

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Respuesta de las Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* a la Aplicación de Ácidos Fenólicos

Por:

CLAUDIA ARIANA PLIEGO ZÚÑIGA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Respuesta de las Plantas de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* a la Aplicación de Ácidos Fenólicos

Por:

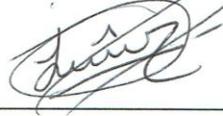
CLAUDIA ARIANA PLIEGO ZÚÑIGA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Antonio Juárez Maldonado

Asesor Principal



Dra. Francisca Ramírez Godina

Coasesora



Dra. Susana González Morales

Coasesora



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2017

AGRADECIMIENTOS

A mi **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**: por haber sido la plataforma para mi crecimiento y por dar oportunidad a los jóvenes para cumplir sus sueños, a ser mejores humanos siendo hombres y mujeres trabajadoras comprometidos con el campo y con México, siempre en mi corazón mi ALMA MATER, un orgullo ser buitre.

Al **Dr. Antonio Juárez Maldonado**: por su compromiso, confianza, enseñanzas y apoyo en este proyecto, profesores como usted inspiran para una mejor preparación, gracias por su valiosa aportación.

A la **Dra. Francisca Ramírez Godina**: por su apoyo y confianza puesta en mí, por aclarar mis dudas en este trabajo y ser una buena guía.

A la **Dra. Susana González Morales**: por confiar en mí para realizar este proyecto.

Al **M.C. William Martínez Zarate**: por su asesoría, apoyo, comprensión, confianza y tiempo brindado para que pudiera lograr este proyecto.

A la **laboratorista Norma Leticia Portos Gaona**: por su asesoría y tiempo para explicarme los procedimientos necesarios y lograr buenos resultados.

A la **Dra. Susana Gómez Martínez**: por su confianza y apoyo al final de mi carrera, un gusto el poder convivir y sentir su apoyo.

A **Diego**: por ser mi “Buddy”, por acompañarme en este logro y amarme incondicionalmente, has marcado mi vida para siempre y sin duda eres un hombre de diez, todo mi amor para ti. Tu entrega, compromiso y cariño han sido mi motor.

A **Lucy Martínez**: por ser, confiar y trabajar para hacer de México un país mejor, por permitirme vivir un proceso de transformación y seguir creciendo.

A todos los profesores que pusieron su granito de arena en mi preparación, gracias por aportar sus conocimientos y hacer profesionistas con pasión, su trabajo tiene recompensas que no tiene valor monetario.

A mis amigos: Dulce, Jorge, Isa, Evelyn, Baldemar, Carlos Miguel, Francisco German, Dany, Juan, Paco, Charlie, Gabino, Said, Sabdiel, Miguel, Davo, Eduardo, Juan Carlos, Mario, Rodrigo, Yesi, Ivan, Dario, Karely, Andrés, Lucky, Idalia, Rosario, Joaquín y Guadalupe por acompañarme de una u otra forma durante mi preparación, por dejar huella en mi vida y crecer juntos.

DEDICATORIAS

A **Dios:** por permitirme lograr mis sueños, mi fe hacia ti me impulsa.

A **mis padres:** por darme la vida, por ser una guía y apoyo en todo momento, por su amor incondicional, ustedes son quienes me inspiran a ir por mas, a lograr mis sueños y llevarlos cada vez más lejos, están siempre en mi corazón, todo trabajo tiene su recompensa y esta no es solo mía, ustedes son la punta de lanza de este gran logro, los amo.

A **mis hermanos:** por cuidarme y apoyarme a lograr mis sueños, por su cariño y compañía, son mi ejemplo a seguir, mis ganas de salir adelante y seguir soñando.

A **mis abuelos:** por sus enseñanzas y anécdotas, su sabiduría alimenta mi alma, me honra tenerlos en mi vida.

A **mis tíos y primos:** por apoyarme y confiar en mí, este logro también es para ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo General.....	2
Objetivos Específicos.....	2
Hipótesis.....	2
ANTECEDENTES	3
Generalidades del cultivo.....	3
Origen e historia.....	3
Clasificación taxonómica	3
Importancia económica.....	4
Descripción botánica	4
Caracterización anatómica e histológica	6
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i>	8
Clasificación taxonómica de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i>	8
Importancia económica.....	9
Estrategias de infección.....	9
Síntomas	10
Manejo de la enfermedad	10
Mecanismos de defensa de las plantas.....	10
Defensa pasiva	11
Respuesta asociada a la pared celular.....	12

Ácidos fenólicos en la autodefensa.....	12
METODOLOGÍA	13
Descripción del sitio experimental.....	13
Siembra y desarrollo del cultivo	13
Aislamiento de <i>Clavibacter</i>	14
Inoculación de las plantas	14
Aplicación del producto.....	14
Análisis estomático	14
Impresión de estomas	14
Medición y evaluación de estomas	15
Análisis histológico.....	16
<i>Fijación</i>	16
<i>Deshidratación</i>	16
<i>Infiltración e inclusión en parafina</i>	17
<i>Cortes en micrótopo</i>	17
<i>Coloración</i>	17
<i>Análisis de imágenes</i>	18
Variables evaluadas.....	18
<i>Severidad de Clavibacter</i>	18
<i>Anatómicas</i>	19
<i>Histológicas</i>	19
Diseño experimental	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
Severidad	21
Estudio de los estomas.....	22
<i>Densidad estomática</i>	22
<i>Índice estomático</i>	23
<i>Largo y ancho de estomas</i>	24
Estudio histológico	27
<i>Hoja</i>	27
<i>Tallo</i>	28
<i>Raíz</i>	31

CONCLUSIONES	35
REFERENCIAS.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Valores medios del porcentaje de severidad de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .	21
2	Densidad Estomática del haz y envés de la hoja del cultivo de tomate en el testigo y tratamientos evaluados.	22
3	Comparación de medias respecto a LSD Fisher del índice estomático en la superficie adaxial y abaxial.	24
4	Comparación de medias respecto a LSD Fisher del largo y ancho de estomas en la superficie adaxial y abaxial de la hoja.	25
5	Número de vasos de xilema, grosor de la epidermis superior e inferior y grosor del parénquima de la hoja.	27
6	Grosor de la epidermis, numero de vasos de xilema, y área de vasos de xilema del tallo.	29
7	Grosor del córtex, número de vasos de xilema y área de vasos de xilema de la raíz.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Compuestos constituyentes del mecanismo de defensa constitutiva activa y pasiva en plantas.	11
2	Impresiones estomáticas de hoja 40x, A: T0 superficie adaxial; B: T0 superficie abaxial; C: Defense superficie adaxial; D Defense superficie abaxial; E: Cmm superficie adaxial; F: Cmm superficie abaxial; G: Cmm + Defense superficie adaxial; G: Cmm + Defense superficie abaxial.	26
3	Cortes transversales de hoja (Medición de parénquima, epidermis superior e inferior) 10x: A: Testigo absoluto; B: Defense; C: Cmm; D: Cmm + Defense.	28
4	Cortes transversales de tallo, (Medición de epidermis) 2.5x: A: T0; B: Defense; C: Cmm; Cmm + Defense.	30
5	Sección de tallo (Medición de área de Xilemas) 10x, A: T0; B: Defense; C: Cmm; Cmm + Defense.	31
6	Corte transversal de raíz (Medición de córtex) 2.5x: A: T0; B: Defense; C: Cmm; Cmm + Defense.	33
7	Sección de tallo (Xilemas) 10x: A: T0; B: Defense; C: Cmm; Cmm + Defense.	34

RESUMEN

El cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* es una de las más importantes enfermedades del tomate *Solanum lycopersicum* causadas por patógenos. Los compuestos fenólicos son parte del metabolismo secundario como un modo de defensa que la planta utiliza contra el ataque de patógenos, los ácidos fenólicos son uno de estos compuestos, en este caso fueron utilizados como detonantes de la defensa natural de las plantas. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar si la aplicación de ácidos fenólicos incrementa la capacidad de tolerar estrés biótico en las plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. Se evaluaron las plantas en cuanto al análisis de severidad de la enfermedad de acuerdo a la escala de (Baysal *et al.*, 2003), se tomaron impresiones estomáticas de las hojas, para el análisis histológico se utilizó la técnica de la parafina y se evaluó: Numero de vasos de xilema en tallo, raíz y hoja; Área de vasos de xilema en tallo y raíz; Grosor de epidermis dl tallo y hoja; Córtex de la raíz y Parénquima de la hoja. El diseño experimental fue bloques completos al azar teniendo cuatro tratamientos. En los resultados se observó una disminución de la severidad en el tratamiento infectado con *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* y aplicaciones de ácidos fenólicos siendo menor al tratamiento con la enfermedad. Se registró un aumento en el índice estomático además de aumentar el área de vasos de xilema y grosor de córtex aumentando la capacidad de fotosíntesis y transpiración de la planta mejorando su resistencia al ataque del patógeno. Se encontró que mediante la aplicación de ácidos fenólicos hay modificación en estructuras de la raíz utilizados como medio de defensa a la entrada de patógenos a su sistema.

INTRODUCCIÓN

La agricultura moderna ha generado la degradación de los recursos naturales, por lo que hoy en día es necesario dar respuesta de manera enfocada a la sustentabilidad. Una posibilidad para el logro de esta, es la agricultura orgánica en la que los insumos agroquímicos tóxicos son sustituidos por insumos variables como bioestimulantes que aportan mayores beneficios (Altieri, 1995) para el desarrollo vegetal y contribuyen a la importancia de los mecanismos de defensa la cual radica en la resistencia que estos tienen como medio de defensa ante el ataque de patógenos. En especies de tipo susceptible, al no presentarse esta respuesta el patógeno se introduce al hospedante gobernándolo de manera satisfactoria (Cruz *et al.*, 2006). Los mecanismos de defensa pasivos son aquellos que ya se encuentran en la planta, es decir es una defensa preexistente por lo cual la determinan propiedades formadas antes de que el patógeno realice su infección así la planta puede resistir ante un ataque de este, en el grupo se encuentran las barreras estructurales o físicas (Cornide *et al.*, 1985).

En cuanto a los patógenos que provocan la muerte celular de su hospedante mediante la liberación de toxinas que degradan los tejidos y favorecen la penetración y colonización de la planta adquiriendo así su alimento a través del tejido muerto son llamados patógenos necrotróficos (Collinge *et al.*, 2001).

Algunos metabolitos secundarios participan en la activación de la defensa natural preexistente en las plantas siendo de suma importancia en la restricción de patógenos. El gran número de metabolitos secundarios y su concentración existente en la variedad de plantas trabajan como agentes antimicrobianos, es decir, se enfocan a limitar la propagación y desarrollo de patógenos en los tejidos vegetales, pues ejercen una presión selectiva en patógenos potenciales; en el proceso se desarrollan por mutación mecanismos de resistencia perpetuando el ciclo patógeno y hospedador (Vivanco *et al.*, 2005). En relación a los metabolitos secundarios, las plantas desprenden gran cantidad de sustancias que contienen un grupo fenol, las cuales llevan por nombre compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides, todas

ellas derivadas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo, estos van desde moléculas muy básicas como ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los polímeros y ligninas (Avalos y Pérez, 2009).

