

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Manejo del Patosistema Tomate (*Solanum lycopersicum* L) en Cáncer Bacteriano  
(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) con *Bacillus subtilis*

**MARIANO HERNÁNDEZ PÉREZ**

TESIS:

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Febrero del 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Manejo del Pato sistema Tomate (*Solanum lycopersicum* L) en Cáncer Bacteriano  
(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) con *Bacillus subtilis*

Por:

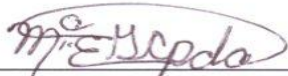
**MARIANO HERNÁNDEZ PÉREZ**

Tesis:

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada



Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda

Asesor Principal

  
Dr. Melchor Cepeda Siller

Coasesor

  
M.C. Marcela Hernández Suárez

Coasesor

  
Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación  
División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México

Febrero del 2013

## DEDICATORIA

*A Dios:*

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

*A mis padres:*

El presente proyecto de tesis está dedicado a mis padres *Abelardo Hernández Pérez* y *Eloina Pérez Pérez*, quienes me dieron la vida, la oportunidad de hacer mi sueño realidad; hoy puedo dar gracias que su esfuerzo y sacrificio empiezan a reflejarse en mi vida.

*A mis hermanos:*

*Abelardo Hernández Pérez* y *Felipe de Jesús Hernández Pérez*, agradezco a ustedes, por todo el apoyo que me ofrecieron y la confianza que en mi depositaran para terminar los estudios, gracias por todo hermanos.

*A mi novia:*

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

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al **Departamento de Parasitología**, por haberme permitido realizar mi trabajo de tesis.

Especial agradecimiento a la **Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda**, por su dirección y apoyo, sin los cuales no hubiera sido posible la realización del presente trabajo, gracias por todo.

Al TLQ. **María Cristina Sánchez Flores**, por su ayuda y ser guía en la realización del proyecto de tesis.

A TLQ. **Silvia Ovalle Nava**, por su ayuda a lo largo del proyecto.

### **Les doy las gracias:**

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

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
<b>DEDICATORIA</b> .....	III
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	V
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	VIII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	IX
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	3
<b>OBJETIVO</b> .....	3
<b>HIPÓTESIS</b> .....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
Cultivo del Tomate.....	4
Requerimientos edafoclimáticos.....	5
Situación cuarentenaria del cultivo de ( <i>Solanum lycopersicum</i> L).....	6
Cáncer bacteriano, ( <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ).....	7
Etiología.....	7
Epifitología.....	8
Síntomas.....	10
Pruebas patogenicidad.....	12

	Pág.
Detección del cáncer bacteriano, <i>C. m. subsp. michiganensis</i> Smith, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	12
<i>Bacillus</i> spp.....	13
El Género <i>Bacillus</i> .....	13
Especie <i>subtilis</i> .....	14
<i>Bacillus</i> en el control biológico de enfermedades bacterianas.....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
Localización.....	18
Material vegetal utilizado.....	18
Obtención de la inóculo.....	18
Etapas de laboratorio.....	18
Aislamiento de la bacteria.....	19
Pruebas de caracterización de acuerdo al protocolo de Schaad <i>et al</i> (2001), realizaron las siguientes pruebas.....	19
Tinción de Gram.....	19
Prueba RYO.....	19
Prueba de Oxidasa.....	20
Prueba de Catalasa.....	20
Prueba de Hugg-Liefeson.....	20
Purificación de colonias bacterianas.....	21

	Pág.
Prueba de la hidrólisis de esculina.....	21
Prueba de hidrólisis de almidón.....	22
Prueba de Patogenicidad.....	22
Diseño experimental.....	23
Descripción del tratamiento.....	23
Preparación del inóculo.....	24
Inoculación.....	26
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
Caracterización de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	27
Caracterización de <i>Bacillus subtilis</i> .....	29
Supervivencia del inóculo.....	30
Prueba de patogenicidad.....	31
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>42</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Productos a base de <i>Bacillus subtilis</i> , cultivo donde se aplica, enfermedad que controla y época de de aplicación (SAG, 2004).....	17
<b>Cuadro 2.</b> <i>Bacillus subtilis</i> vs <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) y sus diferentes concentraciones para cada tratamiento y parte de la planta donde fue inoculado.....	23
<b>Cuadro 3.</b> Pruebas Bioquímicas, Medios diferenciales y semiselectivos en la caracterización de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . Detectados en follaje de tomate de la variedad Tequila.....	27
<b>Cuadro 4.</b> Características y pruebas Bioquímicas para la identificación de <i>B. subtilis</i> .....	29
<b>Cuadro 5.</b> Pruebas Bioquímicas en la caracterización de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . Detectado en el reislamiento en follaje de tomate.....	32
<b>Cuadro 6.</b> Comparación de medias de las diferentes partes del cultivo del tomate.....	33



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1. A)</b> Necrosis de la hoja comúnmente llamada “fuego” <b>B)</b> Pedúnculo y Cáliz lesiones necróticas.....	11
<b>Figura 2. A)</b> Tallo mostrando Síntomas clásico de cáncer bacteriano <b>B)</b> Comparación de tallos sanos (arriba) y enfermo (abajo) que muestra decoloración oscura y cavidades en el área medular (xilema).....	11
<b>Figura 3.</b> Cancro bacteriano conocido como “ojo de pájaro.”.....	11
<b>Figura 4.</b> Cuadrilla de la hematocimetro (Cámara de Neubauer) para el conteo de bacteria.....	25
<b>Figura 5.</b> Inoculación de bacterias en tomates.....	30
<b>Figura 6.</b> Tratamiento 2 ( <i>B. subtilis</i> ), se observa los frutos sanos, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.....	31
<b>Figura 7.</b> Tratamiento 5 que muestra los síntomas de <i>Cmm</i> en los frutos, también conocido como “ojo de pájaro”, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.....	31
<b>Figura 8.</b> Tratamientos de acuerdo al número de hojas a la comparación de medias.....	34
<b>Figura 9.</b> Tratamientos de acuerdo al número de flores en la comparación de medias.....	35

	Pág.
<b>Figura10.</b> Muestra estadísticamente en el número de frutos en la comparación de medias.....	36
<b>Figura 11.</b> Tratamientos en longitud de la hoja en la comparación de medias.....	36
<b>Figura 12.</b> Tratamientos en el diámetro de tallo en la comparación de medias.....	37
<b>Figura 13.</b> Tratamientos en la altura de plantas en la comparación de medias.....	37
<b>Figura 14.</b> Tratamientos de peso de fruto en la comparación de medias. ....	38

## INTRODUCCIÓN

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

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 hombre.

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza mas importante en numerosos países y su popularidad aumenta constantemente. En la actualidad este cultivo ha adquirido importancia económica en todo el mundo incluyendo al país mexicano, ya que es uno de los principales generadores de divisas para el país (Hortalizas, 2010).

La superficie total sembrada de tomates en México ha mostrado una tendencia a decrecer año con año, desde 85,000 hectáreas en 1990 a 75,000 en el 2000, y unas 58,300 en 2010. A pesar de ello, los rendimientos promedios de producción se han incrementado debido a los avances tecnológicos y al uso de agricultura protegida, pasando de 23 t/ha en 1900 a 39 t/ha en 2010. Se estimo una producción de 2.2 millones de toneladas para la temporada 2010/11, asumiendo condiciones meteorológicas favorables y buenos precios internacionales (Hortalizas, 2010).

La superficie dedicada a la producción de tomate ha ido decreciendo gradualmente debido a problemas de plagas, altos costos de producción, fluctuaciones en precios internacionales, cambio de divisa desfavorable y disponibilidad de recursos hídricos limitada. Pequeños productores en busca de mejores precios han comenzado a producir maíz y frijoles. Sin embargo, también se ha producido un cambio gradual de producción a campo abierto a producción protegida de diversa tecnología.

Las operaciones protegidas se concentran principalmente en los estados de Sinaloa, Baja California y Jalisco, aunque también han proliferado operaciones en Colima, México, Hidalgo, Michoacán, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, y Zacatecas (Hortalizas, 2010).

La producción se ha visto limitada por diversos factores, tanto de tipo biótico como abiótico, debido al constante cambio climático que altera los procesos fenológicos del cultivo, aunado a diferentes enfermedades que se han ido sumando al complejo de enfermedades en el cultivo del tomate (López, 1996).

Este cultivo se ve afectado por varios agentes patógenos, virus, hongos, bacterias, como el cáncer bacteriano o cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Smith), puede dispersarse a través de suelo contaminado arrastrado por el viento, que es una de las principales enfermedades en este cultivo. Esta bacteria es de interés cuarentenario para el país, considerada en el grupo  $A_1$  o bien que ya está presente en el país pero bajo condiciones restringidas, en los estados de Chiapas y Sinaloa (López, 1996).

