
Bp vs. <i>Fol</i>	12.51	C	15.37	CD	17.38	BC	19.51	BC	21.51	BC
C.V	36.50		42.24		44.65		47.84		49.87	
DMSH	6.50		8.78		10.41		12.35		13.94	

^zLas letras en la misma columna indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). *Fol*: *Fusarium oxysporum*; Bs: *Bacillus subtilis*; Bp: *Bacillus pumilus*.

Los resultados de este experimento mostraron que *Bacillus pumilus* ATCC 700814 y *Bacillus subtilis* QST-713 tuvieron un efecto antagónico contra *Fol*. Bouchard-Rochette et al. (2022) han informado que hay capacidad antagónica por parte de *B. pumilus* PTB180 y *B. subtilis* PTB185 contra *Fusarium oxysporum*, debido a la producción de surfactinas (ambas cepas) así como iturina y fengicina (*B. subtilis*). En esta misma investigación también se reportó que inhibieron el crecimiento de varios patógenos de plantas, incluidos *Botritis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* y *Phytophthora capsici*.

Es altamente probable que los efectos observados en este experimento de antagonismo sean debido a que las bacterias del género *Bacillus* producen varios metabolitos y moléculas que median la antibiosis, dedicando el 5-10 % del genoma total a su biosíntesis (Fira et al., 2018), las bacteriocinas (péptidos ribosómicos); actúan destruyendo la pared celular o alterando la membrana citoplasmática (Caulier et al., 2019; Karačić et al., 2024) lo cual las hace eficientes para la competencia *in vitro* contra hongos fitopatógenos. La realización de este experimento mostró la capacidad

de *Bacillus pumilus* ATCC 700814 y *Bacillus subtilis* QST 713 para contrarrestar el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Evaluación fenotípica en invernadero

El análisis de varianza arrojó diferencias significativas en los factores de Genotipo (GE), Bacteria (BA) y *Fusarium oxysporum* (Fol) en todas las variables (Cuadro 2), en las interacciones Bacteria-Genotipo se mostraron diferencias significativas a los tres y seis días después de la inoculación. El área bajo la curva del progreso de la enfermedad mostró diferencias en todos los factores de variación.

Cuadro 3. Análisis de varianza de las 18 combinaciones de tres genotipos de tomate, tratados con dos diferentes cepas de *Bacillus* e inoculados con *Fusarium oxysporum* y tres niveles de *Bacillus*.

FV	GL	MSH (g)	MST (g)	AF (cm ²)	Alturas (cm)			ABCPE
					3 DDI	6 DDI	9 DDI	
GE	2	0.308 **	0.043 **	20070.4 **	33.46 **	15.92 **	11.59 **	42.26 **
BA	2	0.113 **	0.023 **	5553.4 **	22.99 **	25.38 **	17.02 **	174.13 **
Fol	1	6.822 **	0.418 **	326338.9 **	0.07	126.20 **	177.81 **	1887.52 **
BAxGE	4	0.004	0.001	373.8	2.07 *	2.05 *	1.10	31.39 **
FolxBA	2	0.013	0.000	114.4	0.24	0.15	0.04	174.13 **
FolxGE	2	0.063 *	0.010 **	2490.3 *	1.04	0.23	0.06	42.26 **
FolxBAxGE	4	0.015	0.002	1195.1	0.47	0.37	0.56	31.39 **
CV		13.560	13.882	12.2	13.43	12.12	11.49	109.21
Media		0.876	0.289	207.2	6.22	7.45	8.24	2.09

*Significativo con $P \leq 0.05$; ** Significativo con $P \leq 0.01$; FV: Factor de variación; GL: Grados de libertad; CV: Coeficiente de variación; MSH: Materia seca de hoja; MST: Materia seca de tallo; AF: Área foliar; DDI: Días después de la inoculación; ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

Se observó que la materia seca de hojas fue menor en las plantas tratadas con *B. pumilus* y *B. subtilis* en un intervalo de 14 y 15 % ($P \leq 0.05$), en comparación con las plántulas no tratadas (Cuadro 4). Un efecto similar se midió en la materia seca de tallo, área foliar y alturas a los 9 días después de la inoculación (DDI), las plántulas tratadas con *B. subtilis* y *B. pumilus* mostraron un 40 % y 67 % de severidad de la enfermedad respectivamente.

Cuadro 4. Comparación de medias de materia seca, hoja y tallo, área foliar, alturas a los 3, 6 y 9 días después de la inoculación con *Fusarium oxysporum*, severidad de la enfermedad (ABCPE), en plántulas de tomate inoculadas con *Bacillus pumilus* y *B. subtilis*.

BA	MSH (g)	MST (g)	AF (cm ²)	Alturas (cm)			ABCPE
				3 DDI	6 DDI	9 DDI	
Blanco	0.967 A ^z	0.330 A	227.470 A	6.596 A	7.858 A	8.664 A	3.257 A
<i>B. pumilus</i>	0.835 B	0.272 B	197.955 B	5.7993 C	7.026 C	7.881 B	1.073 C
<i>B. subtilis</i>	0.825 B	0.266 B	196.225 B	6.254 B	7.469 B	8.169 B	1.941 B
DMSH	0.097	0.033	20.689	0.232	0.251	0.305	0.633

^zLetras mayúsculas diferentes en la misma columna, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$; BA: Bacteria; MSH: Materia seca de hoja; MST: Materia seca de tallo; AF: Área foliar; DDI: Días después de la inoculación; ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta.

El híbrido produjo una menor cantidad de materia seca de hoja y tallo con respecto a los otros dos genotipos evaluados. Este mismo comportamiento se observó en el resto de las variables evaluadas (Cuadro 5). Los genotipos 69/47 y 47/47 fueron los más altos y con mayor área foliar, las diferencias fueron significativas ($P \leq 0.05$).

Cuadro 5. Comparación de medias de materia seca, hoja y tallo, área foliar, alturas a los 3,6 y 9 días después de la inoculación con *Fusarium oxysporum*, severidad de la enfermedad (ABCPE), en tres genotipos de plántulas de tomate.

GE	MSH (g)	MST (g)	AF (cm ²)	Alturas (cm)			ABCPE
				3 DDI	6 DDI	9 DDI	
69/47	0.966 A ^z	0.319 A	231.017 A	6.427 A	7.565 A	8.407 A	2.316 A
47/47	0.936 A	0.315 A	221.593 A	6.557 A	7.714 A	8.449 A	2.487 A
H1	0.726 B	0.233 B	169.047 B	5.665 B	7.080 B	7.862 B	1.472 B
DMSH	0.097	0.033	20.689	0.236	0.251	0.305	0.633

^zLetras mayúsculas diferentes en la misma columna, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$; GE: Genotipo; H1: Híbrido; MSH: Materia seca de hoja; MST: Materia seca de tallo; AF: Área foliar; DDI: Días después de la inoculación; ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta.

La materia seca de hoja y tallo, y el área foliar mostraron una disminución en las plántulas inoculadas con *Fusarium oxysporum* entre 58, 47 y 56 %, respectivamente ($P \leq 0.05$) (Cuadro 6). Las alturas mostraron una disminución significativa hasta el día 6 del 14 % y a los 9 días fue del 17 %.

Cuadro 6. Comparación de medias de materia seca, hoja y tallo, área foliar, alturas a los 3, 6 y 9 días después de la inoculación con *Fusarium oxysporum*, severidad de la enfermedad (ABCPE), en plántulas de tomate sin inocular e inoculadas con *Fol*.

Fol	MSH (g)	MST (g)	AF (cm ²)	Alturas (cm)			ABCPE
				3 DDI	6 DDI	9 DDI	
S	1.231 A	0.377 A	284.958 A	6.229 A	7.990 A	8.974 A	0.001 B

I	0.520 B	0.201 B	129.480 B	6.204 A	6.912 B	7.491 B	4.181 A
DMSH	0.066	0.022	14.010	0.158	0.171	0.208	0.432

*Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$; *Fol*: *Fusarium oxysporum*; S: Sin inoculación con *Fol*; I: inoculación con *Fol*; MSH: Materia seca de hoja; MST: Materia seca de tallo; AF: Área foliar; DDI: Días después de la inoculación; ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad; DMSH: Diferencia mínima significativa honesta.

La interacción de *Fol* y los genotipos 69/47, 47/47 e híbrido (Cuadro 7) mostraron tener efecto en todas las variables, las plántulas de los tres genotipos mostraron una disminución de materia seca de hojas y tallos, así como en el área foliar. Los genotipos 69/47 y 47/47 tuvieron una disminución del 58 % de materia seca de hoja, el híbrido solo tuvo una disminución del 56 %. En la variable de materia seca de tallo el genotipo que mostro una menor disminución fue el Híbrido y el más afectado por *Fol* fue 47/47, en el área foliar los genotipos 69/47, 47/47 y H1, tuvieron un comportamiento similar, una disminución del 55, 52 y 56 % respectivamente. Los genotipos solo mostraron cambios en la altura hasta los 6 días después de la inoculación, la severidad de la enfermedad fue menor en H1 con respecto a los otros genotipos.