En base a esto, es importante aplicar recursos biológicos para la agricultura orgánica y potencializar los mecanismos defensivos vegetales de manera amigable con el medio ambiente, para lo cual en el presente trabajo se realizó la evaluación de los ácidos fenólicos como medios de detonación de la defensa natural de las plantas de tomate ante el ataque patogénico de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.

Objetivo General

Determinar si la aplicación de ácidos fenólicos incrementa la capacidad de tolerar estrés biótico en las plantas de tomate inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

Objetivos Específicos

1. Evaluar la incidencia y severidad de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* en plantas de tomate.
2. Evaluar los cambios histológicos en las estructuras de hoja, raíz y tallo de las plantas de tomate.
3. Evaluar la densidad estomática y células tabloides en haz y envés de las hojas de plantas de tomate.

Hipótesis

Debido a la capacidad de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos, las estructuras se verán modificadas y habrá una respuesta favorable por la aplicación de ácidos fenólicos en las plantas tomate.

ANTECEDENTES

Generalidades del cultivo

Origen e historia

El tomate tiene su origen en América del Sur, en la región andina, especialmente de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile. No obstante su domesticación se llevó a cabo en México. Su nombre proviene del náhuatl xictli, ombligo y tomatl, tomate, cuyo significado es tomate de ombligo (SAGARPA, 2010).

La multiplicidad de tomates conocida en México en el siglo XVI ya era popular en la gastronomía Española e Italiana, mientras que en otros países su utilidad farmacéutica era lo primordial hasta inicios del siglo XIX. Su expansión se logró con los españoles y portugueses hacia Medio Oriente, África, Asia, Estados Unidos y Canadá (FAO, 2002).

Clasificación taxonómica

Según (Foolad, 2007):

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobinta
Superdivision	Spermatophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Suborden	Solanineae
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>lycopersicum</i>

Importancia económica

La producción de tomate a nivel mundial es aproximadamente de 170, 750,767 ton por año cultivadas en 5, 023,810 has (FAOSTAT, 2014). Los principales países productores de tomate son China que aporta el 36% de la producción anual total, enseguida se encuentra posicionado Estados Unidos con el 14%; Turquía, 12%; India, 11%, mientras que México ocupa el doceavo lugar con el 3% de producción (FAO, 2008). La producción anual nacional de tomate es de hasta 2.6 millones de toneladas de las cuales un porcentaje es destinado a su exportación a lo que México ocupa el primer lugar de tomate a nivel mundial siendo Estados Unidos y Canadá su principal mercado (SIAP, 2015).

El aumento de superficie cultivada bajo el concepto de agricultura protegida es del 50% esto justifica la alza de rendimientos para los principales estados productores en México son Sinaloa, que representa el 22% del total nacional, le sigue Baja California y San Luis Potosí con un 8.6% y Michoacán con un 7% (SIAP, 2015).

Descripción botánica

Raíz

Se encuentra constituida por una raíz principal pequeña, numerosas raíces secundarias además de raíces adventicias. Al hacer un corte transversal de la raíz principal se localiza la epidermis, lugar donde están situados los pelos absorbentes capaces de tomar agua y nutrimentos necesarios para el desarrollo de la planta, también se encuentra el córtex y cilindro central, donde se sitúan los vasos de xilema (Ruiz, 2002).

Tallo

Es el eje principal del cual surgen las hojas y flores, tiene un diámetro de 2 a 4 cm y puede ser de crecimiento determinado o indeterminado, en las axilas de las hojas se encuentran los tallos secundarios y su eliminación tiene importancia para una adecuada formación de la planta (Berenguer, 2003); es de tipo herbáceo, por lo que

no le es posible mantenerse erguido, motivo por el cual son utilizados tutores (Jaramillo y Arias, 1997),

Hojas

Son compuestas e imparipinnadas, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado, situadas de forma alterna en el tallo. Cuentan con una epidermis superior e inferior y tejido parenquimatoso en el cual la zona empalizada contiene abundantes cloroplastos, en la epidermis inferior es donde se encuentra el mayor número de estomas (Comisión Veracruzana, 2010).

Flores

De reducido tamaño, pedunculadas, color amarillo y forman corimbos axilares. Compuestas por un pedúnculo corto, cáliz gamosépalo y corola gamopétala. El androceo con cinco o más estambres ligados a la corola con las anteras formando así un tubo, el gineceo presenta de dos a treinta carpelos los cuales darán lugar a los lóculos del fruto (Rodríguez *et al.*, 2001).

Fruto

“Es una baya con forma y tamaño variable, está dividido en cinco partes, pared externa e interna, tejido locular, pulpa gelatinosa, piel y semillas. El color del fruto depende de la presencia de pigmentos carotenoides, es un aspecto fundamental en la calidad” (Jaramillo y Arias, 1997) y va de amarillo, rosado a rojo siendo este último el habitual en su madurez (Rodríguez *et al.*, 2001).

Semilla

Varía en sus tonalidades de color ya que van desde grisáceo hasta color paja de forma oval aplastada; de tamaño entre 3-5 mm de diámetro y 2.5 mm de longitud, recubierta de vellosidades (Rodríguez *et al.*, 2001). Está constituida por el embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal (Jaramillo *et al.*, 2007).

Caracterización anatómica e histológica

Estomas

El haz y envés de la hoja tienen una cobertura de células epidérmicas en la que se encuentran aperturas microscópicas (estomas) que permiten que se lleve a cabo el intercambio gaseoso y transpiración de la planta (Ray, 1985), suelen ser más habituales en la superficie abaxial (envés) de las hojas (Sánchez y Aguirreolea, 1996) aunque también se pueden encontrar en las partes florales, hojas, tallos, rizomas, etc. (Willmer, 1983).

La anatomía estomática está conformada por un par de células que rodea los orificios (ostiolos) llamadas células oclusivas las cuales permiten la conexión de los espacios internos de la hoja con el aire exterior mediante expansión y contracción (Santa Olalla y de Juan, 1993) esto, debido al desplazamiento del agua, que sigue al movimiento de iones de potasio hacia afuera o hacia adentro, procedente de las células epidérmicas anexas (Bidwell, 2002).

Epidermis

Según (Mateo, 1995) la epidermis es un tejido de protección que constituye la parte más externa de la hoja, existiendo tanto en el haz como el envés, donde abundan los estomas. Está cubierta por una capa llamada cutícula que es prácticamente impermeable al agua y a los gases. En algunas hojas, la epidermis está cubierta por pelos o tricomas que protegen a las plantas.

Hay epidermis que no poseen cutícula, como se observa en las zonas de absorción de las raíces. En otros casos son muy finas como en el tallo de las solanáceas, de grosor intermedio o gruesas y muy gruesas (Molist *et al.*, 2014).

Parénquima

Es un tejido poco especializado implicado en una gran variedad de funciones como la fotosíntesis, el almacenamiento, la elaboración de sustancias orgánicas y la regeneración de tejidos (Molist *et al.*, 2014).

Por lo general en las dicotiledóneas se presentan dos tipos de parénquima, el empalizada con grosor de una o dos células estructuradas de forma compacta y el esponjoso con superiores dimensiones aéreas (Bidwell, 2002). Según (Fahn, 1974) el parénquima de empalizada típico está formado por células alargadas, dispuestas transversalmente a la superficie de la hoja en una o más capas, tienen apariencia tubular o redondeadas y separadas o solo ligeramente unidas con otras y se encuentran inmediatamente debajo de la epidermis.

Córtex

El sistema fundamental forma una zona bien diferenciada, está situada entre la epidermis y el cilindro vascular o central, en el tallo la parte periférica presenta colénquima (Dicotiledónea) o esclerénquima (Monocotiledónea) o fibras formando anillos, además presenta un parénquima a menudo clorofílico; los espacios intercelulares son prominentes, menores al córtex de la raíz; es inusual hallar esclerénquima como tejido de sostén primario en la región externa del córtex del tallo (González *et al.*, 2007).

Xilema

El transporte de agua y nutrientes en amplios trayectos está a cargo de los vasos xilemáticos. Para la constitución de vasos de xilema es necesaria la anexión de células conductoras solitarias, formando así hileras, de esta manera y subsiguiente a la formación de la pared celular secundaria, se pierde el núcleo y contenido celular de los elementos traqueales (Nijse, 2004).

El xilema conduce grandes cantidades de agua y algunos compuestos inorgánicos y orgánicos desde la raíz hacia las hojas; desde el punto de vista fisiológico además de la conducción, este tipo de tejidos funcionan como soporte, permitiendo así el crecimiento aéreo de la planta (Megias *et al.*, 2014).

Contreras. *et al.*, 2001 observó cambios a nivel celular en la epidermis, mesòfilo y tejido vascular en secciones transversales de hojas de caraota negra (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas con *Xhantomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xapvph) en

variedades resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles, comprobando que en estadios tardíos la bacteria llega al tejido vascular; provocando cambios estructurales.

Lebeda *et al.*, 2014 en un estudio sobre los mecanismos de resistencia a *Oidium neolycopersici* encontró que el principal mecanismo de resistencia en algunos casos como respuesta al ataque de un patógeno fue la Respuesta Hipersensible por consiguiente el desarrollo limitado de este, aunado a esto existe una amplia variación en la respuesta de resistencia a nivel histológico y citológico.

Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis

Clasificación taxonómica de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

Jansen (2004) la describe de la siguiente manera:

Reino	Bacteria
Clase	Actinobacteriales
Subclase	Actinobacteridae
Orden	Actinomycetales
Género	<i>Clavibacter</i>
Especie	<i>michiganensis</i>
Subespecie	<i>michiganensis</i>

Características morfológicas de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

Es una bacteria perteneciente a los Actinomicetes, no forma esporas, mide de 0.6x0.7 a 1.2 micras, tiene forma bacilar, sin flagelos aeróbica y a diferencia de otras

bacterias que atacan al tomate es la única que se encuentra dentro de las Gram-positivas, lo que la hace una bacteria única en este cultivo (Lewis & Miller, 2005), las colonias en agar son de color amarillo característico y alcanzan un diámetro de 2 a 3 mm en 5 días (Jones *et al.*, 1993) se desarrolla a una temperatura de 28°C (OEPP/EPPO, 2005).

Importancia económica

Chang *et al.* (1992) afirmaron que el cáncer bacteriano se encuentra en todas las zonas productoras de tomate del mundo y aunque es considerada una enfermedad poco frecuente es severa y de gran importancia económica, la cual radica en que el ataque puede presentarse en cualquier etapa fenológica del cultivo y dañar un invernadero completo en solo unas semanas (EPPO, 2010) siendo mucho más probable la infección por las condiciones climáticas óptimas que hay para la reproducción de esta bacteria (Ramírez y Sainz, 2006) asociando esto a la pérdida directa de la planta o con frutos de menor tamaño (Dhanvantari, 1989) ocasionando pérdidas de hasta un 70% y disminución del 20 al 30% en el rendimiento (Rat *et al.*, 1991).

Estrategias de infección

(Ramírez y Sainz, 2006) comentan que el principal agente de infección son las semillas contaminadas para después diseminarse mediante labores culturales al no haber sanidad en los procesos, siendo los residuos de cosecha un factor importante en la sobrevivencia de esta bacteria permaneciendo hasta por periodo de dos años en el suelo.

