

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Manejo de la Mancha Negra de *Pseudomonas corrugata* (Roberts & Scarlett) en  
Tomate con *Bacillus subtilis in situ*

Por:

**LUCERO ELIZABETH AGUILAR HERNÁNDEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Abril de 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Manejo de la Mancha Negra de *Pseudomonas corrugata* (Roberts & Scarlett) en  
Tomate con *Bacillus subtilis* *in situ*

Por:

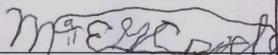
**LUCERO ELIZABETH AGUILAR HERNÁNDEZ**

TESIS

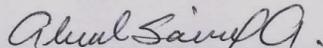
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

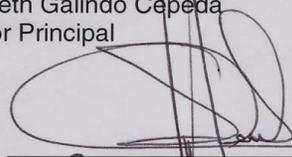
Aprobada



Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda  
Asesor Principal



M.C. Abiel Sánchez Arizpe  
Coasesor



Dr. Melchor Cepeda Siller  
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía  
Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Abril de 2015

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, Por ser mi protector en todo momento, gracias Dios por darme la fuerza necesaria y valor para seguir adelante y culminar mis estudios, de igual forma te agradezco la hermosa familia que me diste.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por abrirme las puertas y brindarme las herramientas necesarias y así culminar mi carrera Ing. Parasitólogo.

A la **Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda**, por su gran amistad, paciencia, por todos los consejos, y apoyo para realizar esta investigación, del que sin su ayuda no se hubiera realizado, Gracias por todo Dra. Elizabeth dios la Bendiga siempre.

Al **Dr. Melchor Cepeda Siller**, por su amistad, por el apoyo técnico-científico para llevar a cabo este trabajo.

Al **M.C. Abiel Sánchez Arizpe**, por ser asesor en este trabajo, por las sugerencias y aportes para el mismo, darnos las armas y consejos suficientes para salir adelante.

A todos los Profesores del Departamento de Parasitología, que me dieron clases , ya que fueron los que me formaron como profesionista, y laboratoristas por las facilidades y apoyos brindados.

Al **M.C. Epifanio Castro Del Ángel**, por su apoyo y participación en la revisión del presente trabajo.

A la **M.C. Yanis Lizet Muñoz Gonzales**, por su amistad, apoyo, y sugerencias para realizar el presente trabajo.

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

**Armando Aguilar López** y **Celia Hernández Aguilar**, a quien estoy eternamente agradecida por su apoyo incondicional en mi formación personal y educativa, por darme la vida, inculcarme buenos valores, brindarme cariño.

### **A MIS HERMANOS**

**Ubando, Héctor, Tenchi, Guille, Nely, Octavio, Ana**, gracias por los consejos y motivaciones para seguir adelante, por el apoyo brindado durante mi formación profesional y en todas las etapas de mi vida.

### **A MIS TIOS**

**Bernarda Hernández Aguilar** y **Ernesto Hernández**, gracias por su apoyo y consejos brindados para seguir adelante.

### **A MIS AMIGAS Y AMIGOS DE LA CARRERA**

Rubí Soledad, Dulce Milagros, Yasmín, Liz, Obed, Fausto, Víctor, Enrique, Lizmark, José Luis, Rudi, Ever, Leonardo, Rusver, Ervin, por compartir su amistad y buenos momentos a lo largo de la carrera.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	I
<b>DEDICATORIA</b> .....	III
<b>INDICE DE CONTENIDO</b> .....	IV
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	VII
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	VIII
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
OBJETIVO.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	5
HIPÓTESIS.....	5
<b>REVISION DE LITERATURA</b> .....	6
Origen e Historia.....	6
Importancia del Cultivo de Tomate.....	6
Enfermedades del Tomate.....	8
Enfermedades por Virus.....	8
Enfermedades Bacterianas.....	9
Enfermedades por Hongos.....	9
Descripción de las Bacterias.....	9
<i>Pseudomonas corrugata</i> .....	11
Clasificación taxonómica.....	11
Síntomas.....	12
Identificación.....	14
Pruebas de patogenicidad.....	14
Descripción de pruebas bioquímicas.....	15
Identificación Molecular.....	16
Técnicas moleculares.....	17
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	17
Identificación de Ácidos Grasos Bacterianos.....	18

Técnicas Serológicas.....	19
Control Biológico.....	22
<i>Bacillus subtilis</i> .....	23
Clasificación taxonómica.....	25
Morfología.....	25
<i>Bacillus subtilis</i> en el control biológico de enfermedades bacterianas.....	26
Aplicación de <i>Bacillus subtilis</i> en la industria.....	26
Patología.....	27
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	29
Localización del Experimento.....	29
Siembra en Almacigo de Tomate.....	29
Tutorado de la Planta.....	30
Etapa de Laboratorio.....	30
Establecimiento del Experimento.....	31
Reproducción e Incremento de la Cepa.....	31
Obtención del Inóculo.....	31
Aislamiento de <i>Pseudomonas corrugata</i> .....	33
Identificación de bacterias en tejido vegetativo (Postulados de Koch).....	33
Aislamiento de la bacteria.....	33
Caracterización Bioquímica.....	34
Tinción de Gram.....	34
Resiembra de colonias bacterianas.....	34
Descripción de pruebas bioquímicas.....	35
Prueba de oxidación - fermentación Hugh-Leiffenson.....	35
Prueba de KOH.....	36
Prueba de la catalasa.....	37
Pruebas preliminares de LOPAT.....	38
Levana.....	38
Oxidasa.....	38
Pectolisis de almidón.....	39
Arginina.....	40

Parámetros Evaluados.....	40
<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>51</b>
<b>APENDICE.....</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Síntomas de <i>Pseudomonas corrugata</i> en tallo y hoja.....	13
2. Trasplante de la plántula de tomate Dpto.Parasitología, UAAAN, 2014.....	30
3. Siembra e Identificación de la bacteria Dpto. Parasitología,UAAAN 2014.....	35
4. Comparación de medias de altura (cm) en dos fechas, de la planta de tomate tipo saladette variedad Maya Dpto. Parasitología, UAAAN 2015.....	43
5. Comparación de Medias en Peso (gr.) de Fruto de tomate saladette variedad Maya por tratamiento Dpto. Parasitología UAAAN 2015.....	44
6. Comparación de Medias en Longitud (cm) de Raíz por Tratamiento Dpto. Parasitología UAAAN 2015 .....	45
7. Comparación de Medias en Diámetro de Raíz (cm) por Tratamiento Dpto. Parasitología UAAAN 2015.....	46
8. Comparación de Medias en Peso (gr.) de Raíz por Tratamiento Dpto. Parasitología UAAAN 2015.....	47

## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Productos a base de <i>Bacillus subtilis</i> , cultivos donde se aplica, enfermedad que controla y época de aplicación.....	28
2. Tratamientos usados en el experimento.....	32
3. Resultados de las pruebas preliminares en la caracterización de <i>Pseudomonas corrugata</i> .....	42
4. Comparación de Medias y Parámetros a Considerar del Tomate Dpto. Parasitología, UAAAN 2014.....	42

## RESUMEN

El uso de *Bacillus subtilis* como control biológico es una herramienta utilizada en la agricultura orgánica, para contrarrestar el daño por microorganismos que causan enfermedades en las plantas. Este género tiene diferentes cualidades de aportación a la agricultura como, promoción de crecimiento radicular e inhibición de organismos causantes de desórdenes bióticos. Esta investigación se llevó a cabo en dos etapas una en invernadero y otra en el laboratorio, utilizando un diseño experimental completamente al azar con 5 tratamientos y 4 repeticiones. La necrosis de la médula del tomate constituye una enfermedad de gran importancia económica y amplia difusión mundial. Se menciona diferentes patógenos que están asociados a esta sintomatología entre los que se incluye a *Pseudomonas corrugata*. Para el caso de la cepa antagonista de *B.subtilis*, se utilizaron 2 cepas, una nativa y una comercial, la concentración fue  $1 \times 10^9$  UFC/ml en la escala de McFarland. Posterior a la aplicación de esta se procedió a evaluar los parámetros de altura de las plantas, peso de frutos, longitud, ancho y peso de raíz. Al final se observó que el uso de *B.subtilis* ayuda al control de *Pseudomonas corrugata*, además de incrementar el crecimiento de raíz y tallo.

Palabras clave: Control biológico, medula negra, *Pseudomonas corrugata*, *Bacillus subtilis*, *Solanum lycopersicum*.

## INTRODUCCIÓN

El tomate es una planta de la familia de las Solanáceas, cuya especie básica es *Solanum lycopersicum L.* En México, el tomate es la segunda hortaliza más importante después del chile (*Capsicum annum L.*). En 2011 fue una de las hortalizas mexicanas de mayor exportación hacia los Estados Unidos, éstas acumularon 1,800 millones de dólares, según datos de la secretaria de economía (SAGARPA 2011). Sinaloa, es el estado que se ha consolidado como el primer productor de tomate en México, cultivándose principalmente en los valles de Ahome, Culiacán y Guasave. En 2012 la superficie anual sembrada de tomate en México fue de 55,888.04 Has., la superficie cosechada fue de 55,237.38 Has., con una producción de 2, 838,369.87 Ton, con un valor superior a los 13 billones de pesos. En el Estado se siembran aproximadamente 18,623.05 Has., con una producción de 1,039,367.64 Ton, y un valor de poco más de 3 billones de pesos, lo que significa una importante fuente de empleos y divisas para esta zona (SIAP, 2013).