Cuadro 7 Comparación de medias de la interacción de *Fusarium oxysporum* (*Fol*) y tres genotipos (GE) de tomate.

Fol	GE	MSH (g)	MST (g)	AF (cm²)	Alturas (cm)				ABCPE
					3 DDI	6 DDI	9 DDI		
S	69/47	1.36 A ^z	0.42 A	320.10 A	6.535 A	8.118 A	9.12 AB	0.01 C	
I	69/47	0.57 C	0.22 C	141.93 C	6.319 A	7.013 C	7.68 C	4.63 A	
S	47/47	1.32 A	0.42 A	300.13 A	6.544 A	8.204 A	9.202 A	0.01 C	
I	47/47	0.55 C	0.21 C	143.10 C	6.569 A	7.210 C	7.672 C	4.97 A	
S	H1	1.01 B	0.29 B	234.65 B	5.608 B	7.647 B	8.598 B	0.01 C	
I	H1	0.44 C	0.17 C	103.45 D	5.722 B	6.496 D	7.101 D	2.94 B	

^zLetras mayúsculas diferentes en la misma columna, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$; *Fol*: *Fusarium oxysporum*; S: Sin inoculación con *Fol*; I: inoculación con *Fol*; GE: Genotipo; H1: Híbrido; MSH: Materia seca de hoja; MST: Materia seca de tallo; AF: Área foliar; DDI: Días después de la inoculación; ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

Los genotipos 69/47 y 47/47 mostraron una mayor sensibilidad al patógeno, mientras que H1 mostró una mayor resistencia a la severidad de la enfermedad causada por *Fol* (Cuadro 8). El genotipo 47/47 al ser tratado con *B. subtilis* y *B. pumilus* mostró 33 y 70 % de severidad de la enfermedad respectivamente.

Cuadro 8 Comparación de medias en la interacción de tres genotipos de tomate y dos bacterias (*Bacillus subtilis* y *B. pumilus*).

Alturas (cm)			
--------------	--	--	--

GE	BA	MSH	MST	AF	3 DDI	6 DDI	9 DDI	ABCPE
69/47	Blanco	1.088 A ^z	0.369 A	249.78 A	6.654 AB	7.875 A	8.771 A	4.26 A
	<i>B. pumilus</i>	0.903 ABC	0.295 AB	229.66 AB	6.138 B	7.152 BCD	7.944 BC	1.24 CD
	<i>B. subtilis</i>	0.905 ABC	0.294 AB	213.61 AB	6.490 AB	7.669 AB	8.486 AB	1.45 CD
47/47	Blanco	1.017 AB	0.345 AB	238.59 AB	6.825 A	7.981 A	8.767 A	3.80 AB
	<i>B. pumilus</i>	0.907 ABC	0.293 AB	213.63 AB	6.129 B	7.259 BC	8.094 ^{AB} _C	1.12 CD
	<i>B. subtilis</i>	0.885 ABC	0.307 AB	212.56 AB	6.717 A	7.881 A	8.450 AB	2.53 BC
H1	Blanco	0.796 BC	0.276 BC	194.06 BC	6.309 AB	7.719 AB	8.428 AB	1.71 CD
	<i>B. pumilus</i>	0.696 C	0.208 C	150.58 C	5.131 C	6.638 D	7.548 C	0.87 D
	<i>B. subtilis</i>	0.686 C	0.215 C	162.51 C	5.556 C	6.858 CD	7.572 C	1.84 CD

^zLetras mayúsculas diferentes en la misma columna, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$; BA: Bacteria; GE: Genotipo; MSH: Materia seca de hoja; MST: Materia seca de tallo; AF: Área foliar; DDI: Días después de la inoculación; ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

En el Cuadro 9, se observó que la materia seca de hoja fue menor en las plántulas de tomate inoculadas con *F. oxysporum* del genotipo 69/47, entre 61, 58 y 52 %, en las condiciones de tratamiento del inductor Blanco (testigo), *B. pumilus* y *B. subtilis*, respectivamente. Así mismo la materia seca de tallo también fue menor en los tres genotipos inoculados con el patógeno y el área foliar mostró ser mayor en este genotipo. Este experimento mostró una disminución de la materia seca de tallo y hoja en los tratamientos inoculados con *Fol*. De acuerdo con los estudios de Abdelaziz et al. (2022), el crecimiento vegetativo (altura de planta, número de hojas, tamaño de tallo y longitud de brotes) del tomate se redujo significativamente debido a *F. oxysporum*.

Cuadro 9 Comparación de medias, en la interacción de tres genotipos de tomate, dos bacterias (*Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*) y *Fusarium oxysporum*.

GE	BA	Fol	MSH	MST	AF	Alturas (cm)			ABCPE
						A1	A2	A3	
69/47	Blanco	S	1.564 A ^z	0.483 A	355.15 A	6.871 A	8.459 A	9.617 A	0.001 D
		I	0.612 DC	0.255 D-G	144.40 E	6.438 AB	7.292 DE	7.925 E-H	8.521 A
	<i>B. pumilus</i>	S	1.277 AB	0.377 A-D	316.61 AB	6.158 ABC	7.683 A-D	8.617 A-F	0.001 D
		I	0.530 D	0.213 E-H	142.72 E	6.117 ABC	6.621 EFG	7.272 GHI	2.479 C
	<i>B. subtilis</i>	S	1.244 AB	0.384 ABC	288.54 ABC	6.575 A	8.213 ABC	9.128 A-D	0.001 D
		I	0.566 D	0.204 E-H	138.68 E	6.404 AB	7.125 DEF	7.844 E-I	2.896 BC
47/47	Blanco	S	1.434 A	0.454 A	322.07 AB	6.779 A	8.429 AB	9.444 AB	0.001 D
		I	0.601 D	0.236 E-H	155.12 ED	6.871 A	7.533 B-E	8.089 D-G	7.604 A
	<i>B. pumilus</i>	S	1.266 AB	0.389 ABC	288.91 ABC	6.025 ABC	7.658 A-D	8.811 A-E	0.001 D

	I	0.548 D	0.198 FGH	138.34 E	6.233 ABC	6.860 D-G	7.378 GHI	2.229CD
<i>B. subtilis</i>	S	1.258 AB	0.423 AB	289.41 ABC	6.829 A	8.525 A	9.350 ABC	0.001 D
	I	0.511 D	0.190 FGH	135.71 E	6.604 A	7.238 DEF	7.550 F-I	5.063 B
Blanco	S	1.054 B	0.325 B-E	244.90 BC	6.263 ABC	8.317 AB	9.094 A-D	0.001 D
	I	0.537 D	0.227 E-H	143.22 E	6.354 AB	7.121 DEF	7.761 E-I	3.417BC
H1 <i>B. pumilus</i>	S	1.019 B	0.287 C-F	223.41 CD	5.113 D	7.233 DEF	8.372 B-G	0.001 D
	I	0.372 D	0.129 H	77.74 E	5.150 D	6.042 G	6.725 I	1.729CD
<i>B. subtilis</i>	S	0.966 BC	0.271 C-G	235.63 C	5.450 CD	7.392CDE	8.328 C-G	0.001 D
	I	0.407 D	0.158 GH	89.38 E	5.663BCD	6.325 FG	6.817 HI	3.688BC

^zLetras mayúsculas diferentes en la misma columna, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$; GE: Genotipo; H1: Híbrido; BA: Bacteria; *Fol*: *Fusarium oxysporum*; S: sin inoculación; I: inoculación con *Fol*; MSH: Materia seca de hoja; MST: Materia seca de tallo; AF: Área foliar; DDI: Días después de la inoculación; ABCPE: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

Es probable que la destrucción de los rasgos de crecimiento vegetativo puede estar relacionada con factores como la alteración hormonal, la explosión oxidativa, el control de patógenos sobre el contenido celular, lo cual puede provocar la alta presión osmótica (Kang et al., 2021; Abdelaziz et al., 2022). Estudios previos han demostrado que la aplicación de bacterias del género *Bacillus* mejoran las características morfológicas del tomate y bioestimulan la resistencia de las plántulas a condiciones de estrés biótico (Kumar & Tabassum, 2019; Ramírez et al., 2022; Dobrzyński et al., 2023), sin embargo en este estudio la inoculación con ambos microorganismos pudo representar un estrés debido a la edad de las plántulas, lo cual sugiere que este experimento debería evaluarse por más tiempo y con plantas adultas. De acuerdo con los resultados de Syed et al. (2021) la inoculación con *Fol* y con una cepa de *Bacillus* puede aumentar la altura de la planta y la materia seca, con una suspensión de esporas de 1×10^6 conidias/mL, después de 14 días, lo cual sugiere que la inoculación con el patógeno en este experimento fue alta (1×10^8 conidias/mL) y no permitió que las bacterias benéficas tuvieran un efecto promotor del crecimiento vegetal en las plántulas.

