

Uso de Portainjertos Resistentes para el Control de la Fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen raza 3) del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Condiciones de MallaSombra

*Resistant Rootstocks Utilization for Fusarium Control (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen race 3) in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under Shade Conditions*

Emma Paulina Báez-Valdez, José Armando Carrillo-Fasio, Manuel Alonzo Báez-Sañudo, Raymundo Saúl García-Estrada, José Benigno Valdez-Torres y Rosalba Contreras-Martínez. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Coordinación Culiacán, km 5.5 Carr. Culiacán-El Dorado, Culiacán, Sinaloa. CP 80129. Correspondencia: acarrillo@ciad.edu.mx

(Recibido: Mayo 25, 2010 Aceptado: Agosto 18, 2010)

Báez-Valdez, E.P., Carrillo-Fasio, J.A., Báez-Sañudo, M.A., García-Estrada, R.S., Valdez-Torres, J.B. y Contreras-Martínez, R. 2010. Uso de Portainjertos Resistentes para el Control de la Fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen raza 3) del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Condiciones de Malla Sombra. Revista Mexicana de Fitopatología 28:111-123.

Báez-Valdez, E.P., Carrillo-Fasio, J.A., Báez-Sañudo, M.A., García-Estrada, R.S., Valdez-Torres, J.B. and Contreras-Martínez, R. 2010. Resistant Rootstocks Utilization for Fusarium Control (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen race 3) in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) under Shade Conditions. Revista Mexicana de Fitopatología 28:111-123.

Resumen. El objetivo del presente estudio fue evaluar el comportamiento de cuatro portainjertos de tomate: Multifort (DeRuiter), Aloha (Takii), RT-160961 (Takii) y Vigostar 10 (Hazera) injertados con cinco híbridos de tomate bola: TL-41500 (Zeraim Geder), Imperial (Enza Zaden), Pilavy (Rogers), Liberty (Hazera) y Aegean (Enza Zaden), inoculados con el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 (Fol 3), causante de la Fusariosis, en base a resistencia de la enfermedad y productividad. El estudio se realizó durante seis meses, llevándose a cabo evaluaciones mensuales del desarrollo de la enfermedad. Se observó que el material Multifort presentó resistencia, ya que no se observaron plantas con presencia de síntomas de la enfermedad en ninguna de sus combinaciones con los cinco híbridos. Por otra parte, Vigostar 10, Aloha y RT-41500 resultaron tolerantes, ya que se observaron algunas plantas con síntomas de la enfermedad. En cuanto al rendimiento, las mejores combinaciones se dieron con los portainjertos Multifort y Vigostar 10, injertados con el híbrido Imperial, en las cuales se obtuvo un incremento en la producción de alrededor de un 170% respecto al híbrido sin injertar. Fotomicrografías de las raíces de los patrones Multifort y Vigostar 10 mostraron diferencias en la organización celular respecto al híbrido Imperial, el cual es altamente susceptible a

Abstract. The present study is aimed to evaluate the performance of four tomato rootstocks: Multifort (DeRuiter), Aloha (Takii), RT-160961 (Takii) and Vigostar 10 (Hazera) grafted with five tomato bola hybrids: TL-41500 (Zeraim Geder), Imperial (Enza Zaden), Pilavy (Rogers), Liberty (Hazera) and Aegean (Enza Zaden), inoculated with the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 (Fol 3), which causes Fusarium based on disease resistance and productivity. The study was conducted for six months, performing monthly reviews of the disease development. It was revealed that the Multifort material was resistant, as no plants were observed in the presence of symptoms of the disease in any of their combination with the five hybrids. Moreover, Vigostar 10, Aloha and RT-41500 were tolerant, due to the fact that there were some plants with symptoms of the disease. Regarding performance, the best combinations were obtained with the rootstocks Multifort and Vigostar 10 grafted with the Imperial hybrid, in which there was an increase in production of about 170% compared to the hybrid without grafting. Differences in cell organization on the hybrid Imperial photomicrographs were revealed by roots of Multifort and Vigostar 10 standards, which is highly susceptible to Fol 3. Similarly, the presence of structural barriers such as tyloses Multifort and Vigostar 10 standards

Fol 3. Así mismo, se observó la presencia de barreras estructurales como tilides en los patrones Multifort y Vigostar 10, actuando como un mecanismo de resistencia ante la presencia de Fol 3. Referente a los estudios histoquímicos, los patrones (Multifort y Vigostar 10) mostraron mayor presencia de polifenoles comparado con el híbrido Imperial (susceptible), considerando a estos compuestos como un factor que interviene en la resistencia que presentan los patrones; contrario a esto, los polisacáridos solubles e insolubles no mostraron suficiente evidencia que los relacione con la resistencia que presentan dichos patrones.

Palabras clave adicionales: Genética, manejo.

INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades del tomate que afectan a la raíz, destaca la marchitez o fusariosis, ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen (Fol). En regiones calidas como las del estado de Sinaloa, México, la Fusariosis es muy severa en los cultivos de tomate, desarrollados bajo condiciones de campo abierto o protegido, ocasionando fuertes daños en los híbridos que muestran susceptibilidad al ataque de este fitopatógeno. Los daños se presentan con mayor severidad cuando las plantas son sometidas a un período de estrés en las etapas de floración y fructificación. La magnitud del daño ocasionada por esta enfermedad en Sinaloa es muy variada, donde se reporta que el rendimiento del tomate cultivado en los lotes infestados, ha disminuido hasta en un 50% debido al ataque de la enfermedad, tanto en campo abierto como en invernadero (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003; García y Valenzuela, 2009). Los síntomas inicialmente se presentan con una clorosis foliar en un sector de la planta y a medida que la enfermedad progresa, el amarillamiento se observa de forma gradual en la mayor parte del follaje (Figura 1-A), ocasionando la marchitez y posteriormente la muerte de la planta, sin producir fruta o en ocasiones es escasa. El tejido vascular en la base del tallo presenta coloración castaño oscuro, extendiéndose hasta el extremo apical del tallo (Figura 1-B). El color pardo en la parte interna del tallo es característico de la enfermedad, por lo que es utilizado para su identificación, mientras que la médula permanece libre de la infección. La infección del fruto (Figura 1-C) aparece de forma ocasional mediante coloración café oscuro en el tejido vascular (Jones y Jiménez, 2001). En Sinaloa, el control de las enfermedades radiculares en el cultivo de tomate mediante la utilización de plaguicidas (fungicidas y fumigantes del suelo) ha ayudado a mantener altos rendimientos y satisfacer la calidad de los alimentos; sin embargo, en años recientes estas contribuciones han sido desafiadas en varios reportes que sugieren que los efectos negativos sobre el medio ambiente pesan más que su beneficio a la sociedad. Si bien es cierto que el uso de estos agroquímicos ha permitido obtener incrementos substanciales en la producción; sus efectos adversos están impactando de manera significativa la sustentabilidad de la agricultura (Watson *et al.*, 1992). La práctica del monocultivo y la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos, han impactado en la agricultura, reduciendo

was observed, acting as a resistance mechanism in the presence of Fol 3. An increased presence of polyphenols compared with the hybrid Imperial (susceptible), was revealed by histochemical studies concerning the standards (Multifort and Vigostar 10), considering these compounds as a factor in the resistance by employers; opposite to this, soluble and insoluble polysaccharides did not reveal enough evidence relating the resistance of those standards.

Additional keywords: Genetic, management.

INTRODUCTION

Among the diseases affecting tomato root stresses or fusarium wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen (Fol), the Fusarium is rather severe for tomato in warm regions such as the state of Sinaloa, developed under open field or protected conditions, causing heavy damage to the hybrids that are susceptible to be attacked by this phytopathogen. The damages are more severe when plants are subjected to a period of stress on flowering and fruiting stages. The amount of damage caused by this disease in Sinaloa is varied, where it has been reported that the yield of tomato cultivated in infested lots has declined as much as 50%, due to the attack of the disease in both open field and greenhouse (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003; García and Valenzuela, 2009). The symptoms are initially presented with a foliar chlorosis in the plant sector and, as the disease progresses, having yellowing gradually observed in most of the foliage (Figure 1-a), causing wilting and then the death of the plant without producing fruit or sometimes being limited. The vascular tissue at the base of the stem reveals a dark brown color extending to the apical end of the stem (Figure 1-B). The brown color on the inner side of the stem is characteristic of the disease, which is used for identification, while the cord remains free of infection. The fruit infection (Figure 1-C) appears occasionally with a dark brown discoloration in the vascular tissues (Jones and Jiménez, 2001). The control of root diseases in Sinaloa in tomato crops using pesticides (fungicides and soil fumigants) has helped to maintain high yields and meet food quality; however, these contributions have recently been challenged in several reports, suggesting that the negative effects on the environment outweigh the benefit to society. While it is true that the use of these chemicals has yielded substantial increases in production, its adverse effects are significantly impacting agriculture sustainability (Watson *et al.*, 1992). The practice of monoculture and contamination by the indiscriminate use of agrochemicals have impacted on agriculture (microorganisms) of agro-ecosystems causing their instability, which is reflected among some other harmful effects, in an increased incidence and severity of the disease on tomato plants. These, and the problems of public health and safety inherent in the production and use of agrochemicals, have led to the search and establishment of ecological alternatives for disease management. Therefore, interest arises from the use of protected agriculture technology and, subsequently, the use of genetic resistance to integrated disease management, particularly with the use of



Figura 1. Daños inducidos por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 en diferentes órganos de la planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). A) planta clorótica o amarilla. B) Raíz con necrosis y áreas color violeta y C) Frutos con necrosis en los tejidos vasculares.

