



Original Article/Artículo Original

Effect of *Bacillus* strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality

Efecto de cepas de *Bacillus* solas y en interacción con hongos fitopatógenos sobre el crecimiento vegetal y calidad del fruto de jitomate

Ruiz-Cisneros, M. F.¹, Ornelas-Paz, J. J.², Olivas-Orozco, G. I.², Acosta-Muñiz, C. H.², Sepúlveda-Ahumada, D. R.², Zamudio-Flores, P. B.², Berlanga-Reyes, D. I.², Salas-Marina, M. A.³, Cambero-Campos, O. J.⁴, Rios-Velasco, C.^{2*}

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), ¹Doctorate in Sciences, ²Professor-Researcher, Campus Cuauhtémoc. Cd. Cuauhtémoc, Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial, C.P. 31570, Chihuahua, México.

³Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), Facultad de Ingenierías, Unidad Académica Villacorzo. Villacorzo, Km 3.0, Carretera Villacorzo-Ejido Monterrey, C.P. 29000, Chiapas, México.

⁴Universidad Autónoma de Nayarit (UAN), Unidad Académica de Agricultura. Km. 9.0 Carretera Tepic-Compostela, C.P. 63155, Xalisco, Nayarit, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Ruiz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J. J., Olivas-Orozco, G. I., Acosta-Muñiz, C. H., Sepúlveda-Ahumada, D. R., Zamudio-Flores, P. B., Berlanga-Reyes, D. I., Salas-Marina, M. A., Cambero-Campos, O. J., Rios-Velasco, C. (2019). Effect of *Bacillus* strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. *Revista Bio Ciencias* 6, e541. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e541>



ABSTRACT

An alternative to promote the quality of tomato fruits (*Solanum lycopersicon* L.) and reduce the indirect effects of phytopathogenic fungi that cause root and crown diseases, might be the use of antagonistic bacteria of the *Bacillus* genus. The aim of the study was to determine the effect, of three *Bacillus* strains alone and together in interaction with phytopathogenic fungi on the plant growth promotion of tomato cv. Merlice and fruit quality. For this purpose, seedlings were inoculated with three *Bacillus* species (*B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* and *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*) and then with three phytopathogenic fungi of tomato (*Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora infestans*). At the end of the production cycle, the height and weight of plants, the length and weight of roots, chlorophyll in leaves, and

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: July 10th 2018.

Accepted/Aceptado: October 1st 2018.

Available on line/Publicado: January 24th 2019.

RESUMEN

Una alternativa para promover la calidad del fruto de jitomate (*Solanum lycopersicon* L.) y aminorar los efectos indirectos de hongos fitopatógenos causantes de enfermedades de raíz y cuello puede ser el uso de bacterias antagonistas del género *Bacillus*. El objetivo del estudio fue determinar el efecto de tres cepas de *Bacillus* solas y en interacción con tres hongos fitopatógenos en la promoción del crecimiento de plantas de jitomate cv. Merlice y calidad del fruto. Para este propósito, se inocularon plántulas con tres especies de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* y *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*), y después con tres hongos fitopatógenos del jitomate (*Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*). Al final del ciclo de producción, se determinaron, la altura y peso de las plantas; longitud y peso de raíces; y clorofila en hojas y el rendimiento. Los frutos cosechados se caracterizaron por color, peso, tamaño, espesor del mesocarpio, sólidos solubles totales, acidez titulable, composición bromatológica, firmeza, y número y peso de semillas. La inoculación con las tres cepas de *Bacillus*

*Corresponding Author:

Claudio, Rios Velasco. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Unidad Cuauhtémoc. Cd. Cuauhtémoc, Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial, C.P. 31570, Chihuahua, México. E-mail: claudio.rios@ciad.mx

the fruit yield, was determined. The fruits harvested were characterized for color, weight, size, mesocarp thickness, total soluble solids, titratable acidity, bromatological analysis, firmness, and number and weight of seeds. *Bacillus* inoculation with the three strains resulted in higher values among the variables evaluated. *Bacillus amyloliquefaciens* significantly increased plant height and root length and yield by 30 %, whereas the phytopathogen *F. oxysporum* significantly decreased yield in 30 %. *Bacillus subtilis* strain showed positive effects on fruit diameter and firmness, protein content and root length. The three *Bacillus* strains promoted the growth of tomato plants, yield and improved some of their fruit quality parameters.

KEY WORDS

Biological control agents, antagonistic bacteria, growth promotion, root diseases, yield.

Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicon* L.; Solanales: Solanaceae) is one of the horticultural crops of great importance worldwide, due to its high consumption in both fresh and processed, with a planted area of approximately 5 million hectare and a production of more than 177 million t in 2016. In the same year, Mexico contributed with more than 4 million t (2.3 %) harvested in an area of more than 90,000 ha (FAO, 2016). This crop, like many others, is susceptible to the attack of a great diversity of phytopathogenic fungi. These microorganisms can cause economic losses up to 100 % in tomatoes (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016). Some of these fungi are causing root and crown diseases, which obstruct the vascular bundles of the plant, preventing the normal flow of water and nutrients, which is reflected in symptoms such as defoliation, wilting, foliar chlorosis, reduced growth, low fruit production, among other negative effects (Shafique *et al.*, 2016). Among the most important pathogenic fungi of tomato are *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Alternaria solani* and *Phytophthora infestans* (El_Komy *et al.*, 2015). Chemical fungicides are the most commonly used for the control of these phytopathogens with satisfactory results; however, the excessive use of these substances may induce the development of resistance by pathogens, elimination of non-target microorganisms, pollution of agricultural soil and water bodies, and other negative effects (Al-Rahmah

resultó en los valores más altos en la mayoría de las variables evaluadas. *B. amyloliquefaciens* incrementó significativamente la altura de la planta, longitud de raíz y el rendimiento en un 30 %, mientras que el fitopatógeno *F. oxysporum* redujo el rendimiento 30 %. *Bacillus subtilis* mostró efectos positivos en el diámetro y firmeza del fruto, contenido de proteínas y longitud de raíz. Las tres cepas de *Bacillus* promovieron el crecimiento de las plantas y el rendimiento y mejoraron algunos parámetros de calidad del fruto.

PALABRAS CLAVE

Agentes de control biológico, bacterias antagonistas, promoción del crecimiento, enfermedades radiculares, rendimiento.

Introducción

El jitomate (*Solanum lycopersicon* L.; Solanales: Solanaceae) es uno de los cultivos hortícolas de gran importancia a nivel mundial, debido a su elevado consumo tanto en producto fresco como procesado, con una superficie sembrada de aproximadamente 5 millones de hectáreas y una producción de más de 177 millones de toneladas en 2016. En el mismo año, México contribuyó con más de 4 millones de toneladas (2.3 %) cosechadas en un área de más de 90,000 ha (FAO, 2016). Este cultivo, como muchos otros, es susceptible al ataque de una gran diversidad de hongos fitopatógenos. Dichos microorganismos pueden causar pérdidas económicas hasta del 100 % en tomate (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016). Algunos de estos hongos son causantes de enfermedades de raíz y cuello, que obstruyen los haces vasculares de la planta, evitando el flujo normal de agua y nutrientes, lo cual se refleja en síntomas como defoliación, marchitez, clorosis foliares, reducción del crecimiento, baja producción de frutos, entre otros efectos negativos (Shafique *et al.*, 2016). Dentro de los hongos patógenos más importantes del jitomate se encuentran *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Alternaria solani* y *Phytophthora infestans* (El_Komy *et al.*, 2015). Los fungicidas químicos son los más comúnmente usados para el control de estos fitopatógenos con resultados satisfactorios; sin embargo, el uso excesivo de estas sustancias puede inducir el desarrollo de resistencia por parte de los patógenos, eliminación de microorganismos no blancos, contaminación de suelos agrícolas y cuerpos de agua, y

et al., 2013; Shafique et al., 2016). An alternative for the control of these pathogens can be the use of antagonistic bacteria of the genus *Bacillus*, recognized as excellent biological control agents, quality enhancers of agricultural soils and promoters of plant growth, among other attributes (Cabra-Cendales et al., 2017). However, several *Bacillus* strains have been evaluated mainly *in vitro*, individually and in few studies have been considered the effects of the application of these on the bromatological composition of the fruits and its potential to decrease the indirect damage in fruits caused *in situ* by phytopathogenic microorganisms (Esitken et al., 2010; Ju et al., 2014; El_Komy et al., 2015). Derived from the above, the objective of the study was to determine the effect of three *Bacillus* strains alone and in interaction with three phytopathogenic fungi on the growth of tomato plants and fruit quality.

Material and Methods

Plant and microbial material

The microbial strains were provided by the ceparium from the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Chihuahua Headquarters, Cuauhtémoc Campus, and the Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, Michoacán, Mexico. Three bacterial strains of the genus *Bacillus* [*B. amyloliquefaciens* (Ba); *B. methylotrophicus* (Bm) and *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (Bs)] were used. The pathogenicity of the phytopathogens and the antagonistic effects of *Bacillus* spp. were confirmed in previous studies (Rios-Velasco et al., 2016; Ruiz-Cisneros et al., 2017) and three phytopathogens isolated of tomato crops in Mexico [*Alternaria solani* (As), *Fusarium oxysporum* (Fo) y *Phytophthora infestans* (Pi)].