Hoy en día, en México existen alrededor de 20,000 Has, de tomate bajo agricultura protegida de las cuales aproximadamente 12,000 son de invernadero y las otras 8,000 corresponden a malla sombra y macrotúnel entre otras estructuras (Ponce, 2013).

Es curioso observar que gracias al cultivo de tomate, México se encuentra en el décimo lugar de productores de todo el mundo con una producción anual de 3 millones de toneladas; por otro lado, el tomate es el tercer producto más exportado

en el país y este cultivo convierte a México en el principal exportador mundial con una cifra de 1.5 millones de toneladas al año, es decir, el 50% de la producción total (Ponce, 2013).

Las plagas más comunes que atacan al cultivo de tomate son: la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), pulgones o áfidos (*Myzus persicae*), trips (*Frankiniella occidentalis*), y el minador de la hoja (*Lyriomisa sativae*) (SAGARPA, 2010). Las enfermedades más comunes son: la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), tizón temprano (*Alternaría solani*), cenicilla polvorienta (*Oidiopsis taurica*) y el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) (Gastélum *et al.*, 2012).

En México el jitomate es una de las especies hortícolas de mayor importancia debido al valor de su producción y a la demanda de mano de obra que genera el cultivo, es el principal producto hortícola de exportación (Ortega, 2010).

El tomate es un producto sumamente importante en la dieta, porque es parte de la canasta básica, capaz de prevenir diferentes cánceres, reduce el colesterol, combate infecciones, fortalece el sistema inmune, elimina el ácido úrico, aplaca el dolor artrítico y reduce el riesgo de infartos, además, es remineralizante y desintoxicante, por ser un diurético natural, lo cual es capaz de eliminar toxinas y el ácido úrico y reduce el colesterol del cuerpo (CNP, 2011).

En el Congreso Internacional de tomate realizado en México en el 2011, enfatizaron en la importancia que tiene el licopeno, producto antioxidante presente en la fruta de tomate y su importancia en consumirlo diariamente en una concentración de 10 a 15 miligramos de licopeno, en su efecto, corresponde en el consumo de dos tomates medianos por paciente.

La superficie total sembrada de tomates en México ha mostrado una tendencia a decrecer año con año desde 85,000 Has., 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 23t/ha en 1990 a 39 t/ha en 2010. Se estimó una producción de 2.2 millones de toneladas para la temporada 2010/11, asumiendo condiciones meteorológicas favorables y buenos precios internacionales (Productores de Hortalizas, 2010).

## **OBJETIVO**

Conocer la eficiencia de *Bacillus subtilis* sobre *Pseudomonas corrugata* en el cultivo de Tomate.

## **JUSTIFICACION**

La medula negra aparece en las diferentes etapas de crecimiento del tomate, por lo que no se pueden usar antibióticos para su control, ya que se consume en fresco y la residualidad de este químico afecta a los humanos por lo que se debe buscar alternativas menos contaminantes.

## **HIPOTESIS**

Se espera que *Bacillus subtilis* nativo tendrá un mejor control de la mancha negra *Pseudomonas corrugata*.

## **REVISION DE LITERATURA**

### **Origen e Historia**

El tomate es una planta nativa de América tropical, cuyo origen se localiza en la región de los Andes (Chile, Colombia, Bolivia y Perú), donde se encuentran la mayor variabilidad genética y abundancia de tipo silvestre. México está considerado a nivel mundial como el centro más importante de domesticación, es en los Estados Unidos de América donde este cultivo se empezó a comercializar hacia el año de 1953 (Valdez, 1993).

### **Importancia del Cultivo de Tomate**

Con base a la superficie dedicada al cultivo y al valor de producción, el tomate o jitomate (*Solanum lycopersicum L.*) es la hortaliza número uno en el mundo y la más cultivada en sistemas hidropónicos e invernaderos. El área de cultivo de tomate se ha incrementado en 38% y la producción en 42% en los últimos 10 años (Labate, 2007).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), indica que a nivel mundial los principales países productores de jitomate son: China, Estados Unidos, Turquía e India, de los cuales el mayor es China. En México, las regiones productoras de tomate con mayor superficie sembrada se localiza en los estados de Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Morelos, Michoacán, Nayarit, Sonora, Puebla, Jalisco, entre otros.

El tipo de tomate dependerá del propósito del consumo y del mercado de destino; ya que podemos clasificarlo en tomate de mesa o ensalada y tomate de pasta, industrial o de cocina. Dependiendo de cuál tipo de tomate seleccionemos, la variedad deberá de cumplir con los requerimientos que el mercado demande ya sea tomate saladette, bola o cherry, siendo características tales como: buena firmeza, buen porcentaje de sólidos solubles, resistencia al manipuleo y al transporte etc. (Corpeño, 2004).

Además de su importancia económica recientemente el consumo de tomate a demostrado ser benéfico para la salud, debido a su contenido de fotoquímicos como el licopeno y el B-caroteno, flavonoides, vitamina C y muchos nutrientes esenciales (Beutner, 2001).

Algunas variedades de tomate contienen altas cantidades de flavonoides, principalmente quercitina (Crozier *et al.*, 1997). Los flavenoles y flavonas son de particular interés como antioxidantes, tienen un alto potencial para la captación de radicales libres. El consumo de los alimentos que les contengan reduce los riesgos de contraer cáncer (Kaur y Kapoor, 2001).

La planta de tomate fue aceptada durante mucho tiempo en Europa como ornamental, dado que se le creía que era venenosa, por su relación con las plantas de la familia solanáceas, como el beleño, la belladona, entre 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 este 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 (Rodríguez *et al.*, 2001).

### **Enfermedades del Tomate**

La planta de tomate se ve afectada por varias enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos. Estas enfermedades se pueden presentar con mayor facilidad en los cultivos con alta densidad de plantas.

#### **Enfermedades por Virus**

Virus del bronceado del tomate (TSWV), Fig.1 Virus del mosaico del pepino (CMV), Virus Y de la patata (PVY), Virus del rizado amarillo del tomate (TYLV), Virus del mosaico del tomate, Virus del enanismo ramificado del tomate (TBSV).

## **Enfermedades Bacterianas**

Chancro bacteriano del tomate. Causada por *Clavibacter michiganensis*. subsp *michiganensis*

Mancha negra del tomate. Causada por *Pseudomonas syringae* p.v. *tomato*.

Roña o sarna bacteriana. Causada por *Xanthomonas vesicatoria*.

Podredumbre blanda. Causada por *Pectobacterium carotovorum*

## **Enfermedades por Hongos**

Oidiopsis. Causado por *Leveillula taurica*

Podredumbre gris. Causado por el hongo *Botrytis cinerea*

Mildiu. Causado por *Phytophthora infestans*

Marchitez vascular. Causado por *Fusarium oxysporum*.

## **Descripción de las Bacterias**

Las bacterias fitopatógenas causan enfermedades en plantas cultivadas y producen anualmente cuantiosas pérdidas en todos los países de la Unión Europea (UE), incluida España. Sin embargo, los estudios sobre estas bacterias y las enfermedades que producen se iniciaron en España más tarde en otros países europeos. (López, 2009).

En 1920, E.F. Smith, Considerado como el padre de las bacterias fitopatógenas, en su libro “Bacterial diseases of plants”, describió las enfermedades conocidas en distintos países. Esta ausencia de información sobre las bacteriosis en España continuó hasta finales de la década de los 60, ya que fueron escasos los trabajos publicados sobre estas enfermedades (López, 2009).

La prevención es el mejor remedio para el control de las bacterias fitopatógenas, ya que los tratamientos químicos disponibles y autorizados se reducen en la práctica sólo a los productos cúpricos, cuya eficacia es generalmente mediana, ya que actualmente la legislación de la Unión Europea (UE) prohíbe la utilización de antibióticos en agricultura, a pesar de su demostrada eficacia, debido a los posibles riesgos de transferencia horizontal de genes de resistencia. (López, 2009).

Los métodos de lucha preventiva frente a las bacterias fitopatógenas son múltiples, pero se basan esencialmente en:

- a) la aplicación de técnicas de diagnóstico sensibles y específicas que permitan detectar las bacterias en el material vegetal.
- b) el análisis de las características de las cepas de cada especie y su comparación molecular con las de otros orígenes.
- c) el conocimiento de las fuentes de inóculo y los reservorios de cada bacteriosis en nuestras condiciones.

d) el estudio de las estrategias de supervivencia de las bacterias fitopatógenas en distintos hábitats.

e) el uso de tratamientos preventivos, entre los que destaca el control biológico.

***Pseudomonas corrugata*** (Necrosis de la medula)

**Tipo de plaga:** Bacteria

**Hospederos:** Tomate

#### **Clasificación taxonómica Según Jansen (2004)**

**Dominio:** Bacteria

**Phylum:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Pseudomonadales

**Familia:** Pseudomonadaceae

La “necrosis de la médula del tomate” constituye una enfermedad de gran importancia económica y amplia difusión mundial. Ha sido mencionada en asociación con diferentes patógenos bacterianos, entre los que se incluyen *Pseudomonas corrugata* (Scarlett *et al.*, 1978).

