

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA



Cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Smith) en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), en el Municipio de Venado, San Luis Potosí.

Por:

HUGO MORENO MONSIVAIS

TESIS

**Presentado como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

Ingeniero Agrónomo Parasitólogo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre del 2005

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
Cáncer bacteriano(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Smith) en
tomate(*Lycopersicon esculentum* Mill), en el Municipio de Venado, San Luis Potosí.

Realizado por
HUGO MORENO MONSIVAIS

TESIS
Que somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobado por:

MC. Abiel Sánchez Arizpe
Presidente del Jurado

MC. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Sinodal

MC. Maria Magdalena Rodríguez Valdez
Sinodal

Biol. Guillermina Reyna Sustaita
Sinodal

MC. Arnoldo Oyervides García
Coordinador de la División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre del 2005

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por brindarme tantas oportunidades durante mi estancia y formarme como un profesionalista.

Al **M.C. Abiel Sánchez Arizpe**, por apoyarme e impulsarme para que se pudiera realizar la presente investigación, así también por su confianza, amistad y sus valiosos consejos.

A la **M.C. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda**, por brindar su experiencia y disponibilidad para la orientación de este trabajo.

A la **Biol. Guillermina Reyna Sustaita**, por su paciencia y apoyo brindado durante la investigación, por haberme brindado apoyo, confianza y su amistad.

A la **MC. Maria Magdalena Rodríguez Valdez**, por su valiosa colaboración para la realización de este trabajo.

Al **M.C. Alfredo Sánchez López**, por su apoyo y su amistad. Así como por sus consejos, y las bases morales que me inculco.

Al **M.C. Gregorio Briones Sánchez**, por sus consejos, y apoyo durante mi estancia en la universidad.

A mis compañeros de generación por que cada uno de ellos es parte muchas experiencias de mi formación, especialmente a los que me apoyaron cuando necesité de un verdadero amigo.

A Gerardo Ontiveros y Enrique Martín por su amistad y la alegría que contagia a sus a todo mundo.

DEDICATORIA

A Dios nuestro Señor: Por haberme dado la vida, la dicha de seguir este camino y brindarme una esperanza en los momentos difíciles.

A mi padre: Por sus valiosos consejos y ejemplos, que han sido indispensables a lo largo de mi camino, por enseñarme lo mas bonito de la agricultura y por que cuando en los tiempos difíciles necesite de su apoyo siempre me dio su mano.

A mi madre: Por el calido ambiente que le brinda a la familia, por la orientación y cuidado de mi persona, por todas la alegrías que me ha brindado, por sus consejos y comprensión.

A mis hermanas y hermanos: Por todo el apoyo que me demuestran por medio de sus palabras y consejos, porque aparte de ser mis hermanos, son los mejores amigos que tengo por hacer que nuestra familia se grande muchas gracias a todos.

A mis cuñadas: por cuidar y acompañar a mis hermanos en esta vida.

A mis cuñados: por proteger a mis hermanas.

A mis sobrinitos: Por darle nueva vida a la familia y llenar de felicidad los hogares de mis hermanos.

Y en especial a mí amada compañera: por regalarme felicidad cada día, por su apoyo, comprensión, y sobre todo por mantener nuestra Lucecita siempre resplandeciente, por llenarme de gratitud muchas gracias.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE CUADROS	ix
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
HIPÓTESIS	4
LITERATURA CITADA	5
Cultivo del tomate.....	5
Situación cuarentenaria sobre el cultivo del tomate.....	6
Cáncer bacteriano, <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , Smith, del Tomate.....	7
Clasificación taxonómica.....	8
Etiología.....	8
Epifitiología.....	10
Síntomas.....	11
Pruebas de patogenicidad.....	14
Detección de cáncer bacteriano por medio de la PCR.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Etapa de campo.....	16
Incidencia de cáncer bacteriano en campo.....	16
Recolección de material.....	18
Etapa de laboratorio.....	19

Identificación de bacterias.....	19
Aislamiento de bacterias.....	20
Tinción de gram.....	20
Resiembra de colonias bacterianas.....	21
Prueba de la utilización de la glucosa.....	23
Preparación de Medio utilización de la glucosa.....	23
Prueba de hidrólisis de esculina.....	24
Prueba de hidrólisis de almidón.....	24
Preparación de medio para hidrólisis de almidón.....	24
Prueba de Patogenicidad.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
Pruebas bioquímicas.....	26
Pruebas de patogenicidad.....	29
Incidencia.....	30
CONCLUSIONES.....	33
RESUMEN.....	34
LITERATURA REVISADA.....	36
APÉNDICE.....	41

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clorosis intervenal y manchas ampulosas blancas, en etapa de daño inicial de <i>C.m.m.</i> en hojas.....	12
Figura. 2. Manchas cafés, en etapa avanzada de daño de <i>C.m.m.</i> en hojas.....	12
Figura. 3. Necrosis marginal y enrollamiento, daño de <i>C.m.m.</i> en hojas.....	12
Figura 4. Infección gradual en tomate con <i>C.m.m.</i> , desde inicial intermedio y daño total.....	13
Figura 5. Deformación en tallo, canceres oscuros, longitudinales y abiertos.....	13
Figura 6. Manchas de 3 a 6 mm de diámetro con el centro oscuro y halo amarillo en fruto de tomate maduro o blanquecino en inmaduro, en forma de ojo de pájaro.....	14
Figura 7. Descripción de la superficie considerada para el estudio y distribución de las variedades cultivadas; Toro y Yaqui.....	17
Figura 8. Detalle de muestreo, cada área integrada por 8 surcos.....	17
Figura 9. Material utilizado y observación de disección de tejido, con síntomas característicos de cáncer bacteriano.....	19
Figura 10. Manchas cafés, en etapa avanzada de daño de <i>C.m.m.</i> en hojas de plantas colectadas.....	42
Figura 11. Infección en tomate de <i>C.m.m.</i> , plantas raquílicas y semimerchitas en plantas colectadas.....	42
Figura 12. Deformación en tallo, canceres oscuros, longitudinales y abiertos en plantas colectadas.....	42

Figura 13. Manchas de 3 a 6 mm de diámetro con el centro oscuro y halo amarillo en fruto de tomate maduro o blanquecino en inmaduro, en forma de ojo de pájaro en frutos colectados.....	43
Figura 14. Morfología de colonias, amarillas, mucoides y convexas.....	43
Figura 15. Tinción de Gram positiva, Acomodo de las células en empalizada y formando Y y V.....	43
Figura 16. Reacción positiva de la Catalasa.....	44
Figura 17. Reacción oxidativa de la glucosa, tubo inferior, superior negativo.....	44
Figura 18. Hidrólisis de esculina, en los medios oscurecidos.....	44
Figura 19. Hidrólisis de almidón positiva en la parte superior e hidrólisis negativa en la parte inferior.....	45
Figura 20. Síntomas en planta inoculada con suspensión bacteriana concentrada.....	45