Tomato seeds (*Solanum lycopersicon* L. cv. Merlice), were provided by the Company DeRuitter™ (Monsanto Holland), while the pollinating agents *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae), were purchased with Koppert Mexico, S.A. de C.V. (El Marqués, Querétaro, Mexico).

Establishment and management of the tomato cultivation

The experiment was performed in a greenhouse (tunnel type of 20 × 8 × 5 m, without heating) in Cuauhtémoc, Chihuahua, Mexico located at 28° 26' 51"

otros efectos negativos (Al-Rahmah et al., 2013; Shafique et al., 2016). Una alternativa para el control de estos patógenos, puede ser el uso de bacterias antagonistas del género *Bacillus*, reconocidas como excelentes agentes de control biológico, mejoradores de la calidad de suelos agrícolas y promotores del crecimiento vegetal, entre otros atributos (Cabra-Cendales et al., 2017). Sin embargo, varias cepas de *Bacillus* han sido evaluadas principalmente *in vitro*, de manera individual y en pocos estudios se han considerado los efectos de la aplicación de estos sobre la composición bromatológica de los frutos y su potencial para aminorar el daño indirecto en frutos causado por microorganismos fitopatógenos *in situ* (Esitken et al., 2010; Ju et al., 2014; El-Komy et al., 2015). Derivado de lo anterior, el objetivo del estudio fue determinar el efecto de tres cepas de *Bacillus* solas y en interacción con tres hongos fitopatógenos sobre el crecimiento de plantas de jitomate y calidad del fruto.

Material y Métodos

Material vegetal y microbiano

Las cepas microbianas fueron proporcionadas por el cepario del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Sede Chihuahua, Campus Cuauhtémoc, y la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México. Se usaron tres cepas bacterianas del género *Bacillus* [*B. amyloliquefaciens* (Ba); *B. methylotrophicus* (Bm) y *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* (Bs)]. La patogenicidad de los fitopatógenos y los efectos antagonistas de *Bacillus* spp., se confirmaron en estudios previos (Rios-Velasco et al., 2016; Ruiz-Cisneros et al., 2017) y tres hongos fitopatógenos aislados de cultivos de jitomate, en México [*Alternaria solani* (As), *Fusarium oxysporum* (Fo) y *Phytophthora infestans* (Pi)].

Las semillas de jitomate (*Solanum lycopersicon* L. cv. Merlice), fueron provistos por la compañía DeRuitter™ (Monsanto Holland), mientras que los agentes polinizantes *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae), fueron adquiridos con Koppert México, S.A. de C.V. (El Marqués, Querétaro, México).

Establecimiento y manejo del cultivo de jitomate

El experimento se realizó en un invernadero (tipo túnel de 20 × 8 × 5 m, sin calefacción) en Cuauhtémoc, Chihuahua, México, localizado a 28°26'51»N; 106°49'43»O y 2,020 msnm. Las semillas de jitomate se germinaron en

N; 106° 49' 43" W and 2,020 masl. Tomato seeds were germinated in trays of 200 cavities until the state of 2-3 true leaves. Subsequently, they were transplanted in black plastic bags with a capacity of 5 L with a mixture of sterilized substrate (121 °C, 15 psi, 1 h) composed of loamy soil, vermiculite (Termolita, S.A. de C.V., Santa Catarina, Nuevo León, Mexico) and peat moss (Lambert Peat Moss Inc.-Turbines Lambert Inc., Quebec, Canada) in a ratio of 1: 1: 1. Fertilization was performed every 30 days post-transplantation (dpt), [250 mL of Urea (6 g/L) (Ferti-urea, Productora de Fertilizantes del Noroeste, S.A. de C.V., Cd. Obregón, Sonora, Mexico) and Triple 19 (2 g/L) (Poly-Feed, greenhouse grade, soluble solid fertilizer NPK 19-19-19, Haifa Mexico, S.A. de C.V., Mexico) and 10 mL of Murashige and Skoog medium (4.4 g/L) (Sigma-Aldrich, Mexico)], during the 2016 production cycle. The pollination was carried out by a bumblebee colony *B. terrestris*.

Inoculation of the substrate with microorganisms

The *Bacillus* strains were grown in LB broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 28 °C, in constant shaking (180 rpm) for 2 d. For their increase, the fungi were inoculated into a nutrient broth (BD Bioxon, Becton Dickinson de Mexico, S.A. de C.V., Cuautitlán Izcalli, Estado de Mexico, Mexico), except *P. infestans* that was grown in a vegetable broth V8 (V8 juice, Campbell's™) added with calcium carbonate (3 g/L), at 28 °C, in constant shaking (180 rpm) for 5 d.

Pathogens and antagonists were applied individually to the substrate of 150 pots, at 8 dpt, according to the concentrations shown in Table 1. Thirty milliliters ($4.5\text{-}6.0 \times 10^{10}$ CFU) of the suspension of the antagonistic bacterium and 20 mL ($2.6\text{-}7.8 \times 10^7$ conidia) of the suspension of the phytopathogen were applied. Ten plants were used for each microorganism (antagonist or phytopathogen), where every plant was an experimental unit (T2-T7, Table 1) y 90 plants for the interaction tests between antagonists and pathogens (T8-T16, Table 1). Additionally, 10 plants without inoculum were used as controls (T1, Table 1).

The interaction treatments (antagonists vs pathogens), consisted in the application of the corresponding phytopathogen at 18 dpt (i.e. 10 d after the application of the *Bacillus* strains). The population of antagonists was maintained by three applications of the inoculum at intervals of 20 d, after the first inoculation. It should

charolas de 200 cavidades hasta el estado de 2-3 hojas verdaderas. Posteriormente, se trasplantaron en bolsas de plástico negro con capacidad de 5 L con una mezcla de sustrato esterilizado (121 °C, 15 psi, 1 h) compuesto de suelo franco, vermiculita (Termolita, S.A. de C.V., Santa Catarina, Nuevo León, México) y peat moss (Lambert Peat Moss Inc.-Turbines Lambert Inc., Quebec, Canadá) en una proporción de 1:1:1. La fertilización se realizó cada 30 días después del trasplante (dpt) [250 mL de Urea (6 g/L) (Ferti-urea, Productora de Fertilizantes del Noroeste, S.A. de C.V., Cd. Obregón, Sonora, México) y Triple 19 (2 g/L) (Poly-Feed, grado invernadero, fertilizante sólido soluble NPK 19-19-19, Haifa México, S.A. de C.V., México) y 10 mL de medio Murashige y Skoog (4.4 g/L) (Sigma-Aldrich, México)], durante el ciclo de producción 2016. La polinización fue llevada a cabo por una colmena de abejorros *B. terrestris*.

Inoculación del sustrato con los microorganismos

Las cepas de *Bacillus* se crecieron en caldo LB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 28 °C, en agitación constante (180 rpm) por 2 d. Para su incremento, los hongos se inocularon en un caldo nutritivo (BD Bioxon, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V., Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México), excepto *P. infestans* que se creció en un caldo de verduras V8 (jugo V8, Campbell's™) adicionado con carbonato de calcio (3 g/L), a 28 °C, en agitación constante (180 rpm) por 5 d.

Los patógenos y antagonistas se aplicaron individualmente al sustrato de 150 macetas, a los 8 dpt, de acuerdo con las concentraciones mostradas en el Tabla 1. Se aplicaron 30 mL ($4.5\text{-}6.0 \times 10^{10}$ UFC) de la suspensión de la bacteria antagonista y 20 mL ($2.6\text{-}7.8 \times 10^7$ conidias) de la suspensión del fitopatógeno. Se usaron 10 plantas para cada microorganismo (antagonista o fitopatógeno), donde cada planta fue una unidad experimental (T2-T7, Tabla 1) y 90 plantas para las pruebas de interacción entre antagonistas y patógenos (T8-T16, Tabla 1). Adicionalmente, se usaron 10 plantas sin inóculo, como testigos (T1, Tabla 1).

Los tratamientos de interacción (antagonistas vs patógenos), consistieron en la aplicación el patógeno correspondiente a los 18 dpt (10 d después de la aplicación de las cepas de *Bacillus*). La población de antagonistas se mantuvo mediante tres aplicaciones del inóculo a intervalos de 20 d, después de la primera inoculación. Cabe resaltar que los fitopatógenos se

be noted that the phytopathogens were inoculated once. The plants were maintained under greenhouse conditions and were evaluated during the production cycle (April to October 2016).

Agronomic measurements

The plants were evaluated for height and weight of the aerial part, length and weight of roots, stem diameter, to the end of the production cycle. Chlorophyll (SPAD units) was estimated four times (every 20 dpt) in 10 random leaves per plant, of each treatment, using a Spad 502DL Plus chlorophyll meter (Konica Minolta Brand, Spectrum Technologies, Inc., Aurora Illinois, USA). The number of fruits produced per plant was also recorded and based on this, the yield was calculated, considering all the fruits harvested over time during the evaluation period.