La entrada a la planta se da por espacios intercelulares para después segregarse enzimas ocasionando la degradación de paredes celulares e invadiendo así los órganos de la planta (Cortez, 2008), *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* se introduce en el tallo o raíz, entrando así al xilema dañándolo y afectando los procesos de entrada de agua y nutrientes resultando en la síntesis de polisacáridos extracelulares y destrucción de los mismos por la presencia de enzimas que los degradan como celulosa, pectin metil esterasa y xilanasas (García *et al.*, 2000).

Síntomas

Según (García *et al.*, 2000) los síntomas se observan en la base de las hojas donde se aprecia un color amarillo que conforme pasa el tiempo se torna café, mostrando quemaduras en el borde de la hoja, enrollándola hacia el envés permaneciendo unidas a la planta.

Los daños a nivel de tallo pueden observarse al hacer un corte, notando una tonalidad café en el sistema vascular, siendo síntomas superficiales y sistémicos pueden observarse manchas en tallos y peciolo además de las hojas (Tlapa, 2008).

Manejo de la enfermedad

El especial cuidado en cuanto a las labores culturales interviene en la prevención de la infección de las plantas, siendo un principal factor la adquisición o desinfección de la semilla y material de trabajo (Ramírez y Sainz, 2006).

Tlapa 2008 menciona el especial énfasis en cuanto al sellado de heridas provocadas por prácticas culturales con productos de ingrediente activo cobre; el ingrediente activo que ha mostrado efecto contra bacterias Gram positivas es el Clorhidrato de Oxitetraciclina.

Mecanismos de defensa de las plantas

Como respuesta a ataques patogénicos, la planta tiene dos tipos de mecanismos: constitutiva o preexistente y el inducible, los dos aplican conforme la especie, pues son resultado de la memoria genética y la capacidad de la planta de sintetizar sustancias antipatogénicas (García, 2003).

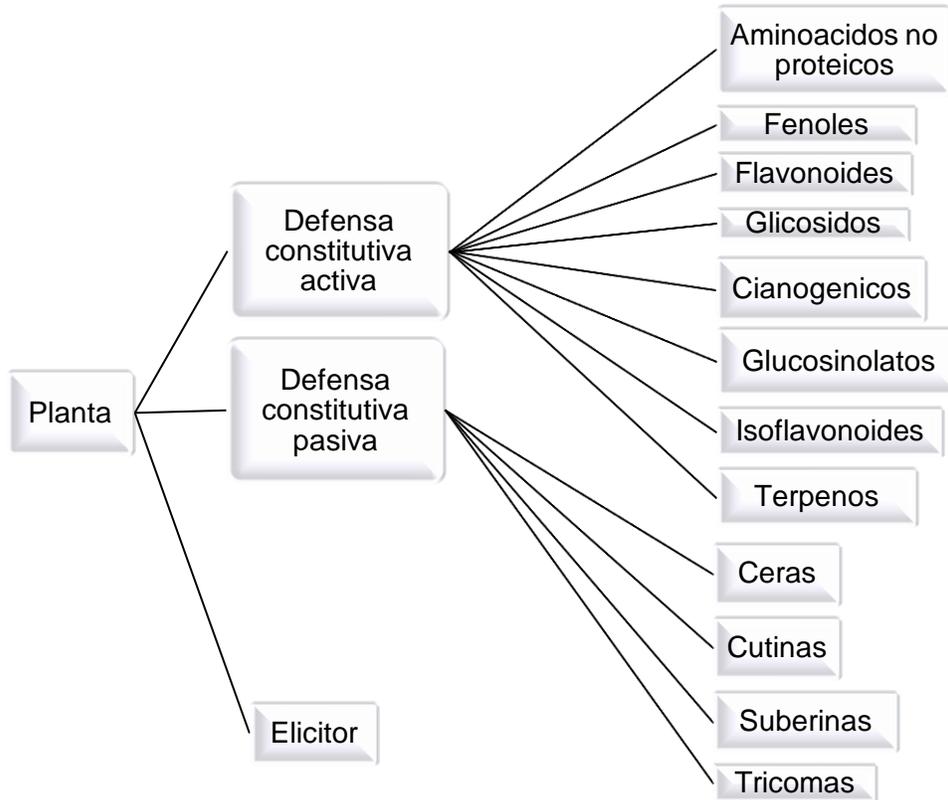


Figura 1. Compuestos constituyentes del mecanismo de defensa constitutiva activa y pasiva en plantas.

Defensa pasiva

Según (Heil 2000, 2004) la respuesta está ligada a las condiciones preexistentes de la planta como características estructurales, ya sean cutinas, suberinas, ceras y tricomas las cuales se encuentran presentes aunque no se muestre el ataque de un patógeno. En el caso de la lignina no es considerada un mecanismo de defensa pasivo ya que puede variar ante un ataque patogénico o condiciones ambientales diversas. En cuanto a los obstáculos, constituyen características estructurales como presencia de apéndices epidérmicos; espesor, dureza y composición química de los tejidos epidérmicos; cantidad y calidad de la cera que recubre las células epidérmicas; tamaño y frecuencia de estomas y lenticelas; lignificación y suberificación por daños mecánicos o heridas (Ferreira *et al.*, 2007).

Respuesta asociada a la pared celular

Como respuesta ante el ataque del patógeno la planta impide su acceso de forma física mediante barreras estructurales (Heil, 2000). Según Orde (2002) el reforzamiento de la membrana y pared celular ayuda a que el patógeno no pueda acceder al contenido citoplasmático y degradar membranas.

El grosor de la cutícula y pared celular son de gran importancia como factor de resistencia fitopatogénica ya que la inducción se realiza a través de ellas y puede imposibilitar la entrada del patógeno al hospedante (Herrera *et al.*, 1897).

Ácidos fenólicos en la autodefensa

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios antimicrobianos encontrados en las plantas, que en algunos casos son directamente tóxicos (Ramesh *et al.*, 2001) y brindan resistencia a la planta estando presentes en gran variedad de tejidos vegetales, de manera que este evento molecular es considerado de gran importancia como parte del proceso defensivo ante el ataque por patógenos (Walters *et al.*, 2005).

METODOLOGÍA

Descripción del sitio experimental

La primera etapa del experimento se realizó en un invernadero ubicado en el departamento de Horticultura ubicado en la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Buenavista, Saltillo Coahuila, con coordenadas 25° 21' 27.17" latitud norte y 101° 02' 00.16" longitud Oeste a una altitud de 1763 msnm.

El invernadero es de baja tecnología con una cubierta de polietileno con 70% de irradiación natural y con una orientación sur-norte, además cuenta con dos cortinas como sistema de enfriamiento. En cuanto al suelo, este cuenta con una cubierta plástica color blanco utilizada como aislamiento de las macetas para con el suelo. El rango de temperatura es de 20 a 30°C y de 50 a 60% de humedad relativa.

El proceso de análisis histológico se llevó a cabo en el laboratorio de Citogenética del departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma “Antonio Narro”.

Siembra y desarrollo del cultivo

La siembra del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se realizó en dos charolas de poliestireno de 200 cavidades las cuales fueron previamente desinfectadas con una solución clorada a una concentración de 2.5 ml L⁻¹ de agua con el objetivo de eliminar agentes que pudieran contaminar o afectar la germinación. El sustrato fue una mezcla de perlita y Peat moss con relación 1:1, las semillas que se emplearon fueron de la variedad “Rio fuego” de crecimiento determinado las cuales fueron depositadas dos semillas por cavidad y se realizaron dos riegos por día.

Para el trasplante se utilizaron bolsas de polietileno color negro con capacidad de 10 L, se llenaron con sustrato Peat moss-perlita en relación 1:1. La nutrición aplicada al cultivo se basó en un solución Steiner (Steiner, 1961) aplicada mediante riego localizado. El manejo del cultivo fue mediante las labores culturales tradicionales a excepción de aplicación de bactericidas.

Aislamiento de *Clavibacter*

La sepa bacteriana *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* se obtuvo de viales con previa identificación, se cultivó la sepa en un medio de cultivo NBY, se incubó a 28 °C durante 15 días.

Inoculación de las plantas

La inoculación con Cmm se realizó 21 días después del trasplante, se hicieron cortes en hojas y posteriormente fueron sumergidas en 30 ml de una suspensión bacteriana ajustada a (1×10^6) cel/ml, el sobrante se asperjó al follaje. Las plantas testigos fueron tratadas con agua destilada.

Aplicación del producto

Como fuente de los ácidos fenólicos se usó el producto Defense GR® de COSMOCEL, cuya función es la detonación de la defensa natural de plantas. Su presentación es en forma grano soluble, y está constituido por Nitrógeno 0.7%, Fosforo 31.0%, Potasio 52.0%, Extractos orgánicos 4.0% y Ácidos fenólicos a 10,000 ppm.

Se realizaron 10 aplicaciones de este producto de manera foliar con una dosis de 1 kg ha^{-1} cada una, la primera aplicación se realizó a los 7 días después del trasplante (ddt) y las demás se realizaron cada 7 días respectivamente hasta concluir la última a los 70 días después del trasplante y totalizando en 10 aplicaciones.

Análisis estomático

Impresión de estomas

Se tomaron muestras de haz y envés de doce plantas por tratamiento, se seleccionó una hoja madura totalmente expandida en la sección aérea de la planta tomando

todas las muestras a una misma altura, se colocó con un pincel una capa delgada de Cemento transparente para PVC (Ciclohexanona-400 CC, Resina de PVC, banco-60 gramos y cloruro de metileno o estearato de zinc-4 gramos) en la parte media de del haz y envés de la hoja, se dejó secar por 10 segundos y posteriormente se colocó un trozo de cinta adhesiva transparente encima, se retiró la impresión epidérmica de la hoja con el trozo de cinta adhesiva transparente y se montó en un portaobjetos.

Medición y evaluación de estomas

En cada impresión se observaron al azar tres campos por muestra en el microscopio a 100x, se contó el número de estomas y de células epidérmicas por cada campo.

Para obtener el área del campo visualizado se aplica lo siguiente:

$$\text{Diámetro del campo visual} = \frac{\text{diámetro del ocular (18)}}{\text{aumento del microscopio (100x)}}$$

Diámetro del campo visual= 0.18

Radio= 0.09

$r^2= 0.0081$

Área del campo = $\pi \times r^2$

Área del campo = $3.1416 \times 0.0081= 0.0254 \text{ mm}^2$

Posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para obtener el número de estomas X mm^2 :

$$\text{Densidad estomatica} = \frac{1 \text{ mm}^2 \times \text{Numero de estomas}}{\text{Area del campo (0.0254mm}^2\text{)}}$$

El índice estomático representa el cociente entre el número de estomas y la cantidad de células epidérmicas. Para el cálculo del índice estomático se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{IE} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de estomas} \times 100}{\text{Células epidérmicas} + \text{N}^\circ \text{ de estomas}}$$

Para el análisis de largo y ancho de estomas se utilizó un microscopio óptico con cámara integrada (Carl Zeiss), tomando fotografías al azar en tres campos por cada muestra en un aumento de 40x. En estas se realizó la medición de largo y ancho de 2 estomas por cada campo tomado en el programa Pixera Wiewfinder Pro.