Los informes de Bouchard-Rochette et al. (2022) mostraron que *B. subtilis* y *B. pumilus* tienen capacidad de biocontrol contra *Botrytis cinérea* en plantas adultas de tomate en condiciones de invernadero y que las bacterias pueden sobrevivir en la planta hasta

21 días, estos resultados sugieren que las cepas de este estudio podrían ser una alternativa para otros hongos patógenos, no solo *Fol*.

Los resultados de la severidad de la enfermedad fueron una guía para identificar si había posibilidad de que se activaran las vías de resistencia sistémica en las plantas tratadas con las bacterias, así mismo informaron que *Fol* muestra un efecto destructivo en las plántulas de tomate, las cuales mostraron los síntomas típicos de marchitez.

Efecto de *Fusarium oxysporum* sobre la integridad de ARN total extraído de raíces de plántulas de tomate

Se extrajo ARN de las raíces de las plántulas de tomate (Figura 2) así como de las hojas (Figura 3), el ARN extraído de raíz mostró degradación a comparación del ARN extraído de hojas. Los tratamientos control de cada genotipo no mostraron degradación (banda 1, 7, 13). Los tratamientos que fueron inoculados con *Fusarium oxysporum* mostraron ARN degradado (banda 3, 4, 6, 9, 10, 12, 15 16, 18), no se encontraron reportes de degradación de ARN causada por *Fol*, pero se han indicado que *Fusarium oxysporum* está relacionado con la degradación de componentes estructurales de la raíz. Se tienen registros que *Ustilago maydis*, hongo fitopatógeno del maíz, secreta ribonucleasas que podrían funcionar como factores de virulencia en la degradación de ARN del huésped (Blank & Dekker, 1975, Göhre et al., 2013).

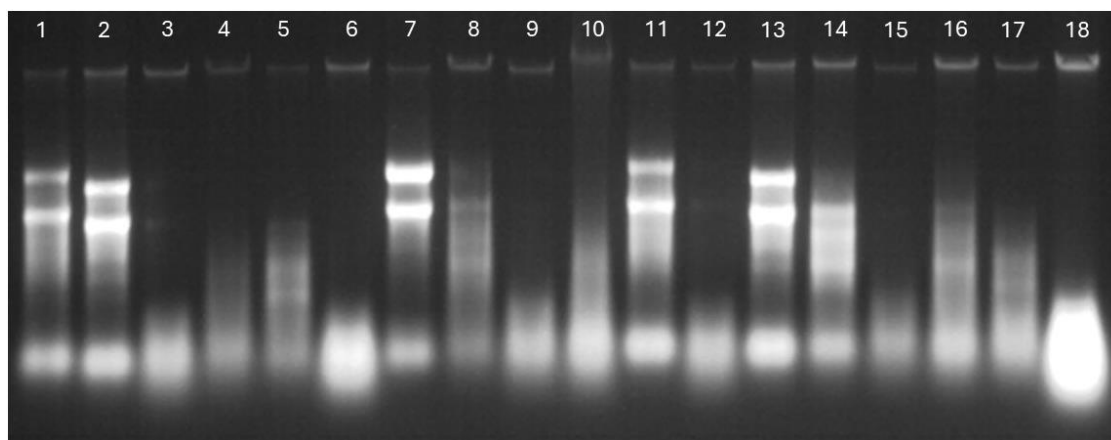


Figura 2. ARN extraído de raíces 24 horas después de la inoculación con *Fol*. Tratamientos: 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (*Bacillus subtilis*); 3) 69/47 (*Fusarium oxysporum*); 4) 69/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 5) 69/47 (*Bacillus pumilus*); 6) 69/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (*Bacillus subtilis*); 9) 47/47 (*Fusarium oxysporum*); 10) 47/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 11) 47/47 (*Bacillus pumilus*); 12) 47/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (*Bacillus subtilis*); 15) Híbrido (*Fusarium oxysporum*); 16)

Híbrido (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 17) Híbrido (*Bacillus pumilus*); 18) Híbrido (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*).

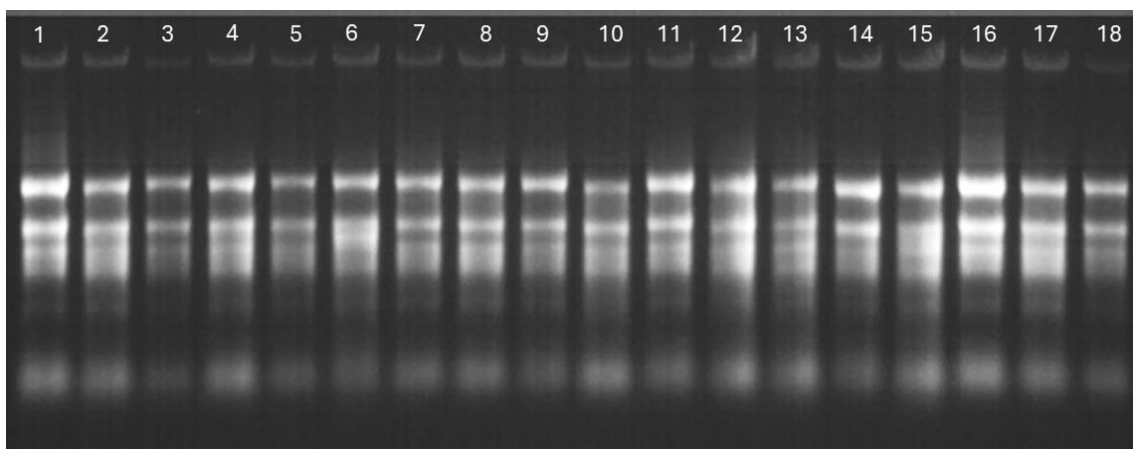


Figura 3. ARN extraído de hojas 24 horas después de la inoculación con *Fol*. Tratamientos: 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (*Bacillus subtilis*); 3) 69/47 (*Fusarium oxysporum*); 4) 69/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 5) 69/47 (*Bacillus pumilus*); 6) 69/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (*Bacillus subtilis*); 9) 47/47 (*Fusarium oxysporum*); 10) 47/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 11) 47/47 (*Bacillus pumilus*); 12) 47/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (*Bacillus subtilis*); 15) Híbrido (*Fusarium oxysporum*); 16) Híbrido (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 17) Híbrido (*Bacillus pumilus*); 18) Híbrido (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*).

F. oxysporum generalmente invade desde las heridas de la raíz de la planta huésped, o directamente a través de la epidermis de la raíz y los pelos radicales dañando la pared celular para ingresar a la planta huésped y colonizar los vasos del xilema de las raíces y los tallos (Zhang et al., 2021; Zhu et al., 2017). En este experimento la raíz solo se expuso al patógeno por 30 segundos, lo cual, aumenta la posibilidad de que el hongo dañó la pared celular para colonizar a la plántula.

La pared celular de la planta es la primera barrera que se encuentra cuando los patógenos infectan las plantas y está compuesta principalmente de componentes como pectinas, hemicelulosas, celulosas y β -1, 3- glucanos (Zhang et al., 2021). Los patógenos secretan enzimas degradadoras de la pared celular, como pectinasas, celulasas, hemicelulasas y ligninasas, para penetrar la pared celular de la planta (Kubicek et al., 2014; Zhang et al., 2021). La defensa de la planta se dirige a la biología del ARN fúngico y viceversa, los patógenos suprimen el silenciamiento del ARN del huésped durante la protección de la planta (Göhre et al., 2013).

Los efectos observados en este experimento probablemente se deban a que tras la infección, el patógeno suprimió la inmunidad del huésped liberando micro ARN dentro del sistema inmunológico de la planta para la progresión de la enfermedad, sin embargo, las plantas también pueden iniciar la expresión de genes de resistencia y ARN pequeños que se dirigen a genes vitales del patógeno para detener la colonización del mismo, este es el principal ejemplo de comunicación cruzada entre dos reinos distintos, que implica una competición por la supervivencia (Chauhan & Rajam, 2022). Otra posible causa se deba a la necrosis inducida, la cual, puede ser el resultado de la muerte celular programada después del reconocimiento del patógeno en una interacción incompatible (donde se produjo una respuesta hipersensible) o de la muerte celular causada por la acción del patógeno en una interacción compatible (Camarena-Gutiérrez & Torre-Almaráz, 2007). Las proteínas intercambiadas mutuamente entre patógeno y hospedante actúan sobre los componentes del ARN de la vía de defensa-virulencia de la planta, por lo cual, la biología del ARN surge como un campo de investigación importante con el potencial de identificar puntos clave en la patogenicidad de los hongos con interés agrícola (Göhre et al., 2013).