Tomatoes were harvested in the red point, according to the specifications of the United States Department of Agriculture (USDA, 2015) and were stored for 3 d at 4 °C until analysis. The fruits were evaluated for weight, polar and equatorial diameter, color, number and weight of seeds, total soluble solids (TSS, °Brix), titratable acidity (% citric acid), firmness and thickness of the mesocarp. The polar and equatorial diameters were measured using a diameter meter measurer (Cranston Machinery Co., Oak Grove, Oregon, USA). The color [L* (lightness from black to white), a* (goes from red to green) y b* (goes from blue to yellow)]. was measured at four equidistant points on the equatorial axis of each fruit, using a Minolta CR300 colorimeter. The number of seeds was determined in 10 random fruits of each treatment. The total soluble solids (TSS, °Brix) were determined, using a PAL-1 digital table refractometer (Atago Co. Ltd., Tokyo Japan). For the titratable acidity, 10 g of flesh (from 20 fruits taken randomly from each treatment) were homogenized with 250 mL of sterile distilled water and 50 mL of the obtained solution were titrated with 0.1 N NaOH, using phenolphthalein 0.5 % as color indicator. The titratable acidity was expressed as % citric acid (NMX-F-102-S-1978). For the firmness of the fruits, 50 tomatoes taken randomly from each treatment were evaluated and was determined by a puncture test using a texture analyzer Ta XTPlus (Texture Analyzer, Surrey, RU), starting at 30 cm/min, at a distance of 15 cm at two opposite points along the equatorial plane and the maximum force (N) was recorded. The thickness of the mesocarp was determined in four sections of 10 random fruits from each treatment, using a digital Vernier (Knova 0-150 mm).

inocularon en una ocasión. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y se evaluaron durante el ciclo de producción (abril a octubre 2016).

Mediciones agronómicas

Al final del ciclo de producción, las plantas se evaluaron para altura y peso de la parte aérea, longitud y peso de raíz y diámetro de tallo. La clorofila (unidades SPAD) se estimó cuatro veces (cada 20 dpt) en 10 hojas al azar por planta, de cada tratamiento, usando un medidor de clorofila Spad 502DL Plus (Konica Minolta Brand, Spectrum Technologies, Inc., Aurora Illinois, EUA). También se registró el número de frutos producidos por planta y con base en esto, se calculó el rendimiento, considerando todos los frutos cosechados a través del tiempo durante el periodo de evaluación.

Los jitomates se cosecharon en el punto rojo, de acuerdo a las especificaciones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA, 2015) y se almacenaron por 3 d a 4 °C hasta su análisis. Los frutos fueron evaluados para peso, diámetro polar y ecuatorial, color, número y peso de semillas, sólidos solubles totales (SST; °Brix), acidez titulable (% ácido cítrico), firmeza y espesor del mesocarpio. Los diámetros polar y ecuatorial se midieron usando un medidor de diámetro (Cranston Machinery Co., Oak Grove, Oregon, EUA). El color [L* (luminosidad de negro a blanco), a* (va de rojo a verde) y b* (va de azul a amarillo)]. se midió en cuatro puntos equidistantes en el eje ecuatorial de cada fruto, usando un colorímetro Minolta CR300. El número de semillas se determinó en 10 frutos al azar de cada tratamiento. Los sólidos solubles totales (SST, °Brix) se determinaron, usando un refractómetro digital de mesa PAL-1 (Atago Co. Ltd., Tokyo Japón). Para la acidez titulable, se homogeneizaron 10 g de pulpa (a partir de 20 frutos tomados al azar de cada tratamiento) con 250 mL de agua destilada estéril y 50 mL de la solución obtenida se titularon con NaOH al 0.1 N, usando fenolftaleína al 0.5 % como indicador de color. La acidez titulable se expresó como porcentaje de ácido cítrico (NMX-F-102-S-1978). Para la firmeza de los frutos, se evaluaron 50 jitomates tomados al azar de cada tratamiento y se determinó mediante una prueba de punción usando un analizador de textura Ta XTPlus (Texture Analyzer, Surrey, RU), iniciando a 30 cm/min, a una distancia de 15 cm en dos puntos opuestos a lo largo del plano ecuatorial y se registró la fuerza máxima (N). El espesor del mesocarpio se determinó en cuatro secciones de 10 frutos al azar de cada tratamiento, usando un Vernier digital (Knova 0-150 mm).

Table 1.
Treatments and concentration (CFU or conidia/mL) of inoculations on tomato plants with *Bacillus* strains and phytopathogenic fungi.

Tabla 1.
Tratamientos y concentración (CFU o conidias/mL) de las inoculaciones en plantas de jitomate con cepas de *Bacillus* y hongos fitopatógenos.

Code	Treatment		Antagonists (CFU/mL)	Phytopathogens (conidia/mL)
	Antagonistic bacteria	Phytopathogenic fungi		
T1	Control	—	—	—
T2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (Ba)	—	1.8×10 ⁹	—
T3	<i>B. methylophilicus</i> (Bm)	—	2.0×10 ⁹	—
T4	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (Bs)	—	1.5×10 ⁹	—
T5	—	<i>Fusarium oxysporum</i> (Fo)	—	1.3×10 ⁶
T6	—	<i>Alternaria solani</i> (As)	—	3.9×10 ⁶
T7	—	<i>Phytophthora infestans</i> (Pi)	—	2.6×10 ⁶
T8	Ba	Fo	1.8×10 ⁹	1.3×10 ⁶
T9	Ba	As	1.8×10 ⁹	3.9×10 ⁶
T10	Ba	Pi	1.8×10 ⁹	2.6×10 ⁶
T11	Bm	Fo	2.0×10 ⁹	1.3×10 ⁶
T12	Bm	As	2.0×10 ⁹	3.9×10 ⁶
T13	Bm	Pi	2.0×10 ⁹	2.6×10 ⁶
T14	Bs	Fo	1.5×10 ⁹	1.3×10 ⁶
T15	Bs	As	1.5×10 ⁹	3.9×10 ⁶
T16	Bs	Pi	1.5×10 ⁹	2.6×10 ⁶

CFU= Colony forming units.

UFC= Unidades formadoras de colonias.

Bromatological analysis

A composite sample of 250 g was obtained from 20 fruits taken randomly from each treatment. The samples were placed into Ziploc™ bags and stored at -80 °C until analysis. Subsequently, the samples were homogenized using a LB10 blender (Waring Laboratory, Torrington, CT, USA) and puree sub-samples were obtained (from 1 to 10 g, depending on the determination). These were subjected to measurements of humidity, ash, proteins (N × 6.25), fats (lipids) and total fiber, according to the official methods (925.10, 923.03, 991.20 and 920.35) of the Association of the Official Analytical Chemistry (AOAC, 2002).

Statistical analysis

The experiment consisted of 16 treatments (Table 1). The assays were performed with 10 tomato plants per treatment, considering each plant as an experimental unit,

Análisis bromatológico

Se obtuvo una muestra compuesta de 250 g a partir de 20 frutos tomados al azar de cada tratamiento. Las muestras se colocaron en bolsas Ziploc™ y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Subsecuentemente, las muestras se homogeneizaron usando una licuadora LB10 (Waring Laboratory, Torrington, CT, USA) y se obtuvieron sub-muestras de puré (de 1 a 10 g, dependiendo de la determinación). Estas se sometieron a mediciones de humedad, cenizas, proteínas (N × 6.25), grasas y fibra total, de acuerdo a los métodos oficiales (925.10, 923.03, 991.20 y 920.35) de la Association of Official Analytical Chemistry (AOAC, 2002).

Análisis estadístico

El experimento consistió de 16 tratamientos (Tabla 1). Los ensayos se realizaron con 10 plantas de jitomate

using a completely random design. Data were analyzed using the software Statistical Analysis System version 9.0 (SAS, 2002) to balance the analysis of variance (ANOVA), and the means were separated by the Tukey test ($p=0.05$). The fruit measurements were determined in triplicate and the data obtained were subjected to an ANOVA and a Tukey separation test ($p=0.05$).

Results and Discussion

Plant growth promotion and yield of the plant

The three *Bacillus* strains showed positive effects in at least one of the agronomic variables evaluated (Figures 1 and 2). The fresh and dry weight of the plants ranged from 104 to 246.6 g and from 29.7 to 47.9 g,

por tratamiento, considerando a cada planta como una unidad experimental, usando un diseño completamente al azar. Los datos se analizaron usando el software Statistical Analysis System versión 9.0 (SAS, 2002) para balancear el análisis de varianza (ANOVA), y las medias se separaron mediante la prueba de Tukey ($p=0.05$). Las mediciones en frutos, se determinaron por triplicado y los datos obtenidos se sometieron a un ANOVA y una prueba de separación de medias por Tukey ($p=0.05$).