La necrosis de la médula del tomate provocada por *Pseudomonas* spp., se ha difundido en la Argentina coincidentemente con la adopción masiva de cultivares híbridos de tomate conducidos bajo cobertura plástica (Alippi *et al.*, 1993).

El control de la necrosis de la médula del tomate presenta dificultades debido a que el patógeno se sitúa en tejidos internos poco accesibles a la acción de antibióticos. Las recomendaciones para el manejo de la enfermedades restringen a la adopción de prácticas culturales tendientes a reducir la dispersión del patógeno y la susceptibilidad del hospedante (Blancard, 1990).

### **Síntomas**

En el cultivo de Tomate, *Pseudomonas corrugata* ataca a cultivos bajo cubierta y excepcionalmente, a los cultivados al aire libre en tiempo nublado y muy húmedo. Ataca a los tallos, en los que produce estrías y ahuecamiento con ennegrecimiento de la médula Figura N.3. A veces presentan resquebrajaduras y proliferación de raíces adventicias. Las hojas presentan clorosis y necrosis. Los daños se inician a partir de los primeros ramilletes florales (Miltidieri, 2005).



**Figura 1:** Síntomas de *Pseudomonas corrugata* en tallo y hoja. (Dick y Elad 1999).

Esta bacteriosis es transmitida por el agua de riego, ya que la bacteria se conserva en el suelo. Las grandes diferencias de temperatura entre el día y la noche predisponen al cultivo a la enfermedad. Los primeros síntomas de esta enfermedad se manifiestan en plantas con los frutos aun verdes, las hojas más jóvenes se muestran cloróticas y el extremo del tallo pierde turgencia en las horas de más calor del día.

Los síntomas más típicos son la aparición de manchas oscuras en el tallo que pueden llegar a ser muy extensas. La necrosis superficial aparece con frecuencia de forma muy característica en la parte superior de los peciolo. Las plantas afectadas suelen emitir raíces adventicias. En el interior de los tallos la enfermedad produce la degradación de la medula. Desde el frente de avance que suele ser nítido, se observa como el tejido medular se oscurece más o menos intensamente, adquiere un aspecto acuoso y posteriormente se pudre, se reabsorbe y se seca, quedando la medula hueca. Los vasos se oscurecen aunque la necrosis medular puede ocasionar

la muerte de las plantas, si las condiciones ambientales evolucionan favorablemente, se recuperan y completan su desarrollo (Catara *et al.*, 2000).

## **Identificación**

Aunque las colonias de *P. corrugata* pueden ser muy variables e inestables, suelen presentar en (LPGA; levadura-peptona-glucosa-agar) una forma rugosa muy peculiar de la que deriva el nombre de la bacteria y produce un pigmento amarillo difusible. *P. corrugata* es oxidasa (+), catalasa (+) y Gram (-); PHB (+), reducción de nitratos (+). Hugh-Leiffenson (oxidativo), levana (-), patata (-) y utilización de D-arabinosa (+) (esta última prueba diferencia a *P. corrugata* del resto de las *Pseudomonas* patógenas) (Catara *et al.*, 2000).

Existen cebadores para su detección específica mediante PCR cebadores D21 y D22.

## **Pruebas de patogenicidad**

Para realizar la prueba de patogenicidad, es necesario seleccionar un método de inoculación adecuado al hospedante, lo cual dependerá del tipo de síntoma, órgano o tejido afectado, además para tratar de reproducir los síntomas típicos, en nivel de invernadero, también se deben de considerar las condiciones ambientales que permiten la manifestación de los síntomas en el campo. Es preciso señalar que para realizar estas pruebas es necesario que los cultivos bacterianos estén puros y no

tengan mucho tiempo de haberse sembrado en medios de cultivo ya que se podría correr el riesgo de que pierdan su virulencia (Rodríguez *et al.*, 2001).

Para verificar el poder patógeno de los aislados, inyectar una suspensión bacteriana (aproximadamente  $10^7$  ufc/ml) en la medula de plantas sanas de tomate. Incubar a 27-30°C y alta humedad relativa y tras unos 7 días, evaluar el poder patógeno de los aislados comparando el estado de las plantas inoculadas con el de las plantas testigo inyectadas con agua estéril (Catara *et al.*, 2000).

### **Descripción de pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2-6h; en general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales modificadas (hay discos o tabletas

comercializados con sustratos cromogénicos para uso individualizado) (Gobernado y López, 2003).

### **Identificación Molecular**

Los métodos del análisis de huellas de ARN permiten investigar completamente las diferencias de los genomas (polimorfismos) esto se debe a las mutaciones que se crean o destruyen sitios de unión para sondas o sitios de unión para moléculas iniciadoras (como caso de amplificación de huellas).

Las técnicas para la obtención de huellas del ADN, permiten detectar las diferencias en la expresión de los genes, que *a priori* no vienen acompañados de mutaciones. La presencia de una molécula de ARN en la célula, tiene su origen en una cascada de señales complejas que permiten a su vez un ensamblaje también complejo de factores de transcripción y subunidades de ARN polimerasa en secuencias específicas de un promotor, con la subsecuente transcripción del gen adyacente; pero con este gen no siempre está activo (transcrito y expresado) por lo que puede encontrarse pasivo si es necesario (Valadez *et al.*, 2000).

## Técnicas moleculares

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente. La reacción en cadena de la polimerasa fue perfeccionada por Kary Mullis perteneciente a la Cetus Corporation en California, en la década de 1983.

Inicialmente la técnica era lenta, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura y era necesario agregar nuevas polimerasas en cada ciclo. Puesto que las temperaturas del ciclo (95 °C en las fases de desnaturalización del ADN) suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína, se emplean ADN polimerasas termoestables, extraídas de microorganismos adaptados a vivir a esas temperaturas, restrictivas para la mayoría de los seres vivos. Dichos microorganismos, generalmente arqueas, son: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy procesivas (Taq) con otras capaces de hacer corrección de errores (Pfu, Vent) (Bartlett & Stirling 2003).

Hoy, todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la

temperatura necesaria para cada etapa de la reacción. Muchos termocicladores modernos hacen uso del efecto Peltier, que permite tanto calentar como enfriar los tubos simplemente invirtiendo la corriente eléctrica. Los tubos usados para PCR tienen una pared muy fina, lo que favorece una buena conductividad térmica, permitiendo que se alcance rápidamente el equilibrio térmico. Casi todos los termocicladores tienen un sistema que calienta la tapa de cierre con el fin de evitar la condensación sobre los tubos de reacción. Los termocicladores más antiguos carecían de este sistema y solucionaban el problema de la condensación con una capa de aceite en la parte superior de la mezcla de reacción o con un poco de cera dentro de los tubos (Bartlett & Stirling 2003).

Por lo general, la PCR es una técnica común y normalmente indispensable en laboratorios de investigación médica y biológica para una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y test de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas (Bartlett & Stirling 2003).

### **Ácidos grasos Bacterianos**

El metabolismo de ácidos grasos es un componente fundamental del metabolismo celular. Los ácidos grasos son esenciales en la elaboración de bloques de fosfolípidos de la membrana. La necesidad para precisar la estructura de ácidos

grasos es importante para entender aspectos relacionados con la biosíntesis y para incrementar su taxonomía (Lambert *et al.*, 1983). Para la determinación de ácidos grasos bacterianos por cromatografía de gases hay que tener en consideración ciertos aspectos. En primer lugar, si se quiere realizar un análisis cuantitativo de los ácidos grasos hay que tener en cuenta el medio que se utilizó para su crecimiento, porque puede inducir a errores por los ácidos grasos que el medio contiene (Lambert *et al.*, 1983). Existen ciertos factores puntuales que influyen el contenido de ácidos grasos y son acetato, glicerol, carbohidratos, lípidos y sustancias nitrogenadas presentes en el medio, oxígeno suplementario, pH y tiempo del cultivo (Edward, 1964).

### **Técnicas Serológicas**

El uso de inmunoensayos en la detección de patógenos de plantas ha sido rutinario en los últimos años, entre los más usados están:

Método por aglutinación: Consiste en hacer reaccionar cantidades equivalentes de los reactantes (Ag y Ac). La formación de gránulos aglutinados o agregados indican una reacción positiva. Las reacciones de aglutinación son menos específicas pues tienen la desventaja de depender grandemente de los factores físicos químicos, tales como, concentración de electrolitos, pH, temperatura y tiempo (Clark, 1981 y Millar, 1988).

Método por precipitación: Pueden ser en medios líquidos o en geles. Estos métodos han demostrado tener una notable eficacia para individualizar y purificar los antígenos dotados de diferencias particulares. La unión del Ag y Ac se traduce por la formación de un precipitado insoluble con la condición que los reactivos se encuentren a concentración equivalente.

Método del látex: Está basado en la prueba de aglutinación. Los Ac son adheridos a partículas de látex. Al enfrentarse el látex sensibilizado con el Ag específico se produce la agregación entre estas esferas y los Ag. Esta prueba ha sido usada principalmente en Virología, en Bacteriología. El método es de 100 a 1000 veces más sensible que una aglutinación normal, la reacción aparece más rápida, generalmente no es necesario microscopio para observar la reacción, se necesita muy poco inmunosuero, no requiere la clarificación de la savia (Clark, 1981 y Millar, 1988).