Análisis histológico

El material biológico utilizado consistió en la colecta de muestras de tres plantas por tratamiento, una por bloque, se tomaron segmentos de tallo y raíz de 10 mm de longitud tomados a 3 y 5 cm de distancia respectivamente desde la base del tallo y raíz principal hacia el corte y trozos de hoja de 1 cm cuadrado tomado del centro de la 4ª hoja de la parte superior de la planta, los tejidos fueron procesados por la técnica histológica de la parafina como se describe a continuación.

Fijación

Las muestras se tomaron después de las 10 aplicaciones del producto, a los 90 ddt. Para conservar los tejidos con un mínimo de alteraciones fueron colocadas en un frasco de vidrio de 15 ml con fijador FAA (Formaldehído (36-40 %) 5 cc, Alcohol etílico al (70 %) 90 cc y ácido acético glacial 5 cc) a temperatura ambiente durante tres meses aproximadamente. Este proceso tiene la finalidad de fijar los tejidos frenando el proceso de vida sin que se distorsionen dichos tejidos, así mismo facilitar su manejo haciéndolos más firmes. Este fijador es considerado por la Microtecnia como el conservador estándar; por tanto es el fijador más utilizado.

Deshidratación

La deshidratación tiene como finalidad eliminar el agua de los tejidos que fueron fijados y endurecidos con anterioridad, los cortes se pasaron por distintos agentes deshidratantes, estos, de menor a mayor concentración, esto se realizó en intervalos de una hora en una serie de soluciones de alcohol etílico al 50%, 60%, 70%, 85%, 95% más eosina; prosiguiendo con alcohol etílico absoluto y alcohol etílico absoluto

más xilol a diferentes concentraciones (3:1, 1:1, 1:3), de esta manera el material estuvo listo para el siguiente proceso, es decir la infiltración e inclusión (Hernández, 1990).

Infiltración e inclusión en parafina

Se colocaron los tejidos en frascos con xilol puro, agregando parafina, se cerraron y posteriormente fueron trasladados a la estufa a una temperatura de 35°C durante 24 horas, después se elevó la temperatura a 45°C y se pasaron los tejidos a parafina pura incubándolos por 24 horas más para posteriormente aumentar a 50°C la temperatura durante 24 horas, se hizo eliminar el xilol y parafina de los frascos para después agregar parafina pura subiendo la temperatura ahora a 60°C para continuar 24 horas después el cambio de parafina pura nuevamente y dejando los frascos en incubación durante 24 horas. Se elaboraron cajas de aluminio cortando rectángulos de 8.2 x 9.4 cm y sellando con cinta adhesiva, se agregó parafina en forma líquida y se colocó el tejido vegetal en forma vertical al centro del molde con la ayuda de una aguja de disección, dejando solidificar las paredes del molde para que posteriormente con la ayuda de un mechero de alcohol y un soplador aplicar calor eliminando así burbujas que pudiera formarse, se dejaron solidificar completamente y se retiró el aluminio de los moldes obteniendo como resultado la inclusión en parafina del tejido vegetal (Hernández, 1990).

Cortes en micrótopo

Se continuó con el montaje de la muestra en el micrótopo (LEICA) y se realizaron varios cortes obteniendo cintas de 20 micras de grosor, colocando tres cortes por portaobjeto y tomando dos portaobjetos como muestras por cada bloque, teniendo así un total de doce cortes para la microfotografía, se colocó adhesivo de Haupt (1 g de gelatina, 15 cm³ de glicerina, 2 g de metabisulfito de sodio por cada 100 cm³ de agua destilada), dos gotas de agua destilada, y se montó la muestra agregando calor para sellarla retirando la parafina sobrante. Teniendo las muestras montadas, se procedió a etiquetarlas y colocarlas en gradillas (Hernández 1990).

Coloración

Se prepararon una serie de reactivos en frascos Coplin, con ayuda de pinzas se tomaron las muestras y se colocaron en el primer frasco durante 10 minutos con contenido de xilol puro (para eliminar parafina), a continuación se pasaron por alcohol etílico absoluto al 96%, 85%, 70%, 60% y 50%, como paso siguiente se enjuagaron sumergiéndolas en agua destilada para después colocarlas en solución de safranina (1 g de safranina por cada 100 cm³ de agua destilada) durante 15 minutos, ya terminado este paso se realizaron una serie de enjuagues nuevamente, ahora en agua del grifo, agua destilada, alcohol etílico al 50%, 60%, 70%, 85% y 96% respectivamente para llegar así a colocarlas en Fast Green (solución de verde rápido al 0.5% en 100 cm³ de alcohol de 96°) por intervalos de 5 a 7 segundos 3 repeticiones aproximadamente, se enjuagaron en alcohol etílico de 96°, alcohol absoluto 1 y alcohol absoluto 2, prosiguiendo se colocaron en una solución carbol-xilol durante 5 minutos y por último en xilol puro. Se sacó de la solución el portaobjetos con la muestra ya coloreada y con una toalla de papel se eliminó el exceso de líquido sin dañar el tejido, se agregó una gota de bálsamo de Canadá para sellar y se colocó un cubreobjetos. Se dejaron secar las muestras durante un lapso de tres semanas en gradillas (Hernández, 1990).

Análisis de imágenes

Colocando la muestra en el microscopio óptico con cámara integrada (Carl Zeiss) se tomaron microfotografías de tres campos por corte de tallo, raíz y hoja utilizando el programa Pixera Wiewfinder Pro, en aumentos de 10x y 40x, por último se realizó una prueba de medias respecto a los tratamientos en base a LSD Fisher.

Variables evaluadas

Severidad de Clavibacter

La incidencia de la enfermedad se expresó como el porcentaje de plantas que presentaron los síntomas (Anfoka, 2000).

Para medir la severidad se utilizó la escala de Baysal *et al.* (2003), que va del 0-5 (0: las hojas no muestran signos de marchitez; 1: 1-10% de las hojas presentan marchitez marginal leve; 2:11-25% de las hojas marchitas; 26-49% de las hojas presentan marchitez asociada con clorosis, el marchitamiento en forma sectorizada; 4: 50-74% de las hojas presentan marchitez, excesiva caída de hojas; y 5 todas las hojas marchitas).

Además se calculó el índice de severidad mediante la fórmula descrita por Raupach *et al.* (1996):

$$\text{Índice de severidad} = \frac{\sum \text{número de clasificación} \times \text{número de plantas en la clasificación} \times 100\%}{\text{número total de plantas} \times \text{clasificación más alta}}$$

Anatómicas

Densidad estomática, Índice estomático, Largo y ancho de estomas.

Histológicas

Numero de vasos de xilema en tallo, raíz y hoja; Área de vasos de xilema en tallo y raíz: Grosor de epidermis del tallo y hoja; Córtex de la raíz y Parénquima de la hoja.

Diseño experimental

Se establecieron cuatro tratamientos con 18 unidades experimentales por tratamiento, totalizando en 72 unidades experimentales para el experimento completo. Una planta se consideró como una unidad experimental. Los tratamientos establecidos fueron los siguientes:

- | | | |
|----------|----------------|--|
| 1 | T0 | Testigo absoluto, plantas no inoculadas o con aplicación. |
| 2 | Cmm | Testigo infestado, plantas inoculadas con <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . |
| 3 | Defense | Testigo relativo, plantas con aplicación de un producto con |

- ácidos fenólicos a 10,000 ppm.
- 4 Cmm +** Plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis* subsp.
Defense *michiganensis* y con aplicación del producto.

El diseño del experimento establecido en campo fue bloques completos al azar. Para el análisis estadístico se hizo una prueba de comparación de medias según LSD ($p \leq 0.5$) para cada una de las variables mencionadas anteriormente utilizando para esto el programa InfoStat, 2008.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Severidad

Los resultados de la evaluación de severidad de en plantas de tomate se presentan en la Tabla 1. La prueba de medias arrojó una diferencia estadística entre los tratamientos y el Testigo a los 75 días ddt, donde el tratamiento con Cmm presentó el mayor índice de severidad superando al Testigo por un 76%, mientras que el tratamiento con Cmm + Defense presentó un 16.1% más severidad en comparación con el testigo, sin embargo al compararlo con solo Cmm, presentó una disminución del 19.4%. Este resultado indica que Defense reduce la incidencia a *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* significativamente.

Tabla 1. Valores medios del porcentaje de severidad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Tratamiento	Días después del trasplante					
	1	15	30	45	75	90
Cmm	18.9 A	38.9 A	58.9 A	71.1 A	82.2 A	93.3 A
Cmm + Defense	15.6 A	31.1 B	40.0 B	45.6 B	62.8 B	80.0 A
T0	0.0 B	3.3 C	13.3 C	16.7 C	46.7 C	76.7 A
Defense	0.0 B	1.1 C	7.8 C	11.1 C	43.3 C	75.6 A
C.V.	35.7	22.5	18.2	22.2	12.2	11.6

Testigo absoluto (T0), plantas inoculadas con *Clavibacter* (Cmm), Aplicación de Defense e inoculación con *Clavibacter* (Cmm + Defense) y aplicación de (Defense), Coeficiente de variación (c. v. %). Medias con la misma letra por columna son estadísticamente iguales entre tratamientos (LSD, $\alpha \leq 0.05$).

Lo dicho anteriormente se explica mediante los estudios sobre la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos son restringidos, aunque se sabe que

pueden tener efecto bactericida (Smith, 1986). Como lo afirma Weinhold y Hancock (1980), pueden tener dos funciones, son directamente tóxicos a los patógenos y además sirven como sustrato a la microflora que impide la entrada a patógenos; sin embargo, esto no hace reversible el daño ya causado a la planta por acción del patógeno por lo que no presentan una acción curativa sino más bien preventiva.

Estudio de los estomas

En las Tablas 2-4 se presentan los resultados del estudio de los estomas, además en la Figura 2 se presentan las micrografías de las diferentes mediciones realizadas.

Densidad estomática

Los resultados de la evaluación de densidad estomática respecto a la superficie adaxial y abaxial de la hoja se muestran en la Tabla 2. Donde la prueba de medias entre los tratamientos y el testigo de la variable DE de la superficie adaxial presentó diferencias significativas, siendo el Testigo el que presentó la mayor densidad estomática al igual que Cmm + Defense, mientras que Defense resultó tener una menor DE equivalente a un 27.7% en comparación con el Testigo. En cuanto a la superficie abaxial no se presentaron diferencias estadísticas, sin embargo en este caso el tratamiento Defense superó al T0 por un 9.9% de DE.

Tabla 2. Densidad Estomática del haz y envés de la hoja del cultivo de tomate en el testigo y tratamientos evaluados.

Tratamiento	DE Adaxial	DE Abaxial
	(No. estomas/mm ²)	(No. estomas/mm ²)
T0	118.11 A	263.56 A
Cmm + Defense	117.02 A	260.28 A
Cmm	111.55 AB	250.44 A
Defense	85.30 B	289.81 A

DE = Densidad estomática, Testigo absoluto (T0), plantas inoculadas con *Clavibacter* (Cmm), Aplicación de Defense e inoculación con *Clavibacter* (Cmm + Defense) y aplicación de (Defense), medias con la misma letra son estadísticamente iguales entre tratamientos (LSD, $\alpha \leq 0.05$).