Resultados y Discusión

Promoción de crecimiento vegetal y rendimiento de la planta

Las tres cepas de *Bacillus* mostraron efectos positivos en al menos una de las variables agronómicas

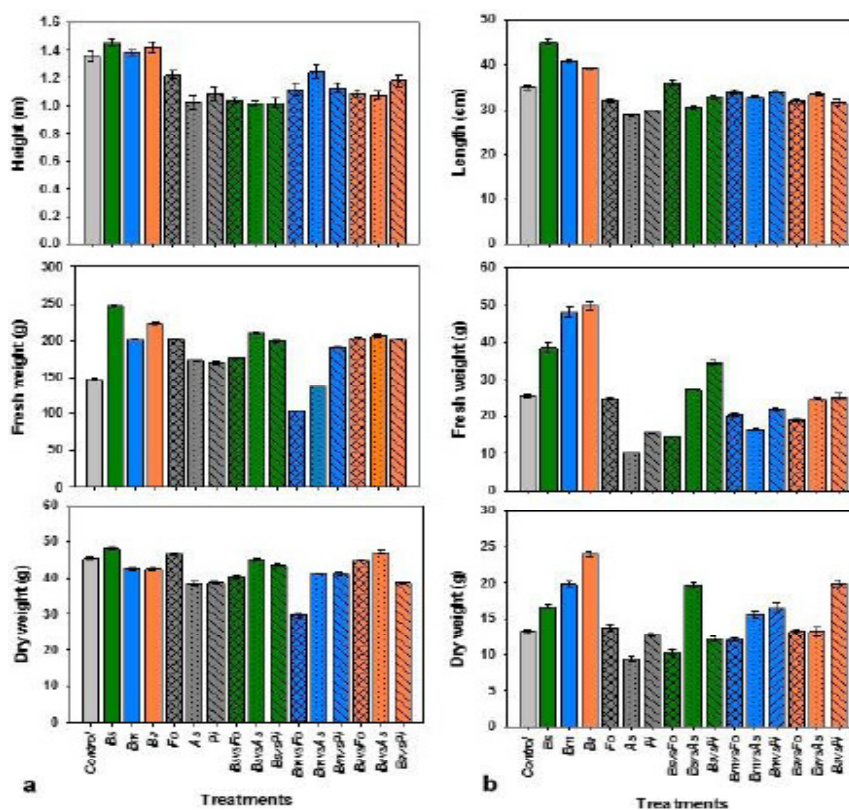


Figure 1. Growth variables (height, fresh and dry weight) estimated in *Lycopersicon esculentum* L. cv. Merlice, inoculated with *Bacillus* strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi: a) plants; b) roots. The data are presented as means \pm standard error.

Figura 1. Variables de crecimiento (altura, pesos fresco y seco) estimadas en *Lycopersicon esculentum* L. cv. Merlice, inoculados con cepas de *Bacillus* solas y en interacción con hongos fitopatógenos: a) plantas; b) raíces. Los datos se presentan como medias \pm error estándar.

respectively. The plants inoculated with *B. subtilis* obtained the highest values, causing the most notable effect in those response variables, compared with the control plants (Figure 1). The same strain promoted the greatest root length (45 cm) and height (1.45 m, Figure 1). Also, the plants treated with *B. amyloliquefaciens*, showed a significant stimulus in height (1.42 m, Figure 1). The three phytopathogens reduced the height of the plant by up to 25 % in relation to those of the control (Figure 1). In addition, plants treated with *A. solani* and *P. infestans* resulted in the lowest values for root length, with 29 and 30 cm, respectively, comparatively to the controls (35 cm), but lower than those treated with the *Bacillus* strains (Figure 1).

Likewise, the plants treated with the *Bacillus* strains showed the highest values in stem diameter, chlorophyll in leaves and yield, compared with those inoculated with the phytopathogens alone and in interaction (*Bacillus* spp. vs phytopathogens; Figure 2). *Bacillus amyloliquefaciens* promoted the highest fruit yield (63,000 kg Ha⁻¹), followed by *B. subtilis* (52,000 kg Ha⁻¹; Figure 2). In the rest of the treatments, the yields were variable (Figure 2).

evaluadas (Figuras 1 y 2). El peso fresco y seco de las plantas varió de 104 a 246.6 g y de 29.7 a 47.9 g, respectivamente. Las plantas inoculadas con *B. subtilis* obtuvieron los valores más altos, causando el efecto más notable en dichas variables de respuesta, comparadas con las plantas testigo (Figura 1). La misma cepa promovió la mayor longitud de raíz (45 cm) y altura (1.45 m; Figura 1). También las plantas tratadas con *B. amyloliquefaciens*, mostraron un estímulo significativo en altura (1.42 m; Figura 1). Los tres fitopatógenos redujeron hasta en un 25 % la altura de la planta con relación a las del testigo (Figura 1). Además, las plantas tratadas con *A. solani* y *P. infestans* resultaron en los valores más bajos para longitud de raíz, con 29 y 30 cm, respectivamente, comparativamente a los testigos (35 cm), pero inferiores a las tratadas con las cepas de *Bacillus* (Figura 1).

Asimismo, las plantas tratadas con las cepas de *Bacillus* mostraron los valores más altos en diámetro de tallo, clorofila en hojas y rendimiento, comparadas con aquellas inoculadas con los fitopatógenos solos y en interacción (*Bacillus* spp. vs fitopatógenos; Figura 2). *Bacillus amyloliquefaciens* promovió el mayor rendimiento de frutos (63,000 kg Ha⁻¹), seguido por *B. subtilis* (52,000 kg Ha⁻¹;

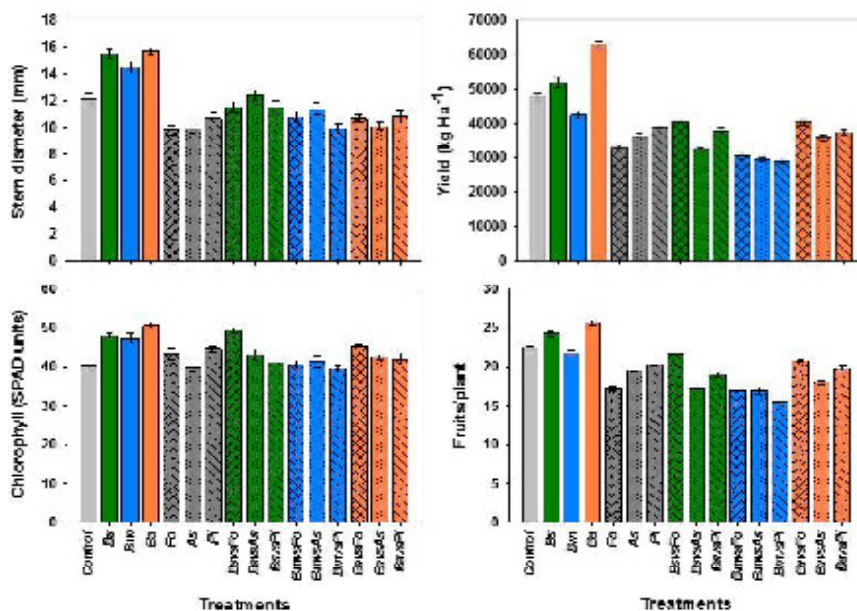


Figure 2. Effects on agronomic variables (stem diameter, chlorophyll (SPAD units), and fruit number) of tomato plants inoculated with *Bacillus* strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi. The data are presented as means \pm standard error.

Figura 2. Efectos en variables agronómicas (diámetro de tallo, clorofila (unidades SPAD), y frutos/planta) de plantas de jitomate inoculadas con cepas de *Bacillus* solas y en interacción con hongos fitopatógenos. Los datos se presentan como medias \pm error estándar.

The positive effects, resulting from the inoculation of *Bacillus* strains may be due to its multiple attributes as excellent root colonizers, root growth enhancers, crop yield promoters, inducers of abiotic stress resistance, among others (Beneduzi et al., 2012). On the other hand, roots produce exudates that stimulate the growth of biological control agents in a synergistic manner (Widnyana & Javandira, 2016; Yuan et al., 2015).

In our study, some agronomic variables such as plant growth, chlorophyll in leaves, yield (number and fruit diameter), root mass and stem diameter were increased by *Bacillus* strains. *Bacillus amyloliquefaciens* promoted the highest yield and fruit size, compared with those obtained from control plants. Mena-Violante & Olalde-Portugal (2007) reported an increase in yield per plant and fruit weight in 25 % and 18 %, respectively, when applying the strain *B. subtilis* BEB-13bs. Gül et al. (2008) and Myresiotis et al. (2014) demonstrated that the application of *B. amyloliquefaciens* in tomato plants increased yield by 8-9 %. Similar effects by *Bacillus* on yield have been reported in other crops (Esitken et al., 2010). This could be attributed to the ability of some *Bacillus* strains to produce hormones such as auxins, cytokinins and gibberellins, which promote root growth and fruit development. They can also solubilize inorganic phosphates and mineralize organic phosphates, among other nutrients, favoring the growth of plants (Esitken et al., 2010). In addition to its ability to produce biosurfactins (lipopeptides), responsible for increasing the mobility of *Bacillus* for rapid root colonization (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Ahemad & Kibret, 2014).

Phytopathogens reduced in great manner the agronomic variables evaluated, as well as the fruit quality parameters. The plants inoculated with *A. solani* and *P. infestans* showed a negative effect on the agronomic variables, mainly on plant height, root length, stem diameter, yield and the number and size of fruits. The yield in plants treated with phytopathogens was 31 % lower than in the control, ranging from 33,000 to 39,000 kg Ha⁻¹. Plants treated with *F. oxysporum* showed the lowest yield (Figure 2). This could be attributed to the deficient nutritional assimilation of diseased plants, caused by the mycotoxins (fusaric acid) and enzymes (cutinases and esterases) produced by phytopathogens (Beneduzi et al., 2012).