Técnica de Inmunofluorescencia: Esta técnica se basa en la conjugación de anticuerpos específicos con moléculas teñidas con productos, ejemplo, la fluoresceína, que produce un color verde amarillento. Es muy sensible para identificar bacterias fitopatógenas y útil para analizar un gran número de muestras. La técnica de inmunofluorescencia permite identificar un antígeno con la ayuda de un inmunosuero conocido, e investigar y titular un anticuerpo con la ayuda de un antígeno conocido (Clark, 1981 y Millar, 1988).

Técnica inmunoenzimática ELISA: El ensayo se basa en la interacción específica de un antígeno (patógeno) y un anticuerpo (proteínas inmunoglobulinas producidas en un vertebrado superior, usualmente conejos).

La reacción se visualiza a través de la acción de un conjugado enzimaanticuerpo sobre un sustrato. Es un método rápido de gran sensibilidad, especificidad y bajo costo, que supera a muchas técnicas de diagnóstico empleadas con anterioridad.

Existen diferentes variantes de la técnica de ELISA, todas basadas en el mismo principio. El tipo de técnica y anticuerpo a emplear dependerá del objetivo de la aplicación (campo, laboratorio), tipo de muestra (suelo, agua tejido) y nivel de sensibilidad y rapidez requerida. La técnica ELISA con sándwich de doble anticuerpo es una de las más empleadas, en este caso el antígeno es ubicado entre dos anticuerpos específicos, el de captura y el de marcaje, este último está conjugado a una enzima y puede cuantificarse en el espectrofotómetro. Esta técnica es de gran utilidad en la detección de patógenos de mezclas complejas, tales como, suelo, extractos de plantas (González, *et al.*, 1999).

Las técnicas de inmunodetección han sido usadas en la detección de microorganismos fitopatógenos, principalmente virus y bacterias y en menor escala para hongos. Una aplicación importante se ha encontrado en los estudios de taxonomía de microorganismos, la fisiología de la enfermedad y la ecología de los patógenos. Con el empleo de estas técnicas se pueden establecer estrategias de

manejo de patógenos, como la certificación de semillas o fijación de cuarentenas (González, *et al.*, 1999).

Las técnicas serológicas ELISA- Inmunofluorescencia además de ser métodos muy confiables y sensibilidad moderada tiene la ventaja de poder asimilar gran cantidad de muestras en algunas horas y los resultados positivos y sospechosos se confirman mediante la prueba de patogenicidad (González, *et al.*, 1999).

### **Control Biológico**

El control biológico es el uso de elementos de la naturaleza en la regulación de poblaciones de especies dañinas al hombre, como son las plagas y enfermedades de la agricultura, las malezas. Los fundamentos de este tipo de control son aquellos que regulan los ciclos naturales de las poblaciones, las relaciones biológicas y abióticas entre especies y las relaciones ecológicas, donde se trata de promover el restablecimiento del equilibrio natural de un ecosistema (Gerhardson, 2002).

Se define como el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Gerhardson, 2002).

El uso de control biológico es una de las herramientas utilizadas en la agricultura orgánica para contrarrestar el daño por microorganismos causantes de enfermedades en plantas, por tal motivo se ha diversificado su medio de aplicación (Parasitoides, Hongos, Bacterias, Nematodos, etc.).

Los métodos de control biológico son utilizados para proteger directamente a las plantas de los patógenos (Toledo, 2004).

El control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

Hay que tener en cuenta que su uso ha tenido significados diferentes a lo largo del tiempo; así, los fitopatólogos han tendido a usar el término para denotar métodos de control que incluyen rotación de cultivos, alteraciones del pH del suelo, uso de enmiendas orgánicas, etc.

Otros investigadores diferencian un control biológico clásico del control biológico moderno donde se incluyen las técnicas de control por interferencia. Sin embargo, la definición más aceptada en la actualidad es la que han utilizado tradicionalmente los entomólogos: Es un método agrícola de control de plagas (insectos, ácaros, malezas, enfermedades de las plantas, etc.) que usa depredadores, parásitos, herbívoros u otros medios naturales. Puede ser un componente importante del control integrado de plagas y es de gran importancia económica para la agricultura (Gerhardson, 2002).

### ***Bacillus subtilis***

Históricamente, *B. subtilis* era un término dado a todos los bacilos aeróbicos que forman endosporas, este organismo fue una de las primeras bacterias estudiadas, y fue nombrado *Vibrio subtilis* en 1835 y renombrado *Bacillus subtilis* en el año 1872.

Fue descubierta accidentalmente por soldados alemanes durante la 2<sup>a</sup> Guerra Mundial, debido al gran número de muertes en soldados por disentería, tras estudios se descubrió esta bacteria en estiércol de camello.

Estos microorganismos se han estudiado desde hace muchos años con fines industriales y agrícolas (Nelson, 2004).

En este último caso, se han demostrado las potencialidades de las especies del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica de nitrógeno (Chen, *et al.*, 2006).

Es una Gram-positiva aeróbica, Una característica que ha atraído un gran interés en *B. subtilis* es su capacidad de diferenciarse y formar endosporas. Sus esporas son resistentes a factores ambientales como el calor, el ácido y la sal, y que pueden persistir en el ambiente por largos períodos de tiempo; antes de la decisión de producir la spora de la bacteria podría llegar a ser móviles, a través de la producción de flagelos, y también tener el ADN del medioambiente mediante el sistema de competencia. (Koneman, 2001).

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 el ciclo del carbón y en nitrógeno. Son habitantes comunes de aguas frescas y estancadas, son particularmente activos en sedimentos (Koneman, 2001).

Comúnmente su hábitat la encontramos en el suelo, y la descomposición de residuos vegetales, produce una variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar una variedad de sustratos naturales y contribuir a los ciclos de nutrientes.

## **Clasificación Taxonómica según Jansen (2004).**

**Reino:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Bacillales

**Familia:** Bacillaceae

**Género:** *Bacillus*

**Especie:** *subtilis*

## **Morfología**

Respecto a su morfología macroscópica; *B. subtilis*, presenta colonias con las siguientes características: Tamaño: mm, Superficie: secas, Cromogénesis: marrón o verde, Transparencia: opaca, Forma: irregular y Borde: ondulado.

Cuando se cultivan en caldo tienen una película coherente.

En cuanto a su microscopia son bacilos Gram-positivos y de largo con un diámetro <0,9 micras.

## ***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 (Donoso, 2006).

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, 2006).

## **Aplicación de *Bacillus subtilis* en la industria**

Es una bacteria que se utiliza como fungicida para semillas de flores y ornamentales, y en semillas de productos agrícolas, semillas de algodón, hortalizas, maní y soja. La bacteria coloniza el sistema radicular de la planta en desarrollo y por lo tanto compite con determinados organismos de la enfermedad por hongos.

Se utilizan en la producción comercial de enzimas extracelulares, como *B. amylo liquefaciens* alfa-amilasa.

## Patología

Se considera un organismo benigno, ya que no poseen rasgos que causan enfermedades. No se considera patógeno o tóxico para los seres humanos, animales o plantas. El riesgo potencial asociado con el uso de esta bacteria en las instalaciones de fermentación es bajo (Castro, 2010).

Produce una toxina extracelular conocido como subtilisina. Aunque subtilisina tiene propiedades toxigénicas muy baja, este compuesto proteínico es capaz de causar reacciones alérgicas en individuos que están expuestos repetidamente a la misma (Castro, 2010).

Es antagónica hacia muchos hongos patógenos de plantas. Este antagonismo se puede lograr de varias maneras incluyendo la competencia de nutrientes, la exclusión de sitios, la colonización, y el acoplamiento de las bacterias al hongo patógeno.

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, 2006).

**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 pv. Syringae</i> )	100 g/ha	Aplicación con 25, 75 y 100 de caída de hojas a pleno invierno. Puntas verdes y plena flor.
Vid	Putridión acida ( <i>Acetobacter sp.</i> )	3 kg/ha (en cada aplicación)	Aplicar en verano y pre cosecha (mojamiento 600-800 l).
Tomate	Mancha bacteriana ( <i>Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria</i> ) Cancro bacterial ( <i>Clavibacter michiganensis subsp michiganensis</i> ) Peca bacteriana ( <i>Pseudomonas syringae pv. Tomato</i> )	300 g/ha (preventivo)  500 g/ha (curativo)	En almacigo, trasplante y posterior a cualquier labor que genere heridas. Aplicación foliar en almacigo y posterior a trasplante, amarra primer desbrote y aplicación de hormonas (después de cualquier labor que genere heridas). Luego solo 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 pv. Syringae</i> )	200g/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 600l/ha.
Kiwi	Bacteriosis del kiwi ( <i>Pseudomonas syringae</i> )	150 g/ha, 15 g/l	Aplicación como aspersion, según síntomas, mojamiento de aplicación sobre cortes de poda y/o heridas.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Localización del Experimento**

El presente trabajo se estableció en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila de Zaragoza, México, en el invernadero de Parasitología. Para el establecimiento de la plántula de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) se llevó acabo en dos etapas una que comprendió las actividades efectuadas en invernadero (etapa de campo) y otra de las actividades que se dio seguimiento se llevó acabo en el laboratorio (etapa de laboratorio).