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

## JUSTIFICACIÓN

Debido a que el cultivo del tomate es uno de los principales generadores de divisas para el país, es importante reducir el uso de plaguicidas para no contaminar el medio ambiente utilizando como un agente de control a *Bacillus subtilis* para el control de *C. m. subsp. michiganensis*.

## OBJETIVO

Controlar la presencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el cultivo del tomate con *Bacillus subtilis*.

## HIPÓTESIS

*Bacillus subtilis* presentara un efecto antagónico en *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

## REVISION DE LITERATURA

### Cultivo del Tomate

El tomate es la más importante en numerosos países y su popularidad aumenta constantemente. En la actualidad este cultivo ha adquirido importancia económica en todo el mundo (Hortalizas, 2010).

*Solanum lycopersicum* es una planta cuyo origen se localiza en Sudamérica y más concretamente en la región andina, aunque posteriormente fue llevado por los distintos pobladores en un extremo a otro, extendiéndose por los continente (Anderlini, 1976).

Los tomates silvestres se agrupaban hasta hace poco tiempo en el género *Lycopersicum*. Actualmente, incluidas en el género *Solanum*, se siguen descubriendo y clasificando nuevas especies de tomate, como por ejemplo *Solanum arcanum* y *S. huaylasense* en el 2005 (Peralta *et al.*, 2005). Todavía en la actualidad se encuentra silvestre en algunas de esa zona, y precisamente de las investigaciones y mejoras genéticas, para lograr cierto tipo de resistencia, se realizaron sobre esas plantas autóctonas.

De hecho esas mejoras ya perecen que empezaron a realizar en el Nuevo Mundo, probablemente en México, donde el tomate fue conocido por Hernán Cortes. Las variedades mejoradas son buenas en tamaño en comparación a la silvestre, y parece ser que las que se importaron en Europa ya eran mejoradas (Rodríguez *et al.*, 2001).

Su nombre deriva de la lengua náhuatl de México, donde se le llamaba “*tomatl*.”

La planta de tomate fue aceptada durante mucho tiempo en Europa como ornamental, dado que se le creía venenosa, por su relación con las plantas de la familia solanáceas, como el beleño, la belladona, y otras; y esta creencia se ha mantenido en muchas regiones hasta el siglo XX (Rodríguez *et al.*, 2001).

El alcaloide causante de la toxicidad es la tomatina, que se encuentra principalmente en las hojas y en los frutos verdes, pero se degrada al madurar.

Superada esta primera fase, su cultivo y su consumo ha alcanzado que difícilmente pueda encontrarse otro producto agrícola que sea consumido en tales cantidades como el tomate.

Según un trabajo de Allen Stevens de la Universidad de Davis California, solo ocupa el lugar dieciséis como fuente de vitamina A entre los principales frutos y hortalizas y el lugar trece como fuente de vitamina C.

Su importancia en la alimentación guarda más relación con el alto consumo del mismo que con su riqueza, y constituye el principal nutriente de la alimentación de muchos países (Rodríguez *et al.*, 2001).

### **Requerimientos edafoclimáticos**

El manejo racional de los factores climáticos de forma conjunta es fundamental para el funcionamiento adecuado del cultivo, ya que todos se encuentran estrechamente relacionados y la actuación sobre uno de estos incide sobre el resto (INFO-AGRO 2004).

El tomate es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas, potencialmente perenne y muy sensibles a las heladas, lo que determina su ciclo, de distinta duración según la variedad. 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).

**La ubicación actualmente más aceptada del tomate es la siguiente (Cronquist, 1984, Esquinas Y Nuez, 1995; Peralta *et al.*, 2005):**

**Reino:** Vegetal

**Sub-reino:** Embryobionta

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Sub-clase:** Dicotyledonae

**Orden:** tubiflorae

**Familia:** Solanaceae

**Género:** Solanum = Lycopersicon

**Especie:** *S. lycopersicum* L.

### **Situación cuarentenaria del cultivo de (*Solanum lycopersicum* L.)**

La fitopatología incide directa e indirectamente sobre la producción agrícola. Podría admirarse que la disminución de las cosechas es la inmediatez directa de las pérdidas. Las medidas de prevención, erradicación, control, etc., favorecen para evitar mermas en los productos. No es extraño que en todo el mundo se hayan arbitrado normas legales para regular todos estos procedimientos, las medidas legales que trascienden los conocimientos de los especialistas hasta el ciudadano común (Nuez *et al.*, 1999).

Los procedimientos cuarentenarios, en México, se aplica a cualquier organismo que presente un peligro para la nación, y no permite 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 agentes sujetos a cuarentenas (López, 1996)

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



**Cáncer bacteriano, (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**

**Según Jansen (2004), la clasificación taxonómica es la siguiente:**

**Dominio:** Bacteria

**Phylum:** Actinobacteria

**Clase:** Actinobacteriales

**Subclase:** Actinobacteridae

**Orden:** Actinomycetales

**Género:** *Clavibacter*

**Especie:** *michiganensis*

**Subespecie:** *michiganensis*

**Etiología.**

El Cáncer bacteriano es una enfermedad muy seria del tomate, causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). La enfermedad se descubrió por primera vez en 1909 en Grand Rapids, Michigan, Estados Unidos, pero actualmente se ha reportado en áreas de producción de tomate de todo el mundo y anualmente ocurren algunos ataques de la enfermedad. Sin embargo, se pueden tomar medidas preventivas en todas las etapas de producción para evitar pérdidas por cáncer bacteriano (Aguirre, 1965)

Esta enfermedad fue estudiada por primera vez E. F. Smith (1910) y debe su nombre al lugar donde fue encontrada por primera vez. En la Argentina fue determinada por Dosio (1957) y descrita posteriormente por Rossi y Resnik (1968) (Fernández, 1975). Actualmente se encuentra distribuida en todas las zonas productoras de tomate del mundo. Es una seria enfermedad (Chang *et al.*, 1991).

El agente etiológico es la bacteria gram (+) *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Fernández, 1975).

Las células pueden ser pleomorficas, pequeñas, en forma de cocos o bastón, dependiendo de las condiciones de crecimiento, no forma esporas, es aeróbica, sin movimiento. El arreglo de las células, generalmente se presenta en empalizadas en forma de **V** o **Y** (OEPP/EPPO, 2005). En **DNA**, 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 avaladas 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 nutritivos son característicamente amarillas y alcanza un diámetro 2-3mm en 5 días, lisa en márgenes enteros y de consistencia butirosa. Lelliott *et al.* (1987) mencionó que el aislamiento se puede realizar por medio de Glucosa Agar Nutritivo (NGA) o Levadura Pectona Glucosa Agar (YPGA). La apariencia de la colonia en medio selectiva varia, dependiendo el medio (Jones *et al.*, 1991). La colonia crece bien a 28°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), (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).

### **Epifitología**

La bacteria *C. m.* subsp. *michiganensis* Smith, en campo se desarrolla mejor a temperatura de 25°-30°C y requiere periodos de alta evapotranspiración (OEPP/EPPO, 2005). Por su parte León *et al.*, (1982) mencionó 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 reportados reducciones en la cosechas de hasta un 70% (Rat *et al.*, 1991). Las semillas es la principal fuente de inóculo del patógeno. El comercio de las semillas ha facilitado la distribución mundial de la enfermedad. Localmente, la transferencia del equipo con-

taminado puede permitir la transmisión de la enfermedad, a otros campos (OEPP/EPPO, 2005).

Smith *et al.* (1992) mencionó que antes de que se adoptara medidas higiénicas y métodos de extracción de semillas, la enfermedad podía causar pérdidas hasta el 70%, siendo esta la principal fuente de diseminación. Por su parte Messiaen (1995), comentaba que las semillas que se hayan 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 semillas del 1% puede proporcionar la infestación del 100% del cultivo.

Las bacterias invernan en o sobre las semillas y, algunas aéreas, 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, tallo, hojas y frutos (García *et al.*, 2000).

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, los vasos xilemáticos espirales, para después salir de ellos e invadir en floema, medula y corteza, donde forman las grandes que originan los cánceres (León *et al.*, 1982).

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

## Síntomas

Por su parte *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* causa el marchitamiento y la úlcera del tallo de tomate (*Solanum lycopersicum*), una de las más importantes enfermedades bacterianas del tomate en todo el mundo. Los síntomas de esta enfermedad se pueden observar en los distintos órganos de la planta: Por un lado, el marchitamiento unilateral de las hojas es el primer síntoma de la enfermedad. Más tarde la marchitez se extiende a todas las hojas. En el tallo aparecen unas lesiones en forma de úlceras. La planta se marchita del todo y muere. En el caso de que la infección se haya producido en el último estadio de desarrollo de la planta de tomate, las plantas pueden sobrevivir para fructificar, pero en tal caso en los frutos aparecerán unas manchas denominadas ojos de pájaro, y a menudo la semilla terminará infectándose y constituyéndose en inóculo de una nueva infección. En los suelos contaminados con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, la bacteria puede entrar a través de heridas en el tallo o en la raíz, y se dirige al xilema. El xilema permite la colonización sistémica de la planta por la bacteria. Precisamente, el marchitamiento se debe en gran medida al atasco de los vasos del xilema a consecuencia de la síntesis de polisacáridos extracelulares (EPS) y a la destrucción de los mismos por la presencia de enzimas que los degradan como celulosa, poligalacturonasa, pectín metil esterasa y xilanasa, García *et al.* (2000).