Figura 2). En el resto de los tratamientos los rendimientos fueron variables (Figura 2).

Los efectos positivos, resultado de la inoculación de cepas de *Bacillus* pueden deberse a sus múltiples atributos como excelentes colonizadores de raíces, mejoradores del crecimiento de raíz, promotores del rendimiento del cultivo, inductores de resistencia al estrés abiótico, entre otros (Beneduzi et al., 2012). Por su parte, las raíces producen exudados que estimulan el crecimiento de los agentes de control biológico en una manera de sinergismo (Widnyana & Javandira, 2016; Yuan et al., 2015).

En nuestro estudio, algunas variables agronómicas tales como el crecimiento vegetal, la clorofila en hojas, el rendimiento (número y diámetro de frutos), masa radicular y diámetro de tallo fueron incrementadas por las cepas de *Bacillus*. *Bacillus amyloliquefaciens* promovió el mayor rendimiento y tamaño de frutos, comparado con aquellos obtenidos de las plantas testigo. Mena-Violante & Olalde-Portugal (2007) reportaron un incremento en el rendimiento por planta y el peso de los frutos en 25 % y 18 %, respectivamente, al aplicar la cepa *B. subtilis* BEB-13bs. Gül et al. (2008) y Myresiotis et al. (2014) demostraron que la aplicación de *B. amyloliquefaciens* en plantas de jitomate, incrementaron el rendimiento en 8-9 %. Efectos similares por *Bacillus* en el rendimiento han sido reportados en otros cultivos (Esitken et al., 2010). Esto podría atribuirse a la capacidad de algunas cepas de *Bacillus* para producir hormonas tales como auxinas, citocininas y giberelinas, las cuales promueven el crecimiento de las raíces y el desarrollo de frutos. También pueden solubilizar fosfatos inorgánicos y mineralizar los fosfatos orgánicos, entre otros nutrientes, favoreciendo el crecimiento de las plantas (Esitken et al., 2010). Además de su capacidad para producir biosurfactinas (lipopéptidos), responsables de incrementar la movilidad de *Bacillus* para una rápida colonización radicular (Lugtenberg & Kamilova, 2009; Ahemad & Kibret, 2014).

Los fitopatógenos redujeron en gran medida las variables agronómicas evaluadas, así como los parámetros de calidad del fruto. Las plantas inoculadas con *A. solani* y *P. infestans* mostraron un efecto negativo en las variables agronómicas, principalmente en altura de la planta, longitud de raíz, diámetro de tallo, rendimiento y el número y tamaño de frutos. El rendimiento en plantas tratadas con fitopatógenos, fue 31 % menor que en los testigos, variando de 33,000 a 39,000 kg Ha⁻¹. Las plantas tratadas con *F. oxysporum* mostraron el rendimiento más bajo (Figura 2). Esto puede atribuirse a la deficiente asimilación nutricional de las plantas enfermas

On the other hand, the yield in plants treated with the *Bacillus* strains and subsequently with the phytopathogens, was lower than that observed with the *Bacillus* strains alone and the controls. However, the symptoms of the disease caused by the phytopathogens were reduced and plant growth was even promoted in some treatments (Figure 1). This could be due to some strains of *Bacillus* being highly competitive and capable of colonizing the rhizosphere forming a protective layer in the roots producing fungicidal compounds, which acts as a natural barrier against phytopathogens (Widnyana & Javandira, 2016).

Fruit quality

The data obtained for the polar and equatorial diameters of fruits, are shown in Figure 3. The size of fruits of plants inoculated with *Bacillus* strains, was higher (21 %) than the rest of the treatments. The biggest fruits were produced by plants inoculated with *B. subtilis* (>55 mm in diameter). In contrast, the plants inoculated with phytopathogens, produced smaller fruits. The fruits of plants treated with *B. subtilis*, had the greatest mesocarp thickness, while those of plants inoculated with phytopathogens were thinner. The thinnest mesocarp was observed in fruits of plants treated with *A. solani* (Figure 3).

The number of seeds per fruits fluctuated from 38 to 151 (Figure 3). The greatest number was obtained from the treatment with *B. methylotrophicus*. The weight of seeds per fruit fluctuated from 0.18 to 1.04 g. The highest weight was obtained in fruits of plants treated with *Bacillus* strains, particularly with *B. methylotrophicus*, while the lowest were observed in plants inoculated with *F. oxysporum* and the interaction *B. amyloliquefaciens* vs *A. solani*. In this regard, Tewksbury *et al.* (2008) mentioned that pathogens could reduce the number and size of seeds in fruits, or even, obtain empty seeds, presumably because of a deficiency in the assimilation of the nutrients caused by the disease.

In general, TSS and titratable acidity did not show a clear trend, although TSS were higher in the fruits of plants treated with the pathogens *A. solani* and *P. infestans*. This may be due to a higher carbohydrate hydrolysis rate, which may have implications in the fresh tomato market (Tigist *et al.*, 2013). The titratable acidity was higher in fruits of plants treated with the three *Bacillus* strains, than in the controls (Table 2). Where the highest

causado por las micotoxinas (ácido fusárico), y enzimas (cutinasas y esterases) producidas por los fitopatógenos (Beneduzi *et al.*, 2012).

Por otra parte, el rendimiento en plantas tratadas con las cepas de *Bacillus* y subsecuentemente con los fitopatógenos, fue menor que el observado con las cepas de *Bacillus* solas y los testigos. Sin embargo, se redujeron los síntomas de la enfermedad causada por los fitopatógenos e incluso se promovió el crecimiento vegetal en algunos tratamientos (Figura 1). Esto pudo deberse a que algunas cepas de *Bacillus* son altamente competitivas y capaces de colonizar la rizosfera formando una capa protectora en las raíces produciendo compuestos fungicidas, que actúa como una barrera natural contra los fitopatógenos (Widnyana & Javandira, 2016).

Calidad del fruto

Los datos obtenidos para los diámetros polar y ecuatorial de frutos, se muestran en la Figura 3. El tamaño de los frutos de plantas inoculadas con las cepas de *Bacillus*, fue mayor (21 %) que en el resto de los tratamientos. Los frutos más grandes fueron producidos por plantas inoculadas con *B. subtilis* (>55 mm de diámetro). En contraste, las plantas inoculadas con los patógenos, produjeron frutos de menor tamaño. Los frutos de plantas tratadas con *B. subtilis*, tuvieron el mayor espesor de mesocarpio, mientras que aquellos de plantas inoculadas con los patógenos, fueron más delgados. El mesocarpio más delgado se observó en frutos de plantas tratadas con *A. solani* (Figura 3).

El número de semillas por fruto fluctuó de 38 a 151 (Figura 3). El mayor número se obtuvo del tratamiento con *B. methylotrophicus*. El peso de semillas por fruto fluctuó de 0.18 a 1.04 g. El mayor peso se obtuvo en los frutos de plantas tratadas con las cepas de *Bacillus*, en particular con *B. methylotrophicus*, mientras que los más bajos se observaron en las plantas inoculadas con *F. oxysporum* y de la interacción *B. amyloliquefaciens* vs *A. solani*. Al respecto, Tewksbury *et al.* (2008) mencionan que los patógenos pueden reducir el número y tamaño de las semillas en los frutos, o incluso, obtener semillas vacías, presumiblemente como consecuencia de una deficiencia en la asimilación de los nutrientes causada por la enfermedad.

En general, los SST y la acidez titulable no mostraron una tendencia clara, aunque los SST fueron mayores en los frutos de plantas tratadas con los patógenos *A. solani* y *P. infestans*. Esto puede deberse a una mayor velocidad de hidrólisis de carbohidratos, lo cual puede tener implicaciones en el mercado del jitomate fresco (Tigist *et al.*, 2013). La acidez titulable