### **Siembra en Almacigo de Tomate Saladette**

El día 19 de Febrero del año 2013 se procedió a sembrar en almacigo el tomate saladette variedad maya con sustrato certificado libre de patógenos, en charolas de 96 cavidades, El día 08 de mayo de 2013 se realizó el trasplante de 25 plántulas para próximamente realizar la inoculación con 5 repeticiones, el trasplante se llevó acabo en bolsas de polietileno de color negro de 5 Lt., de capacidad, con sustrato peat-moss hasta su máxima capacidad de contenido, una vez llenas se procedió al trasplante, colocando una plántula por unidad, posteriormente las bolsas se colocaron en hilera y se les dio un riego con fertilizante a base de algas marinas, aminoácidos, y fosforo con el fin de nutrir a la plántula.



Figura 2: Trasplante de la plántula de tomate UAAAN, 2014

### **Tutorado de la planta**

A los 15 días del trasplante las plantas de tomate presentaron desarrollo vegetativo, posteriormente se procedió a hacer el tutoreo y sostenimiento de la planta, sujetándola con rafia de la parte baja del tallo y haciendo un amarre de sostenimiento a los alambrones de la casa sombra colocados para este fin.

### **Etapa de Laboratorio**

La etapa de laboratorio se llevó a cabo en el laboratorio de fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

## **Establecimiento del Experimento**

Para llevar a cabo este experimento se realizaron cinco tratamientos: testigo absoluto, diluciones con cepa de *Bacillus subtilis* nativo, dilución con cepa de *Bacillus subtilis* comercial, testigo comercial (bactericida), bacteria pura; con cuatro repeticiones cada uno y haciendo un experimento completamente al azar.

## **Reproducción e Incremento de la cepa**

Las cepas seleccionadas se reprodujeron masivamente en caldo nutritivo utilizando 2.0 L, 1.0 L para cada tratamiento (*Bacillus* comercial y *Bacillus nativo*.) a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml en la escala de McFarland, pasando 48 hrs., el inóculo está listo para ser aplicado a las plantas. Las suspensiones de *B. subtilis* se aplicaron a cada tratamiento haciendo una aplicación a la raíz de la planta de tomate con ayuda de una jeringa, la dosis fue de 5 mililitros por planta.

## **Obtención del Inoculo**

Se realizó un muestreo en los invernaderos de la universidad, para localizar plantas de tomate con síntomas de mancha negra para aislar el patógeno.

Se realizó la siembra del tejido con síntomas de mancha negra en medio de cultivo B-King, se incubo a 25 °C y a las 48 horas se realizaron las pruebas bioquímicas para caracterizarla.

Estas cepas se incrementaron en KB para así tener suficiente inóculo. La aplicación de *Pseudomonas* fue por aspersión a la raíz de las plantas con una dosis de 5 ml/planta, además de hacer una aplicación más en los entrenudos de las mismas con una jeringa de insulina (100 µn).

### Tratamientos a evaluar

Se usaron 5 tratamientos, 2 de *Bacillus subtilis*, un testigo absoluto al que no se le aplico el patógeno y el organismo de control biológico, así como un testigo comercial químico estreptomicina, oxitetraciclina y oxiclورو de cobre ( Ultramyl 500) Cuadro 2.

**Cuadro 2: Tratamientos usados en el experimento**

Tratamientos	Descripción	Dosis del producto	<i>Pseudomonas</i>
1	Testigo Absoluto	0	Sin bacteria
2	<i>Bacillus subtilis</i> nativo	5 ml, 2 aplicaciones 1x10 <sup>9</sup> UFC/ml	5ml, 1x10 <sup>6</sup> UFC/ml
3	<i>Bacillus subtilis</i> Comercial	5 ml, 2 aplicaciones 1x10 <sup>9</sup> UFC/ml	5ml, 1x10 <sup>6</sup> UFC/ml
4	Bacteria pura	10 ml agua	5ml, 1x10 <sup>6</sup> UFC/ml
5	Testigo comercial (bactericida)	10 ml, 2 aplicaciones 60 gr./100 L de agua.	1x10 <sup>6</sup> UFC/ml

## **Identificación de bacteria en tejido vegetativo (Postulados de Koch)**

### **Aislamiento de la bacteria**

Para realizar el aislamiento se desinfectaron trozos del tallo de la planta enferma para observar las lesiones de la medula, se separó el follaje del fruto, seleccionando tejido sano y enfermo, el cual fue lavado con agua de la llave, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y lavado con agua destilada estéril, se maceraron y posteriormente se usaron para las primeras tres diluciones ( $10^{-1}$  - $10^{-2}$ - $10^{-3}$ ); que inicialmente tenían 9ml de agua destilada estéril y un ml de solución bacteriana; de ahí se realizó 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 las medidas asépticas en la cámara de flujo laminar y fue incubada a 28°C por 3 días, a partir de los cuales se diferenciaron por sus características morfológicas correspondientes a *Pseudomonas corrugata*.

## **Caracterización Bioquímica**

### **Tinción de Gram**

Se realizó un frotis, colocando una gota de agua en el porta objetos, se tomó una porción de colonia con el 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 dejó decantar, se lavó con agua corriente, y se dejó 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, la forma de acomodo y tipo de las células. Posteriormente se resiembra para tener inóculo suficiente.

### **Resiembra de colonias Bacterianas**

La resiembra de colonias bacterianas se realizó con medidas asépticas mediante el uso de una asa bacteriológica, debidamente flameada para evitar la contaminación, la resiembra se hizo por estrías en medio KB, se incubó a 28°C por 3 días que fue cuando se realizaron las primeras pruebas; tinción de Gram, prueba de RYO.



Figura 3: Siembra e Identificación de la bacteria UAAAN 2014.

## **Descripción de pruebas bioquímicas**

### **Prueba de Oxidación-fermentación Hugh- Leiffenson**

Esta prueba se realiza para la determinación del metabolismo oxidativo o fermentativo de los carbohidratos.

Medio de cultivo

Medio base de Hugh- Leiffenson

Triptona 10,0 g Extracto de levadura 1,0 g Púrpura de Bromocresol 0,04 g Agar 2,0 g Agua destilada 1000,0 ml, Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) por 15 minutos. Vaciar el contenido en tubos, 9 ml por tubo. Agregar la solución de glucosa al 10% esterilizada por filtración.

### **Procedimiento**

Para cada microorganismo a identificar, se inoculan por punción dos tubos de medio. En uno de los dos tubos se cubre la superficie con parafina estéril para crear condiciones de anaerobiosis. Se incuba a 35°C.

### **Resultados**

La producción de ácido se evidencia por el cambio de color de púrpura a amarillo. Los microorganismos fermentadores producen ácido en ambos tubos, los microorganismos oxidativos (respiradores) sólo lo producen en el tubo sin parafina.

## **Prueba de KOH**

Para determinar si las colonias bacterianas aisladas correspondían a los grupos Gram positivo o Gram negativo se realizó una prueba con KOH al 3%. Esta prueba consistió en tomar una asada de la colonia bacteriana de 24 horas de edad y se mezcló, con 10µl de KOH en un portaobjetos; Las bacterias se mezclaron con movimiento rotatorio durante diez segundos con un asa bacteriológica; la mezcla se levantó ligeramente con el asa y se observaron los siguientes parámetros:

- a) La formación de un hilo lechoso indicaba la presencia de una bacteria Gram negativa.
- b) Si el hilo lechoso no se formaba, indicaba que se trataba de una bacteria Gram positiva (Powers, 1995).

## **Prueba de la Catalasa**

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo.

Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. El principal objetivo de esta prueba es separar Micrococacceae (positiva) de *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. (Negativa) (Cortés, 2002).

Originariamente, esta prueba era utilizada para diferenciar entre los siguientes géneros:

- *Streptococcus* (-) de *Micrococcus* (+) y/o *Staphylococcus* (+).
- *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-).
- *Lysteria monocytogenes* (+) y/o *Corynebacterium* (+, con las excepciones de *C.pyogenes* y *C.haemolyticum*, ambos -) de *Erysipelothrix* (-)

Una prueba de rutina de la catalasa a temperatura ambiente puede hacerse siguiendo esta técnica:

#### **Método del tubo de ensayo:**

- Agregar 1ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% directamente a un cultivo puro de agar en slant densamente inoculado.

Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo) (Cortés, 2002).

#### **Pruebas Preliminares de LOPAT**

##### **Prueba levana**

La levana-sacarosa es un polisacárido y que se encuentra presente en algunas especies de bacterias fitopatógenas y es capaz de producir el polisacárido levana , siempre y cuando dichas bacterias se encuentran en un medio de cultivo que tenga sacarosa (Schaad *et al.*, 2001).

- Con el asa bacteriológica sembramos una bacteria por estría cruzada en forma de puntos discretos sobre la superficie del medio para producción de la levana.