En la mayoría de los casos la DE es mayor en la superficie abaxial de la hoja, la cual puede prevenir la pérdida de agua por estar menos expuesta al calentamiento (Martín y Glover, 2007). Como se puede ver en los resultados la mayor densidad estomática en la superficie adaxial la tiene el Testigo, según García y Madiz (1999), podría representar una característica favorable ya que la presencia de una alta DE por unidad de área de lámina se ha correlacionado con una mejor capacidad fotosintética, por lo cual Defense al mostrar menor DE tendrá una menor capacidad fotosintética respecto al testigo y al resto de los tratamientos.

Índice estomático

Los resultados de la evaluación de Índice estomático en la superficie adaxial (haz) y abaxial (envés) de la hoja se muestran en la Tabla 3. No se presentan diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados. Relacionando al argumento de Wilkinson (1979) tanto la DE como el IE pueden estar influenciados por las condiciones ambientales y nutricionales. Además, Hernández (2005), menciona que la disminución en la densidad estomática e índice estomático es una respuesta de aclimatación para restringir la pérdida de agua; por lo que no ejerce influencia para este caso ya que no hay estrés hídrico o salino, lo que explica que no se den diferencias en el IE de los diferentes tratamientos. Sin embargo, los tratamientos Cmm + Defense y Cmm tuvieron numéricamente el mayor porcentaje de IE en la superficie adaxial superando al Testigo por un 4.8% por ello se puede notar que las plantas de los tratamientos fueron superiores en general al Testigo. El tratamiento Defense presentó menor porcentaje de IE con un 13.5% mientras que en la superficie abaxial se muestra con el mayor porcentaje de IE superando al testigo por un 7.73%.

Tabla 3. Comparación de medias respecto a LSD Fisher del índice estomático en la superficie adaxial y abaxial.

Tratamiento	I.E Adaxial	I.E Abaxial
	%	%
Cmm + Defense	11.57 A	27.47 A
Cmm	11.57 A	27.41 A
T0	11.03 A	27.66 A
Defense	9.53 A	29.80 A

Testigo absoluto (T0), plantas inoculadas con *Clavibacter* (Cmm), Aplicación de Defense e inoculación con *Clavibacter* (Cmm + Defense) y aplicación de (Defense), medias con la misma letra son estadísticamente iguales entre tratamientos (LSD, $\alpha \leq 0.05$).

Voleniková y Ticha (2001) mencionan que en hojas anfiestomáticas como lo es el caso del tomate la frecuencia estomática es usualmente más grande en la parte abaxial que en la superficie adaxial como lo podemos ver en los resultados al comparar el IE de la superficie adaxial con la superficie abaxial en los tratamientos y el testigo.

Largo y ancho de estomas

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la prueba de medias realizada respecto a los tratamientos de las variables largo y ancho de estomas. En la superficie adaxial no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos, sin embargo, numéricamente Defense presentó el valor máximo superando al Testigo en un 3.2% en el largo y un 0.6% de ancho de estoma. En cuanto a la superficie adaxial se encontraron diferencias estadísticas en la variable largo de estoma, el tratamiento Defense presentó el mayor valor de largo de estoma superando al Testigo por un 1.7%, mientras que el tratamiento Cmm + Defense tuvo menor valor de en esta variable respecto al Testigo por un 5.9% de largo. La variable ancho de estoma no presento diferencia estadística, sin embargo el tratamiento Defense presento un

ancho de estomas mayor en un 0.85% en comparación con el Testigo y el tratamiento Cmm tuvo el menor rango reduciendo el ancho de estoma hasta un 5.5% en comparación con el Testigo.

Tabla 4. Comparación de medias respecto a LSD Fisher del largo y ancho de estomas en la superficie adaxial y abaxial de la hoja.

Tratamiento	Adaxial		Abaxial	
	Largo (μm)	Ancho (μm)	Largo (μm)	Ancho (μm)
Defense	33.50 A	17.68 A	36.58 A	22.37 A
T0	32.46 A	17.56 A	35.94 AB	22.18 A
Cmm	31.99 A	16.55 A	35.25 AB	20.95 A
Cmm + Defense	31.09 A	17.43 A	33.81 B	21.47 A

Testigo absoluto (T0), plantas inoculadas con *Clavibacter* (Cmm), Aplicación de Defense e inoculación con *Clavibacter* (Cmm + Defense) y aplicación de (Defense), medias con la misma letra son estadísticamente iguales entre tratamientos (LSD, $\alpha \leq 0.05$).

Gleason *et al.* (1993) mencionan que la bacteria *Clavibacter michiganensis* se transmite por semilla infectada y posteriormente penetra los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidatides de la hoja por lo que es relevante estudiar el tamaño de los estomas. Cruz *et al.* (2006) mencionan que la forma y tamaño de los estomas constituye un factor importante en la resistencia a organismos fitopatógenos, como lo es en el caso de Citrus con *Pseudomonas citri* la cual penetra a través de los poros estomatales lo que facilita al patógeno la infección a la planta, o como en la remolacha y su resistencia a *Cercospora beticola*, los estomas de las hojas jóvenes exhiben un tamaño cercano a la mitad que las presentadas por las hojas más viejas.

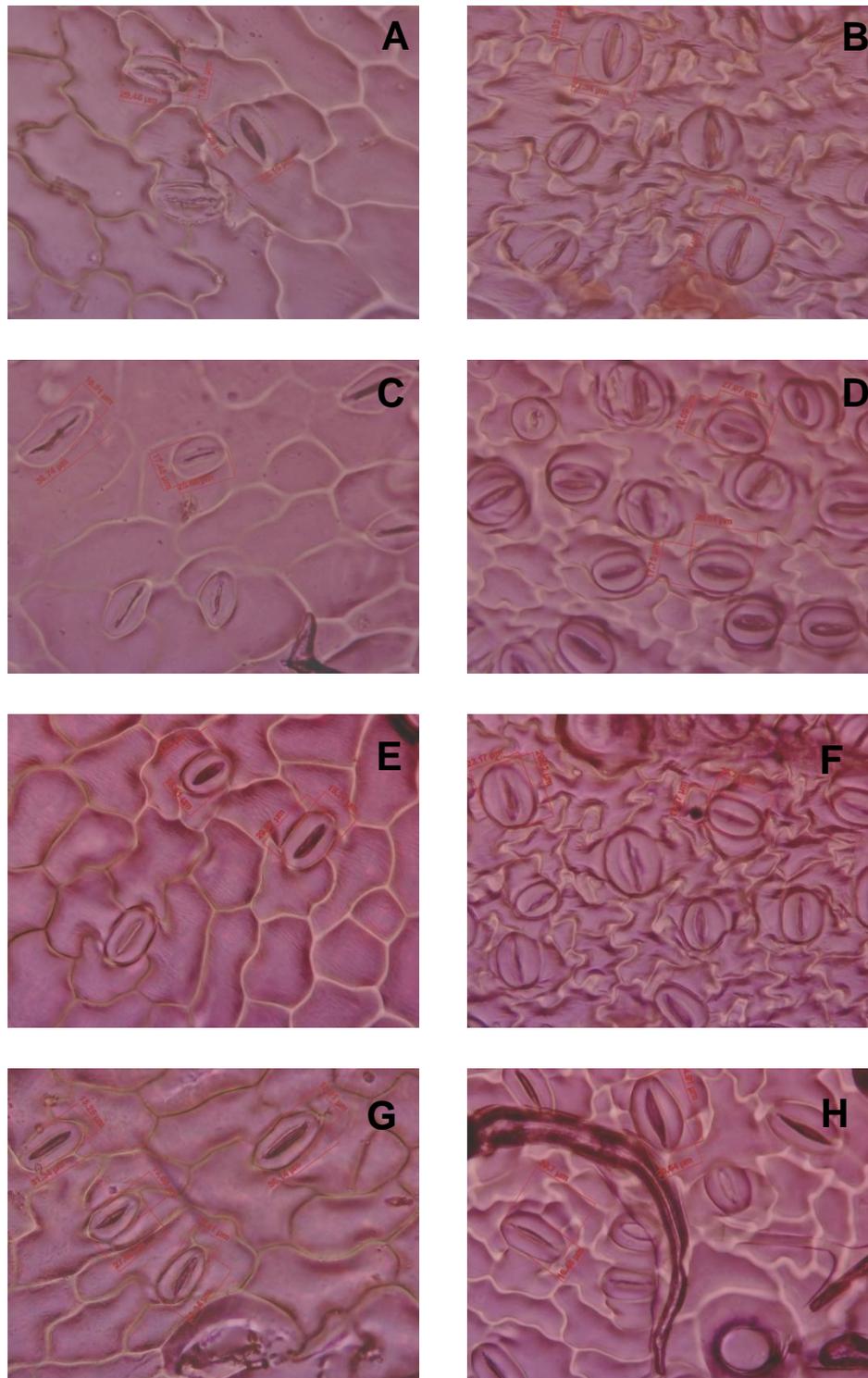


Figura 2. Impresiones estomáticas de hoja 40x, A: T0 superficie adaxial; B: T0 superficie abaxial; C: Defense superficie adaxial; D Defense superficie abaxial; E: Cmm superficie adaxial; F: Cmm superficie abaxial; G: Cmm + Defense superficie adaxial; G: Cmm + Defense superficie abaxial.

Estudio histológico

Hoja

En la Figura 3 se muestran las micrografías de los cortes transversales de las hojas utilizadas para las diversas mediciones. Los resultados obtenidos de las mediciones de las hojas se muestran en la Tabla 5. Se puede observar que no hay deferencia estadística entre los tratamientos en las variables número de vasos de xilema y epidermis inferior.

En cuanto la variable grosor de epidermis superior presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos donde el Testigo presenta un mayor grosor de parénquima y epidermis superior, mientras que los tratamientos que incluyeron la aplicación de Defense en ambas variables presentaron los menores valores. En el caso de la infección por *Pyricularia oryzae* en arroz se ha observado que ciertas células epidérmicas presentan un mayor porcentaje de penetración y formación de apresorios. Esto se ha considerado debido a que no todas presentan la misma resistencia a la penetración ya que algunas presentan su pared celular con pectina y celulosa mientras que otras ya presentan lignificación.

Tabla 5. Número de vasos de xilema, grosor de la epidermis superior e inferior y grosor del parénquima de la hoja.

Tratamiento	Vasos xilema	Epidermis inferior (μm)	Epidermis superior (μm)	Parénquima (μm)
T0	56.08 A	13.39 A	30.46 A	160.76 A
Cmm	47.00 A	13.36 A	27.76 AB	124.78 B
Defense	47.58 A	13.93 A	24.93 B	104.23 C
Cmm + Defense	60.50 A	12.86 A	25.29 B	96.17 C

Testigo absoluto (T0), plantas inoculadas con *Clavibacter* (Cmm), Aplicación de Defense e inoculación con *Clavibacter* (Cmm + Defense) y aplicación de (Defense), medias con la misma letra son estadísticamente iguales entre tratamientos (LSD, $\alpha \leq 0.05$).