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Resultados de Medios diferenciales, Pruebas Bioquímicas, y Medios semiselectivos, correspondientes a las colonias sospechosas para <i>Clavibacter</i> . Detectados en follaje y frutos de tomate.....	26
Cuadro 2. Resultado positivo de las Pruebas Bioquímicas, Medios diferenciales y semiselectivos en la identificación de las Cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . Detectados en follaje de tomate..	27
Cuadro 3. Resultado positivo de las Pruebas Bioquímicas y Medios diferenciales en la identificación de las Cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . Detectados en reaislamiento en follaje de tomate.....	29
Cuadro 4. Medias correspondientes al los muestreos en el punto 1 de síntomas en tomate, del los dos muestreos.....	30
Cuadro 5. Medias correspondientes al los muestreos en el punto 2 de síntomas en tomate, del los dos muestreos.....	30
Cuadro 6. Medias correspondientes al los muestreos en el punto 3 de síntomas en tomate, del los dos muestreos.....	31
Cuadro 7. Medias correspondientes al los muestreos en el punto 4 de síntomas en tomate, del los dos muestreos.....	31
Cuadro 8. Incidencia de plantas enfermas de tomate de la variedad Toro en Venado SLP., UAAAN 2005.....	32
Cuadro 9. Incidencia de plantas enfermas de tomate de la variedad Yaqui en Venado SLP., UAAAN 2005.....	32

RESUMEN

En los últimos años la producción de tomate se ha visto limitada por diversos factores, tanto de tipo biótico como abióticos, debido a que el constante cambio climático altera los procesos fonológicos del cultivo, aunado a diferentes enfermedades que se han ido sumando al complejo de enfermedades del cultivo del tomate.

En San Luis Potosí, este cultivo se ve afectado por varios agentes patógenos, como el cáncer bacteriano o chancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Smith), que a tomado gran importancia debido que en el 2004 se reporto su presencia en zonas productoras del estado, en la región de Villa de Arista. Debido a que es una enfermedad nueva en la región, se debe considerar que la falta de conocimiento del agente causal puede propiciar malas decisiones de control, al confundir los síntomas de esta enfermedad con causados por otros agentes.

El diagnostico del cáncer bacteriano se ve limitado debido a la dificultad de su aislamiento para realizar pruebas biológicas y a que otros métodos de diagnostico como el de la prueba de ELISA y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), resultan en algunos casos poco accesibles para algunos productores.

Con la finalidad de reunir los suficientes argumentos para poder determinar si realmente se atribuye esta sintomatología al cáncer bacteriano (*C. m. subsp. michiganensis*) se realizó el presente trabajo en el rancho El Clérigo, Municipio de Venado, S.L.P y en el laboratorio de fitopatología del departamento de Parasitología ubicado dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

El diagnóstico se desarrolló utilizando las pruebas bioquímicas tradicionales disponibles, se tomaron 8 muestras en total, las cuales al ser separadas por follaje y fruto proporcionaron 16 para aislamiento de bacterias, en B de King. De las sembradas se separaron 11 sospechosas de las cuales solo una de la variedad Toro resultó correspondiente a todas las pruebas características de *C.m.m.*

Se realizaron también las pruebas de patogenicidad con la bacteria para reproducir síntomas y confirmar la identificación y patogenicidad de la misma presente en tomate. Las pruebas de patogenicidad resultaron positivas.

Mediante los análisis de porcentaje de incidencia se determinó hasta un 74.63% de incidencia en la variedad Toro y un 79.4% de incidencia en la variedad Yaqui. Que en general representan pérdidas muy elevadas para los productores.

INTRODUCCIÓN

El buen desarrollo de las plantas cultivadas es de particular interés para quienes están relacionados de manera directa con el crecimiento de las plantas, producción y el manejo de sus productos. Esto depende de la disponibilidad del agua, nutrientes, y de algunos factores del medio ambiente, así como del manejo que tengan contra el ataque de parásitos.

Los problemas fitopatológicos se han incrementado en los últimos años por diversos motivos, que básicamente se relacionan con un proceso de alteración del hábitat de muchos microorganismos, en el que es conveniente resaltar la intervención del humano.

El cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ocupa un lugar preponderante en relación al desarrollo económico y social de la horticultura en México, ya que es uno de los principales generadores de divisas para el país, reportándose en el año 2000 el volumen exportado a Estados Unidos de 689 900 toneladas, lo cual representó un valor total de 466.1 millones de dólares, según el Banco de Comercio Exterior; 2001, así mismo es una fuente importante de trabajo para los mexicanos.

Las regiones productoras de tomate con mayor superficie sembrada se localizan en los estados de Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Morelos, Michoacán, Nayarit, Sonora, Puebla, Jalisco, entre otros.

La producción se ha visto limitada por diversos factores, tanto de tipo biótico como abióticos, debido a que el constante cambio climático altera los procesos fonológicos del cultivo, aunado a diferentes enfermedades que se han ido sumando al complejo de enfermedades del cultivo del tomate.

En San Luis Potosí, este cultivo se ve afectado por varios agentes patógenos, como el cáncer bacteriano o chancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Smith), que a tomado gran importancia debido que en el 2004 se reporto su presencia en zonas productoras del estado, en la región de Villa de Arista. Además, debido a que es una enfermedad nueva para región, se debe considerar que la falta de conocimiento del agente causal puede propiciar malas decisiones de control, al confundir los síntomas de esta enfermedad con causados por otros agentes. Cabe mencionar que esta bacteria es de interés cuarentenario para el país, considerada en el grupo A₁ o bien que ya esta presente en el país pero bajo condiciones restringidas, en los estados de Chiapas y Sinaloa.

El diagnostico del cáncer bacteriano se ve limitado debido a la dificultad de su aislamiento para realizar pruebas biológicas y a que otros métodos de diagnostico como el de la prueba de ELISA y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), resultan en algunos casos poco accesibles para algunos productores.

En la región de Venado S.L.P. no se habían presentado lotes que manifestaran la sintomatología del cáncer bacteriano hasta el presente año, cuando fueron observados síntomas que correspondían a la presencia de este patógeno en los lotes de tomate establecidos en el rancho el Clérigo.

Con la finalidad de reunir los suficientes argumentos para poder determinar si realmente se atribuye esta sintomatología al cáncer bacteriano (*C. m. subsp. michiganensis*) se plantea el presente trabajo.

OBJETIVOS

Determinar la presencia de la bacteria *C. m. subsp. michiganensis* en el cultivo de tomate establecido en el rancho El Clérigo.

Determinar la incidencia de la bacteria *C. m. subsp. michiganensis* en el cultivo de tomate establecido en el rancho El Clérigo.

HIPÓTESIS

La bacteria *C. m. subsp. michiganensis* se encuentra presente el cultivo de tomate establecido en el rancho El Clérigo.

La bacteria *C. m. subsp. michiganensis* se manifiesta con una incidencia del 100% en el cultivo de tomate establecido en el rancho El Clérigo.

LITERATURA CITADA

Cultivo del tomate.

El tomate es la hortaliza más importante en numerosos países y su popularidad aumenta constantemente. En la actualidad este cultivo ha adquirido importancia económica en todo el mundo (Nuez *et al.*, 1999).

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas. Sus flores son radiales y con cinco estambres. El ovario, supero, bicarpelar, contiene numerosos primordios seminales, produciendo bayas polispermas. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor (Nuez *et al.*, 1999).

Según Hunziker (1979), la clasificación taxonómica es la siguiente:

Clase: Dicotyledoneas.

Orden: Solanales.

Familia: Solanaceae.

Subfamilia: Solanoideae.

Tribu: Solaneae.

Genero: *Lycopersicon*

Especie: *esculentum*

Situación cuarentenaria sobre el cultivo del tomate, *L. esculentum* Mill.