Activación de las vías de RSI y RSA en plántulas

Para determinar si la aplicación de *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* contra *Fol* estaba asociada con la inducción de genes relacionados con la defensa se seleccionaron y diseñaron iniciadores para monitorear la expresión de dos genes, uno para la vía RSI (GLUB) y otro para la vía RSA (PR1), se extrajo ADNc y se analizaron sus niveles de expresión mediante RT-qPCR. La inoculación de las plántulas con las bacterias benéficas fue en condiciones *in vitro* (Figura 4), con cuatro plántulas en cada tubo, con lo cual se evitó la contaminación por otros microorganismos, después de 48 horas, las plántulas se inocularon por 30 segundos con *Fol* y se colocaron en placas de medio MS sólido durante 24 horas (Figura 5) posteriormente se realizó la extracción de ARN. Se seleccionaron dos genes de defensa de las plantas, los cuales están relacionados con la patogénesis (PR) que representan las vías de señalización del ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA), para el presente estudio para evaluar la actividad inductora de dos cepas de *Bacillus*. La glucanasa, un miembro de la familia PR-2, es

conocida por romper las paredes celulares de los hongos fitopatógenos al hidrolizar los enlaces glucósidos B-1,3 en las moléculas de glucano (Osei-Obeng et al., 2024).



Figura 4. Plántulas de tomate en cultivo *in vitro*, después de la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*.



Figura 5. Plántulas de tomate en cultivo *in vitro*, después de la inoculación con *Fusarium oxysporum* en cajas Petri con medio MS.

Para comprobar la integridad del ADNc se realizó corrimiento electroforético de muestras de ARN de tomate tratadas con DNasa_(Anexos, Figura 8), un análisis por PCR para comprobar la eliminación del ADN genómico (Anexos, Figura 9) y la amplificación del gen ACT por PCR del ADNc de los 18 tratamientos (Anexos, Figura 10). Los niveles de expresión relativos de los genes relacionados con la defensa a las 24 horas después de la inoculación con el patógeno se resumen en las Figuras 6 y 7.

Los niveles de transcripción de PR1 que codifica las vías de resistencia sistémica adquirida se analizaron a las 24 horas después de la inoculación con *Fol* (Figura 6). El análisis de la expresión de genes por RT-qPCR mostró que a comparación con el tratamiento control (Blanco), hubo una regulación positiva en los tratamientos inoculados con *B. subtilis* vs. *Fol*, con los genotipos 47/47 y H1, en los tratamientos inoculados *B. pumilus* vs. *Fol*, con el genotipo 69/47 también se mostró una regulación

positiva. El H1 mostró una mayor expresión relativa de PR1 con la inoculación de *Fol*, con respecto a los genotipos 69/47 y 47/47. Las proteínas PR son producidas por las plantas en respuesta a la invasión de patógenos o estímulos no biológicos, cuando se someten a estrés biótico, los niveles de expresión de los genes PR aumentan rápidamente, por lo cual, son utilizados como marcadores para detectar la activación inmune de las plantas (Zhao et al., 2024), emplear PR1 mostró que no solo el estímulo de las bacterias benéficas es suficiente para activar la respuesta inmune de la planta sino también la infección con el patógeno, esto se puede observar con un mejor efecto en los genotipos 47/47 y 69/47.

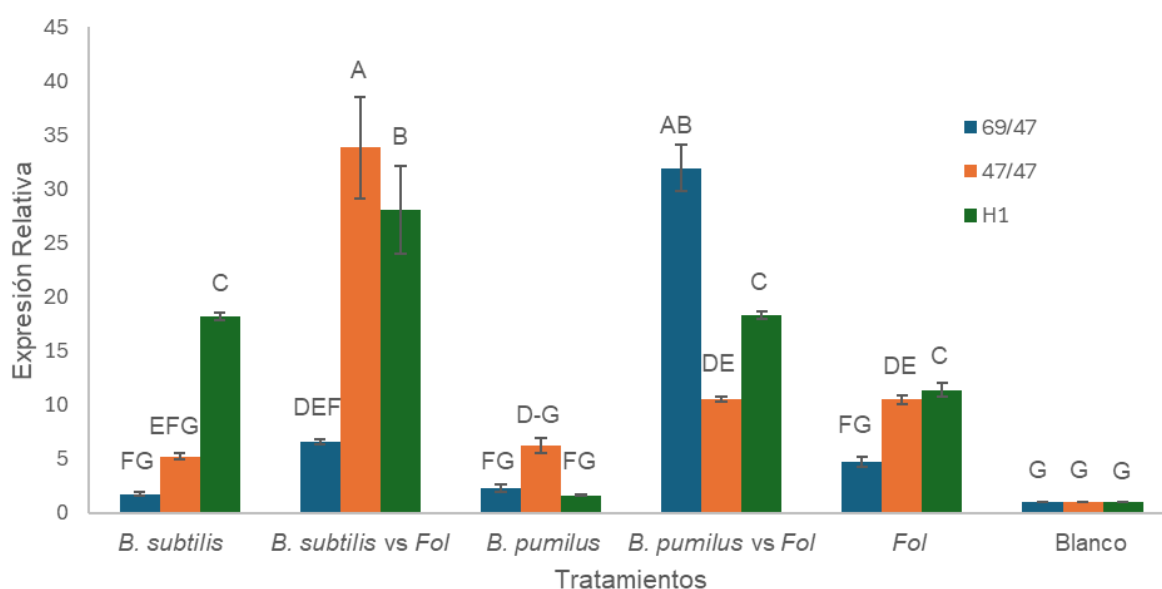


Figura 6. Expresión relativa de PR1, vía de la Resistencia sistémica adquirida (RSA). Genotipos de tomate: 69/47, 47/47 e Híbrido (H1). *B.*: *Bacillus*; *Fol*: *Fusarium oxysporum*.

*Letras mayúsculas diferentes en el mismo tratamiento, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$.

Los niveles de transcripción de GLUB que codifica las vías de resistencia sistémica inducida se analizaron a las 24 horas después de la inoculación con *Fol* (Figura 7). En comparación con el tratamiento control (Blanco), se observó una regulación positiva en los tratamientos inoculados con *B. subtilis* vs. *Fol*, con el Híbrido, en los tratamientos inoculados *B. pumilus* vs. *Fol*, con el tratamiento 47/47 también mostró una regulación positiva. Los resultados de RT-qPCR revelaron que la infección causada por *Fol* así como la aplicación de *B. subtilis* indujeron niveles de expresión de los dos genes. El tratamiento 2 de H1 mostró una expresión relativa de 46.4 con respecto al tratamiento control y el tratamiento 4 con el genotipo 69/47 exhibió los niveles más altos, con una

expresión relativa de 51.58 en comparación con el grupo control (Figura 7). Singh et al. (2021) documentaron que *Chaetomium globosum*, activa la RSI en plantas de tomate a ser invadidas con patógenos como *Fol*, al evaluar al gen GLUB no mostró una expresión relativa a las 24 horas, pero a las 48 horas aumentó la expresión a 2.5.