Figure 1. Damage induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in different organs of the tomato plant (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). A) chlorotic or yellowish plant. B) Root with necrosis and violet areas and C) Fruits with necrosis in vascular tissues.

la biodiversidad (microorganismos) de los agro ecosistemas, ocasionando la inestabilidad de los mismos, la cual se refleja, entre otros efectos nocivos, en una mayor incidencia y severidad de esta enfermedad en las plantas de tomate. Esto y los problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas ecológicas de manejo de las enfermedades. Por lo anterior, surge el interés por el uso de tecnologías de agricultura protegida y subsecuentemente el uso de la resistencia genética para el manejo integrado de enfermedades, en especial con el uso de portainjertos resistentes a las enfermedades de la raíz. Este método consiste en cultivar una planta susceptible, pero altamente productiva, con el sistema radicular de otra planta resistente a la enfermedad que se pretende controlar. El uso de portainjertos constituye actualmente una alternativa que podría sustituir el control químico para el combate de las enfermedades radiculares en el cultivo de tomate; ya que además de su elevado costo, el control químico trae como consecuencia el desarrollo de resistencia en los patógenos, así como problemas de contaminación y toxicidad. Así mismo, otros propósitos con el uso de injertos, son la tolerancia a estrés por temperaturas, tolerancia a la salinidad, tolerancia a

rootstocks resistant to root diseases. This method involves growing a susceptible plant, but highly productive, with the root of another plant resistant to the disease to be monitored. The use of rootstocks is now an alternative that could replace chemical control to combat root diseases in tomato crop and its high cost because, on top of its high cost, chemical control results in the development of resistance in pathogens and as problems of pollution and toxicity. Likewise, other purposes for the use of grafts are the temperature stress tolerance, salt tolerance, drought tolerance of soil conditions and further increased plant vigor and increased performance (Godoy and Castellanos, 2009). The horticultural activity in Sinaloa has been replacing its system of open field production of protected cultivation in the last ten years, mainly in the tomato crop, with an increase in the protected area of 65 hectares for the 1998-1999 horticultural cycle to 2,485 hectares for the 2007-2008 horticultural cycle, of which 40.3% (923 hectares) belong to tomato cultivation, divided in 679 hectares for ball tomato and 244 hectares to Rome or Saladette tomato (AMHPAC, 2008). The grafting technique is based on the combined use of resistant rootstock to soil pathogens, varieties and / or highly productive commercial hybrids, looking forward to replace the use of fumigant / fungicide in soil for many crops (Miguel, 1997). It has been reported by Mazollier (1999) that the most promising tomato rootstocks are interspecific hybrids of *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum*, which gather resistance to root knot nematode *Meloidogyne incognita* and to soil pathogens, such as *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* and *Pyrenochaeta lycopersici*. One feature that stands out with regards to commercial rootstocks is that the resistance is primarily focused on the root system pathogens, such as: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 1, 2, 3; *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongena*, *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *Verticillium dahliae* (race 1 and 2), *Verticillium albo-atrum*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora capsici*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Sclerotinia sclerotiorum* (Mitidieri *et al.*, 2005 ; Besri, 2003). The effectiveness of the use of rootstocks resistant to certain pathogens in different horticultural crops has been demonstrated by previous studies. A study using two tomato varieties, KNVF and KVF interspecific varieties of *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum* was reported by Kuniyasu and Yamakawa (1983), which revealed a resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 and *Pyrenochaeta lycopersici*. Consequently, they were used as rootstocks for grafting two Japanese varieties (Fukuju 2 and Walter) susceptible to *Fusarium* wilt, showing that susceptible varieties grafted on resistant cultivars significantly decreased the incidence of the disease. A He-Man rootstock hybrid (Syngenta) was used by Mitidieri *et al.* (2005), as a rootstock hybrid on which hybrids Fortaleza (Syngenta) and Superman (Petoseed) were grafted. An increased performance, significantly decreased percentages of dead plants 30 days after transplanting and

condiciones de sequía del suelo y adicionalmente el incremento del vigor de la planta y aumentar el rendimiento (Godoy y Castellanos, 2009). En los últimos diez años la actividad hortícola en Sinaloa, principalmente en el cultivo de tomate ha venido sustituyendo su sistema de producción de campo abierto a cultivo protegido, con un incremento de superficie protegida de 65 hectáreas para el ciclo hortícola 1998–1999 a 2,485 hectáreas para el ciclo hortícola 2007–2008, de las cuales el 40.3 % (923 hectáreas) corresponden al cultivo de tomate, dividido en 679 hectáreas para tomate bola y 244 hectáreas a tomate Roma o Saladette (AMHPAC, 2008). La técnica del injerto se basa en el uso de la combinación de patrones resistentes a los patógenos del suelo con variedades y/o híbridos comerciales altamente productivos, con la finalidad de sustituir el uso de fumigantes/fungicidas de suelo en muchos cultivos (Miguel, 1997). Mazollier, 1999 reporta que los portainjertos de tomate más promisorios son híbridos interespecíficos de *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum*, los cuales reúnen resistencia al nematodo agallador de raíces *Meloidogyne incognita* y a patógenos del suelo como *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahlia* y *Pyrenochaeta lycopersici*. Una de las características que sobresale de los portainjertos comerciales es que la resistencia que presentan se enfoca principalmente a patógenos de sistema radicular como: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* razas 1, 2, 3; *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongena*, *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *Verticillium dahliae* (raza 1 y 2), *Verticillium albo-atrum*, *Pyrenochaeta lycopersici*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora capsici*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Mitidieri et al., 2005; Besri, 2003). En estudios previos se ha demostrado la eficacia del uso de portainjertos resistentes a ciertos patógenos en diferentes cultivos hortícolas. Kuniyasu y Yamakawa (1983) reportaron un estudio utilizando dos variedades de tomate KNVF y KVF, híbridos interespecíficos de *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum*, los cuales mostraron resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 y *Pyrenochaeta lycopersici*, por lo que se utilizaron como patrones para injertar dos variedades japonesas (Fukuju 2 y Walter) susceptibles a la marchitez por *Fusarium*, demostrando que el injerto de variedades susceptibles sobre cultivares resistentes, disminuían considerablemente la incidencia de la enfermedad. Mitidieri et al. (2005), utilizaron como portainjerto el híbrido He-Man (Syngenta) sobre el cual injertaron los híbridos Fortaleza (Syngenta) y Superman (Petoseed). Las plantas injertadas mostraron mayor rendimiento, porcentajes significativamente menores de plantas muertas hasta 30 días después del trasplante y plantas con síntomas aéreos de ataque de nematodos. Khaled et al. (2006), reportaron el control de la pudrición de corona y raíz de tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, mediante el injerto de patrones resistentes He-man y Beaufort en las variedades susceptibles Durintha F₁ y Bochra F₁, demostrando así el efecto benéfico del uso de portainjertos resistentes sobre desarrollo de la planta,