La fitopatología incide directa e indirectamente sobre la producción agraria. Podría admitirse que la disminución de las cosechas por las enfermedades es la inmediatez directa de las pérdidas. Las medidas de exclusión, erradicación, control, etc., compondrían los cambios para evitar mermas en los productos. No es por lo tanto extraño que en todo el mundo se hayan arbitrado normas legales para regular todos estos procedimientos. Medidas legales que trascienden los conocimientos de los especialistas hasta el ciudadano común (Nuez et al., 1999).

Los procedimientos cuarentenarios, en México, se aplican a cualquier organismo que represente un peligro para la nación, y no permiten la entrada y/o movilización de los mismos. Para prevenir la entrada o movilización, se requiere de inspecciones en puntos de ingreso; así como la identificación y diagnóstico de los de los agentes sujetos a cuarentenas.

En México, las bacterias de interés cuarentenario para el cultivo del tomate son: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* subsp. *tomato* y *Xanthomonas campestris* subsp. *vesicatoria* (López, 1996).

Cáncer bacteriano, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Smith, del Tomate.

Uno de los agentes nocivos que más daño puede producir en las plantaciones de tomate es *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Smith., causante del cáncer bacteriano del tomate.

El cáncer bacteriano es una enfermedad que causa severas pérdidas en todo el mundo (Strider, 1969). La ocurrencia de esta enfermedad es esporádica, pero puede ser devastadora. En todos los tipos de cultivares de tomate están propensos a serias pérdidas; algunas veces, la enfermedad es específicamente severa tanto en tomates de transplante o de siembra directa que han sido cortados o podados.

El principal hospedero es el tomate pero también ataca otras especies de *Lycopersicon* spp., el chile y *Solanum mammosum*, *S. douglassi*, *S. nigrum* y *Nicotiana glutinosa*. Otras plantas solanáceas son susceptibles a la inoculación artificial (Thyr et al., 1975). Stamova y Sotirova (1987) mencionan al trigo, la cebada, el centeno, la avena, los girasoles, las sandías y los pepinos como susceptibles a la inoculación artificial.

Según Goto (1992), la clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Procaryotae

División: Firmicutes

Clase: Thallobacteria

Familia: Microbacteriaceae

Género: *Clavibacter*

Especie: *michiganensis*

Subespecie: *michiganensis*

Etiología.

El cáncer bacteriano, *C. m.* subsp. *michiganensis*, Smith., es a veces muy destructivo en numerosas regiones productoras de tomate, causa marchitez, muerte de plántulas, y pústulas en la plantas mas grandes, causa una mancha muy definida en el fruto, conocida como ojo de pájaro (Colloch et al., 1972).

Jones et al., (1991), mencionan que *C. m.* subsp. *michiganensis*, fue observado por primera vez en Michigan, E. U. A. en 1909 por E. F. Smith; se cree que probablemente sea originario de ahí, posteriormente fue descrito en 1910 como agente causal del cáncer bacteriano del tomate (OEPP/EPPO, 2005).

C. m. subsp. michiganensis Smith, es una bacteria Gram positiva, las células pueden ser pleomórficas, pequeñas, en forma de cocos o de bastón, dependiendo de las condiciones de crecimiento, no forma esporas, es aeróbica, sin motilidad (EPPO, 1999 de acuerdo a Bradbury, 1986). El arreglo las células, generalmente se presenta en empalizadas en forma de V o Y (OEPP/EPPO, 2005). En NDA, a los tres días la pigmentación de sus colonias es de color amarillo o naranja pálido, puntiformes, mucoides, a los 4 días miden 1mm de diámetro, son ovaladas o redondas, semifluidas y levantadas, a los 7 días miden de 2-3mm de diámetro, son lisas enteras, convexas, semifluidas en aislamiento reciente (en subcultivo son mantecosas) y color amarillo pálido que se va oscureciendo, su crecimiento es relativamente lento. Los reportes de movilidad y encapsulación son variados, pero en general la bacteria es considerada negativa para estas características. Las colonias en agar nutritivo son característicamente amarillas y alcanza un diámetro de 2-3 mm en cinco días, lisas de márgenes enteros y de consistencia butirosa. Lelliott et al., (1987), mencionan que el aislamiento se puede realizar por medio de Glucosa Agar Nutritivo (NGA) o Levadura Peptona Glucosa Agar (YPGA). La apariencia de la colonia en medios selectivos varía, dependiendo del medio (Jones et al., 1991). La colonia crece bien a 28°C (\pm 2°C), (OEPP/EPPO, 2005). Hidroliza esculina, la utilización de la glucosa es oxidativa (aerobia estricta), Oxidasa positiva, Prueba de RYO positiva y catalasa positiva (MAPA/DGSPA, 1991).

Epifitiología.

La bacteria *C. m.* subsp. *michiganensis* Smith, en campo se desarrolla mejor a temperaturas de 25°–30°C y requiere periodos de alta evapotranspiración (OEPP/EPPO, 2005). Por su parte León et al., (1982), mencionan que la bacteria muestra un crecimiento óptimo a temperaturas de 28°C, condiciones bajo las cuales la planta de tomate se desarrolla durante el ciclo de cultivo. Se han reportado reducciones en la cosecha de hasta un 70% (Rat et al., 1991). La semilla es la principal fuente de inóculo del patógeno. El comercio de la semilla ha facilitado la distribución mundial de la enfermedad. Localmente, la transferencia del equipo contaminado puede permitir la transmisión de la enfermedad, a otros campos (OEPP/EPPO, 2005).

Smith et al., (1992), mencionan que antes de que se adoptaran medidas higiénicas y métodos de extracción de semilla, la enfermedad podía causar pérdidas de hasta el 70%, siendo esta la principal fuente de diseminación. Por su parte Messiaen, (1995), comenta que las semillas que se hallan altamente contaminadas desde un principio, pueden motivar el nacimiento de más de un 1% de las plantas enfermas, lo que puede originar ataques generalizados, debido a que una transmisión en semilla del 1% puede propiciar la infestación del 100% del cultivo.

Las bacterias sobreviven en o sobre las semillas y, en algunas áreas, en los restos de plantas depositados en el suelo. Las infecciones primarias pueden deberse a la propagación de esas bacterias desde las semillas hasta los cotiledones u hojas

pero la mayoría de ellas se deben a la penetración de dichas bacterias a través de heridas en raíces, tallos, hojas y frutos.

Las bacterias son llevadas hasta ellos a través de la manipulación de esos órganos, la cual tiene lugar durante el transporte, aunque también son diseminadas por el agua del suelo, por la lluvia acarreada por el viento y las prácticas agrícolas como el atado y la poda de las plantas del tomate en forma de vara. Una vez que se encuentra dentro de la planta, las bacterias llegan al sistema vascular se desplazan y propagan principalmente en, los vasos xilemáticos espirales, para después salir de ellos e invadir al floema, médula y corteza, donde forman las grandes que originan los cánceres (León et al., 1982).

Cuando el clima es húmedo, por los cánceres exudan masas mucilaginosas de bacterias hasta la superficie del tallo, desde donde se extienden hasta las hojas y frutos y producen infecciones secundarias (CNRDF-DGSV, 1999).

Síntomas.

El síntoma principal del cáncer bacteriano, *C. m. subsp. michiganensis* Smith (*C.m.m.*), es una marchitez sistémica de la planta. Las plántulas infectadas pueden morir rápidamente o mostrar los síntomas hasta que han sido transplantadas, en ocasiones los síntomas se pueden presentar hasta que llegan a su estado adulto, en la etapa de floración o producción.