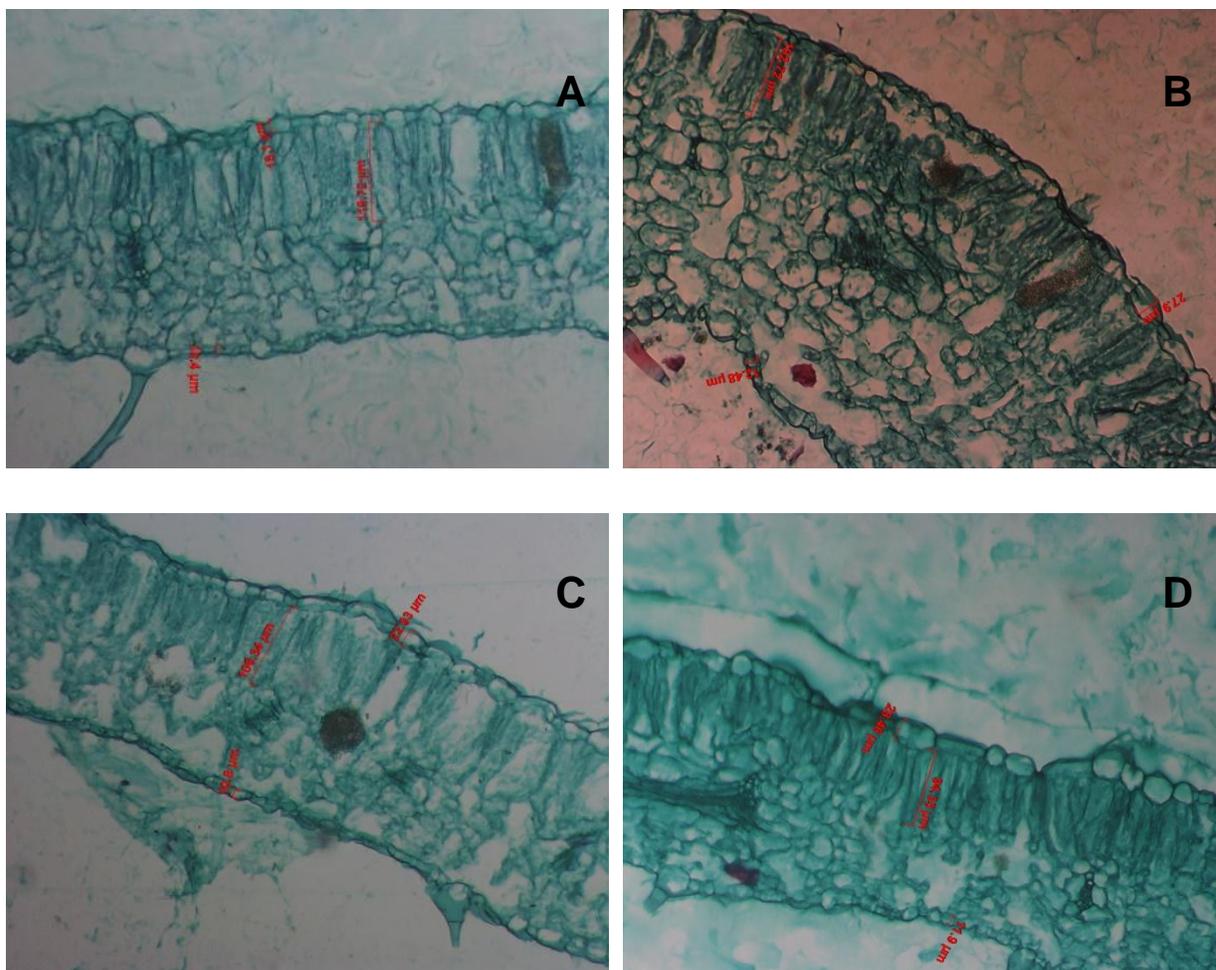


Figura 3. Cortes transversales de hoja (Medición de parénquima, epidermis superior e inferior) 10x: A: Testigo absoluto; B: Defense; C: Cmm; D: Cmm + Defense.

Tallo

En las Figuras 4 y 5 se muestran microfotografías de las mediciones realizadas en las diferentes estructuras del tallo.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la prueba de medias realizada respecto a las variables evaluadas en el tallo de las plantas. Solo se observaron diferencias

estadísticas en el grosor de epidermis, donde los tratamientos Cmm + Defense y Defense presentaron una reducción del grosor de la epidermis en la planta en comparación con el Testigo. Esto indica que la aplicación de Defense disminuye el tamaño de la epidermis, ya que se observó la misma situación en la epidermis superior de la hoja.

Tabla 6. Grosor de la epidermis, numero de vasos de xilema, y área de vasos de xilema del tallo.

Tratamiento	Epidermis (μ)	Vasos xilema	Área vasos xilema (μ^2)
Cmm	51.43 A	26.50 A	3508.21 A
T0	46.89 A	26.89 A	4509.86 A
Cmm + Defense	38.28 B	30.17 A	3482.40 A
Defense	36.83 B	26.83 A	4497.98 A

Testigo absoluto (T0), plantas inoculadas con *Clavibacter* (Cmm), Aplicación de Defense e inoculación con *Clavibacter* (Cmm + Defense) y aplicación de (Defense), medias con la misma letra son estadísticamente iguales entre tratamientos (LSD, $\alpha \leq 0.05$).

En las variables número de vasos de xilema no se encontraron diferencias estadísticas, el tratamiento Cmm + Defense superó al Testigo por un 12.19% mientras que Defense y Cmm fueron menores al Testigo por un 0.22% y 1.4% respectivamente por lo que las plantas de Cmm + Defense aumentaron su número de vasos xilemáticos como modo de defensa a la enfermedad mediante la aplicación de ácidos fenólicos.

El área de vasos de xilema no mostro diferencias estadísticas, el Testigo superó a los tratamientos siendo Cmm + Defense el más bajo por un 22.7 %, Cmm por un 22.2% y Defense un 0.26% demostrando así que la aplicación de ácidos fenólicos a la planta infectada con *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* aumenta el número de vasos xilemáticos y reduce su área.

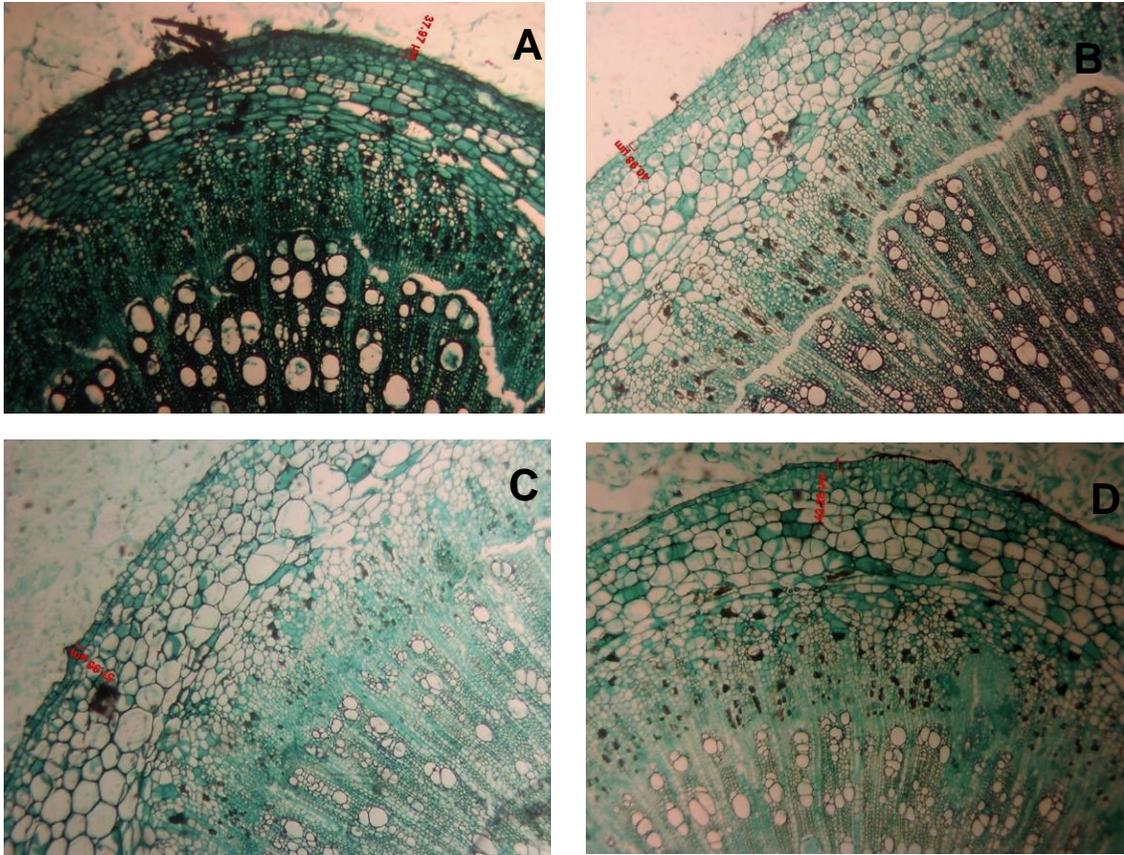


Figura 4. Cortes transversales de tallo, (Medición de epidermis) 2.5x: A: T0; B: Defense; C: Cmm; Cmm + Defense.

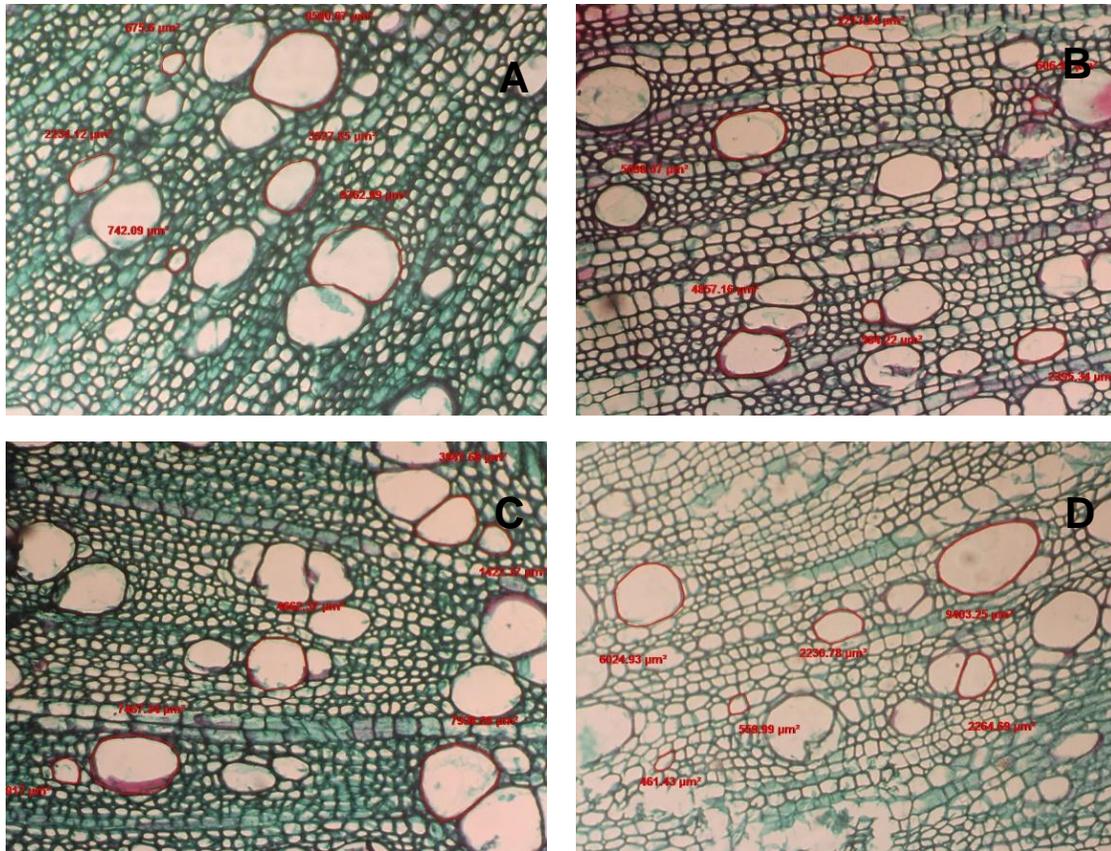


Figura 5. Sección de tallo (Medición de área de Xilemas) 10x, A: T0; B: Defense; C: Cmm; Cmm + Defense.