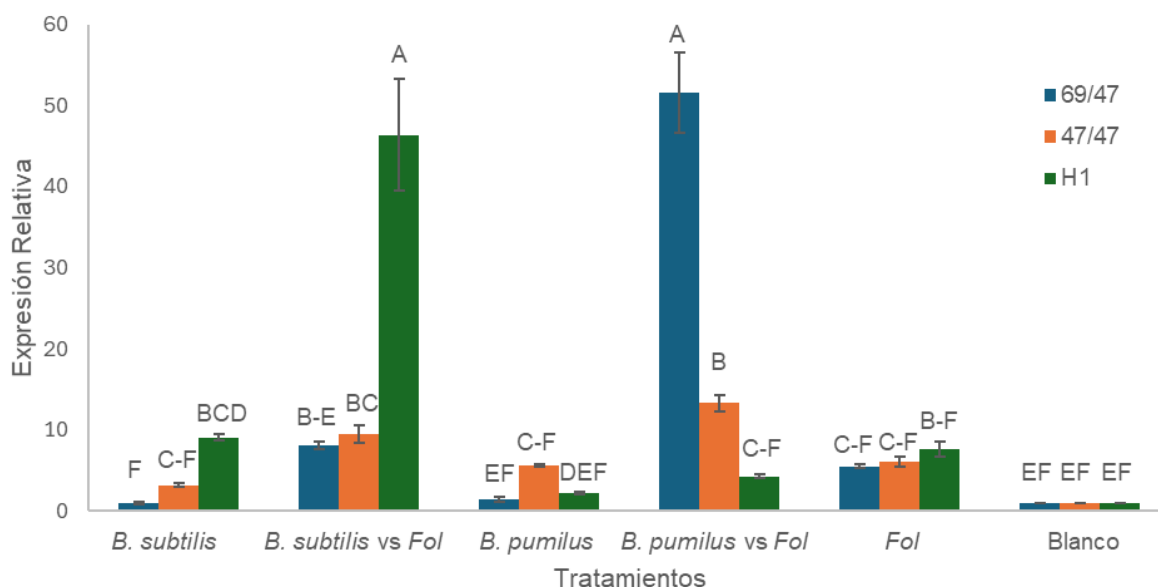


Figura 7. Expresión relativa de GLUB, vía de la Resistencia sistémica inducida (RSI). Genotipos de tomate: 69/47, 47/47 e Híbrido (H1). *B.*: *Bacillus*; *Fol*: *Fusarium oxysporum*.

*Letras mayúsculas diferentes en el mismo tratamiento, muestra diferencia significativa con $P \leq 0.05$.

Cuando las plantas reconocen patógenos invasores, señales de heridas o estrés abiótico, se provoca un estado de preparación de defensa mejorada, sin embargo, la preparación de defensa también puede ser inducida por algunas sustancias químicas orgánicas o sintéticas, en el estado de preparación, las plantas responden al estrés biótico con una activación más rápida y una defensa eficiente, lo cual a menudo está relacionado con la inmunidad (Conrath et al., 2015), considerando que la inoculación no implicó un daño a la raíz es factible considerar que tanto *B. subtilis* como *B. pumilus* secretaron enzimas relacionadas con las fitohormonas SA, ET y JA para inducir la resistencia sistémica.

Se ha encontrado que las vías de señalización de defensa del tomate pueden depender de la dosis de aplicación de un inóculo bacteriano, la aplicación de *Bacillus amyloliquefaciens* activó los genes sensibles al SA; una dosis más alta activó la señalización del JA y ET, la dosis correcta logró inducir la comunicación sinérgica entre

ambas vías de resistencia sistémica (Dimopoulou et al., 2019; Karačić et al., 2024). La inoculación de ambas cepas con una concentración 1×10^8 UFC mL⁻¹ fue adecuada para inducir la RSI y la RSA.

Es posible que la mezcla de ambas cepas de *Bacillus* podría aumentar la RSI y RSA contra *Fol*, estudios previos han reportado que la aplicación de consorcios de *Bacillus pumilus* y *Bacillus amyloliquefaciens* suprimen con mayor eficiencia las enfermedades causadas por hongos fitopatológicos como en plántulas de arroz en comparación con la aplicación individual de cada bacteria (Nan et al., 2024), esto también podría ser una opción para continuar la investigación con consorcios de *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis* inoculados en los cultivos de tomate susceptibles a *Fol*.

CONCLUSIÓN GENERAL

La cepa de *Bacillus subtilis* tuvo un mayor efecto antagónico que *Bacillus pumilus* en condiciones *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Los tratamientos inoculados con *B. subtilis* y *B. pumilus* aumentaron la expresión de los genes PR1 y GLUB relacionados con las vías de RSA y RSI, respectivamente, por lo tanto, podrían utilizarse en campos agrícolas como agentes de control biológico durante un periodo mayor al evaluado y con plántulas con un desarrollo más avanzado. Además, la combinación de ambas cepas podría activar simultáneamente ambas vías de resistencia sistémica, así como aumentar el efecto antagónico contra *Fusarium oxysporum* al competir por nutrientes o evitar que este patógeno dañe la pared celular de la raíz, así mismo sería adecuado identificar los compuestos bioactivos que inhiben el crecimiento del patógeno en condiciones *in vitro* para determinar las vías metabólicas involucradas en su efecto antagónico ante *Fol*.

LITERATURA CITADA

- Abdelaziz, A. M., Kalaba, M. H., Hashem, A. H., Sharaf, M. H., & Attia, M. S. (2022). Biostimulation of tomato growth and biocontrol of *Fusarium* wilt disease using certain endophytic fungi. *Botanical Studies*, 63(1), Article 34. <https://doi.org/10.1186/s40529-022-00364-7>
- Abdelkhalek, A., Aseel, D. G., Király, L., Künstler, A., Moawad, H., & Alaskar, A. (2022). Induction of systemic resistance to tobacco mosaic virus in tomato through foliar application of *Bacillus amyloliquefaciens* strain TBorg1 culture filtrate. *Viruses*, 14(8), Article 1830. <https://doi.org/10.3390/v14081830>
- Abriouel, H., Franz, C. M., Ben Omar, N., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Adedayo, A. A., Babalola, O. O., Prigent-Combaret, C., Cruz, C., Stefan, M., Kutu, F., & Glick, B. R. (2022). The application of plant growth-promoting rhizobacteria in *Solanum lycopersicum* production in the agricultural system: A Review. *PeerJ*, 10, Article e13405. <https://doi.org/10.7717/peerj.13405>
- Ajilogba, C. F., & Babalola, O. O. (2013). Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. *Biocontrol Science*, 18(3), 117–127. <https://doi.org/10.4265/bio.18.117>
- Akram, W., Mahboob, A., & Javed, A. A. (2013). *Bacillus thuringiensis* strain199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3(4), 275-280. <https://doi.org/10.1556/eujmi.3.2013.4.7>
- Alazem, M., & Lin, N. S. (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology*, 16(5), 529–540. <https://doi.org/10.1111/mpp.12204>
- Ali, M. Y., Sina, A. A., Khandker, S. S., Neesa, L., Tanvir, E. M., Kabir, A., Khalil, M. I., & Gan, S. H. (2020). Nutritional composition and bioactive compounds in

- tomatoes and their impact on human health and disease: A Review. *Foods*, 10(1), Article 45. <https://doi.org/10.3390/foods10010045>
- Almeida, O. A. C., de Araujo, N. O., Dias, B. H. S., de Sant'Anna Freitas, C., Coerini, L. F., Ryu, C. M., & de Castro Oliveira, J. V. (2023). The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 951130. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.951130>
- Baard, V., Bakare, O. O., Daniel, A. I., Nkomo, M., Gokul, A., Keyster, M., & Klein, A. (2023). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis* against four *Fusarium* species. *Pathogens*, 12(2), Article 254. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020254>
- Blank, A., & Dekker, C. A. (1975). Differential activity staining: its use in characterization of guanylyl-specific ribonuclease in the genus *Ustilago*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(12), 4914–4917. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.12.4914>
- Bouchard-Rochette, M., Machrafi, Y., Cossus, L., Nguyen, T. T. A., Antoun, H., Droit, A., & Tweddell, R. J. (2022). *Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol ability against *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 170, Article 104925. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104925>
- Cadahia, C. (2000). *Fertirrigación, cultivos hortícolas y ornamentales* (2da. Ed.). Ediciones Mundi-prensa.
- Camarena-Gutiérrez, G., & Torre-Almaráz, R. de la. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13(2), 157-162. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-40182007000200157&lng=pt&tlng=es.
- Campbell, C. L., & Madden, L. V. (1990). *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley and Sons.

- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chae, D. H., Kim, D. R., Cheong, M. S., Lee, Y. B., & Kwak, Y. S. (2020). Investigating the induced systemic resistance mechanism of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) using DAPG hydrolase-transgenic *Arabidopsis*. *The plant pathology journal*, 36(3), 255–266. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2020.0031>
- Chauhan, S., & Rajam, M. V. (2022). RNAi-mediated down-regulation of fasciclin-like proteins (FoFLPs) in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* results in reduced pathogenicity and virulence. *Microbiological Research*, 260, Article 127033. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127033>
- Chávez, A. R., & Aquino Jara, A. S. (2012). Control de los hongos del suelo *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp. con extractos vegetales. *Investigación Agraria*, 14(1), 17-23. http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2305-06832012000100003&lng=en&tlng=es.
- Chitwood-Brown, J., Vallad, G. E., Lee, T. G., & Hutton, S. F. (2021). Breeding for resistance to *Fusarium* wilt of tomato: A Review. *Genes*, 12(11), Article 1673. <https://doi.org/10.3390/genes12111673>
- Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants--with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164(5), 493–513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Chulze, S. N. (2023). Agentes de control biológico de origen microbiano para reducir el impacto de hongos patógenos y toxicogénicos. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.02.001>
- Conrath, U., Beckers, G. J., Langenbach, C. J., & Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annual review of phytopathology*, 53, 97–119. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120132>

- Constantin, M. E., de Lamo, F. J., Vlieger, B. V., Rep, M., & Takken, F. L. W. (2019). Endophyte-mediated resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* is independent of ET, JA, and SA. *Frontiers in Plant Science*, 10, Article 979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00979>
- De Información Agroalimentaria Y Pesquera, S. (2022). *Reporte mensual de escenarios de 18 productos agroalimentarios 2022*. gob.mx. <https://www.gob.mx/siap/documentos/reportes-mensuales-de-escenarios-de-18-productos-agroalimentarios-2022>
- De Agricultura Y Desarrollo Rural, S. (2022). El jitomate, hortaliza mexicana de importancia mundial. gob.mx. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-jitomate-hortaliza-mexicana-de-importancia-mundial?idiom=es#:~:text=El%20jitomate%20es%20uno%20de,B1%2C%20B2%2C%20y%20C>.
- De Agricultura Y Desarrollo Rural, S. (2023) ¿Qué hay detrás de la producción de jitomate? *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. <https://www.gob.mx/agricultura>
- Di, X., Gomila, J., & Takken, F. L. W. (2017). Involvement of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling pathways in the susceptibility of tomato to *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 18(7), 1024–1035. <https://doi.org/10.1111/mpp.12559>
- Dimopoulou, A., Theologidis, I., Liebmann, B., Kalantidis, K., Vassilakos, N., & Skandalis, N. (2019). *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 differentially induces tomato defense signaling pathways depending on plant part and dose of application. *Scientific Reports*, 9(1), Article 19120. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55645-2>
- Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., Kulkova, I., Kowalczyk, P., & Kramkowski, K. (2023). Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1194606>

- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant pathogenic fungi. *Microbiology spectrum*, 5(1), Article 10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016>
- Dong, H., Gao, R., Dong, Y., Yao, Q., & Zhu, H. (2023). *Bacillus velezensis* RC116 inhibits the pathogens of bacterial wilt and fusarium wilt in tomato with multiple biocontrol traits. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), Article 8527. <https://doi.org/10.3390/ijms24108527>
- Doornbos, R.F., van Loon, L.C., & Bakker, P.A.H.M. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A Review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32, 227–243. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0028-y>
- El-Aswad, A. F., Aly, M. I., Alsahaty, S. A., & Basyony, A. B. A. (2023). Efficacy evaluation of some fumigants against *Fusarium oxysporum* and enhancement of tomato growth as elicitor-induced defense responses. *Scientific Reports*, 13(1), 2479. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29033-w>
- El-Sayed, M. H., Kobisi, A. E. A., Elsehemy, I. A., & El-Sakhawy, M. A. (2023). Rhizospheric-derived *Nocardiopsis alba* BH35 as an effective biocontrol agent actinobacterium with antifungal and plant growth-promoting effects: *in vitro* studies. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 607–620. <https://doi.org/10.4014/jmb.2301.01001>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 839–863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>

- Göhre, V., Haag, C., & Feldbrügge, M. (2013). RNA biology in fungal phytopathogens. *PLoS Pathogens*, 9(10), Article e1003617. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003617>
- Haghpanah, M., Jelodar, N. B., Zarrini, H. N., Pakdin-Parizi, A., & Dehestani, A. (2024). New insights into azelaic acid-induced resistance against *Alternaria Solani* in tomato plants. *BMC Plant Biology*, 24(1), Article 687. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05397-7>
- Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi Abd Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291–1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Holmes, E. C., Chen, Y. C., Sattely, E. S., & Mudgett, M. B. (2019). An engineered pathway for *N*-hydroxy-pipecolic acid synthesis enhances systemic acquired resistance in tomato. *Science Signaling*, 12(604), Article eaay3066. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aay3066>
- Hou, Y., Hsu, L., Wang, H., Lai, Y., & Chen, Y. (2020). Calcineurin regulates conidiation, chlamydospore formation and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Frontiers in Microbiology*, 11, Article 539702. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.539702>
- Jaiswal, A. K., Alkan, N., Elad, Y., Sela, N., Philosoph, A. M., Graber, E. R., & Frenkel, O. (2020). Molecular insights into biochar-mediated plant growth promotion and systemic resistance in tomato against *Fusarium* crown and root rot disease. *Scientific Reports*, 10(1), Article 13934. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70882-6>
- Jeong, H., Choi, S. K., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2014). Genome sequence of the plant endophyte *Bacillus pumilus* INR7, triggering induced systemic resistance in field crops. *Genome Announcements*, 2(5), Article e01093-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01093-14>

- Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Tran, L. P., & Ito, S. (2018). Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against *Fusarium* wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology*, 19(4), 870-882. <https://doi.org/10.1111/mpp.12571>
- Kamali, M., Guo, D., Naeimi, S., & Ahmadi, J. (2022). Perception of biocontrol potential of *Bacillus inaquosorum* KR2-7 against tomato *Fusarium* wilt through merging genome mining with chemical analysis. *Biology*, 11(1), 137. <https://doi.org/10.3390/biology11010137>
- Kang, S. G., Lee, K. E., Singh, M., Kumar, P., & Matin, M. N. (2021). Rice lesion mimic mutants (LMM): The current understanding of genetic mutations in the failure of ROS scavenging during lesion formation. *Plants*, 10(8), Article 1598. <https://doi.org/10.3390/plants10081598>
- Karačić, V., Miljaković, D., Marinković, J., Ignjatov, M., Milošević, D., Tamindžić, G., & Ivanović, M. (2024). *Bacillus* Species: Excellent biocontrol agents against tomato diseases. *Microorganisms*, 12(3), Article 457. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030457>
- Kaur, T., Rani, R., & Manhas, R. K. (2019). Biocontrol and plant growth promoting potential of phylogenetically new *Streptomyces* sp. MR14 of rhizospheric origin. *AMB Express*, 9(1), Article 125. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0849-7>
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D., & Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, Article 2363. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
- Kim, H., Lee, Y., Hwang, Y. J., Lee, M. H., Balaraju, K., & Jeon, Y. (2023). Identification and characterization of *Brevibacillus halotolerans* B-4359: a potential antagonistic bacterium against red pepper anthracnose in Korea. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1200023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1200023>

- Kim, T. J., & Lim, G. H. (2023). Salicylic acid and mobile regulators of systemic immunity in plants: Transport and metabolism. *Plants*, 12(5), Article 1013. <https://doi.org/10.3390/plants12051013>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, Article 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 427–451. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831>
- Kumar, A., & Tabassum, B. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291-1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Larkin, R. P., & Fravel, D. R. (2002). Effects of varying environmental conditions on biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. *Phytopathology*, 92(11), 1160–1166. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.11.1160>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, M., Taylor, P. W. J., Chen, D., Vaghefi, N., & He, J. Z. (2023). Major soilborne pathogens of field processing tomatoes and management strategies. *Microorganisms*, 11(2), Article 263. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020263>
- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020). The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, 8(7), Article 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>

- Nabi, R. B. S., Shahzad, R., Tayade, R., Shahid, M., Hussain, A., Ali, M., & Yun, B. (2021). Evaluation potential of PGPR to protect tomato against *Fusarium* wilt and promote plant growth. *PeerJ*, 9, Article e11194. <https://doi.org/10.7717/peerj.11194>
- Nan, J., Jiehua, Q., Dagang, T., Huanbin, S., Zhiquan, L., Hui, W., Shuwei, X., Huizhe, C., Meng, W., & Yanjun, K. (2024). Mixture of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus pumilus* modulates community structures of rice rhizosphere soil to suppress rice seedling blight. *Rice Science*. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2024.09.001>
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., & Niu, D. (2017). Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and *NPR1*-dependent signaling pathway and activates PAMP-Triggered immunity in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 238. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00238>
- Ngou, B. P. M., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2022). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *The Plant Cell*, 34(5), 1447–1478. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>
- Osei-Obeng, P., Kiirika, L. M., & Nyende, A. B. (2024). Antifungal activity of citral against *Fusarium* wilt in tomatoes and induction of the upregulation of glucanase, chitinase, and thaumatin-like protein plant defense genes. *Journal of Natural Pesticide Research*, Article 100097. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2024.100097>
- Pandey, C., Prabha, D., Negi, Y. K., Maheshwari, D. K., Dheeman, S., & Gupta, M. (2023). Macrolactin A mediated biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* infestation on *Amaranthus hypochondriacus* by *Bacillus subtilis* BS-58. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1105849. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1105849>
- Panno, S., Davino, S., Caruso, A.G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., Noris, E., & Matić, S. (2021). A review of the most common and economically important diseases that undermine the cultivation of tomato crop in the