Los primeros síntomas observables son el manchado o marchitamiento de los folíolos de las partes externas e inferior de la planta. El manchado de las hojas se produce cuando el clima es húmedo y aparece inicialmente en forma de manchas ampulosas blancas que se ponen cafés conforme maduran y pueden coalescer (Agrios, 1988 y Rodríguez et al., 1997) (Ver Fig. 1,-3)



Figura1. Clorosis intervenal y manchas ampulosas blancas, en etapa de daño inicial de *C.m.m.* en hojas.



Figura. 2. Manchas cafés, en etapa avanzada de daño de *C.m.m.* en hojas.



Figura. 3. Necrosis marginal y enrollamiento, daño de *C.m.m.* en hojas.

En etapas avanzadas, aparecen pequeñas pústulas blanquecinas en las venas y los folíolos de la hoja. Pueden exponer grietas amarillentas a partir cavidades rojizas, dando un síntoma del cáncer (OEPP/EPPO, 2005).

Agrios, (1988) y Rodríguez et al., (1997) mencionan que las hojas marchitas se enrollan hacia arriba y hacia adentro y más tarde se enardecen y marchitan, pero no se desprenden. Con frecuencia, la enfermedad sólo afecta a los folíolos de un lado de la hoja o de un costado de la planta.

La marchitez puede desarrollarse gradualmente de un foliolo a otro o puede generalizarse y destruir gran parte del follaje (Ver Fig. 4). Al mismo tiempo, sobre los tallos, vástagos y pedicelos de las hojas aparecen varias bandas de colores claros, a menudo a nivel del punto de unión de los pecíolos y tallos. Al principio de su desarrollo, el patógeno no causa ningún cambio en el tejido fino vascular. Más tarde se forman grietas en dichas bandas, las cuales forman cánceres (CNRDF-DGSV, 1999) (Ver Fig. 5).



Figura 4. Infección gradual en tomate con *C.m.m.*, desde inicial intermedio y daño total.

A veces se puede observar una decoloración rosa muy ligera del tejido vascular. El cáncer bacteriano entonces se confunde fácilmente con la marchitez causada por *Verticillium* o *Fusarium* (OEPP/EPPO, 2005) (Ver Fig. 5).

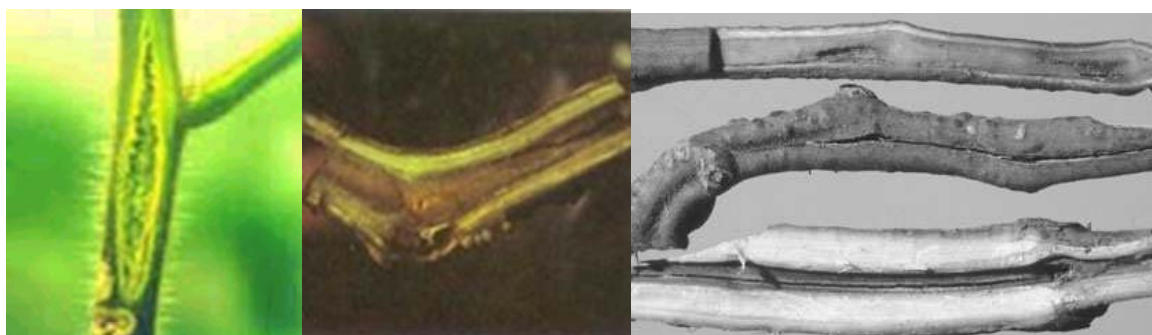


Figura 5. Deformación en tallo, cánceres oscuros, longitudinales y abiertos.

Los síntomas de la enfermedad en los frutos aparecen en forma de pequeñas manchas blancas, aguanosas y superficiales cuya parte central sobre sale más tarde, la cual adquiere un color canela y se vuelve rugosa, pueden no formarse y caer, o madurar irregularmente. El aspecto final de las manchas tiene la forma de ojo de pájaro, con un diámetro de 3-6 mm.; las cuales son características propias de la enfermedad, aunque no siempre ocurren estos síntomas en el fruto (Ver Fig. 6). También puede ocurrir una coloración amarilla en la cicatriz del cáliz (Messiaen, et al., 1968; Colloch, 1972; León et al., 1982; Agrios, 1988).



Figura 6. Manchas de 3 a 6 mm de diámetro con el centro oscuro y halo amarillo en fruto de tomate maduro o blanquecino en inmaduro, en forma de ojo de pájaro.

Pruebas de patogenicidad.

La patogenicidad es la característica más importante de las bacterias fitopatógenas, por lo que su verificación resulta imprescindible en la identificación bacteriana. Además, la comprobación de los postulados de Koch exige la inoculación artificial, en huéspedes sanos, la observación de los síntomas en las plantas inoculadas y el reaislamiento de la bacteria inoculada a partir de las plantas con síntomas (Llácer et al., 1996).

Detección de cáncer bacteriano, *C. m. subsp. michiganensis* Smith, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La dificultad que involucra el diagnóstico de la enfermedad, en especial la detección del patógeno en semillas, hace que se considere de gran interés, la búsqueda de nuevas técnicas que permitan elaborar métodos para su detección y diagnóstico, más sensibles y específicos que los actuales. En respuesta a esta necesidad, se han desarrollado protocolos, basados en la amplificación del ADN de la bacteria conocidos como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección sensible y específica de este género (CNRDF-DGSV, 1999).

Para la identificación de patógenos individuales, se han desarrollado varios ensayos de PCR, incluyendo un ensayo de Fluorogénico 5' nucleasa TaqMan, usando un sistema de detección en tiempo real (Schaad, et al., 2001; CNRDF-DGSV, 1999). Para el caso de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* la amplificación de ADN genera un producto de 614 pb. Utilizando los siguientes primers:

Nombre del primer	Secuencia
CMM-5	5'-GCGAA TAAGCCCA T A TCAA-3'
CMM-6	5'-CGTCAGGAGGTCGCT AA T A-3'

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizo en dos etapas una que comprendió las actividades efectuadas en predios de interés (etapa de campo) y la otra de las actividades que se les dio seguimiento en el laboratorio (etapa de laboratorio).

Etapa de campo

Este estudio se llevo acabo en dos predios ubicados en el rancho El Clérigo en el municipio de Venado, San Luis Potosí, ubicado en las coordenadas; 22° 56^{oo}, Latitud Norte; 101° 06^{oo}, Latitud Oeste; 1790 msnm (INEGI, 2000). Se comenzó realizando una visita de reconocimiento de campo, para posteriormente establecer los predios adecuados para la investigación.

Incidencia de cáncer bacteriano en campo.

Se realizaron muestreos el día 6 de agosto del 2005 y el día 8 de septiembre del 2005, esto debido a que el cultivo se encontraba en plena producción y para la última fecha el cultivo ya se encontraba en senescencia.

En una superficie de 8 ha (444 surcos de 100m de longitud), el predio fue dividido en 2 lotes, correspondientes a 2 variedades; lote 1 correspondiente a la variedad Toro y lote 2 a la variedad Yaqui (Ver Fig. 7). Se tomaron 4 puntos de muestreo por lote, cada punto fue de 8 surcos de los cuales se consideraron 10 plantas al azar por surco (Ver Fig. 8).