- Se Incubo a 28 °C durante 24 -28 horas hay que tener cuidado que la cajas queden hacia arriba.
- Después del período de incubación, se determinó la elevación y consistencia de las colonias bacterianas, si son pulvinadas o mucoides la prueba será positiva, si no es así se considera negativa.

### **Prueba de oxidasa**

La oxidasa es una enzima pigmento que se encuentra presente en las especies de *Pseudomonas flourescens* grupo *Flourescentes* y en las *Pseudomonas* saprofiticas a diferencia de las *Pseudomonas flourescentes* grupo *Syringae* que carece de ella.

- En una tira de papel filtro se adiciono una o dos gotas de solución acuosa al 1 % de N, N, dimetil para fenilen diamina. Inmediatamente después y con ayuda de una varilla de vidrio o asa de platino, depositar sobre el reactivo un poco de crecimiento bacteriano de preferencia sembrado en medio B de King
- Si al cabo de 10 segundos, el crecimiento bacteriano adquiere una coloración rosa, o roja la prueba es positiva. Si no se presenta tal coloración la prueba será negativa.

### **Pectolisis de almidón**

El almidón es un polímero de glucosa, ampliamente distribuido en el reino vegetal como sustancia de reserva. Ciertas bacterias fitopatógenas *Xanthomonas* en su

mayoría son capaces de despolarizar el almidón por medio de enzimas extracelulares, conocidas como  $\alpha$  y  $\beta$  amilasas, las cuales hidrolizan el almidón de la maltosa (Schaad, *et al.*, 2001).

- En el medio de cultivo de almidón se sembró la bacteria y se incubó a 28 °C durante 4 días.
- Después de este periodo se adicionó unas gotas de solución de lugol sobre el cultivo bacteriano y se observó los cambios que se presentan
- Si después de adicionar el lugol se forma un halo transparente por abajo o al rededor del crecimiento bacteriano, se consideró la prueba positiva.
- Cuando todo el medio de cultivo adquiere una coloración morada significa que el almidón no ha sido degradado y por lo tanto es negativa.

### **Prueba de arginina**

La deshidrolasa de arginina es una enzima que se encuentra presente en la especie del género *Pseudomonas*. El complejo enzimático está constituido por las enzimas arginina desaminasa y la citrolina ureidasa. La primera metaboliza la arginina a citrolina y  $\text{NH}_3$  y la segunda, transforma la citrolina en ornitina  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  (Schaad, *et al.*, 2001).

- A partir de el cultivo bacteriano se inoculó por picadura 2 de los tres tubos con medio de cultivo.

- Se introdujo el asa recta previamente flameada al tubo no inoculado con la bacteria.
- Se adiciono 1 ml aproximadamente de aceite mineral estéril a cada uno de los tubos.
- Se incubo a 28 °C durante 72 horas.
- Si la bacteria presento la arginina desaminasa y la citrulina ureidasa, en el medio de cultivo se acumulara  $\text{NH}_3$ , el cual se alcalinizo, provocando que el indicador rojo de fenol cambio del color rosa al violeta, por lo que la prueba será positiva.

### **Parámetros Evaluados**

Los cuales se analizaron con un diseño experimental completamente al azar.

Tratamientos	Altura de la Planta cm.	Peso de Fruto gr.	Long. De Raiz cm.	Ancho de Raiz cm.	Peso de Raiz cm.
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5
1					
.					
5					

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 4 charolas sembradas de tomate saladette de la variedad maya, el resultado obtenido fue la germinación de 2 charolas, siendo las otras dos afectadas por la helada del día 30 de marzo de 2013.

Durante el desarrollo del cultivo las plagas que se presentaron fueron: mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), araña roja (*Tetranychus urticae*), las cuales fueron controladas con un repelente orgánico a base de extracto de ajo en las primeras etapas, posteriormente se realizó 2 aplicaciones de Imidacloprid a una concentración de 1 ml/L de agua con un intervalo de aplicación de 5 días. Las enfermedades que se presentaron: *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*.

### **Caracterización de la bacteria**

De los tejidos que presentaron los síntomas de mancha negra que aparecen en el Cuadro 3. que corresponden a *Pseudomonas corrugata* donde los resultados obtenidos fueron tal y como lo menciona (Schaad *et al.*, 2001).

**Cuadro 3:** resultados de las pruebas preliminares en la caracterización de *Pseudomonas corrugata* de acuerdo a (Schaad *et, al.*, 2001).

PRUEBA	LITERATURA	CEPA
Tinción de Gram	Negativo ( - )	Negativo ( - )
Catalasa	Positivo ( + )	Positivo ( + )
Hugg – Leiffenson	Positivo ( +/- )	Positivo ( + )
Levana	Negativa ( - )	Negativa ( - )
Oxidasa	Positivo ( + )	Positivo ( + )
Pectolisis Almidón	Positivo ( + )	Positivo ( + )
Arginina	Negativo ( - )	Negativo ( - )

De acuerdo a los resultados obtenidos y comparandolos con Schaad, et al. (2001). *Pseudomonas corrugata* es un bacilo Gram (-), no aprovecha levana y arginina y positivas las pruebas Catalasa, Hugg–Leiffenson, Oxidasa, Pectolisis de papa y la hipersensibilidad de Tabaco, ver Cuadro 3. Esto nos ayudó a corroborar que la bacteria fue *Pseudomonas corrugata*.

Los resultados obtenidos demuestran que la cepa de *Bacillus subtilis* nativa demostró ser superior a los demás tratamientos, en cada una de las variables, tal como se muestra en el (Cuadro 4).

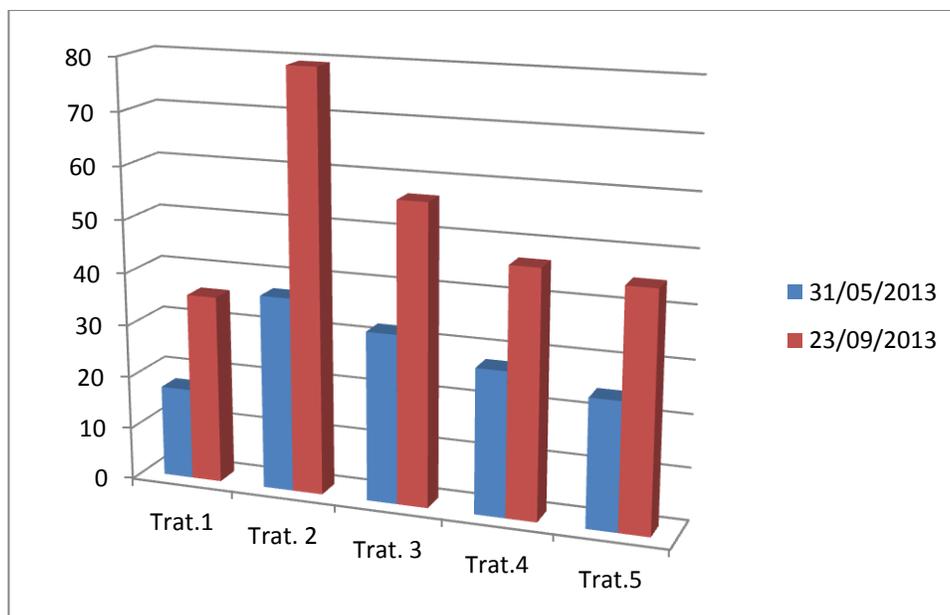
Los resultados que arroja esta investigación demuestra que la cepa de *B. subtilis* nativa fue la que mostró mayor altura con 37 cm en la primera evaluación como también para la última toma de datos, lo cual muestra altura de 79.4 cm comparado

con el testigo absoluto con tan sólo 17.4 y 35.80cm respectivamente, las dos cepas de *B. subtilis* promovieron significativamente ( $P < 0.0001$ ) mayor altura en comparación con el testigo.

**Cuadro 4:** Comparación de Medias y Parámetros a Considerar del Tomate tipo saladette variedad Maya Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

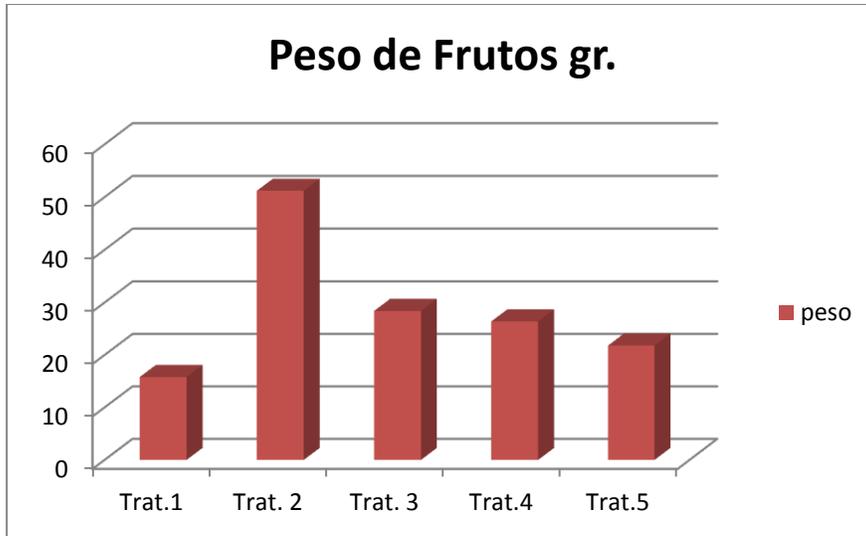
Tratamientos	Altura de Planta (cm) 31/05/2013	Altura de Planta (cm) 23/09/2013	Peso de Fruto (gr).	Long. de Raíz (cm).	Ancho de Raíz (cm).	Peso de Raíz (gr).
Testigo Absoluto	17.4 e	35.8 d	15.8 d	11.4 d	2.2 d	0.66 c
<i>B. subtilis</i> nativo	37a	79.4 a	51.2 a	33.6 a	7.6 a	7.72 a
<i>B. subtilis</i> comercial	32.2b	56.8 b	28.4bb	23.4 b	5.4 bb	4.96 b
Bacteria pura	27.6c	46.8 cc	26.4 b	16.2cc	3.6 cdd	3.1 cc
Testigo comercial	24.4d	45 c	21.8 c	14cdd	4.8bcc	2.26 cc
C.V.	5.77	4.23	6.09	9.73	18.46	23.24

El mejor tratamiento para altura de la planta de tomate es el T2 inoculado con *Bacillus subtilis* nativo, es el mejor tratamiento en las dos fechas evaluadas y no se observa diferencia estadística en la fecha 31 de mayo, sin embargo en la fecha posterior del 23 de septiembre se observa diferencia estadística (Fig. 4).