Raíz

En las Figuras 6 y 7 se muestran las micrografías de las mediciones realizadas en las diferentes estructuras de la raíz.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de las variables evaluadas en la raíz. En la variable grosor de córtex se observaron diferencias estadísticas, donde el Testigo fue superado por todos los tratamientos, siendo el más alto Cmm + Defense por un 84.35% Esto quiere decir que al presentarse la enfermedad y mediante la aplicación de Defense se proporciona aumento en el grosor del córtex lo que puede dar como resultado una protección a la planta.

Tabla 7. Grosor del córtex, número de vasos de xilema y área de vasos de xilema de la raíz.

Tratamiento	Córtex (μ)	Vasos xilema	Área vasos xilema (μ^2)
T0	148.79 B	39.56 A	2812.41 B
Cmm	253.09 A	34.78 BC	3477.82 A
Cmm + Defense	274.30 A	33.89 C	2951.00 B
Defense	252.49 A	38.56 AB	2404.60 C

La variable número de vasos de xilema presentó también diferencias significativas, donde el Testigo fue el más alto, siendo contrarios los resultados al número de vasos de xilema en el tallo donde el tratamiento Cmm + Defense presento el valor más alto en esta variable. Al presentar mayor número de vasos de xilema la planta tendrá mayor capacidad de absorción de agua siendo una función vital que está implicada en varios procesos importantes. En el caso de los tratamientos con Cmm se observaron los valores más bajos de número de vasos.

En cuanto al área de los vasos de xilema Cmm presentó el valor más alto superando al Testigo en un 23.65%, mientras que en Defense hubo una reducción en el área de vasos de xilema en un 14.5%. El tratamiento Cmm + Defense fue estadísticamente igual al Testigo mostrando así la capacidad de defensa de la planta a la enfermedad.

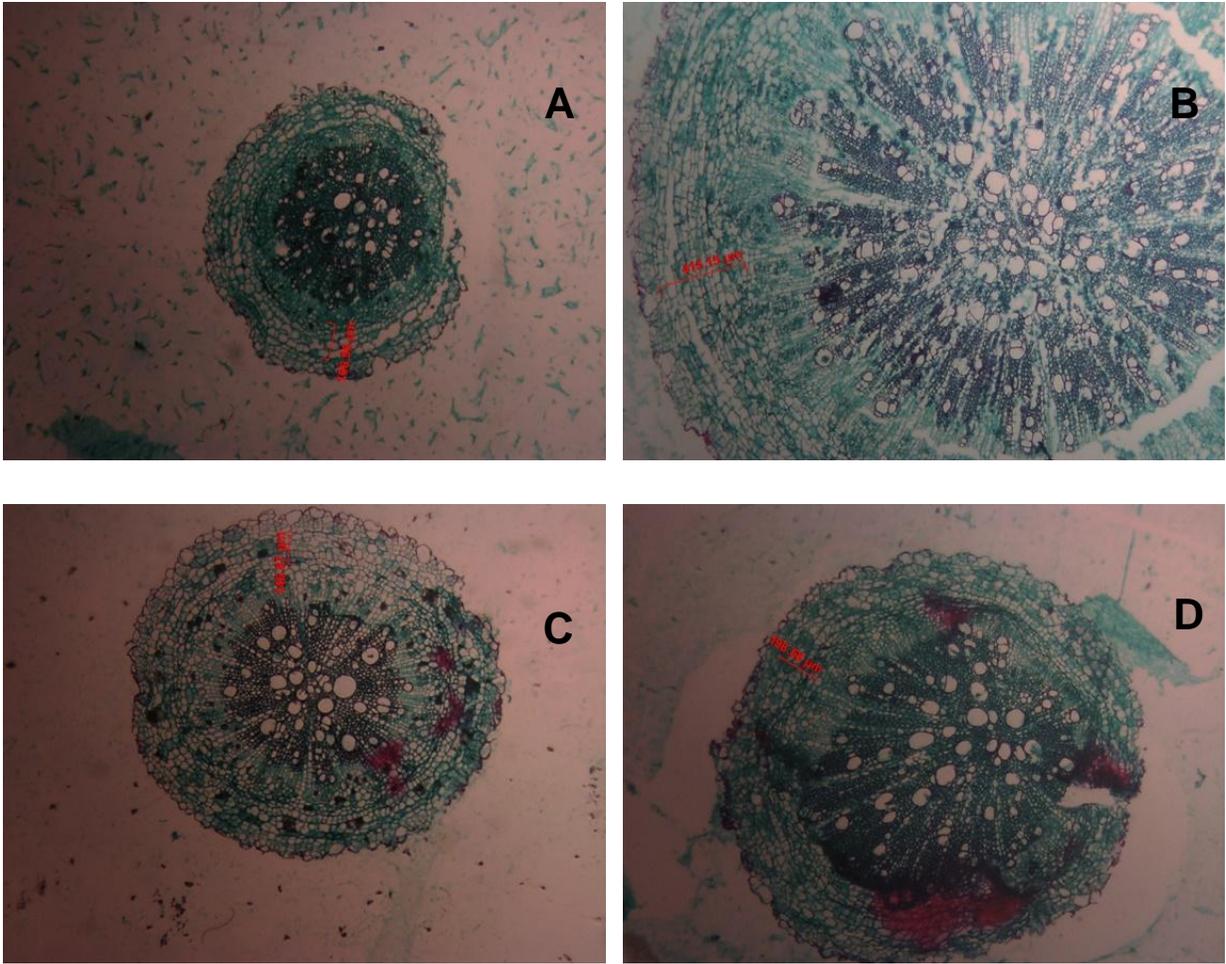


Figura 6. Corte transversal de raíz (Medición de córtex) 2.5x: A: T0; B: Defense; C: Cmm; Cmm + Defense.

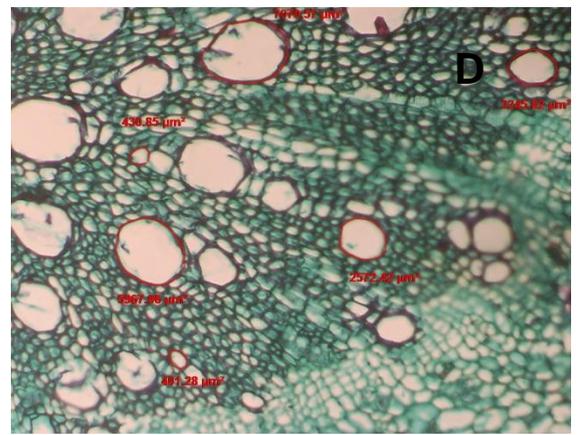
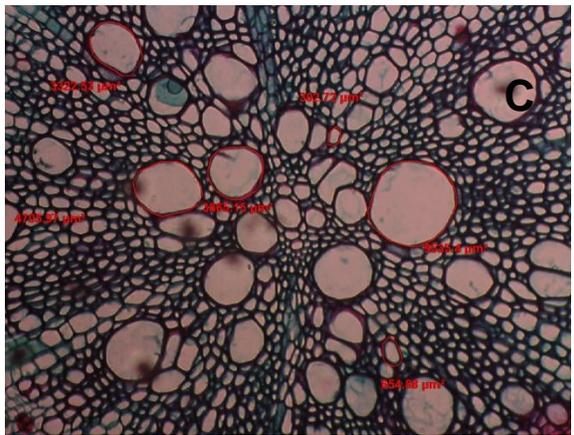
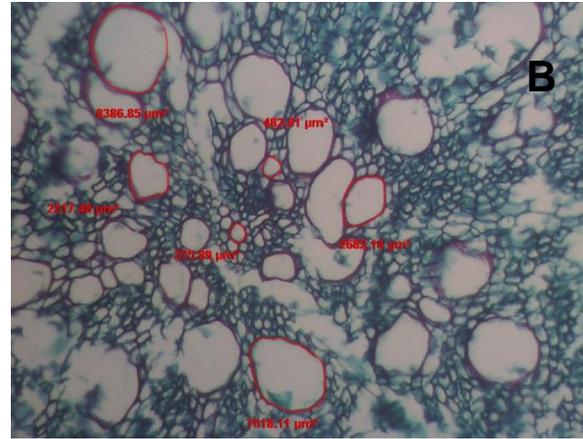
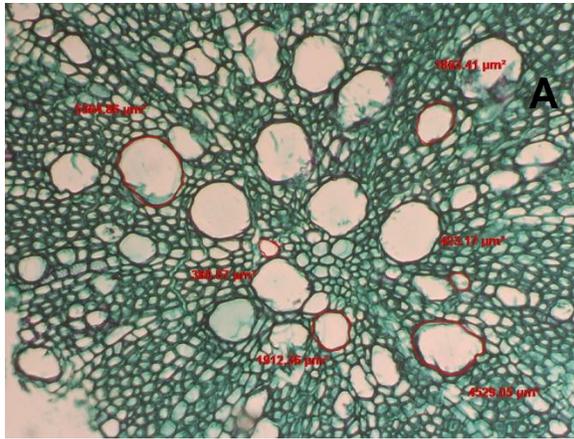


Figura 7. Sección de tallo (Xilemas) 10x: A: T0; B: Defense; C: Cmm; Cmm + Defense.

CONCLUSIONES

Se demostró que los ácidos fenólicos disminuyen la severidad en las plantas, mejorando su capacidad de respuesta ante el daño potencial causado por *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.

La aplicación de ácidos fenólicos tuvo un efecto positivo en la respuesta de defensa de la planta ante el ataque de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* modificando la densidad estomática de la superficie adaxial y el largo de los estomas de la superficie abaxial de la hoja, lo que en última instancia podría mejorar su capacidad fotosintética.

Se encontró que mediante la aplicación de ácidos fenólicos hay modificación en estructuras de hoja, en el grosor de parénquima y epidermis superior. En tallo se observaron cambios en el grosor de epidermis y en raíz, en el grosor de córtex y número y área de vasos de xilema por lo cual este mecanismo en la planta es utilizado como medio de defensa a la entrada de patógenos a su sistema y la mejora en la conducción de agua y nutrientes lo cual incrementa entonces la capacidad de tolerar el ataque de patógenos.