Los síntomas de la enfermedad se manifiestan en cualquier estado de desarrollo del cultivo. En plantas adultas, el aspecto marchito es característico, los bordes de los folíolos inferiores aparecen secos y curvados hacia abajo luego adquieren un color castaño, se secan y necrosan, permaneciendo el pecíolo unido al tallo, (Figura 1). A menudo se observa marchitamiento en la mitad del folíolo o en un solo lado de la planta. En tallos brotes y pecíolos se observan líneas de color amarillo y luego castaño, bajo ciertas condiciones estas se abren formando canchales, fuente de infecciones secundarias (Figura 2). Las plantas enfermas pueden morir rápidamente, pero a menudo sobreviven hasta la cosecha. Los daños en fruto se observan en forma muy esporádica (Figura, 3).



**Figura 1. A)** Necrosis de la hoja comúnmente llamada “fuego”. **B)** Pedúnculo y cáliz mostrando lesiones necróticas, fist-the seed (asta s/año)).



**Figura 2. A)** Tallo mostrando síntomas clásicos de cáncer bacteriano **B)** Comparación de tallos sanos (arriba) y enfermos (abajo) que muestran decoloración oscura y cavidades en el área medular (xilema), Paul Bachi.



**Figura 3.** Cancro bacteriano conocido como “ojo de pájaro”, first-the seed (asta s/año)).

En condiciones naturales, la bacteria es específica de tomate (*Solanum lycopersicom*) citándose con excepción un ataque a *Solanum douglasii* y a *Capsicum annum*, como nuevo hospedante en condiciones naturales. La principal fuente primaria de inóculo es la semilla, que transporta a la bacteria en forma epífita o como infección latente, pero debido al largo periodo de incubación que presenta la enfermedad solo se manifiesta a los 30 o 40 días luego del trasplante (Chang *et al.*, 1992).

La fuente secundaria de infección es la generada por los canchales que se abren. La supervivencia de la bacteria en el campo es a través de los restos de cultivo que persisten en el campo, también sobrevive en hospedantes alternativos, en plantas guachas (Chang *et al.*, 1991).

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

### **Pruebas de patogenicidad**

La prueba de patogenicidad es la característica más importante de las bacterias fitopatógenas, por lo que su verificación resulta imprescindible en la identificación bacteriana. Además, de 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 la planta con síntomas (Llacer *et al.*, 1996).

### **Detección del 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 permite elaborar método para su detección y diagnóstico, más sensible y específico que los actuales. En respuesta a esta necesidad, se han

desarrollados 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 (CNRDF-DGSV, 1999; Schaad *et al.*, 2001).

## ***Bacillus* spp.**

### **El Género *Bacillus***

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, es un género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas, quimiheterotrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos. Son anaerobios o aerobios facultativos son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía 0,5 a 2,5  $\mu\text{m}$  x 1,2-10  $\mu\text{m}$ . Este género se encuentra comúnmente en suelos y plantas donde tienen un papel importante en ciclo del carbono y el nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos. (Koneman, 2001).

**Según Jansen (2004). La Clasificación Taxonómica es la siguiente:**

**Dominio:** Bacteria

**Fylum:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Bacillales

**Genero:** *Bacillus*

**Especie:** *subtilis*

En la primera edición del género es claramente diverso desde el punto de vista fenotípico y genotípico. La diferenciación entre especies del género *Bacillus* se centro en los resultados en la fermentación de lactosa, sorbitol, manitol, melobiosis, hidrólisis de la urea, y descarboxilacion de la lisina.(Anderson *et al.*,2003).

Vanegas *et al.* (2005) señalan que: “Existen cepas bacterianas silvestres del género *Bacillus* que son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de cepas patógenas de *F. solani* y *F. oxysporum*”. Las cepas silvestres del género *Bacillus sp.* aislados de la rizósfera de plantas son capaces de generar un efecto antagónico en el crecimiento y desarrollo de este patógeno, además de no presentar efectos adversos en la viabilidad de las plantas del estudio.

Más recientemente, los datos de la secuencias de RNA se han empleado para dividir géneros de *Bacillus* en al menos cinco líneas diferentes. Entre las especies más representativas del genero *Bacillus* se encuentran *B.alkalophilus*, *B anthracis*, *B azotoformans*, *B brevis*, *B cereus*, *B subtilis*, *B coagulans*, *B firmus*,*B insolitus*, *B licheniformis*, *B polimyxa* y *B turingiensis* entre otros (Berge'ys ,2000).

### **Especie: *subtilis***

Es una bacteria Gram positiva, produce endospora las que son termorresistentes y también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación la radiación los ácidos y los desinfectantes químicos, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones, producen antibióticos como la bacitricina, polimixina, gramicidina y circulina, fermentan la caseína y el almidón, vive dentro de los límites de 55 a 70°C. Es un gran controlador biológico, *Bacillus subtilis* promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfisii*, *Fusarium spp.*, *Verticillium spp*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium spp*, y el nematodo nodulador de raíces *Meloidogyne spp* y *Rhizoctonia solani*, agente causal de la enfermedad denominada “mal del tallito” del algodónero (Anónimo, 2002).



Las bacterias como *Bacillus subtilis* al ser habitantes comunes en el suelo establecen por si solas en la rizosfera del cultivo tratado y colonizan el sistema radical, compitiendo con los organismos que la atacan y por lo tanto suprimen enfermedades causadas por patógenos como *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp.; es decir su mecanismo de acción en este caso es por competencia. *Bacillus subtilis* también es una bacteria eficaz contra varios hongos patógenos, ya que es capaz de producir un antibiótico, llamado iturin, el cual es particularmente activo contra el hongo, *Sclerotinia frutícola*, y también se ha probado para el control del hongo patógeno, *Verticillium* (Anónimo, 2002).

*B. subtilis* es la especie tipo del género *Bacillus*, y sus esporas están ampliamente distribuidas en ambientes naturales. Puede degradar pectina y polisacáridos en los tejidos vegetales. Produce una gran gama de antibióticos pertenecientes a la familia de las Iturinas (Wulff *et al.*, 2002). Se ha reportado como un eficiente antagonista de fitopatógenos. Esta especie se encuentra entre los microorganismos promotores del crecimiento vegetal debido a que produce sustancias semejantes a las fitohormonas, y además contribuye al mejoramiento de la absorción de agua y nutrientes en la raíz. Se le atribuye también la inducción de resistencia mediante la activación de genes defensivos de la planta (Guillén *et al.*, 2006).

Virgen y García (1990) obtuvieron una reducción en la incidencia de *Fusarium oxysporum* sp. *niveum*, en plantas de sandía (*Citrullus vulgaris*), mediante el tratamiento de la semilla con *Bacillus subtilis* ( $1.6 \times 10^4$  bacterias  $g^{-1}$  de semilla). Virgen y Calleros *et al.* (1996) lograron en papa (*Solanum tuberosum*) cierto control de *Rhizoctonia solani* con la aplicación de *Bacillus subtilis* citado por Zabaleta, (2000).

### ***Bacillus* en el control biológico de enfermedades bacterianas**

El cobre es el elemento que ha dado mejores resultados en el control de enfermedades de origen bacteriano. Sin embargo, éstos han sido erráticos cuando se presentan condiciones ambientales favorables para el desarrollo y diseminación de las bacterias; a ello se suma la aparición de cepas bacterianas resistentes a compuestos cúpricos. Resultados igualmente erráticos se obtienen cuando se aplican antibióticos contra bacterias fitopatógenas, como las formulaciones de estreptomicina y oxitetraciclina, debido al desarrollo de razas resistentes (SAG, 2004).

En la búsqueda de alternativas más efectivas, la atención se ha dirigido a las propiedades controladoras observadas en *Bacillus subtilis*. Cabe señalar, que el género *Bacillus* presenta el mayor número de especies conocidas con propiedades insecticidas, entre las que destaca *B. thuringiensis* (Donoso *et al.*, 2006).