plants with aerial symptoms of nematode attack were revealed by the grafted plants. The control of crown and root rot of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* was reported by Khaled et al. (2006), by grafting on He-man and Beaufort resistant rootstock in the Durintha F₁ and Bochra F₁ susceptible varieties, demonstrating the beneficial effect of the use of resistant rootstock on plant growth, yield and fruit quality. Resistance rates of different rootstocks from three international companies were reported by Rivard and Louws, (2006): DeRuiter Seeds (Maxifort and Beaufort with moderate resistance to *Fol* R₁ and high resistance to *Fol* R₂); Takii Seeds (Anchor-T, Survivor and Aegis with a high resistance to races of *Fol* 1 and 2) and Bruinsma Seeds (Body and Robusta with a high resistance to both races of *Fol*). The grafting technique was performed in Mexico by means of using the tomato hybrids Caiman, Imperial and Girona (Enza Zaden) and the Multifort standard (De Ruiter), in order to have the production evaluated (ton/ha) in plants guided to one or two stems; thus the grafted plants revealed a higher production with regards to those not grafted, with a difference of 36 ton/ha at two stems (Garduño and González, 2007). A similar study was held in this very same place with the Caiman and Girona varieties (Enza Zaden) grafted over Beaufort and Maxifort (De Ruiter), aiming to evaluate the production in relation to fruit size lower than 200 g or higher than 300 g, showing that a higher production of fruit weighing more than 300 g was revealed by the Caiman variety grafted with Maxifort (Garduño and González, 2007). A study using the grafting technique in a tomato Roma crop, on the other hand, was performed by Ricárdez et al. (2008), as an alternative to methyl bromide to control soil pests and diseases, making two rootstocks combinations: Multifort (DeRuiter) and Spirit (Nunhems), with the commercial hybrid 7705 (Nunhems), under conditions of shade cloth and using soil with and without methyl bromide. They also used different densities of plants in shade cloth (50%, 60% and 80%), considering the distance of 0.60, 0.50 and 0.40 m among plants, respectively. They discovered that the combination of Multifort and Spirit rootstocks with the hybrid 7705 had an increased production at a density of 80% (distance of 0.40 cm among plants) with a yield of 187.4 ton/ha in Multifort + hybrid 7705 and 165.4 ton/ha in Spirit with the hybrid 7705. Considering the studies previously performed and because of the extensive use of the grafting technique in tomato production in the state of Sinaloa, the present study was proposed with the combination of four rootstocks: Multifort (DeRuiter), Aloha (Takii), RT-160961 (Takii) and Vigostar 10 (Hazera) and five undetermined hybrid tomato bola type: TL-41500 (Zeraim Gedera), Imperial (Enza Zaden), Pilavy (Rogers), Liberty (Hazera) and Aegean (Enza Zaden), aiming to determine the best rootstock combinations-commercial tomato hybrid resistance to *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3), with reference to the severity of the disease and its productivity, grown under shade cloth conditions. Likewise, it was proposed to determine the resistance mechanisms in the suppression of rootstock *Fol* 3 of the rootstocks previously mentioned.

rendimiento y calidad del fruto. Rivard y Louws, (2006) reportan índices de resistencia de diversos portainjertos de tres compañías internacionales: DeRuiter Seeds (Maxifort y Beaufort con moderada resistencia a *Fol* R₁ y alta resistencia a *Fol* R₂); Takii Seeds (Anchor-T, Survivor y Aegis con alta resistencia a razas de *Fol* 1 y 2) y Bruinsma Seeds (Body y Robusta con alta resistencia a ambas razas de *Fol*). En México se realizó la técnica de injerto utilizando los híbridos de tomate Caimán, Imperial y Girona (Enza Zaden) y el patrón Multifort (De Ruiter), para evaluar la producción (ton/ha) en plantas guiadas a uno y dos tallos demostrando que las plantas injertadas presentaron mayor producción respecto a las no injertadas, con una diferencia de 36 ton/ha a un tallo y 66 ton/ha a dos tallos (Garduño y González, 2007). En este mismo lugar se llevó a cabo un estudio similar con las variedades Caimán y Girona (Enza Zaden) injertadas sobre Beaufort y Maxifort (De Ruiter) con el fin de evaluar la producción en relación al tamaño del fruto, menor a 200 g o mayor a 300 g, demostrando que la variedad Caimán injertada con Maxifort presentó mayor producción de frutos con peso mayor a 300 g (Garduño y González, 2007). Por otro lado, Ricárdez *et al.* (2008), realizaron un estudio empleando la técnica de injerto en el cultivo de tomate roma como una alternativa al uso del bromuro de metilo en el control de plagas y enfermedades del suelo, realizando dos combinaciones con los portainjertos: Multifort (DeRuiter) y Spirit (Nunhems), con el híbrido comercial 7705 (Nunhems), bajo condiciones de malla sombra y usando suelo con y sin bromuro de metilo. También utilizaron diferentes densidades de plantas en la malla sombra (50%, 60% y 80%), considerando la distancia entre plantas de 0.60, 0.50 y 0.40 m respectivamente. Ellos encontraron que las combinaciones de los portainjertos Multifort y Spirit con el híbrido 7705, presentaron mayor producción a una densidad del 80% (distancia de 0.40 cm entre plantas con un rendimiento de 187.4 ton/ha en Multifort + híbrido 7705 y de 165.4 ton/ha en Spirit con el híbrido 7705. Considerando los trabajos anteriores y dado el uso extensivo de la técnica de injerto en la producción de tomate en el estado de Sinaloa, se planteó la presente investigación con las combinaciones de cuatro portainjertos: Multifort (DeRuiter), Aloha (Takii), RT-160961 (Takii) y Vigostar 10 (Hazera) y cinco híbridos de tomate tipo bola indeterminado: TL-41500 (Zeraim Gedera), Imperial (Enza Zaden), Pilavy (Rogers), Liberty (Hazera) y Aegean (Enza Zaden); con el objetivo de determinar las mejores combinaciones portainjerto – híbrido comercial de tomate a la resistencia de la Fusariosis (*Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* raza 3), con referencia a la severidad de la enfermedad y su productividad, cultivados bajo condiciones de malla sombra. De igual manera, se propuso determinar los mecanismos de resistencia en la supresión a *Fol* 3 de los portainjertos mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en una estructura protegida con malla sombra 855 m², con un 50% de sombreado respecto a la irradiación total del sol, ubicada en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.)

MATERIALS Y METHODS

The Experiment was set in a structure protected with an 855 m² shade cloth with a 50% shadow over the entire radiation from the sun at the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) Culiacán Coordination, which is located on the Culiacán-Eldorado road, Km. 5.5. The seeds of the rootstock materials: (Multifort (DeRuiter), Aloha (Takii), RT-160961 (Takii) and Vigostar 10 (Hazera), as well as the indeterminate tomato bola hybrids: TL-41500 (Zeraim Gedera), Imperial (Enza Zaden), Pilavy (Rogers), Liberty (Hazera) and Aegean (Enza Zaden), were planted in germination trays of 120 caves with moss substrate, which were saturated with water, having them covered with black polythene until the beginning of germination. It is noteworthy that the cultivation of commercial hybrids was made a week before the rootstocks. Once the seeds had germinated, for both commercial hybrids and rootstocks, they were subjected to greenhouse conditions until the stems of both materials presented a thickness from 0.4 to 0.6 cm in diameter and / or had submitted a development from 3 to 4 true leaves. Subsequently, all materials were taken to a fusion chamber with a temperature of 25° C and a 95% relative humidity. The grafting process was performed using the approximation technique, which involves contacting the rootstock tissues and the variety, so that the regions of the *cambium* coincide and remain closely linked by pressing a silicone graft clip (Godoy and Castellanos, 2009). Once the grafting had been performed, the plants were kept in the fusion chamber for three days under the conditions mentioned above, having the relative humidity decreasing gradually until an 80 - 85 % had been reached. As the seedlings merged, the trays were transferred to the greenhouse shading and left there for 24 hours to have them acclimatized and finally transplanted into bags of 16 L with coconut fiber substrate and drip irrigation. The transplantation of each one of the materials (standard combination / commercial hybrid) was held in November 17, 2007. Beds were prepared in the greenhouse for the distribution of plants, with two lines of plants spaced 1.80 m among beds and a separation of 0.4 m among bags, which means that there was a density of 27,750 plants per hectare.

Inoculation of potted (grafted plants). Once the grafts transplant to pots in the shade had been established, the inoculation of the fungus *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* raza 3 was performed, being previously identified at a physiological race level by using the differential lines of tomato: EP7, Packmor, Walter, IR3-301-301 and the hybrid SUN-0289 (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003) and corroborated with the identification by means of molecular techniques (PCR) by Dr. Tsutomu Arie from the University of Agriculture and Technology in Tokio, Japan (Báez, 2009). Applying 50 mL of a spore suspension of 1×10^6 spores/mL (previously determined with spore count assessments with the aid of a hemacytometer) in the base of the stem of each plant per pot (50,000 spores per gram of substrate). Among each standard combination / commercial hybrid, plants were left as control plants or conventional, as well as pots with each hybrid material without grafting, looking forward to