Para determinar presencia de los síntomas, se observaron tallos, hojas y frutos. Se notificaron las plantas que mostraron los síntomas que se asemejaban a los causados por el cáncer bacteriano (*C. michiganensis* sbsp. *michiganensis* Smith), tales como producción de raíces adventicias, tallos agrietados, manchas ampulosas blancas, clorosis intervaneal, márgenes de las hojas necrosados, y el síntoma llamado ojo de pájaro en frutos (Ver Figuras. 10,-14 del apéndice). Los datos obtenidos se anotaron en una libreta de campo, para ser analizados posteriormente.



Figura 7. Descripción de la superficie considerada para el estudio y distribución de las variedades cultivadas; Toro y Yaqui.

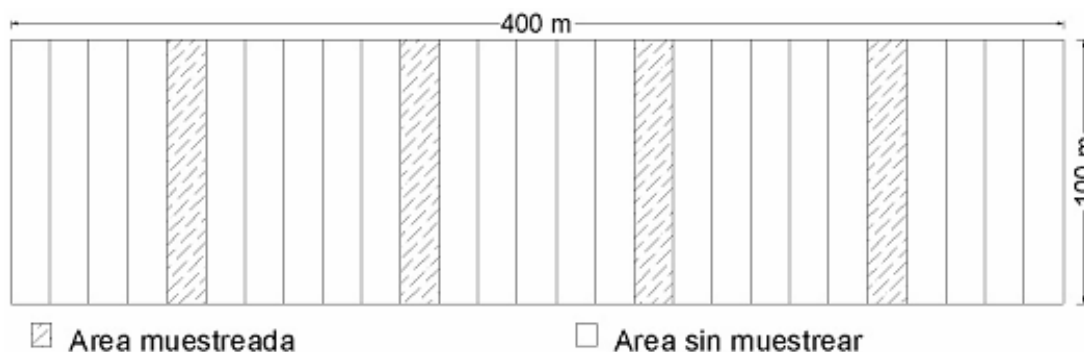


Figura 8. Detalle de muestreo, cada área integrada por 8 surcos.

Recolección de material.

Para la colecta de material, al igual que el anterior, se muestrearon los 8 surcos de los cuatro puntos, pero a diferencia del anterior en este caso los muestreos se hicieron en forma de zig-zag y se tomaron 10 muestras, aproximadamente cada 15 metros, de 5 plantas cada una, cabe mencionar que se tomaron tallos, hojas y frutos, las cuales se homogeneizaron para sacar una muestra representativa, por punto de muestreo. Se obtuvieron 4 muestras de cada lote las cuales fueron colocadas en bolsas por separado, debidamente etiquetadas y cerradas, para posteriormente ser llevadas al laboratorio.

El muestreo fue dirigido a las plantas que mostraron los síntomas característicos de cáncer bacteriano (*C. michiganensis* sbsp. *michiganensis* Smith), tales como producción de raíces adventicias que justifican la posible presencia de una enfermedad vascular, tallos agrietados, manchas ampulosas blancas, clorosis intervanal, los márgenes de las hojas necrosados, y el síntoma llamado ojo de pájaro en frutos (Ver Figuras. 10-14).

Etapa de laboratorio

El diagnóstico de las muestras se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Virología del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

De cada muestra se tomaron 2 tipos de tejido, las provenientes de tallo y hojas, y por separado los frutos,

Identificación de bacterias.

Se diseccionaron algunos trozos de tallo enfermo para observar las lesiones en los conductos vasculares, así como para localizar las partes útiles para el aislamiento (Figura 9).



Figura 9. Material utilizado y observación de disección de tejido, con síntomas característicos de cáncer bacteriano.

Aislamiento de bacterias

El material se tomo de la parte aérea de la planta, se separo por follaje y fruto, se seleccionó tejido sano y enfermo, el cual fue lavado con agua corriente y se corto en pequeños trocitos, que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y lavado con agua destilada estéril, estos fueron colocados en bolsas de maceración con 10ml de agua destilada estéril, se maceraron y posteriormente se usaron para la primera de tres diluciones (10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3}) (Ver Fig. 9); que inicialmente contenían 9ml de agua destilada estéril mas 1ml de solución bacteriana; las cuales consistieron en tomar 1ml de la bolsita de maceración y colocarlo en el tubo correspondiente a 10^{-1} , de ahí se realizo la segunda dilución, tomando 1ml para 10^{-2} y la tercera dilución 1ml para 10^{-3} . La dilución 10^{-3} se sembró colocando 0.1ml por dispersión en el medio diferencial KB, con medidas asépticas en la cámara de flujo laminar y fue incubada a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ por 3 días, a partir de los cuales se diferenciaron por sus características y se tomaron en cuenta las que presentaran las características morfológicas correspondientes a *C. michiganensis*; colonias convexas, enteras y de color amarillo pálido, y las de velocidad de crecimiento lento (Figura 14 del apéndice).

Tinción de Gram.

Se realizo un frotis, colocando una gota de agua en un porta objetos, se tomó una porción de colonia con un asa bacteriológica flameada y fue diluida en el porta objetos, se dejó secar, posteriormente se agregó cristal violeta por un minuto, se decantó con agua, se agregó lugol por un minuto, se decantó con agua, se agregó etanol para decantar, posteriormente se agregó safranina 1% por 30 segundos y se

dejo decantar, se lavó con agua corriente, y se dejo secar. Consecutivamente se colocó una gota de aceite de inmersión sobre el frotis y se observaron sus características al microscopio, en 100X, para determinar color de la tinción la colonia y la forma de acomodo y tipo de las células (Ver Fig. 15 del apéndice).

La prueba de RYU se realizó para corroborar el resultado de la tinción de Gram. Consistió en colocar una gota de hidróxido de Potasio (KOH) al 3% en un porta objetos, posteriormente colocar con un asa bacteriológica flameada la colonia en la gota, diluir, y observar si es mucoide levantando el asa de la gota, si se forma una tirita de mezcla se considera positiva, y por lo tanto la tinción deberían de haber dado negativa, aclarando que *Clavibacter* en gram positiva, por lo que se buscaron bacterias Ryo negativas.

Otra prueba realizada fue la de la oxidasa, para la cual se utilizo papel filtro, que fue colocado en una caja petri, posteriormente se le agrego una gota de reactivo de Kovacs; solución al 1% de dihidroclorhidrico tetrametil parafenilendiamino en agua destilada, y se froto inmediatamente una asa bacteriológica, cargada con cultivo joven.

Resiembra de colonias bacterianas.

La resiembra de colonias de bacterias se realizo con medidas asépticas, mediante el uso de un asa bacteriológica, debidamente flameada, por estría simple en KB y CNS; medio semiselectivo. Las cepas fueron incubadas a $\pm 28^{\circ}\text{C}$ por 3 días,

que fue cuando se realizaron las primeras pruebas; Tinción de gram, prueba de Ryo y oxidasa. Así mismo, las cepas fueron sembradas en glucosa, esculina, y almidon.

Preparación de Medio B. de King (Estéril a 1 atmósfera en autoclave/15min.).

Proteosa peptona	20.0gr.
K ₂ HPO ₄	1.5gr.
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5gr.
Agar	15.0gr.
Glicerol	15ml.
Agua destilada	1000ml.

Preparación de Medio CNS (Estéril a 1 atmósfera en autoclave/15min.).

Caldo nutritivo	8.0gr.
Extracto de levadura	2.0gr.
K ₂ HPO ₄	2.0gr.
KH ₂ PO ₄	0.5gr.
LiCL	10.0ml.
Agar	7.5gr.
Agua destilada	1000ml.