Mediterranean basin. *Agronomy*, 11, Article 2188.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11112188>

Pazarlar, S., Madriz-Ordeñana, K., & Thordal-Christensen, H. (2022). *Bacillus cereus* EC9 protects tomato against *Fusarium* wilt through JA/ET-activated immunity. *Frontiers in Plant Science*, 13, Article 1090947.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1090947>

Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

Pye, M. F., Hakuno, F., Macdonald, J. D., & Bostock, R. M. (2013). Induced resistance in tomato by SAR activators during predisposing salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 4, Article 116. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00116>

Ramírez-Pool, J. A., Calderón-Pérez, B., Ruiz-Medrano, R., Ortiz-Castro, R., & Xoconostle-Cazares, B. (2024). *Bacillus* strains as effective biocontrol agents against phytopathogenic bacteria and promoters of plant growth. *Microbial Ecology*, 87(1), Article 76. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02384-1>

Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M. D. R., Catañeda-Antonio, D., Munive, J. A., & Baez, A. (2022). *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 470–482. <https://doi.org/10.1111/jam.15179>

Rashad, Y. M., Abdalla, S. A., & Sleem, M. M. (2022). Endophytic *Bacillus subtilis* SR22 triggers defense responses in tomato against *Rhizoctonia* root rot. *Plants*, 11(15), Article 2051. <https://doi.org/10.3390/plants11152051>

Rios Velasco, C., Caro Cisneros, J.M., Berlanga Reyes, D.I., Ruiz Cisneros, M.F., Ornelas Paz, J.J., Salas Marina, M.Á., & Guerrero Prieto, V.M. (2016). Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista*

Mexicana de Fitopatología, 34(1), 85-99.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>

- Rodríguez Alvarado, G., García López, J., & Fernández Pavía, S. P. (2011). Enfermedades del jitomate (*Solanum lycopersicum*) cultivado en invernadero en la zona centro de Michoacán. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(1), 51-60.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000100005&lng=es&tlng=es
- Salwan, R., Sharma, M., Sharma, A., & Sharma, V. (2023). Insights into plant beneficial microorganism-triggered induced systemic resistance. *Plant Stress*, 7, Article 100140. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100140>
- Samaras, A., Roumeliotis, E., Ntasiou, P., & Karaoglanidis, G. S. (2021). *Bacillus subtilis* MBI600 promotes growth of tomato plants and induces systemic resistance contributing to the control of soilborne pathogens. *Plants*, 10(6), Article 1113. <https://doi.org/10.3390/plants10061113>
- Selim, M. A., Almutari, M. M, Shehab, H. I, & El-Saeid M. H. (2023). Risk assessment of pesticide residues by GC-MSMS and UPLC-MSMS in edible vegetables. *Molecules*. 28(3), Article 1343. <https://doi.org/10.3390/molecules28031343>
- Shah, J., Chaturvedi, R., Chowdhury, Z., Venables, B., & Petros, R. A. (2014). Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *The Plant Journal*, 79(4), 645–658. <https://doi.org/10.1111/tpj.12464>
- Singh, J., Aggarwal, R., Bashyal, B. M., Darshan, K., Meena, B. R., Yadav, J., Saharan, M. S., & Hussain, Z. (2022). Temporal transcriptome of tomato elucidates the signaling pathways of induced systemic resistance and systemic acquired resistance activated by *Chaetomium globosum*. *Frontiers in Genetics*, 13, Article 1048578. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1048578>

- Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *3 Biotech*, 7(4), Article 255. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0896-1>
- Singh, J., Aggarwal, R., Bashyal, B. M., Darshan, K., Parmar, P., Saharan, M. S., Hussain, Z., & Solanke, A. U. (2021). Transcriptome reprogramming of tomato orchestrate the hormone signaling network of systemic resistance induced by *Chaetomium globosum*. *Frontiers in Plant Science*, 12, Article 721193. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721193>
- Srinivas, C., Nirmala Devi, D., Narasimha Murthy, K., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B., Kalagatur, N. K., Niranjana, S. R., Hashem, A., Alqarawi, A., Tabassum, B., Abd Allah, E. F., & Chandra Nayaka, S. (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity- A Review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315–1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Syed Nabi, R. B., Shahzad, R., Tayade, R., Shahid, M., Hussain, A., Ali, M. W., & Yun, B. W. (2021). Evaluation potential of PGPR to protect tomato against *Fusarium* wilt and promote plant growth. *PeerJ*, 9, Article e11194. <https://doi.org/10.7717/peerj.11194>
- Takken, F., & Rep, M. (2010). The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 309–314. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00605.x>
- Thepbandit, W., & Athinuwat, D. (2024). Rhizosphere microorganisms supply availability of soil nutrients and induce plant defense. *Microorganisms*, 12(3), Article 558. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030558>
- Tian, L., Hossbach, B. M., & Feussner, I. (2024). Small size, big impact: Small molecules in plant systemic immune signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 81, Article 102618. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2024.102618>

- Van Der Plank, J. (1963). Vertical and Horizontal Resistance against Potato Blight. *Elsevier eBooks*.
- Vitale, A., Rocco, M., Arena, S., Giuffrida, F., Cassaniti, C., Scaloni, A., Lomaglio, T., Guarnaccia, V., Polizzi, G., Marra, M., & Leonardi, C. (2014). Tomato susceptibility to fusarium crown and root rot: effect of grafting combination and proteomic analysis of tolerance expression in the rootstock. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.08.006>
- Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263–1280. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert026>
- Wang, X., Bi, W., Gao, J., Yu, X., Wang, H., & Liu, D. (2018). Systemic acquired resistance, NPR1, and pathogenesis-related genes in wheat and barley. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(11), 2468-2477. [https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(17\)61852-5](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(17)61852-5)
- Wilson, S. K., Pretorius, T., & Naidoo, S. (2023). Mechanisms of systemic resistance to pathogen infection in plants and their potential application in forestry. *BMC Plant Biology*, 23(1), Article 404. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04391-9>
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., & Niu, D. (2022). Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants*, 11(3), Article 386. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>
- Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Shi, W., Ninkuu, V., Li, G., Yang, X., & Zeng, H. (2021). FoEG1, a secreted glycoside hydrolase family 12 protein from *Fusarium oxysporum*, triggers cell death and modulates plant immunity. *Molecular Plant Pathology*, 22(5), 522–538. <https://doi.org/10.1111/mpp.13041>
- Zhang, Z., Li, J., Zhang, Z., Liu, Y., & Wei, Y. (2021). Tomato endophytic bacteria composition and mechanism of suppressiveness of wilt disease

(*Fusarium oxysporum*). *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 731764.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.731764>

Zhang, Q., Wu, L., Yin, H., Xu, Z., Zhao, Y., Gao, M., Wu, H., Chen, Y., & Wang, Y. (2021). D6 protein kinase in root xylem benefiting resistance to *Fusarium* reveals infection and defense mechanisms in tung trees. *Horticulture Reserch*, 8(1), Article 240. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00656-2>

Zhao, S., Li, M., Ren, X., Wang, C., Sun, X., Sun, M., Yu, X., & Wang, X. (2024). Enhancement of broad-spectrum disease resistance in wheat through key genes involved in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 15, Article 1355178. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1355178>

Zhu, W., Ronen, M., Gur, Y., Minz-Dub, A., Masrati, G., Ben-Tal, N., Savidor, A., Sharon, I., Eizner, E., Valerius, O., Braus, G. H., Bowler, K., Bar-Peled, M., & Sharon, A. (2017). BcXYG1, a secreted xyloglucanase from *Botrytis cinerea*, triggers both cell death and plant immune responses. *Plant Physiology*, 175(1), 438–456. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00375>

ANEXOS

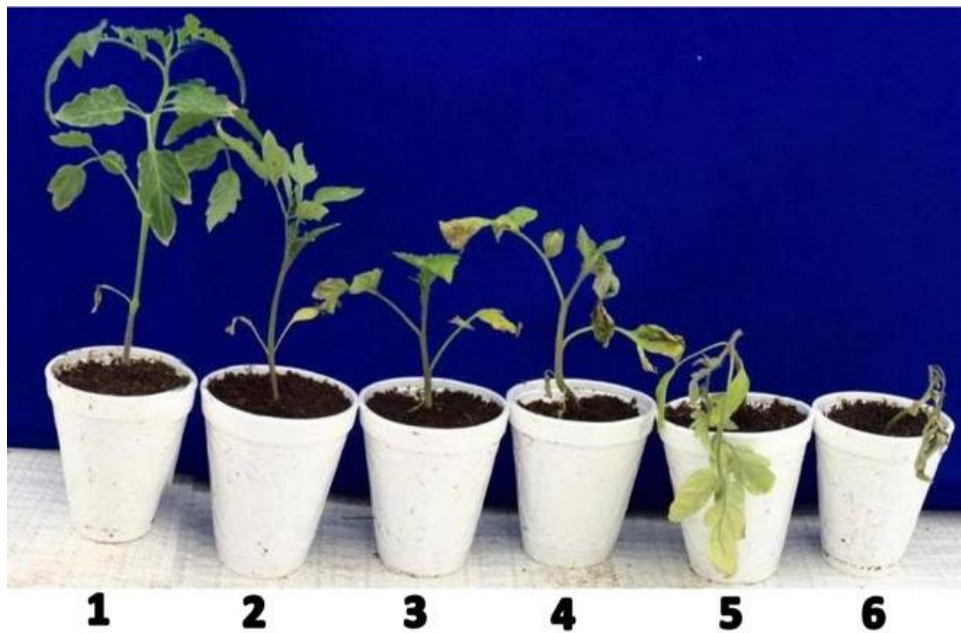


Figura 8. Escala visual de severidad de plántulas en tomate infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Condiciones de invernadero.