Coordinación Culiacán, el cual se encuentra ubicado en carretera Culiacán-Eldorado, Km. 5.5. Las semillas de los materiales de los portainjertos: (Multifort (DeRuiter), Aloha (Takii), RT-160961 (Takii) y Vigostar 10 (Hazera); así como, de los híbridos de tomate bola indeterminados: TL-41500 (Zeraim Gedera), Imperial (Enza Zaden), Pilavy (Rogers), Liberty (Hazera) y Aegean (Enza Zaden), se sembraron en charolas de germinación de 120 cavidades con sustrato de musgo, las cuales se saturaron de agua cubriéndose con polietileno negro hasta el inicio de la germinación. Es importante mencionar que la siembra de los híbridos comerciales se efectuó una semana antes que los portainjertos. Una vez germinadas las semillas, tanto de los híbridos comerciales como portainjertos, se sometieron a condiciones de invernadero hasta que los tallos de ambos materiales presentaran un grosor de 0.4 a 0.6 cm de diámetro y/o que presentaran el desarrollo de 3 a 4 hojas verdaderas. Posteriormente, todos los materiales fueron llevados a una cámara de fusión con una temperatura de 25° C y 95% de humedad relativa. El proceso de injerto se realizó mediante la técnica de aproximación, la cual consiste en poner en contacto los tejidos del portainjerto y de la variedad, de manera que las regiones del *cambium* coincidan y se mantengan estrechamente unidas presionándose con un clip de injerto de silicona (Godoy y Castellanos, 2009). Una vez realizado el injerto, las plantas se mantuvieron en la cámara de fusión por tres días a las condiciones antes mencionadas, disminuyendo la humedad relativa en forma gradual, hasta llegar a 80 - 85 %. Una vez fusionadas las plántulas, las charolas fueron trasladadas al invernadero dejándose 24 horas en sombreo para aclimatarlas y finalmente se trasplantaron en bolsas de 16 L con sustrato de fibra de coco y riego por goteo. El trasplante de cada uno de los materiales (combinación patrón/híbrido comercial) se efectuó el 17 de noviembre del 2007. Para la distribución de las plantas en el invernadero se prepararon camas con dos líneas de plantas, con una separación de 1.80 m entre camas y con una separación entre bolsas de 0.4 m. Es decir, había una densidad de 27,750 plantas por hectárea.

Inoculación de macetas (plantas injertadas). Una vez establecido el trasplante de los injertos a las macetas en la malla sombra, se realizó la inoculación de hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raza 3, previamente identificado a nivel de raza fisiológica, mediante el uso de líneas diferenciales de tomate: EP7, Packmor, Walter, IR3-301-301 y el híbrido SUN-0289 (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003) y corroborada con la identificación por medio de técnicas moleculares (PCR) por parte del Dr. Tsutomo Arie de la Universidad de Agricultura y Tecnología de Tokio Japón (Báez, 2009). Aplicando 50 mL de una suspensión de esporas de 1×10^6 esporas/mL (previamente determinado con evaluaciones de conteo de esporas con la ayuda de un hematocitometro) en la base del tallo de cada planta por maceta (50,000 esporas por gramo de sustrato). Entre cada combinación patrón / híbrido comercial, se dejaron como plantas testigo o convencionales; macetas con cada material híbrido sin injertar, con el propósito de determinar el comportamiento de cada híbrido comercial en la

determine the behavior of each commercial hybrid resistance / susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003).

Severity of Fusarium. After plants inoculation, the disease severity became evaluated on a monthly basis. The presence of the disease symptoms were determined in each of the grafts of the inoculated plants, considering the severity caused by *Fol* to do so, taking into account the arbitrary scale proposed by Vakalounaks and Fragkiadakis, (1999), where: 0 Healthy plant, 1 chlorotic plant, 2 wilted plant and 3 dead plant. Since the measurement scale used was nominal, data were transformed to percentages of severity using the formula proposed by Vakalounaks and Fragkiadakis (1999).

Evaluation of productivity. Productivity was assessed in relation to the number of fruits and their total weight per plant and fruit size, using an electronic scale with a capacity of 40 kg, with reference to the scale proposed by the USDA (1997), which considers the sizes MXL, XL, L, S and lingers.

Histological and Histochemical study. The inoculated and uninoculated roots with *Fol* 3 of the Multifort and Vigostar 10 seedling rootstocks, as well as the Imperial hybrid, were used for the histological study. A total of ten part hair plants were inoculated separately in each of the hybrid standards of interest with the stump of *Fol* 3, a concentration of 1×10^6 spores/ml (concentration determined with the help of the hemacytometer), submerging the roots of seedlings for 30 minutes in the spore suspension (100mL), which were then planted in 1.0 L pots with sterilized soil-sand substrate (50-50). The inoculated plants and their respective controls (without inoculation) were kept in the greenhouse until the symptoms of the disease (leaf chlorosis) were manifested by the plants of the Imperial hybrid (positive control). Cross sections were then performed at the base of the stem to verify the presence of necrosis in the conducting vessels of xylem and phloem (Santos and López, 1993). Similarly, histological tests were performed on roots of rootstocks resistant to *Fol* race 3 and the susceptible hybrid, in order to determine structural or morphological changes. Root samples were cut into 2 cm long and fixed with FAA (formaldehyde-acetic acid-alcohol-water). Dehydration was then performed, which consisted in treating the tissue with a series of alcohol solutions (50, 70, 96 and 100%), aiming to prepare the tissue for infiltration and embedding in paraffin. Thin sections (10 μ m) were cut from the material embedded in paraffin microtome and mounted on slides. The roots were stained with potassium permanganate to 1% for the determination of polyphenols, and then plant tissues were observed under the microscope. It is reported on literature that the polyphenols in plant tissues turn brownish (Curtis, 1986). Root tissues were stained with peryodic acid at 0.05% for the determination of soluble polysaccharides, acquiring a magenta color, thus (Jensen, 1962). The roots were stained with peryodic acid at 0.05% for the detection of insoluble polysaccharides, passing the Schiff reagent afterwards, where the insoluble polysaccharides turned violet (Jensen, 1962).

Statistical analysis. A crossover design factor (time) and a nest factor (standard) was used for severity assessment, taking the grafted plants as experimental units nested in the

resistencia/susceptibilidad a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 (Carrillo-Fasio *et al.*, 2003).

Severidad de Fusariosis. Posterior a la inoculación de las plantas, se evaluó cada mes la severidad de la enfermedad. En las plantas inoculadas de cada uno de los injertos se determinó la presencia de los síntomas de la enfermedad, para lo cual se consideró la severidad ocasionada por *Fol*, tomando en consideración la escala arbitraria propuesta por Vakalounaks y Fragkiadakis, (1999), donde: 0 Planta sana, 1 Planta clorótica, 2 planta marchita y 3 Planta muerta. Dado que la escala de medición utilizada fue nominal, se transformaron los datos a porcentajes de severidad empleando la fórmula propuesta por Vakalounaks y Fragkiadakis (1999).

Evaluación de productividad. Utilizando una balanza electrónica con capacidad de 40 kg, se evaluó la productividad en relación al número de frutos y al peso total de los mismos por planta, así como el tamaño de los frutos, tomando como referencia la escala propuesta por la USDA (1997), que considera los tamaños MXL, XL, L, M, S y rezaga.

Estudio histológico e Histoquímico. Las raíces inoculadas y no inoculadas con *Fol* 3 de las plántulas de los portainjertos Multifort, Vigostar 10 y del híbrido Imperial, fueron utilizadas para el estudio histológico. Parte vello se inocularon diez plantas por separado de cada uno de los patrones e híbridos de interés con la cepa de *Fol* 3, a concentración de 1×10^6 esporas/ml (determinando la concentración con la ayuda del hematocritómetro), sumergiendo la raíz de las plántulas durante 30 minutos en la suspensión de esporas (100 mL), las cuales posteriormente fueron sembradas en macetas de 1.0 L, con sustrato suelo-arena (50-50) esterilizada. Las plantas inoculadas y sus respectivos testigos (sin inoculación) fueron conservadas en el invernadero, hasta que las plantas del híbrido imperial (testigo positivo) manifestara los síntomas de la enfermedad (clorosis foliar). Posteriormente se realizaron cortes transversales en la base del tallo para corroborar la presencia de necrosis en los vasos conductores de xilema y floema (Santos y López, 1993). Igualmente, se realizaron pruebas histológicas en las raíces de los patrones resistentes a *Fol* raza 3 y en el híbrido susceptible para determinar cambios estructurales o morfológicos. Las muestras de raíz se cortaron en trozos de 2 cm de largo y se fijaron con FAA (formaldehído-ácido acético-alcohol-agua). Posteriormente se realizó la deshidratación la cual consistió en tratar los tejidos con una serie de soluciones de alcohol (50, 70, 96 y 100%), con el fin de preparar el tejido para la infiltración e inclusión en parafina. Secciones finas (10 μ m) se cortaron del material inmerso en la parafina con un micrótopo y se montaron en los portaobjetos. Para la determinación de polifenoles las raíces se tiñeron con permanganato de potasio al 1% y posteriormente se observaron los tejidos vegetales bajo el microscopio compuesto. La literatura reporta que los polifenoles presentes en los tejidos vegetales, adquieren una coloración café (Curtis, 1986). Para la determinación de polisacáridos solubles, los tejidos de las raíces se tiñeron con ácido peryódico al 0.05%, adquiriendo estos un color magenta (Jensen, 1962). Para la detección de

factor standard and with repeated measures of the time factor. The levels of each factor were: Standard (Multifort, Vigostar 10, Aloha, RT-169061 and without standard) and Time (1 month, 2 months, 3 months, 4 months and 5 months), obtaining a total of 25 treatments with 5 grafts (replicas) each, for a total of 125 observations. A completely randomized 2 factors design (Standard and Hybrid) was performed for the productivity assessment with the following levels per factor: Standard (Multifort, Vigostar 10, Aloha, and RT-169061 and without standard) and Hybrid (Imperial, Pilavy, TL-41500, Liberty and Aegean) resulting in a total of 25 treatments, with 3 replicas each, for a total of 75 observations. A descriptive analysis was performed for histological and histochemical studies; the presence of structures and chemical resistance in roots of *Fol* 3 resistant standards (Multifort and Vigostar 10) was revealed, having the not grafted Imperial hybrid as control (susceptible).