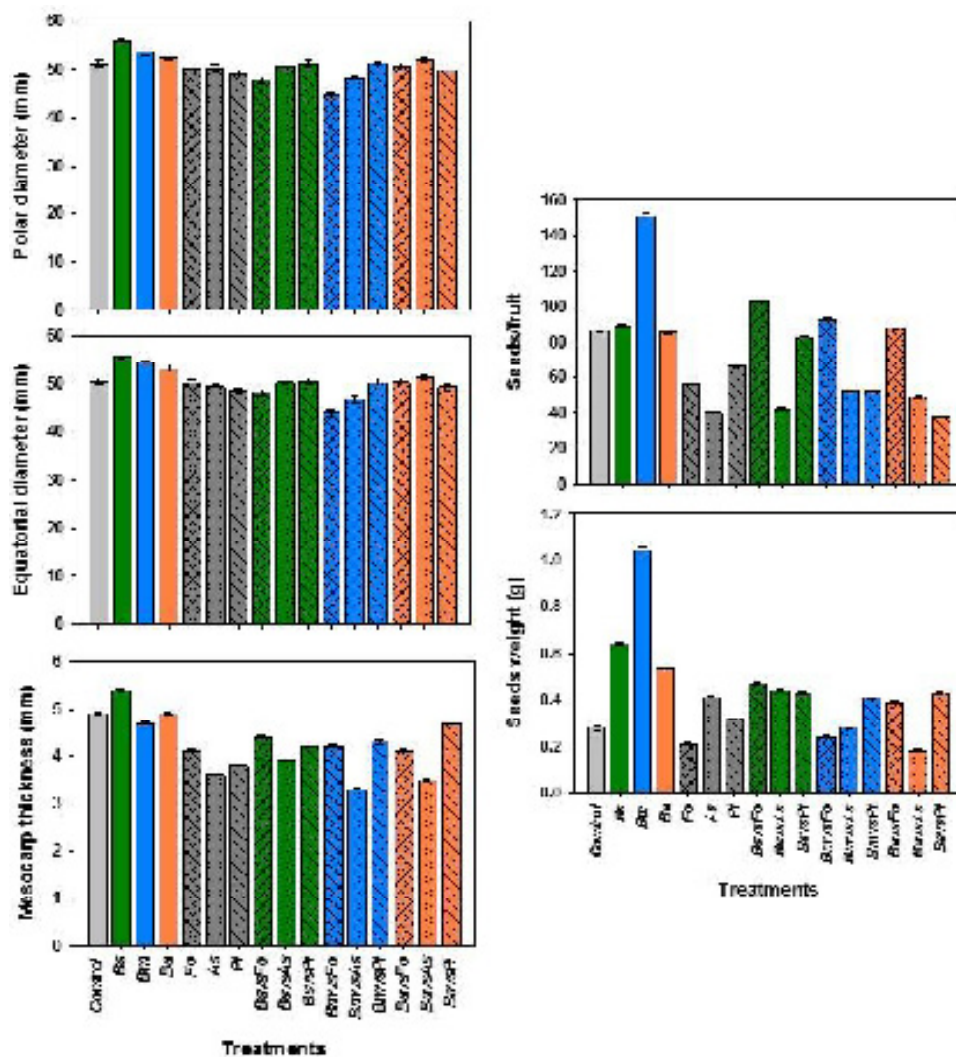


Figure 3. Effects on agronomic variables (polar and equatorial diameter, number of seeds/fruit, seeds weight and mesocarp thickness) of tomato fruits obtained from plants inoculated with *Bacillus* strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi. The data are presented as means \pm standard error.

Figura 3. Efectos en las variables agronómicas (diámetros polar y ecuatorial, número de semillas/fruto, peso de semillas y espesor de mesocarpio) de frutos de jitomate obtenidos de plantas inoculadas con cepas de *Bacillus* solas y en interacción con hongos fitopatógenos. Los datos se presentan como medias \pm error estándar.

values were observed in fruits of plants treated with *B. amyloliquefaciens* (0.48 % citric acid), while the lowest values were observed in fruits from plants treated with *F. oxysporum* (0.24 % citric acid, Table 2).

The firmness of the fruits ranged from 23.3 to 59.2 N without showing a clear trend. The fruits of plants treated

fue mayor en frutos de plantas tratadas con las tres cepas de *Bacillus*, que los testigos (Tabla 2). Donde los valores más altos se observaron en frutos de plantas tratadas con *B. amyloliquefaciens* (0.48 % ácido cítrico), mientras que los valores más bajos se observaron en frutos de plantas tratadas con *F. oxysporum* (0.24 % ácido cítrico; Tabla 2).

with *B. subtilis*, showed the highest values, resulting in an increase in the firmness in 1.6-fold compared to control fruits. The softest fruits were obtained from plants treated with *F. oxysporum* (Table 2). Similar results were obtained by Mena-Violante & Olalde-Portugal (2007) in tomato plants inoculated with *B. subtilis*. According to these authors, the firmer fruits are more resistant to the attack of pathogenic microorganisms, which improves its shelf life. This effect can be attributed to changes in the production of phytohormones, mainly ethylene, which is responsible of maturation genes in plants. The color of the

La firmeza de los frutos fluctuó de 23.3 a 59.2 N sin mostrar una tendencia clara. Los frutos de plantas tratadas con *B. subtilis*, mostraron los valores más altos, resultando en un incremento en la firmeza en 1.6 veces comparado con los frutos testigo. Los frutos más blandos se obtuvieron de plantas tratadas con *F. oxysporum* (Tabla 2). Resultados similares fueron obtenidos por Mena-Violante & Olalde-Portugal (2007) en plantas de tomate inoculadas con *B. subtilis*. De acuerdo con estos autores, los frutos más firmes son más resistentes al ataque de microorganismos patógenos, lo cual mejora su vida de anaquel. Este efecto puede ser atribuido a cambios en la

Table 2.
Total soluble solids (TSS, °Brix), titratable acidity (% citric acid), firmness and fruit color by CIELAB system parameters L*, a* and b* of tomato fruits harvested from plants inoculated with Bacillus strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi.

Tabla 2.
Sólidos solubles totales (SST, °Brix), acidez titulable (% ácido cítrico), firmeza y parámetros de color L*, a* y b* por el sistema CIELAB de frutos de jitomate cosechados de plantas inoculadas con cepas de Bacillus solas y en interacción con hongos fitopatógenos.

Treatment	TSS (°Brix)	% citric acid	Firmness (N)	L*	a*	b*
Control	4.40 ± 0.11 ^{ab}	0.34 ± 0.02 ^{ab}	37.4 ± 1.4 ^{bcdef}	49.2 ± 1.2 ^{abc}	14.4 ± 0.9 ^{ab}	19.2 ± 0.9 ^{ab}
Antagonists alone						
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	4.43 ± 0.53 ^{ab}	0.43 ± 0.03 ^{ab}	59.2 ± 1.0 ^a	48.5 ± 0.3 ^{abc}	13.8 ± 1.2 ^{abc}	19.5 ± 0.7 ^{ab}
<i>B. methylotrophicus</i>	3.78 ± 0.18 ^b	0.42 ± 0.09 ^{ab}	26.1 ± 0.6 ^{ef}	49.3 ± 1.1 ^{abc}	16.0 ± 0.6 ^a	21.6 ± 0.8 ^{ab}
<i>B. amyloliquefaciens</i>	3.95 ± 0.25 ^{ab}	0.48 ± 0.01 ^a	43.2 ± 1.2 ^{abcde}	53.4 ± 0.5 ^a	14.4 ± 0.6 ^{ab}	19.9 ± 1.5 ^{ab}
Phytopathogens alone						
<i>F. oxysporum</i>	4.34 ± 0.34 ^{ab}	0.24 ± 0.03 ^b	23.3 ± 1.2 ^f	48.9 ± 0.8 ^{abc}	14.6 ± 0.7 ^{ab}	20.2 ± 1.3 ^{ab}
<i>A. solani</i>	4.77 ± 0.34 ^a	0.39 ± 0.04 ^{ab}	36.2 ± 1.5 ^{cdef}	50.7 ± 0.7 ^{abc}	15.0 ± 0.9 ^{ab}	22.5 ± 1.0 ^a
<i>P. infestans</i>	4.52 ± 0.28 ^{ab}	0.32 ± 0.03 ^{ab}	51.6 ± 1.4 ^{abc}	49.1 ± 0.2 ^{abc}	14.5 ± 0.5 ^{ab}	21.1 ± 1.5 ^{ab}
Antagonists vs phytopathogens						
<i>B. subtilis</i> vs <i>F. oxysporum</i>	4.16 ± 0.22 ^{ab}	0.33 ± 0.05 ^{ab}	34.5 ± 0.8 ^{cdef}	50.1 ± 0.5 ^{abc}	13.9 ± 1.2 ^{abc}	23.6 ± 1.0 ^a
<i>B. subtilis</i> vs <i>A. solani</i>	4.68 ± 0.23 ^{ab}	0.39 ± 0.18 ^{ab}	41.7 ± 1.3 ^{abcdef}	49.6 ± 1.9 ^{abc}	16.3 ± 0.4 ^a	19.5 ± 0.3 ^{ab}
<i>B. subtilis</i> vs <i>P. infestans</i>	3.96 ± 0.25 ^{ab}	0.33 ± 0.05 ^{ab}	55.4 ± 1.1 ^{ab}	50.5 ± 0.8 ^{abc}	14.8 ± 0.6 ^{ab}	21.0 ± 0.4 ^{ab}
<i>B. methylotrophicus</i> vs <i>F. oxysporum</i>	4.34 ± 0.24 ^{ab}	0.27 ± 0.09 ^{ab}	52.1 ± 1.4 ^{abc}	51.5 ± 1.5 ^{abc}	12.1 ± 1.4 ^{bcd}	22.8 ± 1.0 ^a
<i>B. methylotrophicus</i> vs <i>A. solani</i>	4.18 ± 0.11 ^{ab}	0.36 ± 0.05 ^{ab}	32.0 ± 0.6 ^{def}	41.8 ± 1.0 ^{bc}	9.9 ± 1.5 ^d	18.5 ± 1.6 ^{ab}
<i>B. methylotrophicus</i> vs <i>P. infestans</i>	4.07 ± 0.49 ^{ab}	0.35 ± 0.03 ^{ab}	46.7 ± 1.7 ^{abcd}	40.3 ± 0.7 ^b	10.7 ± 1.3 ^{cd}	15.5 ± 1.9 ^b
<i>B. amyloliquefaciens</i> vs <i>F. oxysporum</i>	3.79 ± 0.22 ^b	0.40 ± 0.05 ^{ab}	52.7 ± 1.1 ^{abc}	48.9 ± 1.1 ^{abc}	14.7 ± 0.5 ^{ab}	21.1 ± 1.4 ^{ab}
<i>B. amyloliquefaciens</i> vs <i>A. solani</i>	4.69 ± 0.10 ^{ab}	0.32 ± 0.12 ^{ab}	33.6 ± 1.4 ^{cdef}	49.3 ± 1.1 ^{abc}	13.9 ± 1.0 ^{abc}	19.8 ± 1.3 ^{ab}
<i>B. amyloliquefaciens</i> vs <i>P. infestans</i>	3.83 ± 0.13 ^{ab}	0.38 ± 0.13 ^{ab}	58.6 ± 0.9 ^a	50.2 ± 2.0 ^{abc}	13.3 ± 0.9 ^{abcd}	20.9 ± 0.3 ^{ab}

Means with the same literal between columns, are statistically equal, according to the Tukey's test ($p=0.05$). ± Standard error.