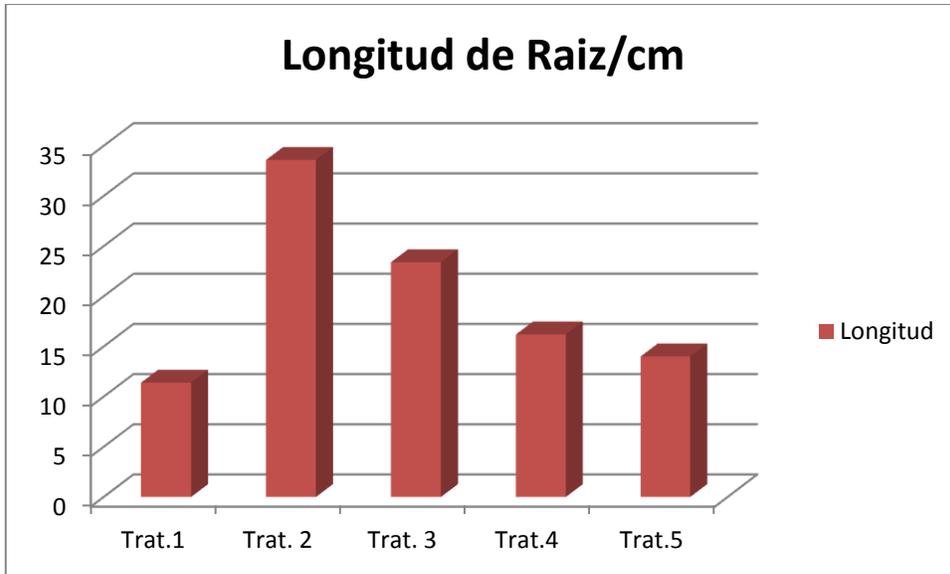
**Figura 4: Comparación de medias de altura (cm) en dos fechas de tomate tipo saladette variedad Maya Dpto. Parasitología, UAAAN 2015.**

Las cepas de *B. subtilis* en cada una de las variables evaluadas resultaron ser superiores al testigo, ahora cabe resaltar que es de gran relevancia mencionar que lo importante, además de obtener resultados favorables en las demás variables se verán reflejadas en el rendimiento del cultivo, (Fig. 5). Por lo tanto al evaluar el peso de fruto para cada tratamiento podemos observar que todos los atributos que se le dan a dichas cepas se vieron reflejadas en el rendimiento del cultivo, en el cual el mayor rendimiento se obtuvo al utilizar la cepa nativa de *B. subtilis* arrojando 51.20g seguida por la cepa comercial con 28.40, comparados con el testigo el cual presentó el menor rendimiento (peso en gramos) con 15.80g, el análisis de varianza manifiesta alta diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ) y con un coeficiente de variación relativamente bajo. (Cuadro 4).



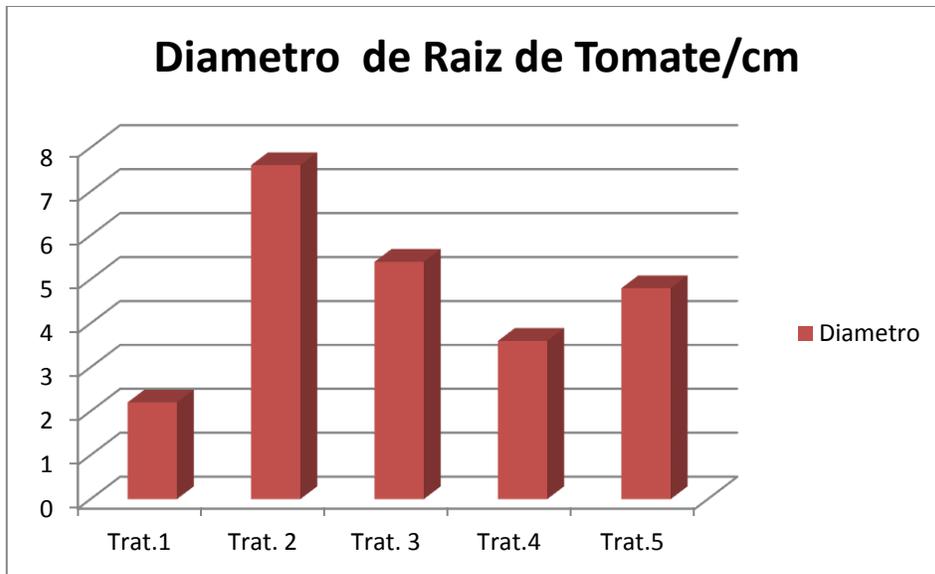
**Figura 5: Comparación de Medias en Peso (gr.) de Fruto de Tomate saladette variedad Maya Dpto. Parasitología, UAAAN 2015.**

Para la longitud de raíz, se obtuvieron resultados favorables con las cepas de *B. subtilis*, es de relevancia mencionar que la longitud mayor se obtuvo con la cepa nativa de *B. subtilis* (33.60cm) seguida por la comercial (23.40), en comparación con el testigo el cual presentó tan sólo 11.40cm, (Fig. 6) el análisis de varianza manifestó alta diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ). (Cuadro 4) Investigaciones recientes avalan y demuestran que *B. subtilis* promueve el crecimiento de la raíz, (Filipon, 2002).



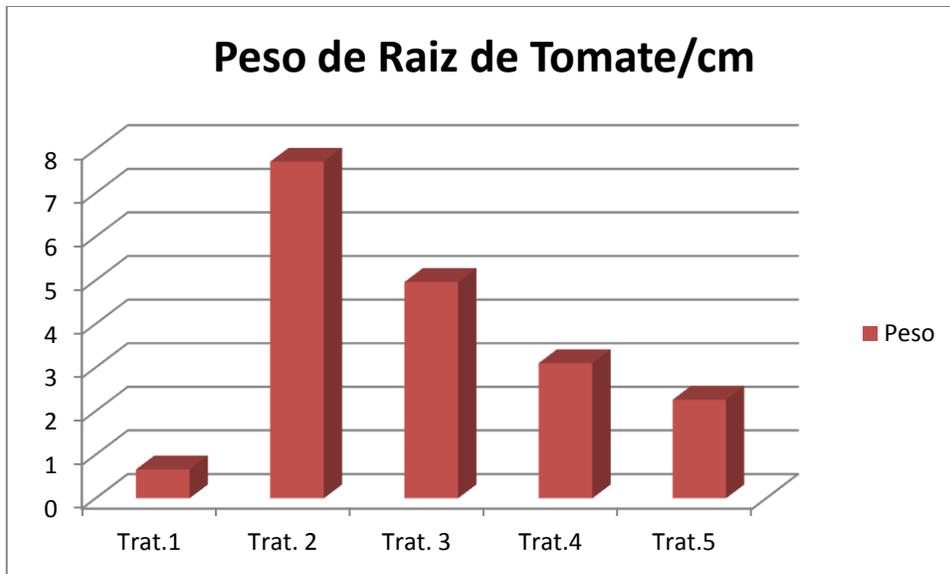
**Figura 6: Comparación de Medias en la Longitud de Raíz (cm) por Tratamiento de Tomate saladette variedad Maya Dpto. Parasitología, UAAAN 2015.**

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación podemos observar que las plantas tratadas con las cepas de *B. subtilis* manifiestan mayor densidad radicular en la cual podemos darnos cuenta que con la cepa nativa su densidad máxima fue de 7.60 cm seguida por la cepa comercial en la cual observamos que obtuvo un valor de 5.40cm ambas comparadas con el testigo absoluto al cual no se inocularon dichas cepas (Fig. 7) manifiestan alta diferencia significativa ( $P < 0.0001$ ), en este tratamiento obtenemos la densidad más baja que corresponde a 2.2cm respectivamente. (Cuadro 4).