RESULTS AND DISCUSSION

Severity of Fusarium. The first symptoms of the disease (chlorosis) were in the first month 22 days after transplanting and 15 days after inoculation with *Fol* 3, mainly in ungrafted hybrids. Later there was an increase in the severity of *Fol* 3 over time, especially in hybrids without grafting (Conventional), used as controls for each combination. Symptoms of the disease in affected plants increased over time until the wilting and death of the plant in the fifth month. The same trend was revealed by the grafted hybrids on the Vigostar 10, Aloha and RT-160961 standards, showing chlorosis symptoms until the fifth month; this means that they did not have symptoms of the disease until the end of the crop cycle, being considered tolerant to *Fol* 3, thus (Table 1). Quite the opposite, the hybrids grafted on Multifort revealed neither external damage (chlorosis, wilting and death) nor damage to the root (root necrosis and/or vascular) until the end of the crop; therefore, this material is considered fully resistant to *Fol* 3. Consequently, it is indicated by these results that such standards or rootstocks can be used as a viable alternative for root pathogens control and, in this special case, wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in tomato. It has been revealed by the results obtained by Pavlou *et al.*, (2002), that resistant rootstocks can be used to protect cucumber cultivation from soil pathogens, such as *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, differing to what had been observed in ungrafted susceptible hybrids. Also, it has been proved by Kuniyasu and Yamakawa (1983) that the grafting of KNVF and KVF resistant cultivars with Fukuju 2 and Walter susceptible varieties, reduced the incidence of wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 and *Pyrenochaeta lycopersici* in tomato plants. While this had already been shown in trials in other states of Mexico (Ricárdez *et al.*, 2008), similar values have been reported by other authors (Mitidieri *et al.*, 2005), where it is mentioned that significantly lower percentages of diseased plants until 30 days after transplanting of plants with symptoms caused by air attack nematodes and *Fusarium oxysporum*, were revealed by grafted tomato plants. Thus, it is demonstrated by these results that either cultivars or hybrids that are usually

polisacáridos insolubles, igualmente las raíces se tiñeron con ácido peryódico al 0.05%, pasándose posteriormente al reactivo de Schiff, donde los polisacáridos insolubles se tiñen de color violeta (Jensen, 1962).

Análisis estadístico. En la evaluación de la severidad se utilizó un diseño de un factor cruzado (Tiempo) y un factor nido (Patrón), tomando las plantas injertadas como unidades experimentales anidadas en el factor Patrón y con medidas repetidas en el factor Tiempo. Los niveles de cada factor fueron: Patrón (Multifort, Vigostar 10, Aloha, RT-169061 y sin patrón) y Tiempo (1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses y 5 meses), obteniendo un total de 25 tratamientos con 5 injertos (réplicas) cada uno, para un total de 125 observaciones. Para la evaluación de la productividad se realizó un diseño de 2 factores totalmente al azar (Patrón e Híbrido), con los siguientes niveles por factor: Patrón (Multifort, Vigostar 10, Aloha, RT-169061 y sin patrón) e Híbrido (Imperial, Pilavy, TL-41500, Liberty y Aegean) resultando un total de 25 tratamientos, con 3 replicas cada uno, para un total de 75 observaciones. Para los estudios histológicos e histoquímicos se realizó un análisis descriptivo, observando la presencia de estructuras de resistencia y sustancias químicas en raíces de los patrones resistentes a Fol 3 (Multifort y Vigostar 10), teniendo como testigo el híbrido Imperial sin injertar (susceptible).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Severidad de Fusariosis. Los primeros síntomas de la enfermedad (clorosis) se presentaron en el primer mes (22 días después del trasplante y 15 días después de la inoculación de Fol 3), principalmente en los híbridos sin injertar. Posteriormente se observó un incremento en la severidad de Fol 3 a través del tiempo, principalmente en los híbridos sin injerto (Convencionales), usados como testigos para cada combinación. Los síntomas de la enfermedad en las plantas afectadas se incrementaron a través del tiempo hasta llegar al marchitamiento y muerte de la planta al quinto mes. Los híbridos injertados sobre los patrones Vigostar 10, Aloha y RT-160961 mostraron una misma tendencia, presentando síntomas de clorosis hasta el quinto mes; es decir, presentaron síntomas iniciales de la enfermedad hasta el final del ciclo del cultivo, por lo que se consideran tolerantes a Fol 3 (Cuadro 1). En cambio, los híbridos injertados sobre Multifort no manifestaron daños externos (clorosis, marchitamiento y muerte); así como tampoco daños en la raíz (necrosis radicular y/o vascular) hasta el término del cultivo, por ello se considera a este material completamente resistente a Fol 3. Estos resultados indican que estos patrones o portainjertos pueden ser usados como una alternativa viable de control de patógenos radiculares y en este caso especial sobre la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 en tomate. Resultados obtenidos por Pavlou *et al.*, (2002), demostraron que el uso de patrones resistentes protegen a los cultivos de pepino de patógenos de suelo como *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, contrario a lo observado en los híbridos susceptibles sin injertar. Así mismo, Kuniyasu y Yamakawa (1983) probaron que el injerto de los cultivares resistentes KNVF y KVF, con las variedades

Cuadro 1. Medias de severidad de Fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3) en portainjertos de tomate bola.

Table 1. Severity measures of Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3) in rootstocks of tomato bola.

Portainjerto	% severidad				
	1 mes	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses
Convencional (sin injertar)	3.33	15.55 ^a	31.10 ^a	84.44 ^a	100 ^a
Multifort	0.0	0.0	0.0	0.0	0
Vigostar 10	0.0	0.0	0.0	0.0	9.99 ^b
Aloha	0.0	0.0	0.0	0.0	8.88 ^b
RT-160961	0.0	0.0	0.0	0.0	6.66 ^b

Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$)

used by horticultural producers in the state of Sinaloa, Mexico and other parts of the country, can be grafted on to this type of standard to confer resistance to attack by this plant pathogen, without diminishing neither yield nor fruit quality.

Productivity assessment of tomato bola grafting.

Significant differences among the rootstock-tomato hybrid combination used ($P < 0.05$) are revealed by the variance analysis (Table 2). Significant differences for the performance among the rootstock-hybrid combinations of tomato used are revealed by the variance analysis (Table 2) for yield. A better performance was revealed by the Imperial hybrid with the Multifort and Vigostar 10 standards, since higher yields were statistically equal, with 150.4 and 148.3 ton/ha, respectively; in addition, they provided 28.2 and 32.5% to export-quality products (MXL, XL, L and M fruit sizes); whereas the Imperial hybrid combinations with the RT-160961 standard and the ungrafted Imperial hybrid had 36.6 and 55.4 ton/ha yields, respectively (Table 3). A similar trend was revealed by the rootstock combination with the Pilavy hybrid. The highest production was registered by the Multifort rootstock with a yield of 124.0 ton/ha, plus an average of 28.8% with export quality. The best combination for the hybrid Aegean occurred with an output of 185.6 ton/ha; although, the lowest value (25%) in the percentage for exporting fruits was obtained by this particular case; this means that there was a large number of fruits with defects, such as the apical closure disease (cat face). The best combinations in production were obtained by the Aloha and Multifort rootstocks for the combinations of rootstocks with the TL-41500 hybrid, and Multifort, with 149.4 and 136.3 ton/ha, with percentages of 31.0 and 30.0 %, respectively, of product with exportation sizes; nevertheless, a high damage percentage by fruit rot (Blossom end rot) was revealed by both combinations. The highest production was recorded by the Aloha rootstock (140.6 t/ha) among the combinations of the hybrid rootstocks with Liberty, presenting 27.8% of export-quality fruit. Generally, an increase in the yield of

susceptibles Fukuju 2 y Walter, disminuyeron la incidencia de la marchitez ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 y *Pyrenochaeta lycopersici* en plantas de tomate. Si bien esto ya había sido demostrado en ensayos en otros estados de la República Mexicana (Ricárdez *et al.*, 2008), valores similares son reportados por otros autores (Mitidieri *et al.*, 2005), donde mencionan que las plantas injertadas de tomate mostraron porcentajes significativamente menores de plantas enfermas hasta los 30 días después del trasplante y de plantas con síntomas aéreos ocasionados por el ataque de nemátodos y *Fusarium oxysporum*. Con estos resultados queda demostrado que los cultivares o híbridos que normalmente son utilizados por productores hortícolas en el estado de Sinaloa, México y otras zonas del país, pueden ser injertados sobre este tipo de patrones para conferir resistencia al ataque de este fitopatógeno, sin que disminuya el rendimiento y la calidad la fruta.