También la prueba de la Catalasa, que consistió en colocar una gota de agua oxigenada al 1%, y posteriormente agregar con una asa bacteriológica desinfectada una porción de la colonia bacteriana; se cultivo joven, con esta prueba se busco observar si la colonia causaba reacción o efervescencia al ser diluida en la solución (Figura 16).

Prueba de la utilización de la glucosa.

A través de esta prueba se buscaba determinar si la bacteria era aerobia o anaerobia se utilizaron 2 repeticiones; una con aceite mineral para determinar si fermenta y otra sin el aceite para determinar si oxida, y 2 testigo, uno para cada caso. El medio fue colocado en tubitos de ensaye. Esta prueba se realizo para observar si la bacteria oxida; en medio sin aceite y que no fermente; en medio con aceite (Ver Fig. 17 del apéndice).

Preparación de Medio utilización de la glucosa (Estéril a 1 atmósfera en autoclave/15min.).

Peptona	2.0gr.
NaCl	5.0gr
K ₂ HPO ₄	0.3gr.
Agar	3.0gr.
Azul de bromotimol	0.03gr.
Glucosa (1%)	10.0gr.
Agua destilada	1000ml.

Se ajusto pH a 7.1, con ácido acético; para bajar, y Hidróxido de potasio; para subir, antes de agregar Glucosa. La glucosa 1%, se esterilizo por filtro mulpare, por separado de los otros componentes.

Prueba de hidrólisis de esculina.

Esta prueba se realizo para observar si la bacteria es capaz de hidrolizar la esculina, la cual si el medio se torna oscuro se considera positiva, que es la característica buscada (Ver Fig. 18 del apéndice).

Prueba de hidrólisis de almidón.

Esta prueba se realizo para observar si la bacteria es capaz de hidrolizar la almidón, en este medio la característica es observar un halo transparente alrededor de la colonia. De este modo se considera positiva (Ver figura 19 del apéndice).

Preparación de medio para hidrólisis de almidón (Estéril a 1 atmósfera en autoclave/15 min.).

Agar nutritivo	10.0gr.
Almidón soluble	50.0gr.
Agua destilada	1000ml.

Se debe disolver el almidón en el agua y agregarlo al agar nutritivo, esterilizar y vaciar a cajas. La bacteria se debe sembrar por puntos e incubar 2 días, agregar lugol y observar.

Hidrólisis= Halo transparente alrededor de la colonia es +.

Hidrólisis= Sin halo alrededor de la colonia es –.

Prueba de Patogenicidad.

Una vez que se aislaron y se tuvieron puras las colonias de bacterias se realizaron pruebas de patogenicidad en plántula de tomate. Las inoculaciones se realizaron por medio de la punción en los tallos entre el tejido leñoso y la dermis. La inoculación se realizó con una solución de cultivo bacteriano joven (48hr de antigüedad). Utilizando una suspensión bacteriana concentrada. Para el estudio se seleccionó una planta sana, la cual fue transplantada en Peat Moos esterilizado y con humedad suficiente para su desarrollo normal. Se observó periódicamente hasta que presentó los primeros síntomas similares a los causados por *C.m.m.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados aquí expresados se discutirán de la forma siguiente, primeramente los resultados de las Pruebas Bioquímicas correspondientes a las colonias sospechosas para *Clavibacter*. Detectados en follaje y frutos de tomate (Cuadros 1, 2), a continuación los resultados de las pruebas de patogenicidad (Cuadro 3) y por ultimo el porcentaje de incidencia de cáncer bacteriano en Venado S.L.P (Cuadros 4,-9).

Pruebas bioquímicas.

Cuadro 1. Resultados de Medios diferenciales, Pruebas Bioquímicas, y Medios semiselectivos, correspondientes a las colonias sospechosas para *Clavibacter*. Detectados en follaje y frutos de tomate.

M	KB	TG	O	RYU	CNS	O/F	Observaciones	Alm	Esc	R.
Fa1	+	+	-	-	+	+/+	Naranja	-	+	-
Fa2	+	+	-	-	-	+/-	Amarillo	-	+	+
Fa3	+	+	+	-	+	-/-	Rapido crecimiento	X	+	-
fa4	-	+	-	+	+	-/-	Rapido crecimiento	X	+	-
fa5	+	+	+	-	+	-/-	Amarillo canario	+	+	-
Fb6	+	+	+	-	-	+/-	Resembrada	X	+	-
Fb7	+	+	-	-	+	+/-	Amarilla	-	-	-
Fb8	+	+	+	-	+	+/-	Amarillo	X	X	-
fb9	+	+	+	-	+	-/-	Lento desarrollo	X	X	-
fb10	-	+	-	+	+	-/-	Rapido crecimiento	X	X	-
fb11	-	+	-	+	+	-/-	Rapido crecimiento	X	X	-

Abreviaturas:

M= Muestra.

Fa= Follaje del Toro.

fa= Frutos de Toro.

Fb= Follaje de Yaqui.

fb= Frutos de Yaqui.

TG= Tinción de Gram.

O/F= Oxidación/Fermentación.

O= Oxidasa.

Alm= Almidon.

Esc= Esculin.

X= No realizadas.

+/-= Positivo/negativo

Cuadro 2. Resultado positivo de las Pruebas Bioquímicas, Medios diferenciales y semiselectivos en la identificación de las Cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Detectados en follaje de tomate de la variedad Toro.

Prueba	Ración	Resultado
Crecimiento en B de king	+	+
Crecimiento en CNS	+	+
Crecimiento a 28°C	+	+
Colonias amarillas, mucoides y convexas.	+	+
Tinción de Gram	+	+
Prueba de RYU	-	+
Oxidasa	-	+
Catalasa	+	+
Utilización de la glucosa. O/F	+/-	+
Hidrólisis de esculina	+	+
Hidrólisis de almidón	-	+

Rodríguez, 1994, señala que la colonias del genero *Clavibacter*, son pequeñas, de crecimiento lento, mucoides, convexas de color amarillo y variantes como; naranja, rosas y rojas, dependiendo de el medio.

Entre las técnicas de tinción diferencial más importantes y utilizadas figura la Tinción de Gram que refleja diferencias biofísicas y bioquímicas en las paredes celulares bacterianas y permite su división en dos grupos; las que se decoloran totalmente por acción del alcohol (Gram negativo) y las que conservan su coloración (Gram positivo), para el caso de *Clavibacter* el resultado debe de ser positivo. Hay casos inciertos, especialmente en bacterias corineformes, en ellos se recomienda utilizar el test de solubilidad en KOH, el cual resultara negativo (Noval, 1991).

King, et al., 1954, mencionan que el medio B de King (KB), puede emplearse como medio rutinario de aislamiento y multiplicación, con la mayor parte de los patógenos. Para este análisis resultó ser muy favorable para el desarrollo de colonias bacterianas. Por su parte Llácer, G. 1996 y Schaad, et al., 2001, mencionan al medio CNS, como de crecimiento rápido, para el género *Clavibacter*, sin embargo en este estudio se utilizó con mayor frecuencia el KB debido a que mostró mejor respuesta de crecimiento de bacterias.