Las nuevas tendencias mostradas por la exigencia de los mercados agrícolas internacionales, y en menor medida de los locales, restringen el uso de plaguicidas, ya sea por la adopción de sistemas de producción integrada o bien, orgánica (cuadro 1). Esta tendencia ha sido aún más crítica en el manejo de enfermedades bacterianas, dada la aparición sistemática de resistencia a los antibióticos usados, no sólo en agricultura sino también en salud humana. Lo anterior ha generado la búsqueda de una nueva gama de antibióticos alternativos, y el uso de los tradicionales se ha restringido en las actividades ajenas a la medicina, tales como la agricultura y ganadería (SAG, 2004).

**Cuadro 1.** Productos a base de *Bacillus subtilis*, cultivos donde se aplica, enfermedad que controla y época de aplicación (SAG, 2004).

<b>Cultivo</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Dosis</b>	<b>Época de aplicación</b>
Carozos (cerezo, durazno, ciruelo)	Cáncer bacteriano ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Syringae</i> )	100 g/ha	Aplicación con 25, 75 y 100% de caída de hojas a pleno invierno. Puntas verdes y plena flor.
Vid	Pudrición acida ( <i>Acetobacter</i> sp.)	3 kg/ha (en cada aplicación)	Aplicar en verano y precosecha (mojamiento 600-800 l).
Tomate	Mancha bacteriana ( <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> )  Cancro bacterial ( <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ) Peca bacteriana ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> )	300 g/ha (preventivo)  500 g/ha (curativo)	En almácigo, trasplante y posterior a cualquier labor que genere heridas. Aplicación foliar en almácigo y posterior a trasplante, amarra primer desbrote y aplicación de hormonas (después de cualquier labor que genere heridas). Luego, sólo en presencia de síntomas. Curativo, aplicaciones cada 3 días, hasta que las lesiones se presenten secas y sin avance.
Peral	Tizón de flor ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> )	200 g/ha	Aplicación foliar en 10, 25, 50 y 100% de floración.  Repetir en caso de lluvias o heladas primaverales.
Avellano Europeo	Tizón bacteriano ( <i>Xanthomonas arboricola</i> )	150 g/ha	Aplicación en brotación y floración de amentos con mojamiento entre 600 y 1.000 l.
Arándano	Tizón bacteriano ( <i>Pseudomonas syringae</i> )	150 g/ha	Aplicación en caída de hojas con mojamiento de 300 l/ha y en brotación y floración con 600 l/ha.
Kiwi	Bacteriosis del kiwi ( <i>Pseudomonas syringae</i> )	150 g/ha 15 g/l	Aplicación como aspersión, según síntomas, mojamiento de aplicación sobre cortes de poda y/o heridas.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Localización

El trabajo experimental se estableció en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro unidad Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México. Al sur de la ciudad, con domicilio Calzada Antonio Narro # 1923 Buenavista C.P. 25315. Para el establecimiento de la plántula de tomate (*Solanum lycopersicum*) se llevo a cabo en el invernadero del Departamento de Parasitología, y la caracterización se realizó en el laboratorio de Fitopatología.

## Material vegetal utilizado

Se usaron plantas de la variedad Tequila de 5 días de trasplante para hacer la inoculación.

## Obtención del inóculo

Para determinar la presencia de la bacteria, se observaron tallos, hojas, frutos. Que mostraron los síntomas que se asemejaban a los causados por el cáncer bacteriano (*C. m. subsp. michiganensis* Smith), tales como la producción de raíces adventicias, tallos agrietados, mancha ampulosa blanca, clorosis intervenal, margen de las hojas necrosadas, y el síntoma llamado ojo de pájaro en el fruto. Los que fueron colectados y trasladados al laboratorio para su caracterización.

## Etapas de laboratorio

El diagnóstico de la muestra se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología.

## **Aislamiento de la bacteria**

Se desinfectaron algunos trozos del tallo enfermo para observar las lesiones en los conductos vasculares, así como para localizar las partes útiles del aislamiento. Los materiales enfermos a utilizar fueron lavados y desinfectados por medio de calor, tanto como en tallo, y fruto. Fueron macerados en un mortero, y se hizo la siembra de dispersión en el medio diferencial KB y D-2, 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 morfológicas correspondientes a *C. michiganensis*; colonias convexas, enteras y de color amarillo pálido, y la velocidad de crecimiento lento (OEPP/EPPO, 2005).

**Pruebas de caracterización de acuerdo al protocolo de Schaad et al (2001), se realizaron las siguientes pruebas.**

### **Tinción de Gram**

Se realiza una prueba, colocando una gota de agua en un porta objetos, se tomo una porción de colonia con una asa bacteriológica flameada y fue diluida en el porta objetos, se deja secar, posteriormente se agrega cristal violeta por un minuto, se enjuaga con agua, se agrega lugol por un minuto, se enjuaga con agua, se agrega alcohol para enjuagar, posteriormente se agrega safranina 1% por 30 segundos y se lava con agua esterilizada, y se deja secar. Consecutivamente se coloca una gota de aceite de inmersión sobre el porta objeto y se observan sus características al microscopio, en 100X, para determinar color de la tinción de la colonia y la forma de acomodo y tipos de células (Schaad *et al.*, 2001).

### **Prueba de RYO**

Se realizó para comprobar 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 una asa bacteriológica flameada la colonia en la gota, diluir, y obser-

var si es mucoides levantando el asa de gota, si se forma una estría de mezcla se considera positiva, y por lo tanto la tinción debería de haber dado negativo, aclarando que *Clavibacter* es Gram positiva, por lo que se buscaron bacterias RYO negativos.

### **Prueba de Oxidasa**

Para el cual se utilizó 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 con un asa bacteriológica, cargada con un cultivo joven (Schaad *et al.*, 2001).

### **Prueba de Catalasa**

Consiste en colocar una gota de agua oxigenada al 1%, y posteriormente agregar con un asa bacteriológica desinfectada una porción de la colonia bacteriana; en esta prueba se busca observar si la colonia causa reacción o efervescencia al ser diluida en la solución (Schaad *et al.*, 2001).

### **Prueba de Hugg-Liefeson**

Se busca determinar si la bacteria es aerobia ó anaerobia, se utilizaron 2 repeticiones; una con aceite mineral para determinar si fermenta y la otra sin aceite para determinar si se oxida, y 2 testigos, 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 medios con aceite (Schaad *et al.*, 2001).

### **Medio utilización de la glucosa (Estéril a 1 atmosfera en autoclave/15min.).**

Peptona	2.0gr
NaCl	5.0gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3gr
Azul de bromotimol	0.03gr

Glucosa	10.0gr
Agua destilada	1000ml

Se ajusta pH a 7.2, con ácido acético; para bajar, y Hidróxido de potasio; para subir, antes de agregar Glucosa. La glucosa 1%, se esteriliza por filtro multipase, por separado de los otros componentes.

### **Purificación de colonias bacterianas**

La resiembra de la colonia bacteriana se realizó con medios asepticos, mediante el uso de una asa bacteriológica, debidamente flameada, por estrías seriadas en KB. Las capas 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, oxidasa, catalasa y de óxido/fermentación. Así mismo, esculina, y almidón (OEPP/EPPO, 2005).

### **Preparación de medios B. de King (Esterilizar a 1 atmósfera en autoclave/15 min.).**

Proteasa peptona	20.0gr
$K_2HPO_4$	1.5gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5gr
Agar	15.0gr
Glicerol	15ml
Agua destilada	1000ml

### **Prueba de hidrólisis de esculina**

Esta prueba se realizó 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.

### **Prueba de hidrólisis de almidón**

Esa prueba se realizó para observar si las bacterias es capaz de hidrolizar el almidón, en este medio la característica es observar un halo transparente alrededor de la colonia. De este modo se considera positiva.

### **Prueba de medio para hidrólisis de almidón (Estéril a 1 atmosfera en autoclave/15min.).**

Agar nutritivo	10.0gr
Almidón soluble	50.gr
Agua destilada	1000ml

Se debe disolver el almidón en agua y agregar 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 negativo

### **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 punción en los tallos entre los tejidos leñoso y la dermis. La inoculación se realizó con una solución de cultivo bacteriano joven (48hrs de crecimiento). Utilizando una suspensión bacteriana concentrada de  $11 \times 10^8$  a la 8 en escala de MacFarland y usando la Cámara de Neubauer para el conteo de las bacterias.



## Diseño experimental

El experimento se estableció con el diseño completamente al azar en el cual, los tratamientos se asignaron consecutivamente.