Evaluación de Productividad de Injertos de Tomate Bola.

El análisis de varianza (Cuadro 2) para el rendimiento muestra diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las combinaciones portainjerto-híbrido de tomate utilizados. El híbrido Imperial se comportó mejor con los patrones Multifort y Vigostar 10 ya que promediaron mayores rendimientos, siendo estadísticamente iguales con 150.4 y 148.3 ton/ha respectivamente; proporcionando además 28.2 y 32.5 % de producto con calidad de exportación (frutos calibres MXL, XL, L y M); mientras que las combinaciones del híbrido Imperial con el patrón RT-160961 y el híbrido Imperial sin injerto, tuvieron rendimientos de 36.6 y 55.4 ton/ha respectivamente (Cuadro 3). La combinación de los portainjertos con el híbrido Pilavy mostró una tendencia similar. La mayor producción se registró con el portainjerto Multifort con un rendimiento de 124.0 ton/ha, y un promedio del 28.8% con calidad de exportación. Para el híbrido Aegean, la mejor combinación ocurrió con el portainjerto Multifort

Cuadro 2. Análisis de variancia para producción acumulada de nueve cosechas en la combinación portainjerto-híbrido de tomate bola.

Table 2. Analysis of variance for cumulative production of new crops in the rootstock-hybrid combination of tomato bola.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P
Patron	4	46442.7	11610.7	1312	0.000
Hibrido	4	8949.5	2237.4	2.53	0.052
Patron* Hibrido	16	24934.6	1558.4	1.76	0.065
Error	50	44244.8	884.9		
Total	74	124571.6			

con una producción de 185.6 ton/ha; aunque en este caso se obtuvo el valor más bajo (25%) en cuanto al porcentaje de frutos de exportación, es decir, hubo una gran cantidad de frutos con defecto como lo es el mal cierre apical (cara de gato). Para las combinaciones de los portainjertos con el híbrido TL-41500, las mejores combinaciones en producción

hybrid was revealed by the effect of rootstock-hybrid combination, which can be attributed to grafting with standards that have either resistance characteristics or tolerance to *Fol* 3, since the ungrafted hybrids Imperial and Pilavy had a lower production; but as they became grafted, the production in most of the standards increased, except for RT-160961, a combination that reduced the production of all hybrids. According to the results obtained by Ermel *et al.*, (1999), The decrease in the production of some hybrids may be due to graft incompatibility between the RT-160961 standard and hybrids. Such inconsistency may be due to a vascular discontinuous access and by vascular necrosis because of physiological, anatomical and biochemical changes due to the presence of phenols in the graft union of the rootstock. The results of the study hereby are consistent with what had been previously reported by Khaled *et al.*, (2006), who confirmed the beneficial effect of resistant rootstocks on plant development, yield and fruit quality of tomato.

Histological and histochemical observations. The Imperial hybrid tissues integrity uninoculated with regards to the inoculated (Figure 2) were compared in the cross sections of the roots. An abundant inter and intracellular mycelium colonization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 can be appreciated in the latter in most of the root tissue including the epidermis, cortex parenchyma and conducting vessels (Figure 3), projecting the colonization of cortex cells, as well as the penetration of intercellular hyphae in some of the xylem cells intracellularly colonized, generating a severe damage in the inoculated tissue, probably due to toxins

Cuadro 3. Medidas de producción acumulada de nueve cosechas en la combinación portainjerto-híbrido de tomate bola.

Table 3. Average cumulative production of new crops in the rootstock-hybrid combination of tomato bola.

Patron/Varietal	Producción ton/ha				
	Imperial	Aegean	Pilavy	TL-41500	Liberty
Convencional (sin injertar)	55.45b	111.83ab	66.1a	92.8a	116.0a
Multifort	150.4a	185.6a	124.0a	136.3a	112.3a
Vigostar 10	148.3a	107.8ab	104.2a	109.6a	123.8a
Aloha	121.5ab	132.8ab	91.9a	149.4a	140.6a
RT-160961	36.6b	86.0b	82.9 ^a	79.4 ^a	89.1a

Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$)

produced by the pathogen, such as fusaric acid and licochalcin, which act killing the cells protoplasm (Cárdenas, 2005). It has been revealed by the Vigostar 10 and Multifort standards that the cell organization of the roots is very different from the organization revealed by the Imperial hybrid, since the roots of both Vigostar 10 and Multifort are shaped by an abundant vascular system, mainly by xylem, which is distributed through the root and, apparently, through a thinner crust, mainly in the Multifort case. A cortex of a

se obtuvieron con los portainjertos Aloha y Multifort, con 149.4 y 136.3 ton/ha, con porcentajes de 31.0 y 30.0 %, respectivamente, de producto con calibres de exportación; sin embargo, en ambas combinaciones se observó un alto porcentaje de daño por pudrición apical del fruto (Blossom end rot). Entre las combinaciones de los portainjertos con el híbrido Liberty, la mayor producción se registró con el portainjerto Aloha (140.6 t/ha); presentando 27.8% de frutos con calidad de exportación. En general, el efecto de las combinaciones portainjerto-híbrido muestra un incremento en el rendimiento de los híbridos, el cual puede atribuirse a los injertos con patrones que presentan características de resistencia o tolerancia a Fol 3, ya que los híbridos sin injertar, Imperial y Pilavy, tuvieron la menor producción, pero al ser injertados aumentaron la producción en la mayoría de los patrones, excepto con RT-160961, combinación que disminuyó la producción de todos los híbridos. De acuerdo a los resultados obtenidos por Ermel *et al.*, (1999). La disminución en la producción de algunos híbridos injertados puede deberse a la incompatibilidad que hay entre el patrón RT-160961 y los híbridos. Esta incompatibilidad puede estar dada conexión vascular discontinua y necrosis vascular por alteraciones fisiológicas, anatómicas y bioquímicas debido a la presencia de fenoles en el área de unión del injerto. Los resultados de esta investigación coinciden con los reportados por Khaled *et al.*, (2006), quienes comprobaron el efecto benéfico del uso de portainjertos resistentes sobre el desarrollo de planta, rendimiento y calidad del fruto de tomate.

Observaciones histológicas e histoquímicas. En los cortes transversales de las raíces se comparó la integridad de los tejidos en el híbrido Imperial sin inocular respecto al inocular (Figura 2). En este último se aprecia abundante colonización inter e intracelular de micelio de *Fusarium*

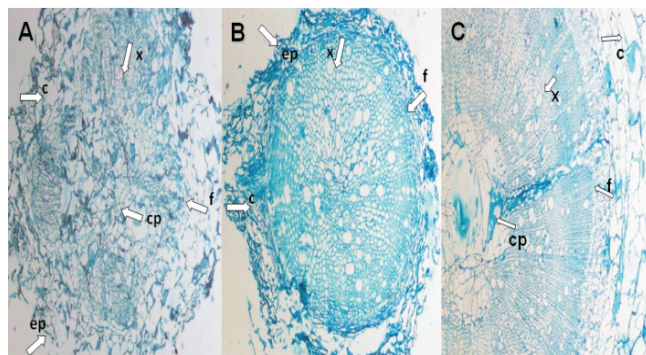


Figura 2. Micrografías de cortes trasversales de raíces del híbrido y los patrones sin inocular vista a 4X que muestran diferencias en la organización celular. A) Imperial, B) Multifort y C) Vigostar. (Epidermis (ep), corteza (c), xilema (x), floema (f), células de parénquima (cp)).

Figure 2. Micrographs of transverse sections of roots of the hybrid and the uninoculated standards seen at 4X showing differences in the cellular organization. A) Imperial, B) Multifort and C) Vigostar. (Epidermis (ep), cortex (c), xylem (x), phloem (f), parenchyma (cp)).