Vidaver y Star, 1982, comentan que cuando las colonias crecen entre 21 y 26°C, temperaturas óptimas para estos patógenos, son aerobios estrictos con un metabolismo oxidativo de utilización de la glucosa. Son catalasa positiva y oxidasa negativa. Sin embargo OEPP/EPPO, 2005, describe que la colonia crece bien a 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

Noval, 1991, reporta que como característica de este género de bacterias esta la metabolización oxidativa de la glucosa e Hidrólisis de almidón. Así mismo Rodríguez, 1994 y Schaad, et al., 2001, señalan la hidrólisis de esculina como positiva para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Pruebas de patogenicidad.

Los síntomas se manifestaron a los siete días de haberse inoculado la planta con la solución bacteriana. La planta mostró algunos síntomas similares a los causados por *C.m.m.*, cabe mencionar que a partir de que estos se manifestaron se realizó el reaislamiento, siguiendo los mismos criterios que para el primer aislamiento, en el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas realizadas. Los síntomas observados fueron, producción de raicillas en la parte aérea de la planta, tumores en los tallos, Clorosis intervenal, enrollamiento de hojas (Ver Fig. 20, del apéndice) y lesiones en los conductos vasculares.

Cuadro 3. Resultado positivo de las Pruebas Bioquímicas y Medios diferenciales en la identificación de las Cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Detectados en reaislamiento en follaje de tomate.

Prueba	Ración	Resultado
Crecimiento en B de king	+	+
Crecimiento a 28°C	+	+
Colonias amarillas, mucoides y convexas.	+	+
Tinción de Gram	+	+
Prueba de Ryo	-	+
Oxidasa	-	+
Catalasa	+	+
Hidrólisis de almidón	-	+

Los resultados vertidos en el cuadro 3 que atienden al las características típicas de *C.m.m.* denotan como positivas las pruebas de reaislamiento y resiembra para concluir, con los postulados de Koch, este estudio.

Incidencia de la enfermedad.

Resultados cuantitativos de los datos de incidencia, correspondientes a los muestreo realizado en las 2 fechas, que presentaron síntomas, en follaje y frutos de tomate, similares a los causados por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Cuadro 4. Medias correspondientes al incidencia de la enfermedad en base a los muestreos realizados en el punto 1 de síntomas en plantas de tomate de la variedad Toro.

Toro M1	No. de plantas		Yaqui M1	No. de plantas	
	1 ^{er} muestreo	2 ^o muestreo		1 ^{er} muestreo	2 ^o muestreo
S ₁	5	7	S1	8	9
S ₂	8	9	S2	7	8
S ₃	7	8	S3	5	7
S ₄	5	6	S4	7	9
S ₅	6	8	S5	6	8
S ₆	8	8	S6	6	7
S ₇	7	7	S7	8	8
S ₈	6	8	S8	5	9
\bar{X}	6.5	7.6	\bar{X}	6.5	8.13
%	65.0	76.0	%	65.0	81.3

S= Surco

\bar{X} = Media

Cuadro 5. Medias correspondientes al incidencia de la enfermedad en base a los muestreos realizados en el punto 2 de síntomas en plantas de tomate de la variedad Toro.

Toro M 2	No. de plantas		Yaqui M2	No. de plantas	
	1er muestreo	2o muestreo		1er muestreo	2o muestreo
S ₁	6	8	S ₁	8	8
S ₂	5	6	S ₂	7	8
S ₃	7	7	S ₃	9	9
S ₄	5	7	S ₄	6	7
S ₅	7	8	S ₅	7	7
S ₆	6	9	S ₆	5	6
S ₇	5	6	S ₇	8	9
S ₈	7	8	S ₈	7	9
\bar{X}	6.00	7.37	\bar{X}	7.3	7.88
%	60.0	73.7	%	73.0	78.8

Cuadro 6. Medias correspondientes al incidencia de la enfermedad en base a los muestreos realizados en el punto 3 de síntomas en plantas de tomate de la variedad Toro.

Toro M 3	No de plantas		Yaqui M4	No de plantas	
	1er muestreo	2o muestreo		1er muestreo	2o muestreo
S ₁	5	6	S ₁	6	8
S ₂	6	7	S ₂	8	8
S ₃	8	8	S ₃	6	7
S ₄	7	8	S ₄	7	7
S ₅	6	7	S ₅	8	9
S ₆	7	9	S ₆	8	8
S ₇	6	8	S ₇	5	6
S ₈	8	9	S ₈	7	9
\bar{X}	6.63	7.75	\bar{X}	6.88	7.75
%	66.3	77.5	%	68.8	77.5

Cuadro 7. Medias correspondientes al incidencia de la enfermedad en base a los muestreos realizados en el punto 4 de síntomas en plantas de tomate de la variedad Toro.

Toro M4	No de plantas		Yaqui M4	No de plantas	
	1er muestreo	2o muestreo		1er muestreo	2o muestreo
S ₁	7	8	S ₁	8	9
S ₂	5	7	S ₂	5	7
S ₃	6	7	S ₃	6	7
S ₄	8	9	S ₄	8	8
S ₅	5	6	S ₅	7	8
S ₆	6	7	S ₆	8	9
S ₇	7	8	S ₇	7	8
S ₈	5	5	S ₈	6	8
\bar{X}	6.13	7.13	\bar{X}	6.88	8.00
%	61.3	71.3	%	68.8	80.0

Cuadro 8. Incidencia de plantas enfermas de tomate de la variedad Toro en venado SLP., UAAAN 2005.

Toro	Incidencia		Avance de la enfermedad %
	1er muestreo	2o muestreo	
Punto ₁	65.0	76.0	11.00
Punto ₂	60.0	73.7	13.70
Punto ₃	66.3	77.5	11.20
Punto ₄	61.3	71.3	10.00
% Total	63.15	74.63	11.48

En el cuadro 8 se puede observar un 63.15% de incidencia en el primer muestreo, el cual para el segundo muestreo aumento en un 11.48%.

Cuadro 9. Incidencia de plantas enfermas de tomate de la variedad Yaqui en venado SLP., UAAAN 2005.

Yaqui	Incidencia		Avance de la enfermedad
	1er muestreo	2o muestreo	
Punto ₁	65	81.3	16.30
Punto ₂	73	78.8	5.80
Punto ₃	68.88	77.5	8.62
Punto ₄	68.88	80	11.12
% Total	68.94	79.4	10.46

En el cuadro 9 se puede observar un 68.15% de incidencia en el primer muestreo, el cual para el segundo muestreo aumento en un 10.46%.

Al realizar una comparación entre las dos variedades, se puede apreciar que la variedad Yaqui mostró mayor incidencia que la Toro, con una diferencia de 5.79% en el primer muestreo y 4.77 en el segundo muestreo. Es importante considerar que el avance de la enfermedad manifestó el 1% de variación, en la variedad toro. Basado en estos resultados se puede mencionar que la variedad Yaqui fue ligeramente más susceptible que la variedad Toro.

CONCLUSIONES

Bajo las metodologías, condiciones experimentales en que se llevó a cabo el presente trabajo y de acuerdo a los resultados obtenidos, se presentan las siguientes conclusiones:

Se determino la presencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Smith, en el cultivo de tomate establecido en el rancho del Clérigo.

Se determino que la incidencia de cáncer bacteriano fue muy alta en el cultivo de tomate de Venado, S.L.P.

LITERATURA REVISADA

Agrios, N. G. 1988. Plant Patology. 3a Edition. Academic Press, Inc.

San Diego, U.S.A. 803 p.

Aguilar, R. J. 1999. Memorias. Centro Nacional de Referencias Fitosanitarias (CNRDF). Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). México.