## Descripción del tratamiento

El experimento consistió en la selección de 48 plantas sanas de tomate la cual fue trasplantada en Peat Moos esterilizado y con humedad suficiente para su desarrollo normal. Fueron 8 tratamientos (T) incluyendo el testigo con 6 repeticiones cada una. Se inocularon las plantas de tomate una semana después del trasplante con las bacterias a diferentes concentraciones como se muestra en (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** *Bacillus subtilis* (Bs) vs *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) y sus diferentes concentraciones para cada tratamiento y parte de la planta donde fue inoculado

Tratamiento	Dosis	# Aplicación
T1.- Testigo Absoluto		
T2.- <i>Bacillus subtilis</i>	5 ml ( $6.075 \times 10^7$ )	1 Raíz
T3.- Bs + Cmm	5 ml + 2.5 ml	1 Raíz
T4.- Bs + Cmm	2.5 ml + 1 ml	1 Tallo
T5.- Cmm	2.5 ml ( $7.8625 \times 10^8$ )	1 Raíz
T6.- Cmm	1 ml ( $3.145 \times 10^8$ )	1 Tallo
T7.- Bs + Cmm	5 ml + 2.5 ml	2 Raíz
T8.- Bs + Cmm	2.5 ml + 1 ml	2 Tallo

## Preparación del inóculo

Antes de inocular se prepararon las soluciones bacterianas de la siguiente manera:

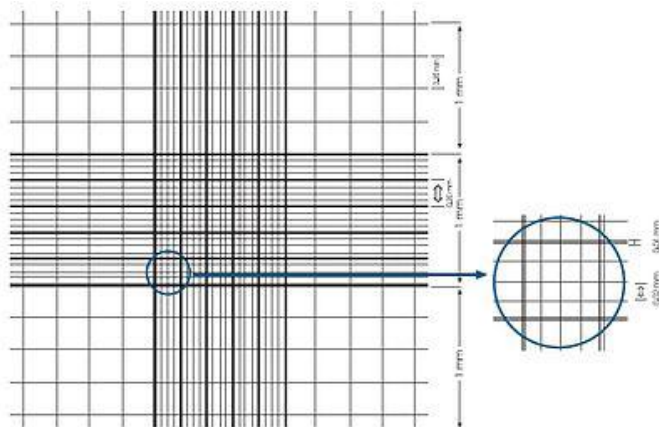
Se prepararon dos soluciones una de *B. subtilis* que será como agente de bio-control y la otra de *Cmm* que será el agente causal de la enfermedad.

Con un asa bacteriológica se tomo suficiente colonias de bacterias de *B. subtilis* para ser colocado en matraz de erlenmeyer de 500 ml que contiene caldo papa, se deja reposar durante 48 horas para que se reproduzcan las colonias de la bacterias y aplicarlo en el tomate (Cuadro 2).

Con un asa bacteriológica se tomo suficiente colonias de bacterias de *Cmm* para ser colocado en matraz de erlenmeyer de 500 ml que contiene agar nutritivo, se deja reposar durante 48 horas para que se reproduzcan las colonias de la bacteria y aplicarlo en el tomate Cuadro 2.

Para conocer la concentración aproximada de las bacterias de cada tubo se hizo una comparación entre las soluciones y una solución de  $\text{BaCl}_2$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , en la escala de McFarland, usando la concentración del tubo 1. La semejanza entre turbidez era la concentración del numero de bacterias. En este experimento se obtuvo una concentración de  $3.0 \times 10^8$  en las soluciones de ambas bacterias para la inoculación (Koneman, 2006).

Para conocer la concentración se realizo un conteo con la cámara de Neubauer (Pecsok y Shields, 1997):



**Figura 4.** Cuadrilla de la Cámara de Neubauer para el conteo de bacterias.

Para determinar la concentración de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y la de *B. subtilis*.

Se hizo el conteo de la bacteria contando 5 cuadros los cuatro de la orilla y el centro se obtiene el promedio ( $\bar{x}$ ).

$$(\bar{x}) (25) (10000) = \text{bacteria /ml}$$

$$(125.8) (25) (10000) = 314, 500,000 \text{ bacteria/ml}$$

Para la raíz se inoculo  $7.8625 \times 10^8$  bacteria/2.5ml, para el tallo fue  $3.145 \times 10^8$

Para *B. subtilis*

$$(\bar{x}) (25) (10000) = \text{bacteria /ml}$$

$$(48.6) (25) (10000) = 12,150, 000 \text{ bacteria/ml}$$

Para raíz y tallo se inóculo  $6.075 \times 10^7$  bacteria/5ml de la concentración madre de *B. subtilis*.

## **Inoculación**

La inoculación se hizo en el tallo y suelo (raíz) con una jeringa poniendo la solución en ella y por punción en el tallo se inocular la bacteria dejando el primer tratamiento como testigo.

La toma de dato fue diario hasta que aparecieron los primeros síntomas, se observo periódicamente hasta que presento los primeros síntomas similares a los causados por *Cmm*.

## RESULTADO Y DISCUSIÓN

Los resultados expresados se discutirán de la forma siguiente, primeramente los resultados de las Pruebas Bioquímicas correspondientes a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cuadro 3), seguido de *Bacillus subtilis* (Cuadro 4) y por último los resultados entre las bacterias (Cuadro 5).

### Caracterización de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

**Cuadro 3.** Pruebas Bioquímicas, Medios diferenciales y semiselectivos en la caracterización de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Detectados en follaje de tomate de la variedad Tequila.

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 RYO	-	+
Oxidasa	-	+
Catalasa	+	+
Utilización de la glucosa. O/F	+/-	+
Hidrólisis de esculina	+	+
Hidrólisis de almidón	-	+

Rodríguez, 1994, señala que las colonias del género *Clavibacter*, son pequeñas, de crecimiento lento, mucoides, convexas de color amarillo y variantes como; naranja, rosas y rojas, dependiendo del medio. y concuerda con el tipo de colonias que se aislaron.

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 resulto ser muy favorable para el desarrollo de colonias bacterianas. Por su parte Llácer, 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*.

## Caracterización de *Bacillus subtilis*

**Cuadro 4.** Características y pruebas Bioquímicas para la identificación de *B. subtilis*

Pruebas	Reacción
Reacción a tinción de Gram	+
Crecimiento anaeróbico	-
Posición de la espora	Central
Oxidasa	-
Catalasa	+
Fermentación de la glucosa	+
L-arabinosa	+
D-xilosa	+
D-manitol	-
Hidrólisis de almidón	+
Hidrólisis de la caseína	+
Hidrólisis de la Urea	-
Movilidad	+
Utilización de Citrato	+
Reducción de Nitrato	+
Crecimiento en NaCl al 7%	+
Crecimiento a pH 5.7	-
Hidrólisis de la Gelatina	+

La cepa de *B. subtilis* que se aisló para hacer las pruebas bioquímicas; que presento tinción de Gram positiva, con endospora central y crecimiento aeróbico, catalasa positiva, presenta hidrólisis de almidón y reduce los nitratos, no produce indol, forma escasa cantidad de ácido sulfúrico, presenta crecimiento en NaCl al 7%, es manitol negativo y utiliza el citrato, (Cuadro 4). Con base a los resultados anteriores la cepa corresponde *Bacillus subtilis* (Bergey`s, 2000).

Imágenes que muestran plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad tequila indeterminado, a una semana después del trasplante con un altura de 10 cm previas a la inoculación con *Cmm.* y *B. subtilis*.



**Figura 5.** Inoculación de bacterias en tomate

Se evaluaron 8 tratamientos incluyendo el testigo. En el cuadro 3 se observa claramente las plantas vivas que llegaron a la producción teniendo el patógeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*.

### **Supervivencia del inóculo**

Imágenes que muestra síntomas de *Clavibacter michiganensis* después de ser tratado con *B. subtilis* inoculados a plantas de tomate en los distintos tratamientos que llegaron a la cosecha.





**Figura 6.** Tratamiento 2 (*B. subtilis*), se observa los frutos sanos, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, 2012.



**Figura 7.** Tratamiento 5 que muestra los síntomas de *Cmm* en los frutos, también conocido como “ojo de pájaro”, Saltillo, Coahuila de Zaragoza, 2012.

#### **Prueba de patogenicidad.**

Para comprobar que los síntomas observados eran causados por *Cmm* y no por otro microorganismo, se aplicaron los postulados de Koch se resembró el tejido vegetal (Figura 7)

Los síntomas se manifestaron a los tres días de haberse inoculado la planta con la solución bacteriana. La planta mostró algunos síntomas similares a los causados por *Cmm.*, 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 5) se muestran los resultados obtenidos de las pruebas realizadas. Los síntomas observados fueron, Clorosis intervenal, enrollamiento de hojas y lesiones en los conductos vasculares.

**Cuadro 5.** Pruebas Bioquímicas en la caracterización 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 5 que atienden al las características típicas de *Cmm.* denotan como positivas las pruebas de reaislamiento y resiembra para concluir, con los postulados de Koch, este estudio.