1= planta sana, 2 = 20 %, 3 = 40 %, 4 = 60 %, 5 = 80 % y 6 = 100 % de daño.

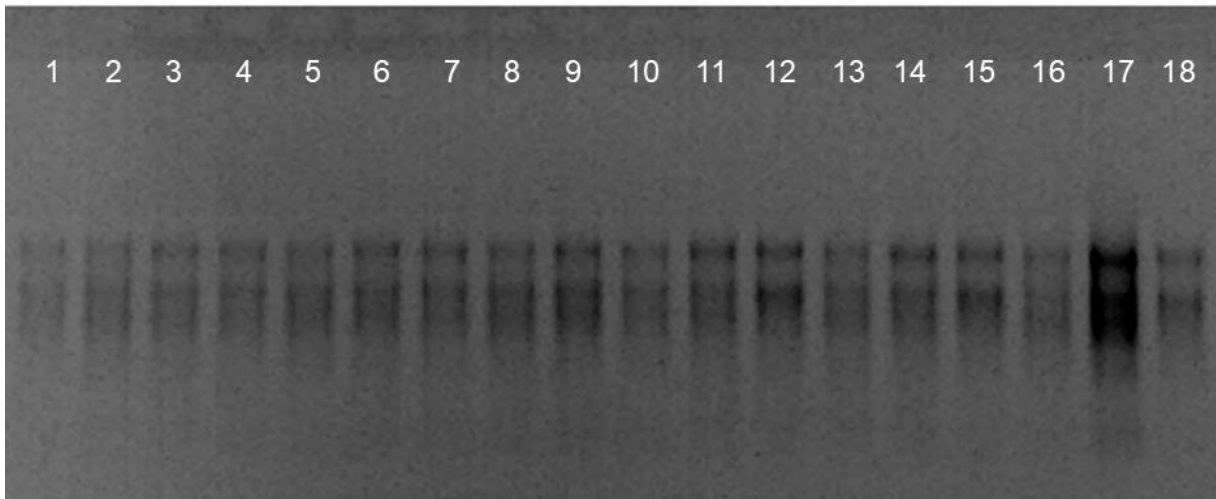


Figura 9. Corrimiento electroforético de muestras de ARN de tomate tratadas con DNasa. 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (*Bacillus subtilis*); 3) 69/47 (*Fusarium oxysporum*); 4) 69/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 5) 69/47 (*Bacillus pumilus*); 6) 69/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (*Bacillus subtilis*); 9) 47/47 (*Fusarium oxysporum*); 10) 47/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 11) 47/47 (*Bacillus pumilus*); 12) 47/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (*Bacillus subtilis*); 15) Híbrido (*Fusarium oxysporum*); 16) Híbrido (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 17) Híbrido (*Bacillus pumilus*); 18) Híbrido (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*).

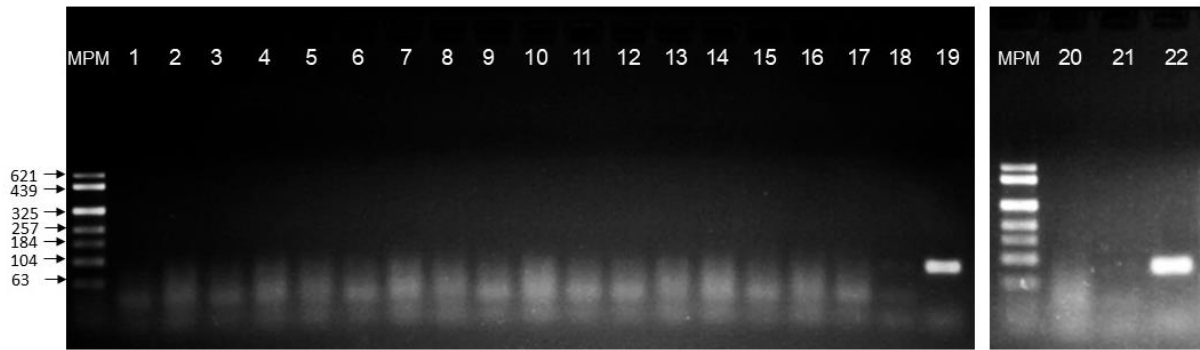


Figura 10. Análisis por PCR de muestras de ARN de tomate tratadas con DNasa: comprobación de la eliminación del ADN genómico mediante la amplificación del gen ACT. MPM: Marcador de peso molecular; 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (*Bacillus subtilis*); 3) 69/47 (*Fusarium oxysporum*); 4) 69/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 5) 69/47 (*Bacillus pumilus*); 6) 69/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (*Bacillus subtilis*); 9) 47/47 (*Fusarium oxysporum*); 10) 47/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 11) 47/47 (*Bacillus pumilus*); 12) 47/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (*Bacillus subtilis*); 15) Híbrido (*Fusarium oxysporum*); 16) Híbrido (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 17) Híbrido (*Bacillus pumilus*); 18 y 21) ACT control negativo; 19 y 22) ACT control positivo; 20) Híbrido (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*).

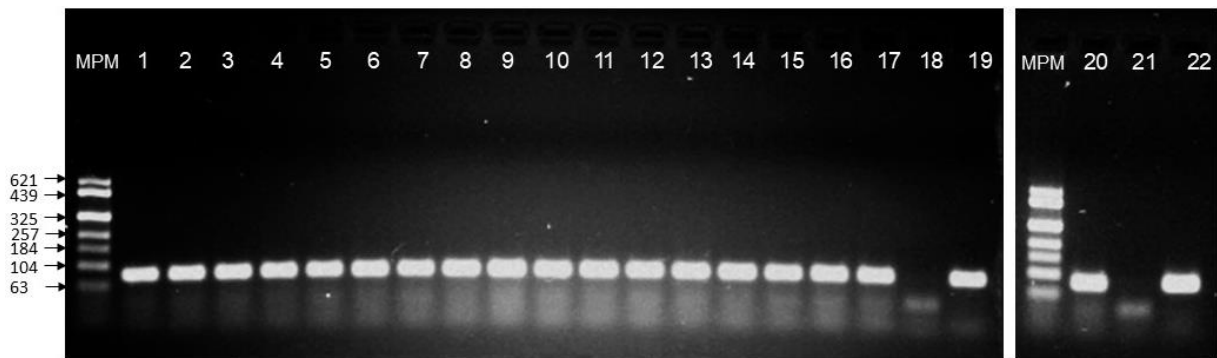


Figura 11. Amplificación por PCR del gen ACT a partir de muestras de cDNA de tomate. 1) 69/47 (control); 2) 69/47 (*Bacillus subtilis*); 3) 69/47 (*Fusarium oxysporum*); 4) 69/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 5) 69/47 (*Bacillus pumilus*); 6) 69/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 7) 47/47 (control); 8) 47/47 (*Bacillus subtilis*); 9) 47/47 (*Fusarium oxysporum*); 10) 47/47 (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 11) 47/47 (*Bacillus pumilus*); 12) 47/47 (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*); 13) Híbrido (control); 14) Híbrido (*Bacillus subtilis*); 15) Híbrido (*Fusarium oxysporum*); 16) Híbrido (*Bacillus subtilis* vs. *Fusarium oxysporum*); 17) Híbrido (*Bacillus pumilus*); 18 y 21) ACT control negativo; 19 y 22) ACT control positivo; 20) Híbrido (*Bacillus pumilus* vs. *Fusarium oxysporum*).