REFERENCIAS

- Altieri, M. 1995. Agroecología, Creando sinergia para una agricultura sostenible. Cuaderno de Trabajo 1-31 pp.
- Anfoka, G.H., 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to cucumber mosaic virus. Crop Prot. 19: 401-405.
- Avalos A., Pérez Urria E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología) 2 (3). Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. pp 119-145.
- Baysal E, Peker H, Kemal M, Temiz A., 2003. Cultivation of oyster mushroom on waster paper with some added supplementary materials. Bioresour. Technol. 89: 95-97.
- Berenguer, J. J. 2003. Manejo de cultivo de tomate en invernadero. Pp. 147-152. En: Castellanos J. Z. y Muños R. J. J. (Eds). Curso Internacional de producción de hortalizas en invernaderos. Celaya Guanajuato, México.
- Bidwell, R. G. S. 2002. Fisiología Vegetal. AGT. Editor. Tercera Reimpresión. México, D. F. 762 Pág.
- Chang R J,S M Ries, J K Pataky, 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. Phytopathology 82: 552-560.
- Comisión Veracruzana, C, A. 2010. Monografía del Tomate. Estado de Veracruz. P.4.
- Collinge, DB: Borch, J; Madriz-Ordeñana, K; Newman, M-A. 2001. The responses of plants to pathogens. In Hawkesford, MJ; Buchner, P. Molecular analysis of plant adaptation to the environment. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers.

- Contreras N; Trujillo G; Borges O; Centeno Fernando, 2001. Análisis ultraestructural de la interacción de *Xanthomonas axonopodis* pv. Phaseoli con genotipos resistentes, moderadamente resistentes y susceptibles a *Phaseolus vulgaris* L. Interciencia.
- Cornide María Teresa; H. Lima; G. Galvez y A. Sigarroa, 1985. Mecanismos de resistencia a las enfermedades en Genética vegetal y fitomejoramiento. Ciudad de la Habana: Editorial Científico-Técnica, 1985. p. 400-414.
- Cortez, A. 2008. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance against foliar diseases of *Agrotis stolonifera* and *Nicotiana benthamiana*. Library Archives Canada, v1, p.1-24.
- Cruz B.; Hernández F. Y; Rivas FE. 2006. Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos y plagas. Temas de ciencia y tecnología. Vol. 10. Número 29. Instituto de investigaciones hortícolas, Universidad Agraria de la Habana. La Habana, Cuba pp. 45-54
- Dhanvantari, B. N. 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. Can. J. Plant Pathol. 11:400-408.
- EPPO, 2010. Data sheet on quarantine pest. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO A2 List. Nº. 50.
- Fahn, A. 1974. Anatomía Vegetal. H. Blume Ediciones. Madrid, España. 627 pág.
- FAO. 2002. Recuperado el 20 de Enero de 2017, de Agroinformación-El Cultivo del Tomate. 1ª parte. El origen.: <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>
- FAO. 2008. Análisis del Programa de Agricultura por Contrato ante un Escenario de Precios a la Alza. Monografía de Cultivos, Jitomate. Sinaloa, México 10p.
- FAOSTAT. 2014. Recuperado el 20 de ENERO de 2017, de Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

- Ferreira, R.B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C.N., Chen, Z., Batista, L.M., Duarte, J., Borges, A. y Teixeira, A.R. 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*. 5: 677-700.
- Foolad, M. R. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, (1), 52.
- García M. y Madriz P. 1999. Anatomía foliar comparada de cinco genotipos de frijol mungo, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Rev. Fac. Agron.. (LUZ)*. 1999,16: 610-620.
- García, M.; Perez, L. 2003. Fitoalexinas: Mecanismo de Defensa de las Plantas. *Revista Chapingo*, n.9, p.5-10.
- García, S. R., Carrillo, A. J., Allende, M.R., Márquez, Z.I. y Cruz, O. J. 2000. Síntomas e identificación de bacterias en plantas de tomate cultivadas con alta tecnología en Sinaloa. Resúmenes del XXVII Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología. L-32.
- Gleason ML, Gitaitis RD, Ricker MD, 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Disease* 77,1069-76.
- González, E., A.; Cedillo P. E. y Díaz. G. L. 2007. Morfología y Anatomía de las Plantas con Flores. Ed. UACH. Edición 1. Texcoco, México. pp 59, 68, 70, 72, 75,93 y 119.
- Heil, M. 2000. Different Strategies for Studying Ecological Aspects of Systemic Acquired Resistance (SAR). *Journal of Ecology*, p.706-708.
- Heil, M. 2004. Induction of Two Indirect Defences Benefits Lima Bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in Nature . *Journal of Ecology*, n92, p.527-536.
- Herrera Ysla L.; S. Mayea y D. Seidel, 1987. *Fitopatología General*. Ciudad de la Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1987: p. 39-47.

- Hernández, S. M. 1990. Manual de Laboratorio: Citología y Citogenética. Editorial Trillas: UAAAN. México. 105 Pág.
- Hernández, V.R.E.M. 2005. Micro morfología de la epidermis foliar de plantas sanas y enfermas de Agave tequilaza Weber. Tesis de doctorado en ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
- Jansen, J. D. 2004. Fatty acid analysis in the identification, taxonomy and ecology of (plant pathogenic) bacteria. In: Kowalchuk, GA, De Bruijn, F.S, Head, M, Akkermans, A.D, Van Elsas, A.D. Eds. Molecular Microbial Ecology Manual. 2 ed. New York. USA. Spring Publishing. 973-982.
- Jaramillo, J., Arias, M. 1997. ICA Hortalizas, Manual de Asistencia Técnica No. 28.
- Jaramillo, J., Rodríguez, V. P., Guzmán, M., Zapata. M, Rengifo, T 2007. Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas. pp. 55-57.
- Jones, J. B., Jones, J. P. 1993. Compendium of Tomato Diseases. The American Phytopathological Society. Minnesota, Estados Unidos.
- Lebeda A., Mieslerová B., Petřivalský M., Luhová L., Špundová M., Sedlářová M., Nožková-Hlaváčková V., Pink D.A.C. 2014. Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersici*. European Journal of Plant Pathology 138(3), 569-596.
- Lewis, I. M. L. AND Miller, S.A. 2005. Evaluation of hot water seed treatment for the control of bacterial leaf spot and bacterial canker on fresh market and processing tomatoes. Acta Horticulture 695:197-204.
- Martín, C., y B. Glover. 2007. Aspectos funcionales del patrón celular en la epidermis aérea. (En inglés). Curr. Opin. Plant. Biol. 10:70-82.

- Mateo, J. J. 1995. Funciones, Estructura y Morfología de las Hojas. CFGM Trabajos Forestales y de Conservación Medio Natural. Agrotecnología (Botánica). pág. 10.
- Megias, M., Molist, P., Pombal M. A. 2014. Tejidos Vegetales Conductores. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Pp. 5-9.
- Molist, P., Pombal, M. A., Megias M. 2014. Tejidos Vegetales de Protección. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Pp. 8-17.
- Molist, P., Pombal, M. A., Megias M. 2014. Tejidos Vegetales-Parénquima. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Pp. 6-12.
- Nijse, J. 2004. On the mechanism of Xylem Vessel Length Regulation. *Plant Physiology*, January 2004. 134: 32-34.
- Lebeda, A., Mieslerova, B., Petrivalsky, M., Luhova, L, Spundlarova, M., Nozcova-Hlavackova, V., Pink, D.A.C., 2014. Resistance mechanisms of wild tomato germplasm to infection of *Oidium neolycopersisi*. *European Journal of Plant Pathology* 138 (SI), 569-596.
- OEPP/EPPO, 2005. No. 39, Diagnostic protocol for *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. – Data Sheets on Quarantine Pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 275-283.
- Orde, K. M. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patogeno. *Manejo Integrado de Plagas*, 22-32.
- Pool, V. M., y M. B. MC Kay. 1916. Relation of stomatal movement to infection by *Cercospora beticola*. *J. Agr. Res.* 5:1011-1038.
- Ramesh, S.A., Velazhahan, R., Viswanathan, R., Padmanaban, P. y Vidhyasenkarán, P. 2001. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum falcatum* in

- sugarcane by a Synthetic Signal Molecule, Acibenzolar-S-Methyl (CGA-245704). *Phytoparasitica*. 29:231-242.
- Ramírez, V. J. y Sainz, R. R. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1ª ed. Once Ríos (Eds). Culiacán, Sinaloa, México. 19-160 pp.
- Rat, B., Poissonnier, J.; Goisque, M. J., and Burgaud, A. 1991. Le Point. Sur le chancro bactérien. *Frutas y Hortalizas*. Prepared by CABI an EPPO for the EU. 86. 38-40 pp.
- Raupach, G.S., Liu, L., Murphy, J.F., Tuzun, S.T., Kloepper, J, W., 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis*. 80:891-894.
- Ray, P. M. 1985. *La Planta Viviente*. Compañía Editorial Continental, S.A. México. pp. 72-73.
- Rodríguez, R. Tavares, R y Medina, 2001. *Cultivo moderno de tomate*. Segunda edición. Mundi Prensa, Madrid, España. pp. 255.
- Ruiz R., J. D. 2002. Poda en hortalizas. *Apuntes de producción de hortalizas II*. Universidad Autónoma Antonio Narro. Torreón, Coahuila. México. P. 78.
- SAGARPA, 2010. *Análisis del Programa de Agricultura por Contrato ante un Escenario de Precios a la Alza*. Monografía de Cultivos, Jitomate. Sinaloa, México. 10p.
- Sánchez, M. y J. Aguirreolea, 1996. Relaciones hídricas. En: Azcon-Bieto, J. y M. Talon (eds). *Fisiología y bioquímica vegetal*. Edigrafos. Madrid, España. pp 49-90.
- Santa, O.F.M, J.A. de J.V., 1993. *Agronomía del Riego*. Editorial Mundiprensa, ad Departamento de Producción Vegetal y Técnica Agraria, Universidad de Castilla, España. pp.267-268.

- SIAP. 2015. Recuperado el 20 de ENERO de 2017, de SIAP:
<http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119?idiom=es>
- Smith, D. A. y Banks, S. W. 1986. (Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins). *Phytochem.* 25, 979-995.
- Steiner, A. A. 1961. A Universal Method for Preparing Nutrient Solutions of a Certain Desired Composition. *Plant Soil.* pp 15: 134-154.
- Tlapa, B. B. 2008. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de tomate (*Solanum esculentum*) In Jitomate tecnoligas para su producción en invernadero Bautista M, N. Chavarin P, C., Valenzuela E, F. Colegio de Postgraduados. Montecillos Texcoco, Estado de México. pp: 65-94.
- Vivanco Jorge M., Cosio Eric, Víctor M. Loyola-Vargas y Héctor E. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia.* pp 68-75.
- Volenikovà, M., y I. Tichà. 2001. Perfiles de inserción en densidad y tamaño de estomas en *Nicotiana tabacum*. (En ingles) *Biol. Plant.* 44:161-165.
- Walters, D., Newton, A. y Lyon, G. 2005. Induced resistance: Helping plants to help themselves. *Biologist.* 52: 28-33.
- Wilkinson, H.P. 1979. The plant surface (mainly leaf). In: C.R. Metalcafe, and L. Chalk, editors, *Anatomy of the dicotyledons.* Vol. 1. Claredon Press, Oxford, USA. p. 97-117.
- Willmer, C. M. 1983. *Stomata.* Longman Inc., New York. 166pp.
- Weinhold, A. R., Hancock, 1980. Defense at the perimeter: extruded chemicals. In: Horsafall, J. G. and Cowling G. (Eds.). *Plant Disease.* Vol. V Academic Press. N. Y.: pp. 121-137.