**Cuadro 6.** Comparación de medias de las diferentes partes del cultivo del tomate.

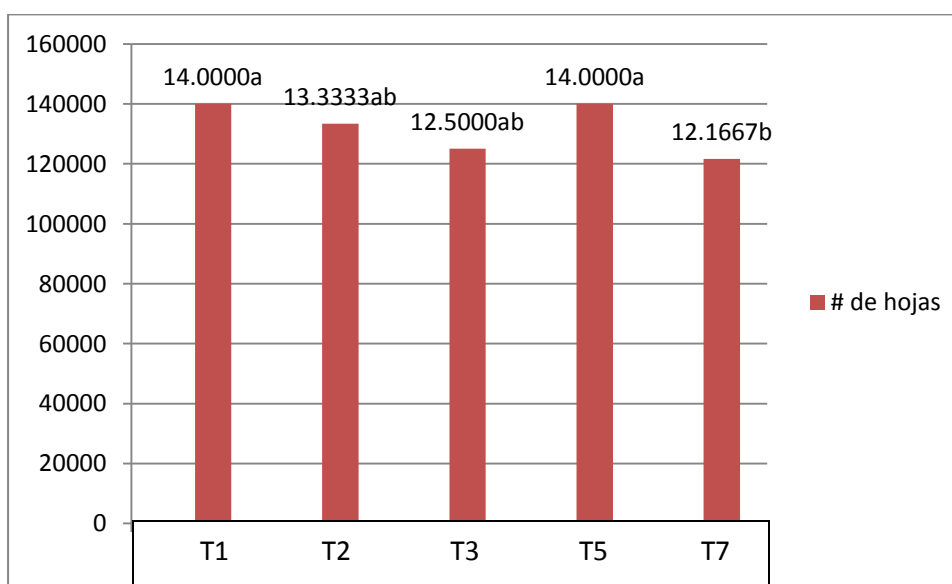
Trat.	Numero de:			Centímetro			Peso
	Hojas	Flore	Fruto	Long. de ja	Diámetro tallo	Altura planta	Fruto (gr.)
1	14.0000a	6.1667a	1.6667	26.0000a	0.5167ab	70.0000a	30.0000
			ab				ab
2	13.3333	6.5000a	2.1667a	25.2500a	0.5833a	64.1667	37.5000
	ab					abc	a
3	12.5000	5.0000	0.8333	26.0000a	0.5500a	66.3333ab	29.8333
	ab	bc	bc				ab
4	0.0000c	0.0000d	0.0000c	0.0000b	0.0000c	0.0000d	0.0000d
5	14.0000a	5.0000	0.5000c	24.7500a	0.5333a	61.6667bc	28.6667
		bc					bc
6	0.0000c	0.0000d	0.0000c	0.0000b	0.0000c	0.0000d	0.0000d
7	12.1667b	4.5000c	0.5000c	23.3667a	0.4333b	60.3333c	20.6667
							c
8	0.0000c	0.0000d	0.0000c	0.0000b	0.0000c	0.0000d	0.0000d
<b>C.V.</b>	17.53	30.83	122.26	16.25	25.50	12.59	39.19

Nivel de significancia: 0.05 Tukey

En este cuadro se ve que *B. subtilis* además de ser un agente de biocontrol actúa como un fertilizante para las planta se tiene un mayor peso en el fruto como se ve en el tratamiento (T2) que se inoculo solo la bacteria antagónica que donde se tubo mejor resultado, seguido del testigo (T1), los demás tratamientos (T3, T5 y T7), dieron un buen resultado además que tenían los patógenos que se inoculo en el suelo en el tratamiento (T5), mostro los síntomas de *Cmm*, en el fruto conocido también como “ojo de pájaro”. Pero los que fueron inoculado en el tallo mostraron los síntomas a los 3 días, y a la semana murieron que son los tratamientos (T4, T6 y T8).

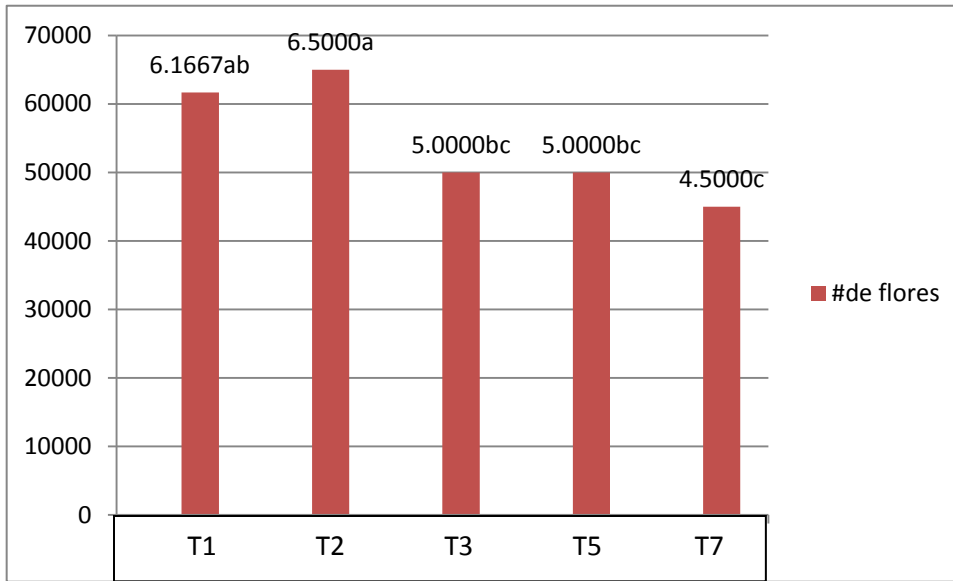
Según Filipon (2002), señalan que la bacteria *Bacillus subtilis* no es potencialmente patógena, no produce endotoxina y secreta proteínas al medio, algunas de ellas con propiedades antifúngicas, como la subtilinas y otros antibióticos de la familia iturinas. La subtilinas secretada por *B. subtilis* actúa sobre la pared celular de los hongos. Se ha demostrado que induce resistencia sistémica natural de la planta contra el patógeno bacteriano y fungoso propiedad llamada Resistencia Sistémica Adquirida (SAR).

Se utiliza industrialmente como bioinsecticida y biofungicida. *B. subtilis* se ha utilizado para el control biológico de *Phytophthora infestans*, *P. sojae* y *P. capsici* en suelos infestados por el patógeno en cultivos de frijol y tomate (Filipon, 2002). En la Figura 8 se puede observar que el número de hojas fue mayor en el tratamiento donde se usó *Cmm* en la raíz, así como el testigo, el que menos presentó fue el (T8).



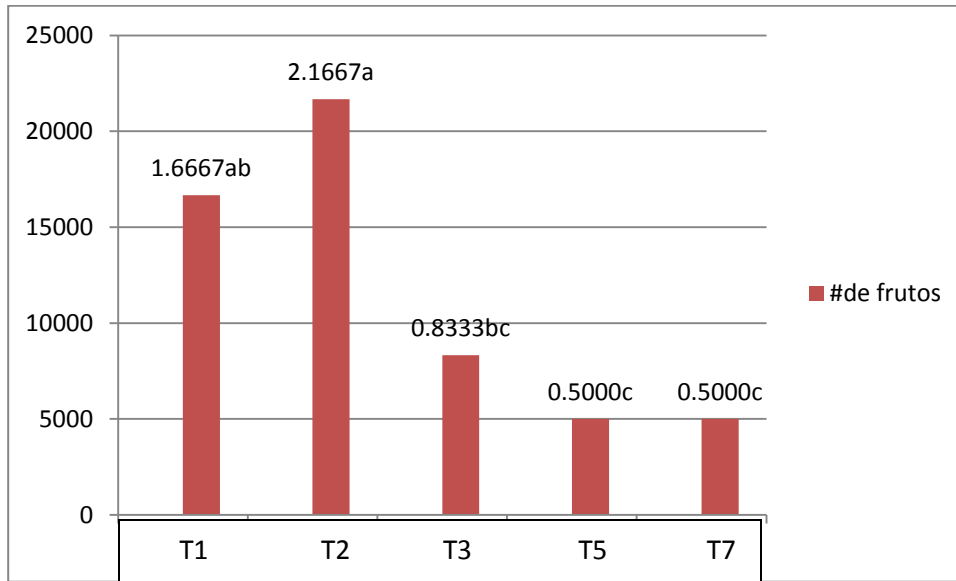
**Figura 8.** Tratamientos de acuerdo al número de hojas a la comparación de medias.