Banco de Comercio Exterior. 2001. Clasificación de las exportaciones de tomate a estados unidos. Secretaria de Economía, México.

Bradbury, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International, Wallingford, UK.

Colloch, H.M., H.T. Cook and W.R. Wright. 1972. Market diseases of tomatoes, peppers and eggplants. U.S. Department of Agriculture. Washington, D.C. 102 p.

CNRDF-DGSV, 1999. Memorias. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Centro Nacional de Referencias Fitosanitarias, Dirección General de Sanidad Vegetal. México.

- EPPO, 1999. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Data Sheets on Quarantine Pests. Prepared by the EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) for the EU.
- Goto, M. 1992. Fundamentals of bacterial Plant Pathology. Academic Press, Inc. San Diego, California, U.S.A.
- Hunziker, A.T. 1979. South American *Solanaceae*: a synoptic survey. In: "Hawkes, J. G.; Lester, R. N.; Skelding, A.D. (Eds.). The biology and Taxonomy of the *Solanaceae*. Academic Press, New York & London": 4985.
- INEGI, 2000. Superficie del país por Entidad y Municipio, Carta Topográfica, 1: 50000.
- Jones, J. B.; Stall, R. E. & Zitter, T. A. 1991. Compendium of tomato diseases. The American Phytopathological Society. E.U. p 1.
- King, E. O.; Ward, M. K. & Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lav. Clin. Med.* 44; 301-307.
- Lelliott, R.A. & D.E. Stead (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- León G., Y M. Arosamena D. 1982. El cultivo del tomate para consumo fresco en el valle de Culiacán. INIA-SARH. 183 p.

López, N. J. E. 1996. Bacterias de importancia cuarentenaria con su rango de hospederos y su principal área de inspección. Métodos de diagnóstico de bacterias de importancia cuarentenaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Comisión Nacional de Sanidad Vegetal Agropecuaria “Dirección General de Sanidad Vegetal”. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Capítulo V.

Llácer, G.; López, M. M.; Trapero, A.; Bello, A. 1996. Patología vegetal. Sociedad Española de Fitopatología. Graficas Papallona. España. 592, 595 p.

MAPA/DGSPA, 1991. Manual de laboratorio. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Dirección General de la Producción Agraria. Mundi-Prensa. Madrid, España.

Messiaen, C.M., y R. Lafon. 1968. Enfermedades de las hortalizas. Editorial Oikos tau. Barcelona, España. 361 p.

Nuez, F.; Rodríguez del Rincón, A.; Tello, J.; Cuartero, J.; Segura, B. 1999. El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa. España.

Noval, C. 1991. Parte II, Las Bacterias. Manual de laboratorio; Diagnóstico de hongos, Bacterias, y Nematodos Fitopatógenos. Ministerio de Agricultura, Pesca, y Alimentación. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Madrid, España.

OEPP/EPPO. 2005. No. 39, Diagnostic protocol for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. - Data Sheets on Quarantine Pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 275-283.

Rat, B.; Poissonnier, J.; Goisque, M.J.; Burgaud, A. (1991) Le point sur le chancre bactérien. Fruit et Légumes 86, 38-40.

Rodríguez, M. M. L. 1994. Manual de identificación de bacterias Fitopatógenas. UACH. México.

Rodríguez, R. R.; Tabares, R. J. M.; Medina, J. J. A. 1997. Cultivo Moderno del Tomate. 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 167 p.

Schaad, N. W.; Jones, J. B.; Chun, W. 2001. Laboratory Guide Identification of Plant Pathogenic Bacteria.

Smith, I. M., Dunez, J., Lelliott, R.A., Phillips, D. H., Archer, S. A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Mundi-Prensa. Madrid, España.

Stamova, L.; Sotirova, V. (1987) Reaction of different crops to artificial inoculation with *Corynebacterium michiganense*. Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 23, 211-216.

Strider, D.L. (1969) Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*: a literature review and bibliography. Technical Bulletin North Carolina Agricultural Experiment Station, No. 193.

Thyr, B.D.; Samuel, M.J.; Brown, P.G. (1975) New solanaceous host records for *Corynebacterium michiganense*. Plant Disease Reporter 59, 595-598.

Vidaver, A. K., and Starr, M. P. 1982. Phytopathogenic coryneforme and related Bacteria. In: The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, ed. M. P. Starr, H. G, Stolp, H. G. Truper, A. Balows, H. G. Shlegel, *: 1989- 1987.

APENDICE



Figura 10. Manchas cafés, en etapa avanzada de daño de *C.m.m* en hojas de plantas colectadas.



Figura 11. Infección en tomate de *C.m.m.*, plantas raquíticas y semimerchitas en plantas colectadas.



Figura 12. Deformación en tallo, canceres oscuros, longitudinales y abiertos en plantas colectadas.



Figura 13. Manchas de 3 a 6 mm de diámetro con el centro oscuro y halo amarillo en fruto de tomate maduro o blanquecino en inmaduro, en forma de ojo de pájaro en frutos colectados.



Figura 14. Morfología de colonias, amarillas, mucoides y convexas.

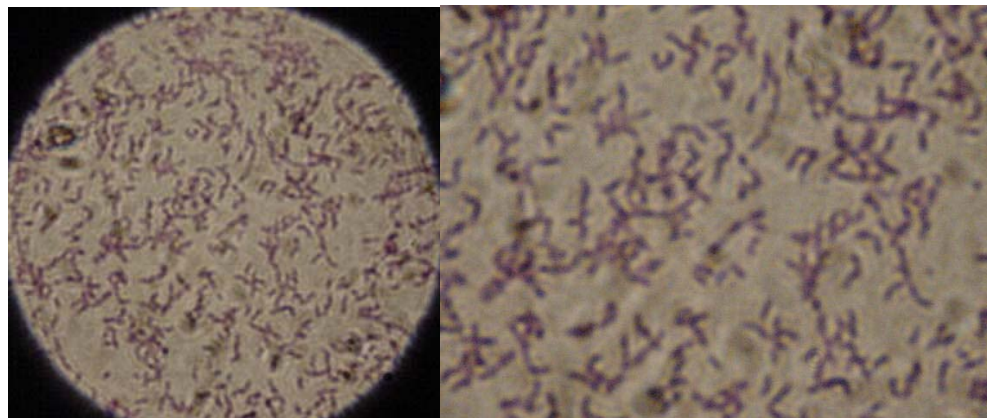


Figura 15. Tinción de Gram positiva, Acomodo de las células en empalizada y formando Y y V.



Figura 16. Reacción positiva de la Catalasa.



Figura 17. Reacción oxidativa de la glucosa, tubo inferior, superior negativo.



Figura 18. Hidrólisis de esculina, en los medios oscurecidos.

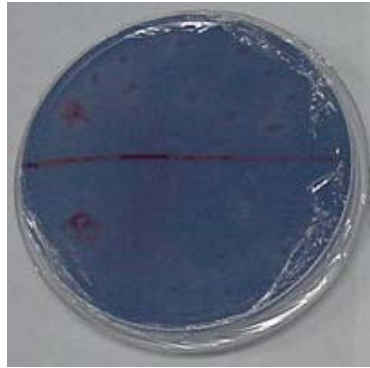


Figura 19. Hidrólisis de almidón positiva en la parte superior e hidrólisis negativa en la parte inferior.



Figura 20. Síntomas en planta inoculada con suspensión bacteriana concentrada.