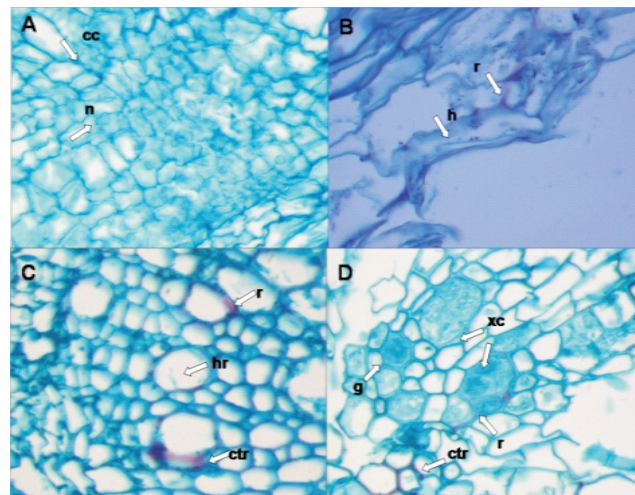


Figura 3. Micrografías de cortes transversales de las raíces del híbrido imperial inoculado vista a 40X. A) Corteza invadida por Fol 3; B) Células de parénquima colonizadas, penetración y crecimiento intercelular de hifas; C) Hifas ramificadas en células de xilema; D) Xilema colonizado con presencia de sustancias. (Colonización celular (cc), núcleo (n), hifas ramificadas (hr), compuestos de color rojo (r), xilema colonizado (xc), compuestos de aspecto granular (g), colonización intracelular (ctr)).

Figure 3. Micrographs of transverse root sections of the inoculated Imperial hybrid seen at 40X. A) Cortex invaded by Fol 3; B) Colonized parenchyma cells, penetration and hyphae intercellular growth; C) Branched hyphae in xylem cells; D) Colonized Xylem with the presence of substances. (Cellular colonization (cc), nucleus (n), branched hyphae (hr), reddish compounds (r), branched xylem (xc), granular aspects compounds (g), intracellular colonization (ctr)).

similar to Imperial hybrid can be appreciated at the root of Vigostar 10 rootstock, but with a better delineation of the cortex. Perhaps the pre-existing resistance standards become influenced by such cell arrangement; this is quite the opposite to the Imperial hybrid, which reveals the discontinuous vascular system being distributed in certain sectors of the root; mostly, the latter consists of a parenchyma tissue that may be involved in this cultivar susceptibility to *Fol 3* because the organization of the vascular system can have an effect on the relative susceptibility of the plant (Beckman and Talboys, 1981). Furthermore, the parenchyma is composed by living cells with thin cell walls; it can be easily disintegrated by several species of *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* and *Rhizoctonia* (Cárdenas, 2005). The degree of fungal colonization was reduced in the plants root tissue of the Multifort and Vigostar 10 rootstocks. The few hyphae that managed to penetrate the root system were mainly restricted to the epidermis and outer cortex, while the internal tissues were rarely colonized. The pathogen penetration in tissues outside the root was correlated with cytological changes, mainly characterized by the formation of appositions or physical barriers formed by tyloses (Figure 4) in xylem vessels, which are a defensive response to the presence of the

oxysporum f. sp. *lycopersici* raza 3 en la mayor parte del tejido radicular, incluyendo epidermis, corteza, células de parénquima y vasos conductores (Figura 3); sobresaliendo la colonización en células de la corteza; así como la penetración de las hifas de manera intercelular en algunas células de xilema colonizadas intracelularmente, lo que generó severos daños en el tejido inoculado, probablemente debido a toxinas producidas por el patógeno como ácido Fusárico y licomarasmina que actúan matando al protoplasma de las células (Cárdenas, 2005). El estudio histológico de los patrones Vigostar 10 y Multifort revela que la organización celular de las raíces es muy diferente a la organización que presenta el híbrido Imperial, ya que las raíces de Vigostar 10 y Multifort están conformadas por abundante sistema vascular, principalmente de xilema, el cual está distribuido a través de la raíz y una corteza aparentemente de menor grosor principalmente en el caso de Multifort. En la raíz del portainjerto Vigostar 10, se aprecia una corteza de tamaño similar al híbrido Imperial, pero con una mejor delimitación de la corteza. Probablemente este acomodo celular influye en la resistencia preexistente que presentan los patrones, contrario al híbrido Imperial que muestra el sistema vascular discontinuo, encontrándose distribuido en ciertos sectores de la raíz, conformada esta última en su mayoría por tejido parenquimatoso, lo que puede intervenir en la susceptibilidad que presenta este cultivar a Fol 3, ya que la organización del sistema vascular puede tener un efecto en la susceptibilidad relativa de la planta (Beckman y Talboys, 1981). Además, el parénquima está constituido de células vivas con pared celular muy delgada y puede ser desintegrada fácilmente por varias especies de *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* (Cárdenas, 2005). El grado de la colonización fungosa fue reducido en tejido de las raíces de las plantas de los portainjertos Multifort y Vigostar 10. Las pocas hifas del patógeno que lograron penetrar al sistema de la raíz, fueron restringidas principalmente a la epidermis y a la corteza externa, mientras que los tejidos internos raramente fueron colonizados. La penetración del patógeno en los tejidos externos de la raíz, se correlacionó con los cambios citológicos caracterizados principalmente por la formación de las aposiciones o barreras físicas formadas por tílides (Figura 4) en vasos de xilema, las cuales son una respuesta de defensa ante la presencia del patógeno (Agrios, 2005). Rojas (1992), menciona que las barreras físicas son los principales mecanismos involucrados en la resistencia de plantas de *Lycopersicon esculentum* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radisis lycopersici*. Resultados similares fueron reportados por García (1994), quien observó la formación de tílides en raíces de plantas de *Lycopersicon esculentum* cvs. Bonny Best, Contesa y Larma, inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, siendo el material Larma, resistente a este fitopatógeno, donde se presentaron mayor cantidad de tílides, factor que se ha indicado que le confiere la resistencia al fitopatógeno señalado, como se ha indicado.

Determinación de polifenoles como mecanismos de defensa bioquímica. Los resultados de la tinción de los tejidos de los patrones Multifort y Vigostar 10; así como, del híbrido Imperial con permanganato de potasio al 1%;

patógeno (Agrios, 2005). As mentioned by Rojas (1992), the physical barriers are the main mechanisms involved in plant resistance of *Lycopersicon esculentum* to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radisis lycopersici*. Similar results were reported by García (1994), who observed the tyloses formation in roots of plant of *Lycopersicon esculentum* cvs., Bonny Best, Contesa and Larma, inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*, being the Larma material resistant to this phytopathogen, where a higher amount of tyloses was revealed; a factor indicated to confer resistance to the phytopathogen mentioned above, as indicated.

Polyphenols determination as mechanisms of biochemical defense. The results of the tissue staining standards Multifort and Vigostar 10, as well as the Imperial hybrid with potassium permanganate to 1%, resulted positive for the presence of polyphenols, which are stained brown by the oxidation of phenolic compounds, indicating that the staining technique used was correct, thus. Sufficient evidence was observed having the differences in the presence of these compounds among cultivars revealed, as the Multifort and Vigostar 10 standards revealed a less intense brownish coloration in the uninoculated tissue compared to the Imperial hybrid; this can be attributed to the resistance degree by employers and the extensive colonization observed in Imperial hybrid. However, an evidence of a greater polyphenols accumulation in the walls and intercellular spaces was revealed by the infected tissue in Vigostar 10 and Multifort, probably as a beneficial defense response, since in accordance to what has been reported by Cárdenas (2005), a melanized barrier between the settlement area and the area of defense is provided by polyphenols, revealed by an increase in color intensity within these areas, quite opposite to what had been observed in Imperial, whose coloration in the infected sites was less than in the standards, mainly than Multifort.

CONCLUSIONS

The usage of Multifort rootstock in combination with five commercial hybrids had the best scab severity control compared with the Aloha, RT-160961 and Vigostar 10 rootstocks, as well as with conventional materials (without grafting), achieving a *Fusarium* severity of 0% compared with the rest of the rootstocks, with values ranging from 6.66 to 9.99% severity. An additional advantage of the use of rootstocks is that it allows to increase productivity in export sizes. Regarding the action mechanisms of Multifort rootstock resistance and the tolerance revealed by Vigostar 10, they can be attributed to the type of xylem cellular organization revealing natural standards, including the training of tyloses and the presence of polyphenols. Neither soluble nor insoluble polysaccharides were related to these standards as an important factor in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3.