De acuerdo a la figura 8 estadísticamente hablando los mayores número de hojas se reflejaron en los tratamientos (T1 y T5), seguidos del (T2 y T3) y por último (T7)

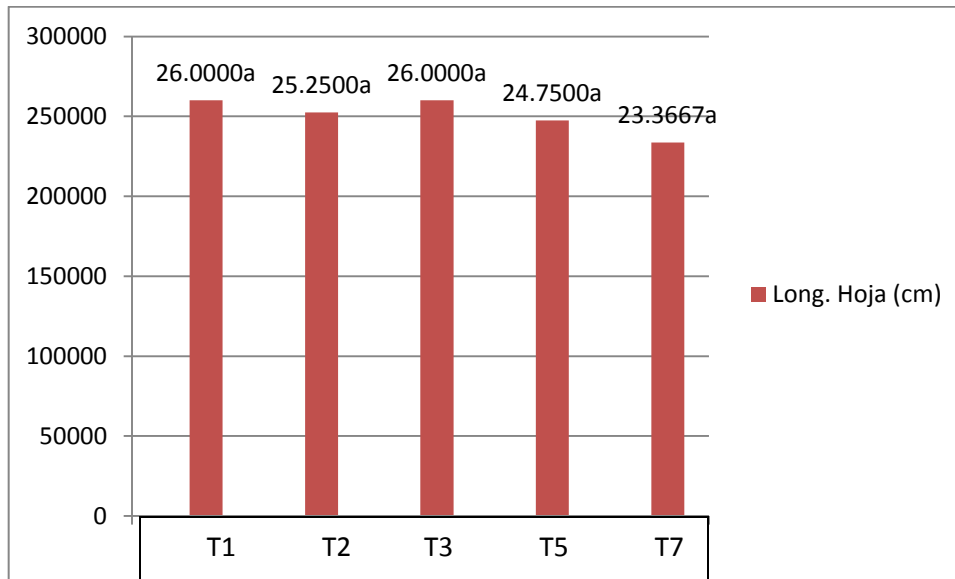


**Figura 9.** Tratamientos de acuerdo al número de flores en la comparación de medias

Se observó que al comparar las medias de las variables de respuesta número de flores amarradas no existió tanta diferencia entre los tratamientos figura 9, pero si se vio diferencia entre frutos amarrados, se reflejó una mayor producción de frutos con el uso de *Bacillus subtilis* (T2), en comparación a los demás tratamientos que estuvieron muy bajos, figura 10.

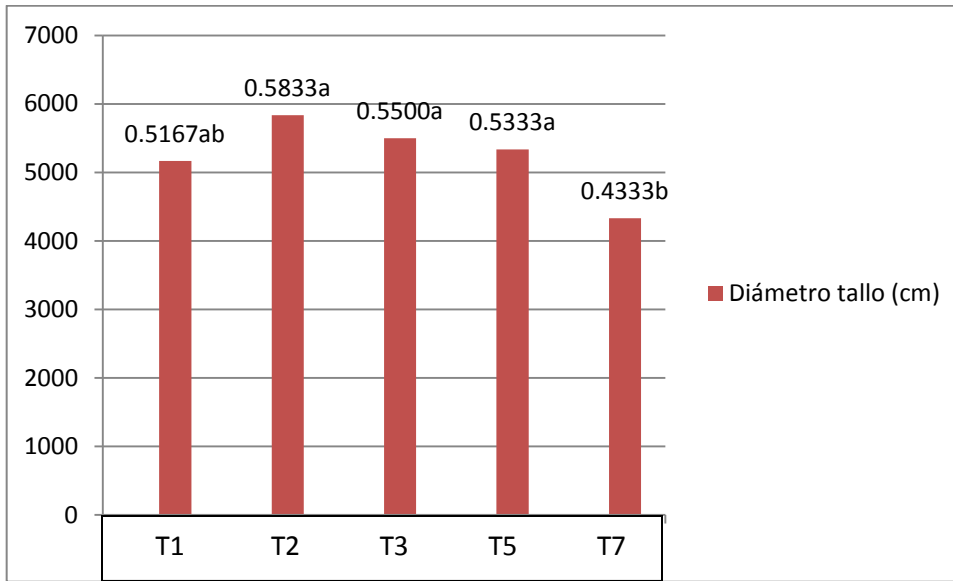


**Figura 10.** Muestra estadísticamente los tratamientos en el número de frutos en la comparación de medias.

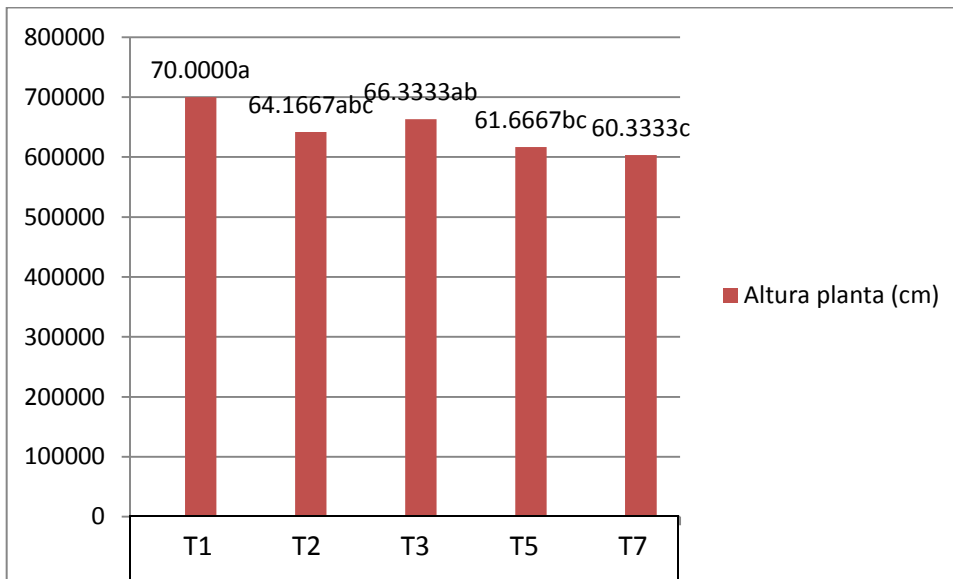


**Figura 11.** Tratamientos en longitud de la hoja en la comparación de medias.

En esta grafica no hubo diferencia significativa en cuanto la longitud de la hoja estadísticamente es igual.



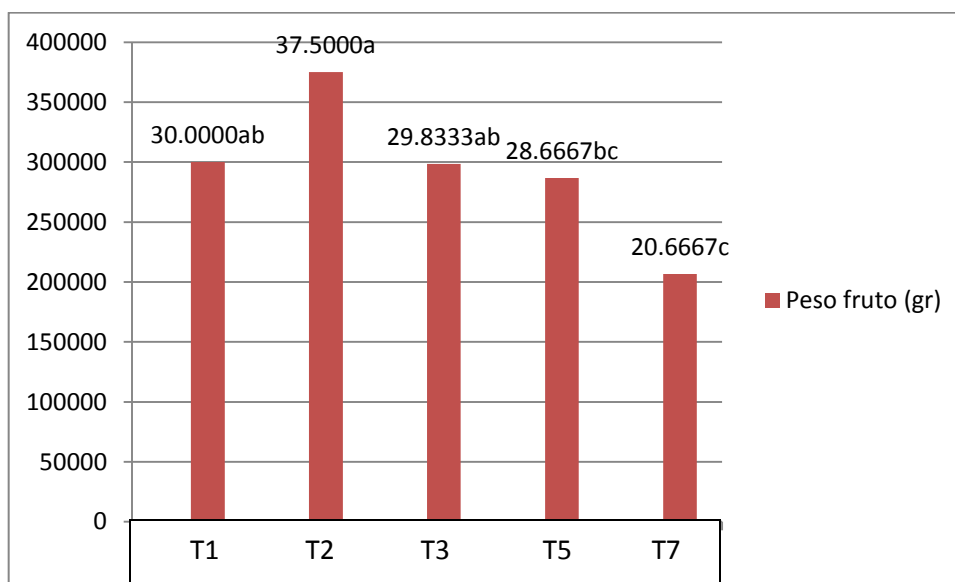
**Figura 12.** Tratamientos en el diametro de tallo en la comparacion de medias



**Figura 13.** Tratamientos en la altura de planta en la comparacion de medias

Investigaciones recientes muestra que *B. subtilis*, no solamente inhibe al patógeno, sino que además, promueve el crecimiento de la raíz y la planta, figura 13, e incrementa el contenido de lípidos, triglicéridos y esterol en las hojas del tomate. Del mismo modo se ha utilizado en el tratamiento de semillas de cereales, algodón y

maíz. En general *B. subtilis* es utilizado como un organismo antagonista en aplicaciones agronómicas (Filipon 2002).



**Figura 14.** Tratamientos del peso de frutos en la comparacion de medias.

El mayor efecto en el rendimiento del cultivo se obtuvo en las plantas inoculadas con *Bacillus subtilis*, mientras que los demás tratamientos fueron similares al testigo Figura14.