Medias con la misma literal entre columnas, son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p=0.05$). ± Error estándar.

fruits was not affected by the microorganisms evaluated (Table 2), which is consistent with the existing literature. This is the attribute of quality most closely related to appearance, sugar content, acidity, pH, texture, flavor and juiciness (Araujo *et al.*, 2014).

Bromatological composition of fruits

The moisture content in fruits of plants treated with *Bacillus* strains ranged from 95.5 to 96.8 %. Plants treated with *B. methylotrophicus* produced fruits with the lowest water content (Table 3). However, the moisture content in fruits from plants treated with *Bacillus* strains and in interaction with phytopathogens was higher than 98 %. This can be attributed to hydric stress induced in plants, by the disease caused by these pathogens, which could inhibit the normal transpiration of plants and their fruits (Yadeta & Thomma, 2013).

The ash content was higher in fruits from plants treated with *Bacillus* strains in 95 %, than those obtained from the interaction treatments (*Bacillus* vs phytopathogens) and in the control plants (Table 3).

The protein content ranged from 0.33 to 0.93 % (Table 3), where it was observed that tomatoes from plants treated with the *Bacillus* strains, contained more protein (0.68-0.93 %) than those obtained from the control plants. The fruits of plants treated with pathogens had a high protein content, except with the treatment of *A. solani*, resulting in the lowest values (Table 3). While the content of fats (lipids) ranged from 0.02 to 0.18 % without a clear trend (Table 3), where the highest value was observed in tomatoes of plants treated with *B. methylotrophicus*. The bromatological composition of the fruits analyzed was similar to that reported in literature (Guil-Guerrero & Reboloso-Fuentes, 2009; Pinela *et al.*, 2012). Pinela *et al.* (2012), reported high moisture levels, ranging from 90.6 to 93.7 %, ash content ranged between 0.54 and 0.74, a low lipid content ranging from 0.03 to 0.17 in tomato cultivars. Additionally, Hernández-Suárez *et al.* (2007) mentioned that many factors such as cultivar and cultural practices could influence in the bromatological composition of the tomato fruits, mainly in the mineral concentration (ashes), protein and fat content. Therefore, the ability of *Bacillus* strains to fix nitrogen, solubilize minerals such as phosphorus and produce hormones that regulate plant growth, may be involved in the increase of

producción de fitohormonas, principalmente etileno, el cual es responsable de la expresión de genes de la maduración en las plantas. El color de los frutos no se vio afectado por los microorganismos evaluados (Tabla 2), lo cual es consistente con la literatura existente. Este es el atributo de calidad más estrechamente relacionado con la apariencia, contenido de azúcar, acidez, pH, textura, sabor y jugosidad (Araujo *et al.*, 2014).

Composición bromatológica de frutos

El contenido de humedad en frutos de plantas tratadas con las cepas de *Bacillus* fluctuó de 95.5 a 96.8 %. Las plantas tratadas con *B. methylotrophicus* produjeron frutos con el menor contenido de agua (Tabla 3). Sin embargo, el contenido de humedad en frutos de plantas tratadas con las cepas de *Bacillus* y en interacción con los fitopatógenos fue superior al 98 %. Esto puede atribuirse al estrés hídrico inducido en las plantas, por la enfermedad causada por dichos patógenos, lo cual podría inhibir la transpiración normal de las plantas y sus frutos (Yadeta & Thomma, 2013).

El contenido de cenizas fue mayor en frutos de plantas tratadas con cepas de *Bacillus* en un 95 %, que aquellos obtenidos de los tratamientos de interacción (*Bacillus* vs fitopatógenos) y de las plantas testigo (Tabla 3).

El contenido de proteínas fluctuó de 0.33 a 0.93 % (Tabla 3), donde se observó que los jitomates de plantas tratadas con las cepas de *Bacillus*, contenían más proteína (0.68-0.93 %), que aquellos obtenidos de las plantas testigo. Los frutos de plantas tratadas con patógenos tuvieron un alto contenido de proteínas, excepto con el tratamiento de *A. solani*, resultando en los valores más bajos (Tabla 3). Mientras que el contenido de grasas (lípidos) fluctuó de 0.02 a 0.18 % sin una tendencia clara (Tabla 3), donde el valor más alto fue observado en jitomates de plantas tratadas con *B. methylotrophicus*. La composición bromatológica de los frutos analizados, fue similar a lo reportado en la literatura (Guil-Guerrero & Reboloso-Fuentes, 2009; Pinela *et al.*, 2012). Pinela *et al.* (2012), reportaron altos niveles de humedad, fluctuando de 90.6 a 93.7 %, el contenido de cenizas fluctuó entre 0.54 y 0.74, un contenido bajo de grasas fluctuando de 0.03 a 0.17 en cultivares de jitomate. Adicionalmente, Hernández-Suárez *et al.* (2007) mencionan que muchos factores como el cultivar y las prácticas culturales, pueden influir en la composición bromatológica de los frutos de jitomate, principalmente en la concentración de minerales (cenizas), proteína y contenido de grasa. Por lo tanto, la capacidad de las cepas de *Bacillus* para fijar el nitrógeno, solubilizar minerales como el fósforo y producir hormonas que regulen el crecimiento vegetal, puede estar involucrada en el incremento del contenido de proteínas y cenizas en los frutos (Sivasakthi *et al.*, 2014). Por otra parte, la eficacia de las bacterias

Table 3.
Bromatological analysis of tomatoes harvested from plants inoculated with
***Bacillus* strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi.**

Tabla 3.
Análisis bromatológico de jitomates cosechados de plantas inoculadas con cepas de
***Bacillus* solas y en interacción con hongos fitopatógenos.**

Treatment	Bromatological composition				
	Moisture (%)	Ashes (%)	Proteins (%)	Fats (Lipids) (%)	Fiber (%)
Control	96.8 ± 0.13 ^{cd}	0.09 ± 0.01 ^b	0.35 ± 0.09 ^{cd}	0.08 ± 0.01 ^{bcd}	1.18 ± 0.01 ^a
Antagonistic microorganisms					
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	95.7 ± 0.20 ^{de}	0.41 ± 0.06 ^a	0.93 ± 0.04 ^a	0.02 ± 0.04 ^d	1.19 ± 0.03 ^a
<i>B. methylotrophicus</i>	95.5 ± 0.18 ^e	0.43 ± 0.01 ^a	0.68 ± 0.07 ^{abc}	0.18 ± 0.03 ^a	1.16 ± 0.03 ^a
<i>B. amyloliquefaciens</i>	96.8 ± 0.71 ^{cd}	0.41 ± 0.07 ^a	0.92 ± 0.11 ^a	0.08 ± 0.02 ^{abcd}	1.14 ± 0.03 ^a
Phytopathogenic microorganisms					
<i>F. oxysporum</i>	97.1 ± 0.33 ^{bcd}	0.38 ± 0.06 ^a	0.70 ± 0.15 ^{ab}	0.15 ± 0.04 ^{abc}	1.58 ± 0.05 ^a
<i>A. solani</i>	97.7 ± 0.05 ^{abc}	0.08 ± 0.01 ^b	0.33 ± 0.02 ^d	0.04 ± 0.01 ^d	1.76 ± 0.02 ^a
<i>P. infestans</i>	97.4 ± 0.25 ^{abc}	0.10 ± 0.03 ^b	0.72 ± 0.06 ^{ab}	0.06 ± 0.01 ^{cd}	1.29 ± 0.04 ^a
Antagonists vs phytopathogens					
<i>B. subtilis</i> vs <i>F. oxysporum</i>	98.3 ± 0.07 ^{ab}	0.03 ± 0.04 ^b	0.51 ± 0.04 ^{bcd}	0.03 ± 0.04 ^d	1.32 ± 0.54 ^a
<i>B. subtilis</i> vs <i>A. solani</i>	98.5 ± 0.06 ^a	0.02 ± 0.04 ^b	0.44 ± 0.04 ^{bcd}	0.08 ± 0.02 ^{bcd}	1.40 ± 0.23 ^a
<i>B. subtilis</i> vs <i>P. infestans</i>	98.6 ± 0.10 ^a	0.03 ± 0.05 ^b	0.42 ± 0.04 ^{bcd}	0.03 ± 0.01 ^d	1.47 ± 0.20 ^a
<i>B. methylotrophicus</i> vs <i>F. oxysporum</i>	98.7 ± 0.05 ^a	0.04 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.04 ^{bcd}	0.04 ± 0.01 ^d	1.32 ± 0.54 ^a
<i>B. methylotrophicus</i> vs <i>A. solani</i>	98.5 ± 0.09 ^a	0.04 ± 0.05 ^b	0.47 ± 0.04 ^{bcd}	0.10 ± 0.01 ^{abcd}	1.24 ± 0.10 ^a
<i>B. methylotrophicus</i> vs <i>P. infestans</i>	98.5 ± 0.03 ^a	0.03 ± 0.02 ^b	0.44 ± 0.04 ^{bcd}	0.08 ± 0.01 ^{abcd}	1.27 ± 0.39 ^a
<i>B. amyloliquefaciens</i> vs <i>F. oxysporum</i>	98.5 ± 0.03 ^a	0.03 ± 0.02 ^b	0.51 ± 0.02 ^{bcd}	0.05 ± 0.70 ^d	1.44 ± 0.13 ^a
<i>B. amyloliquefaciens</i> vs <i>A. solani</i>	98.6 ± 0.09 ^a	0.02 ± 0.01 ^b	0.46 ± 0.08 ^{bcd}	0.17 ± 0.04 ^a	1.48 ± 0.72 ^a
<i>B. amyloliquefaciens</i> vs <i>P. infestans</i>	98.5 ± 0.1 ^a	0.08 ± 0.04 ^b	0.45 ± 0.06 ^{bcd}	0.06 ± 0.02 ^{cd}	1.54 ± 0.98 ^a