Acknowledgements. To Yoshio Smith Félix Gutiérrez (responsible of the greenhouses) and to the laboratory staff: Brissa Darinka Plata Vargas and Laura Aracely Contreras

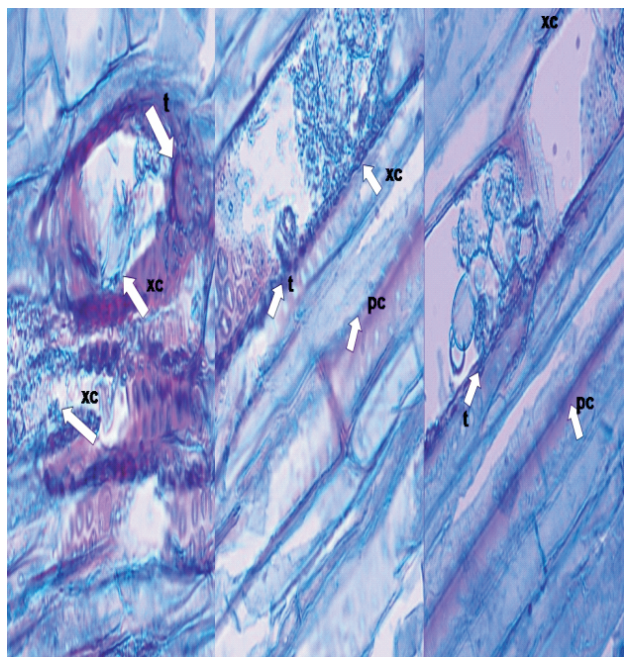


Figura 4. Micrografías de cortes longitudinales vista a 40x que muestran células de xilema de Multifort inoculado con presencia de tilides. (Xilema colonizado (xc), tilides (t)).
 Figure 4. Micrographs of longitudinal sections seen at 40x showing inoculated Multifort xylem cells with tyloses. (Colonized Xylem (xc), tyloses (t)).

resultaron ser positivos para la presencia de polifenoles, los cuales se tiñeron de café por la oxidación de los compuestos fenólicos, indicando que la técnica de tinción empleada fue correcta. Se observó evidencia suficiente que muestra diferencias en la presencia de estos compuestos dentro de los cultivares, ya que en el tejido sin inocular, los patrones Vigostar 10 y Multifort, mostraron una coloración café menos intensa comparados con el híbrido Imperial, lo cual puede atribuirse al grado de resistencia que presentan los patrones y a la abundante colonización que se observó en el híbrido Imperial. Sin embargo, los tejidos infectados de Vigostar 10 y Multifort mostraron evidencia de una mayor acumulación de polifenoles en las paredes y espacios intercelulares, siendo probablemente una respuesta de defensa benéfica, ya que de acuerdo a lo citado por Cárdenas (2005), los polifenoles proporcionan una barrera melanizada entre la zona de colonización y la zona de defensa, y se manifestó con un aumento en la intensidad de color dentro de estas zonas, contrario a lo observado en Imperial, cuya coloración en los sitios infectados fue menor a la de los patrones, principalmente Multifort.

CONCLUSIONES

El uso del portainjerto Multifort en combinación con los cinco híbridos comerciales presentó el mejor control de la severidad de la fusariosis en comparación con los portainjertos Aloha, RT-160961 y Vigostar 10, así como, con los materiales

Angulo, for their technical support in the production and handling of tomatoes.

LITERATURACITADA

- Agrios, G. N. 2005. Como se defienden las plantas de los patógenos en: Fitopatología. Guzman, M.(ed). 2da ed. Limusa. México, D.F. 952 p.
- AMHPAC, 2008. Asociación Mexicana de Horticultura Protegida. www.amhpac.org.
- Báez, Valdez, E. P. 2009. Efecto Patrón/Híbrido Sobre Resistencia a la Fusariosis, Productividad y Cambios Histológicos e Histoquímicos en Raíces de Tomate Bola. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C. Culiacán, Sinaloa, México. 101 p.
- Beckman, C. H., and Talboys, P. W. 1981. Anatomy of resistance. pp. 431-486. In: Mace, M. E., A. A. Bell, and C. H. Beckman. (eds.). Fungal wilt disease of plants. Academic Press, New York. USA. 726 p.
- Besri, M. 2003. Tomato grafting as an alternative to methyl bromide in Morocco. In Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. november 2003. San Diego, CA USA.
- Cárdenas, S. E. 2005. Histopatología vegetal. Colegio de postgraduados Montecillo, Edo. de México. 80 p.
- Carrillo-Fasio, J. A., Montoya-Rodríguez, T., García-Estrada, R., Cruz Ortega, J., Márquez Zequera, I. y Adriana Josefa Sañudo-Barajas. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder & Hansen, en tomate en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 21: 123-127.
- Curtis P. J. 1986. Microtecnia Vegetal. Ed. Trillas. México D.F., México. 106 p
- Ermel, F. F., Kervella, J., Catesson, A. M., and Poessel, J. L. 1999. Localized graft incompatibility in pear/quince (*Pyrus communis*/*Cydonia oblonga*) combinations: multivariate analysis of histological data from 5-month-old grafts. Tree Physiology 19:645-654.
- García, E. R. 1994. Alteraciones fisiológicas e histológicas inducidas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en tres cultivares de tomate. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo estado de México. 124p.
- García, E. R. y Valenzuela, U. G. 2009. Marchitez del Tomate y Pudrición de la Corona y raíz. In: Manual de Producción de Tomate en Invernadero. Celaya, Guanajuato, Mexico. Ed. Intagri. 458p.
- Garduño, S.I., y González, G.A. 2007. Efecto del injerto y el número de tallos por planta sobre el rendimiento en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Roque. Roque Celaya, Guanajuato, México. 102p.
- Godoy, H. H. y Castellanos, J. 2009. El injerto en tomate. In: Manual de Producción de Tomate en Invernadero. Celaya, Guanajuato, Mexico. Ed. Intagri. 458p.
- Jensen, W.A. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. 3a. ed. Freeman, Ames, Iowa. USA. 389p.

convencionales (sin injertar), logrando una severidad de la fusariosis del 0%, en comparación con el resto de los portainjertos, que presentaron valores de 6.66 a 9.99% de severidad. Una ventaja adicional del uso de los portainjertos es que permite incrementar la productividad en tamaños de exportación. Respecto a los mecanismos de acción de la resistencia del portainjerto Multifort y la tolerancia de Vigostar 10, se pueden atribuir al tipo de organización celular del xilema que presentan los patrones de manera natural, además de la formación de tilides y mayor presencia de polifenoles. Los polisacáridos solubles e insolubles no se relacionaron en estos patrones como un factor importante en la resistencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3.

Agradecimientos. A Yoshio Smith Félix Gutiérrez (responsable de invernaderos) y al personal de los laboratorios: Brissa Darinka Plata Vargas y Laura Aracely Contreras Angulo, por su apoyo técnico en la producción y manejo del cultivo de tomate.

Jones, J. B. y Jiménez G. M. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. Mundi-Prensa Libros. Madrid, España. 74p.

Khaled, H., Mejda, D. R., Hayfa, J. K., and Mohamed, E. M. 2006. Control of fusarium crown and root rot of tomato, Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by Grafting onto Resistant Rootstocks. Plant Pathology Journal 5:161-165.

Kuniyasu, K. and Yamakawa, K. 1983. Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 by grafting to KNVF and KVF, rootstocks of the interespecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* x *L. hisutum*. Annual Phytopathology Society Japan 49: 581-586.

Mazollier, C. 1999. Greffage de la tomate en culture sous abri. PHM. Reve Horticole. Editions du Point Veterrinaire 404: 44-48.

Miguel, A. 1997. Grafting for the control of soilborne pathogens. pp. 75-80. In: Bello, A., Gonzalez, J.A., Arias, M. and Rodrigues-Kabana, R. (eds) Alternatives to methyl bromide for the southern European countries. S.C.V. Valencia Spain. 404p.

Mitidieri, M. S., Brambilla, M. V., Piris, M., Piris, E., y Maldonado, L. 2005. El uso de portainjertos resistentes en cultivo de tomate bajo cubierta: resultados sobre la sanidad y el rendimiento del cultivo. INTA Centro Regional Buenos Aires Norte, Buenos Aires, Argentina. 8p.

Pavlou, G. C., Vakalounakis, D. J., and Ligoigakis, E. K. 2002. Control of root and stem rot of cucumber, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* by grafting onto resistant rootstocks. Plant Disease. 86:379-382.

Ricárdez, M., Rodríguez N., Díaz, M. y Camacho F. 2008. Influence of rootstock, cultivar and environment on tomato yield under greenhouse. Departamento de producción vegetal. Universidad de Almería, España. Acta

Horticultural 797. ISHS.

Rivard, C., Louws, F. 2006. Grafting for disease resistance in heirloom tomatoes. Department of Agriculture and local governments cooperating. North Carolina State University, North Carolina A&T State University, U.S. 8 p.

Rojas, M. R. I. 1992. Posibles factores bioquímicos involucrados en la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en plantas de jitomate. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 80p.

Santos, J. R. M. and López, C. A. 1993. Tomato cultivar differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races. Horticultura Brasileira 11: 27-29.

USDA, 1997. United States Standards for grades of fresh tomatoes: Agric. Handbook No. 437. U.S. Gov. Printing Office. Washington D.C., USA. 560 p.

Vakalounakis, D. J. and Fragkiadakis, G. A. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolate from cucumber. Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD fingerprinting. Phytopathology 89:161-168.

Watson, R. T., Albritton, D. T., Anderson, S. O., and Lee-Bapt, S. 1992. Methyl bromide: its atmospheric science, technology and economics. Montreal Protocol Assessment Suppl., United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya: 234 p .