Los resultados obtenidos permiten inferir que el tratamiento con (*Bs*), empleados en este ensayo promueve la altura de la planta e incrementar los rendimientos en el cultivo debido a que la bacteria del genero *Bacillus* induce diferentes mecanismos relacionados con la promoción de crecimiento en las plantas, ya sea que proporcionen directamente nutrientes, participen en la fijación de nitrógeno, fosforo y potasio, la solubilizacion de fosforo y otros nutrientes; o bien , que las plantas sean capaces de producir hormonas vegetales y sus promotores de crecimiento como el acido indolacetico o por la producción de sideroforos o antibióticos para la supresión de la mi flora dañina a esta (Hallmann *et al.*, 1997; Kloepper *et al.*, 1980; Van Veen *et al.*, 1997).



Como se observo en este ensayo, con el uso de cepas de (*Bs*), se puede obtener rendimientos similares a tratamientos con bactericidas y fungicida, lo que permitirá integrar el control biológico en un esquema de manejo integrado de enfermedades en el cultivo de tomate con beneficio al medio ambiente, reducir toxicidad al humano y reducir la resistencia de patógenos de suelo a los bactericidas (Yuen *et al.*, 1985).

## CONCLUSIONES

El mejor tratamiento donde se inoculo la bacteria fue T3 donde se coloco la bacteria directamente a la raíz.

Al hacer la inoculación de *Cmm* en el tallo que fue el tratamiento (T4, T6 y T8) se obtuvo en una pérdida total en las plantas

Los tratamientos restantes (T5, T7) llegaron a producción con menos rendimientos y con menor calidad en los frutos.

## RECOMENDACIONES

El uso de la bacteria (*Bs*) como un agente de biocontrol mostro un buen resultado para el control del patógeno (*Cmm*) se puede utilizar como un preventivo ya que si la bacterias se encuentra en la planta ya sería difícil su control, la mejor técnica para el control es necesario tratar el suelo con *B. subtilis* así como también las semilla para reducir el inóculo de la bacteria y hongos fitopatógenos. Ya que se han evaluado distintos compuestos químicos comerciales, y combinaciones de varios de ellos, para el posible tratamiento preventivo, ya que, una vez desencadenada la infección sistémica, resulta prácticamente imposible su control.

Es muy importante conocer la importancia de la relación no patogénica microorganismo-planta en la rizósfera, donde los microorganismos como *Bacillus subtilis* ejerce una acción específica mediante la producción de metabolitos secundarios, resistencia a estreses biótico y abióticos y facilitando la toma de nutrientes del suelo; todas estas actividades podrían favorecer el desarrollo del cultivo de tomate.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, A. 1965. Patología vegetal. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. 816 p.
- Anderlini, R. (1976): El cultivo del tomate. Mundi-Prensa (España)
- Anderson, T. H. 2003 Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Ag.Ecosys.Environ.* 98:285-293.
- Anónimo. 2002. Agrobiologicals.  
<http://www.agrobiologicals.com/glossary/G1667htm>.
- Bergeys D, 1989 - 2000. Manual of the Determinative Bacteriology. Night Edition. Philadelphia 2 :540-589.
- Carlton, W. M.; Braun, E. J.; and Gleason, M. L. 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Tomato Leaves Through Hydathodes. *Phytopathology* 88:525-529.
- Chang, R. J.; Ries, S. M. and Pataky, J. K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology* 81:1276-1281.
- Chang, R. J.; Ries, S. M. and Pataky, J. K. 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology* 82:553-560.

- CNRDF-DGSV, 1999. Memorias. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Centro Nacional de Referencias Fitosanitarias, Dirección General de Sanidad Vegetal. México.
- Cronquist. A. 1984. Introducción a la botánica. 2da ed. Ed. CECOSA. México. 848 p.
- Donoso, E., Lolas, M. y Muñoz, C. 2006. Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas de importancia regional. Universidad de Talca. 32 p.
- Esquinas, J. T. y Nuez, V.F: (1995) El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa, España. 793 p.
- Fernández M. V. 1975. Introducción a la fitopatología (3° edición) Volumen II: bacterias, fisiogénicas, fungicidas, nematodos. Colecciones científicas del INTA. Impreso en los talleres gráficos I. S. A. G. -Don Bosco 4053- Bs. As.
- Filipon, Z. 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. Agriculture Ecosystems & Environment.: 88 169-174.
- García, S.R., Carrillo, A. J., Allende-Molar, R., Márquez Z. I. y Cruz-Ortega, J. 2000. Síntomas e identificación de bacterias en plantas de tomate cultivadas con alta tecnología en Sinaloa. Resúmenes del XXVII Congreso Nacional de Fitopatología. Soc. Mex. De fitopatología. L-32.
- Guillén, R.; F. Hernández; G. Gallegos; R. Rodríguez; C. Aguilar; E. Padrón; M. Reyes. 2006: «*Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile», *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(2):105-114, México, <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/612/61224204.pdf>

- Hallmann, J., Quadt-hallmann, A., Mahaffee, W. F., and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43:895-914.
- Hortalizas. 2010. Tomates de México.  
<http://www.hortalizas.com/articulo/18142/tomates-de-mexico>
- INFOAGRO (Información Agrícola, ES). 2004. Cultivo de tomate (en línea). España, Editorial Agrícola Española, S.A. Consultado 13 nov. 2006. Disponible en <http://www.infoagro.com/hortalizas/pimiento>.
- Janse J. D, 2004. Fatty acid analysis in the identification, taxonomy and ecology of (plant pathogenic) bacteria. In: Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans AD, van Elsas JD, eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York, USA: Spring Publishing, 973-982.
- Jones, J. B.; Stall, R. E. & Zitter, T. A. 1991. Compendium of tomato diseases. The American Phytopathological Society. E.U. A. 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.
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N., and Miller, T. D. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70:1078:1082.
- Koneman. E.W 2001. *Diagnostico microbiológico: Texto y atlas de color*. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Koneman. E. W. 2006. "Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology" 6°.

- Llácer, G.; López, M. M.; Trapero, A.; Bello, A. 1996. Patología vegetal. Sociedad Española de Fitopatología. Graficas Papallona. España. 592, 595 p.
- 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 bacteria de importancia cuarentenaria. Secretaria de Agricultura, Ganadería, y Desarrollo Rural. Comisión Nacional de Sanidad Vegetal Agropecuario. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Capítulo V.
- 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.
- 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.
- Nuez, F. 1999: desarrollo de nuevos cultivares. p. 626-669. In: Nuez, V.F. (Ed.) El cultivo del tomate. Edición Mundi-Prensa, España. 793 p.
- OEPP/EPPO. 2005. No. 39, Diagnostic protocol for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. – Data Sheets on Quarantine Pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35,

275-283.

- Pecsok, R. L., Shields, L. D. 1997 "Métodos Modernos de Análisis Químico". Primera impresión. Limusa. México.
- Peralta, I., S. Knapp, and D.M. Spooner. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru. Syst. Bot. 30:424-434
- Rat, B.; Poissonnier, J.; Goisque, M.J.; Burgaud, A. (1991) Le point sur le chancre bactérien. Fruit et Légumes 86, 38-40.
- Rodríguez, R.R.; Tabares, R.J.; Medina, J. 2001. Cultivo moderno del tomate. 2° Edición.
- Rodríguez, M. M. L. 1994. Manual de identificación de bacterias Fitopatógenas. UACH.Mexico.
- SAG. 2004. Declaración de Ventas de Plaguicidas, año 2004. 152 pp. [En línea]. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). <<http://www.sag.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedDta=GP1tktXdhR-JAS2Wp3v88hMmV7C%2FJUat%2B&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivold=1645>>
- Schaad, N. W; Jonas and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 5ª.Ed. APS PRESS Minnesota U.S.A. 373 p.
- 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.



- Van Venn, J. A., Oberbeek, L. S., and Elsas, J. D., 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61:121-135.
- Venegas E, Ciampi L., Collado L., Costa M., Fuentes R., Nissen J., Schobitz R., Schoebitz M. 2005. Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género *Bacillus cohn* antagonistas de cepas patógenas de *Fusarium link.* en *cala. Agro sur.* vol.33, no.2, p.1-12. Disponible: [http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-88022005000200001&lng=es&nrm=iso](http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-88022005000200001&lng=es&nrm=iso). ISSN 0304-880
- 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.
- Wulff, E.; C. Mguni; K. Mansfeld-Giese; J. Fels; M. Lübeck; H. Hockenhull. 2002.: «Biochemical and Molecular Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilis* Isolates with Distinct Antagonistic Potencial Against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*», *European Journal of Plant Pathology* 51:574-584, Holanda.
- Yuen, G. Y., Schroth, M. N., and McCain, A. H., 1985. Reduction of *Fusarium* wilts of Carnation with suppressive and antagonistic bacteria. *Plant Disease* 69:1071-1075.
- Zabaleta. M. E., 2000. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. <http://www.chapingo.mx/terra/contenido/17/3/art201-207.pdf>