Means with the same literal between columns, are statistically equal, according to the Tukey's test ($p=0.05$). ± Standard error.

Medias con la misma literal entre columnas, son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($p=0.05$). ± Error estándar.

protein and ash content in fruits (Sivasakthi *et al.*, 2014). On the other hand, the efficacy of the antagonistic bacteria evaluated under greenhouse conditions, without heating, could be affected by temperature, internal humidity and concentration of the antagonistic and phytopathogenic microorganisms (Inam-ul-Haq *et al.*, 2009).

Conclusion

The *Bacillus* strains evaluated in this study promoted fruit yield and size in tomatoes under greenhouse conditions, emphasizing on variables such as plant height, leaf chlorophyll, yield, root mass, stem diameter, size and fruit

antagonistas evaluadas bajo condiciones de invernadero, sin calefacción pudieron verse afectadas por la temperatura, humedad interna y concentraciones de los microorganismos antagonistas y fitopatógenos (Inam-ul-Haq *et al.*, 2009).

Conclusión

Las cepas de *Bacillus* evaluadas en este estudio promovieron el rendimiento y tamaño de frutos en jitomates bajo condiciones de invernadero, con mayor énfasis en las variables como altura de la planta, clorofila en hojas, rendimiento, masa radicular, diámetro de tallo, tamaño y calidad de frutos. Por lo tanto, las cepas *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* pueden ser una alternativa

quality. Therefore, strains *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* subsp. *inaquosorum* can be a sustainable alternative to be used to increase the yield and size of the fruits in tomato.

sustentable para usarse para incrementar el rendimiento y tamaño de los frutos en jitomate.

Acknowledgements

The author María Fernanda Ruiz Cisneros thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-Mexico) for the scholarship provided during her Doctorate studies.

Agradecimientos

La autora María Fernanda Ruiz Cisneros agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) por la beca proporcionada durante sus estudios de Doctorado.

References

- AOAC. (Association of Official Analytical Chemistry). (2002). Official methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemists. 17a Ed. Washington, D.C., USA.
- Ahemad, M. & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*, 26(1): 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Al-Rahmah, A. N., Mostafa, A. A., Abdel-Megeed, A., Yakout, S. M. and Hussein, S. A. (2013). Fungicidal activities of certain methanolic plant extracts against tomato phytopathogenic fungi. *African Journal of Microbiology Research*, 7(6): 517-524. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1902>
- Araujo, J. C., Silva, P. P., Telhado, S. F., Sakai, R. H., Spoto, M. H. and Melo, P. C. (2014). Physico-chemical and sensory parameters of tomato cultivars grown in organic systems. *Horticultura Brasileira*, 32(2): 205-209. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362014000200015>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A. and Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4): 1044-1051. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3571425/pdf/gmb-35-1044.pdf>
- Cabra-Cendales, T., Rodríguez-González, C. A., Villota-Cuásquer, C. P., Tapasco-Alzate, O. A. and Hernández-Rodríguez, A. (2017). *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Acta Biológica Colombiana*, 22(1): 37-44. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n1.57375>
- El_Komy, M. H., Saleh, A. A., Eranthodi, A. and Molan, Y. Y. (2015). Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. *The Plant Pathology Journal*, 31(1): 50-60. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2014.0087>
- Esitken, A., Yıldız, H. E., Ercisli, S., Donmez, M. F., Turan, M. and Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*, 124: 62-66. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.012>
- FAO. (Organization de las Naciones Unidas) Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. (2016). Producción de jitomate a nivel mundial. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> Last Checked August 2018.
- Guil-Guerrero, J. L. & Reboloso-Fuentes, M. M. (2009). Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.10.012>
- Gül, A., Kidoglu, F. and Tüzel, Y. (2008). Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum*, L.) growing in perlite. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6(3): 422-429. <https://doi.org/10.5424/sjar/2008063.335>
- Hernández-Suárez, M. H., Rodríguez, E. R. and Romero, C. D. (2007). Mineral and trace element concentrations in cultivars of tomatoes. *Food Chemistry*, 104(2): 489-499. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.072>
- Inam-ul-Haq, M., Javed, N., Khan, M. A., Jaskani, M. J., Khan, M. M., Khan, H. U., Irshad, G. and Gowen, S. R. (2009).

- Role of temperature, moisture and *Trichoderma* species on the survival of *Fusarium oxysporum ciceri* in the rainfed areas of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4): 1965-1974. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41\(4\)/PJB41\(4\)1965.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41(4)/PJB41(4)1965.pdf)
- Ju, R., Zhao, Y., Li, J., Jiang, H., Liu, P., Yang, T., Bao, Z., Zhou, B., Zhou, X. and Liu X. (2014). Identification and evaluation of a potential biocontrol agent, *Bacillus subtilis*, against *Fusarium* sp. in apple seedlings. *Annals of Microbiology*, 64(1): 377-383. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0672-3>
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63: 541-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.161918>
- Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T., and Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) en la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal, ESJ*, 12(18): 232-256. <http://dx.doi.org/10.19044/esj.2016.v12n18p232>
- Mena-Violante, H. G. & Olalde-Portugal, V. (2007). Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae*, 113(1): 103-106. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.031>
- Myresiotis, C. K., Vryzas, Z. and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2014). Enhanced root uptake of acibenzolar-S-methyl (ASM) by tomato plants inoculated with selected *Bacillus* plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Applied Soil Ecology*, 77: 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.01.005>
- NMX-F-102-S-1978. (Norma Mexicana). Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Norma mexicana. Dirección general de normas. <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-102-S-1978.PDF>
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M. and Ferreira, I. C. (2012). Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 829-834. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.045>
- Rios-Velasco, C., Caro-Cisneros, J. M., Berlanga-Reyes, D. I., Ruiz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz J. J., Salas-Marina, M. A., Villalobos-Pérez, E. and 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): 84-99 <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Ruiz-Cisneros, M. F., Rios-Velasco, C., Berlanga-Reyes, D. I., Ornelas-Paz, J. J., Acosta-Muñiz, C. H., Romo-Chacón, A., Zamudio-Flores, P. B., Pérez-Corral, D. A., Salas-Marina, M. Á., Ibarra-Rendón, J. E. and Fernández-Pavía, S. P. (2017). Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3): 437-462. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-3>
- SAS, (Statistical Analysis System). (2002). SAS User's Guide. Version 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Shafique, H. A., Sultana, V., Ehteshamul-Haque, S. and Athar, M. (2016). Management of soil-borne diseases of organic vegetables. *Journal of Plant Protection Research*, 56(3): 221-230. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0043>
- Sivasakthi, S., Usharani, G. and Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 9(16): 1265-1277. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.7914>
- Tewksbury, J. J., Reagan, K. M., Machnicki, N. J., Carlo, T. A., Haak, D. C., Peñaloza, A. L. C. and Levey, D. J. (2008). Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33): 11808-11811. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802691105>
- Tigist, M., Workneh, T. S. and Woldetsadik, K. (2013). Effects of variety on the quality of tomato stored under ambient conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 50(3): 477-486. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0378-0>
- USDA (United States Department of Agriculture). (2015). Tomatoes: Shipping point and market inspection instructions. https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Tomato_Inspection_Instructions%5B1%5D.pdf
- Widnyana, I. K. & Javandira, C. (2016). Activities *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* sp. to stimulate germination and seedling growth of tomato plants. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9: 419-423. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.158>

- Yadeta, K. A. & Thomma, B. P. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4(97): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097>
- Yuan, J., Zhang, N., Huang, Q., Raza, W., Li, R., Vivanco, J. M. and Shen, Q. (2015). Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Scientific Reports*, 5: 13438. <https://doi.org/10.1038/srep13438>