**Figura 7: Comparación de Medias en Diámetro de Raíz (cm) por Tratamiento de Tomate saladette variedad Maya Dpto. Parasitología, UAAAN 2015.**

Los resultados obtenidos en este ensayo podemos darnos cuenta que la cepa de *B. subtilis* nativa demuestra ser significativamente superior a los demás tratamientos ( $P < 0.0001$ ), el mayor peso se dio con esta cepa con 7.72g, seguida por la cepa comercial con 4.96g, obteniendo en menor peso en el testigo absoluto, esto sucedió debidamente a que se obtuvo mayor densidad radicular, por lo tanto es de esperarse mayor peso en la raíz. (Figura 8)



**Figura 8: Comparación de Medias en Peso de Raíz (gr) por Tratamiento de Tomate saladette variedad Maya Dpto. Parasitología, UAAAN 2015.**

Con los resultados obtenidos nos damos cuenta que las cepas de bacterias antagonistas como es *B. subtilis* además de poder inhibir el crecimiento y desarrollo de muchos fitopatógenos también indirectamente promueven el crecimiento y desarrollo de los cultivos, tal como sucedió en esta investigación, también es importante comentar que con un mayor crecimiento y desarrollo radicular, la planta puede tener mejor anclaje como también mayor absorción de nutrientes.

Esta reducción de síntomas de la enfermedad *Pseudomonas corrugata*, pudo deberse por la competencia por nutrientes, y probablemente inducción de la resistencia por *B. subtilis*, además de la producción de sustancias antibióticas que

son liberadas. Estos antibióticos han sido identificados como péptidos antifungosos pertenecientes a la familia Iturinas (Gueldner, *et al.*, 1988).

Resultados similares encontró Díaz (1990), donde determino que a nivel laboratorio *B. subtilis* inhibe a *F. oxysporum f sp. niveum*, pero en condiciones de invernadero los resultados fueron mejores ya que la humedad ayuda al incremento de espacio físico . Estas sustancias antibióticas liberadas por *B. subtilis* pueden ser capaces de difundirse a través del suelo, como lo demostró Tschen (1987). Sin embargo no se determinó el mecanismo antagónico que redujo la incidencia de la enfermedad.

Filippi, *et al.*, (1987) demostraron algo similar a lo anterior, al inocular *B. subtilis* en las raíces de clavel al momento de trasplante contra *F. oxysporum fsp. dianthi*, y mediante observaciones histológicas , determinaron que la colonización de *B. subtilis* fue al 100% en la base de las raíces nuevas , concluyendo que cuando la colonización decrece de un 20-30% la enfermedad inicia, mencionaron además que un 80% o más raíces colonizadas son efectivas en la protección y debajo de este nivel no existe diferencia entre los tratamientos y testigos.

## CONCLUSIONES

El uso de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol arrojó resultados significativos en el control de *Pseudomonas corrugata*, tal como se manifestó en la cepa nativa y comercial, en relación con el testigo.

En el crecimiento y/o desarrollo de Tomate tipo Saladette variedad Maya los tratamientos T2 Y T3 fueron los que tuvieron mayor índice de crecimiento en centímetros sobre la altura de planta, crecimiento radicular; así como también mayor rendimiento expresado en gramos.

## BIBLIOGRAFÍA

Alippi AM, Ronco BL, Alippi HE, 1993. Tomate necrosis médula causada por *Pseudomonas corrugata* en Argentina. *Planta de Enfermedades* 77 , 428 .

Bartlett & Stirling (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: *Methods Mol Biol.* 226:3-6

Beutner., S.B. 2001., Evaluación cuantitativa de las propiedades antioxidantes de los colorantes naturales y fitoquímicos: carotenoides, flavonoides. 559-568.

Blancard, D. 1990. Enfermedades del tomate. Observar, identificar, luchar. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 212 pp.

Castro, Natalia G. De L. 2010 Citología microbiana, *Bacillus subtilis* (PDF). <http://es.scribd.com/doc/31345785/Bacillus-Subtilis-PDF#scribd>

Catara, V; Arnold, D., Cirvilleri, G, y Vivian, A., 2000: Specific oligonucleotide primers for the Rapid Identification and Detection of the Agent of tomato pith Necrosis, *Pseudomonas corrugata*, by PCR Amplification: Evidence for two Distinct Genomic Groups. *Eur. J. plant Patthol.* 106: 753-762.

Chen Y. P., Rekha P. D., Arun A. B., Shen F. T., Lai W., Young C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology.*; 34:33-41.

Clark, M. F. 1981 Immunosorbent assays in plant pathology. Ann. Rev. Phytopathol. 19: 83-106.

Corpeño, B. 2004. Manual del cultivo del tomate. El Salvador. 43 p.

Cortes, J.A. Prueba de la Oxidasa. 21 de Septiembre de 2002. Tomado de <http://www.joseacortes.com/microbiologia/pruebasbioq/oxidasa.htm>.

Crozier, A. M.E.J. Lean, M.S. McDonald, and C. Black. 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of comercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. Journal Agricultural Food and Chemistry 45: 590-595.

CNP, información del Boletín N°3, noviembre 2011., Huellas de ADN en genomas de plantas, Ernestina Valadez Moctezuma Mundi – Prensa, México, S.A. de C.V.

Díaz. P.A. 1990. Antagonismo de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium oxysporum* f sp niveum y su eficiencia en el control del marchitamiento de la sandía en el invernadero . Tesis profesional. UAAAN. Saltillo, Coah, Méx. 34 p.

Dick A, Elad Y. (1999) Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climate conditions. Eur J Plant Pathol 105: 123–137.

Disponible

<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria/>

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.

Edward KD. The Fatty Acids of *Euglena gracilis*. Journal of Lipid Research 1964; 5(3):352-362. 6

Enfermedades en cultivos protegidos de tomate, pimiento y berenjena, en el noroeste argentino. 13(34-35): 1-8. may.-dic. 1994. Página/s: 8. Hospederos: Pimiento; Tomate - Referencia: 347.

FAOSTAT. 2010. Dirección de Estadística. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?pageID=567//ancor>.

Filipon, Z. 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically related biological parameters. Agriculture Ecosystems & Environment.: 88 169-174.

Filippi, C.G. Bagnoli, M. Volterrani and G. Picci. 1987. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum* f. sp. Dianthi. Sydow and Hans. III. Relation between protection against Fusarium wilt in carnation and bacterial antagonistic colonization of root. Plant and soil. 98: 161-167. Netherlands.

Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I. E., Espinoza-Mancillas, M. G., Leyva-López, N. E., Martínez-Valenzuela, C., Martínez-Álvarez, J. C., y Herrera-Rodríguez, G. 2012.

FUENTE: Monografía de cultivos. Jitomate. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

Gerhardson, B. (2002), "Biological substitutes for pesticides", Trends in Biotechnology., 20, 338-342.

Gobernado M, Lopez-Hontangas JL. Identificación bacteriana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2003;21(Supl 2):54-60.

González, Aileen., Miguel, Alexander., Stefanova, Marusia. 1999. Cancrosis bacteriana de los Cítricos. *Boletín Técnico* 5(2) octubre.

Gueldner, R.C., Ch.C.Reilly., P.L. Pusey ., C.E. Coatello R.F. Arrendale and R.H. Cox. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis* . *J. Agric. Food Chem.* 36: 366.370. U.S.A

Guía de identificación de plagas y enfermedades tomate. Información técnica. Bayer Crops ciense, México. Junio 2012.

Inforural, 25 de Septiembre de 2012. FUENTE: Monografía de cultivos. Jitomate. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (SAGARPA).

Jansen, J.D, 2004. Fatty acid analysis in the identification, taxonomy and ecology of (Plant pathogenic) bacteria. In: Kawalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans AD, Van Elsas JD. Eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2 nd ed. New York, USA: Springer Publishing, 973-982.

Kaur.c.y H. Kpoor. 2001., antioxidantes en las frutas y hortalizas *Diario de los milenios salud internacional de la ciencia y la tecnología alimentos.* 703-735

Koneman, E. W. 2001. *Diagnostico microbiológico: Texto y atlas de color.* Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.

Labate; 2007. Tomate, genoma y mejoramiento molecular en las verduras, vol.5

Lambert MA, Hickman-Brenner FW, Farmer III JJ, Moss CW. Differentiation of Vibrionaceae Species by Their Cellular Fatty Acid Composition. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1983; 33:777-792. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-33-4-777>.

López, Manual de prácticas de bacteriología, Dra. María Cristina Fuentes, 2002  
Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas, Ma. De Lourdes Rodríguez Mejía. 2001.

María M. López. IVIA-Laboratorio de Bacteriología. Carretera de Moncada a Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia. Tel. 963424000. Fax 963424001. e-mail: [mlopez@ivia.es](mailto:mlopez@ivia.es) Actualidad 47:21 Junio 2009.

Mazzanti de Castañon, M.A.; Cundom, M.A.; Cabrera de Álvarez, M.G. 1994.

Miltidieri, M. Polack, L.A. 2005. Guía de monitoreo y reconocimiento de plagas, enfermedades y enemigos naturales de tomate y pimiento. 8. Guía de reconocimiento de enfermedades en tomate y pimiento. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Estación Experimental Agropecuaria - San Pedro. Página/s: 12. URL: [http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/2005/mm\\_0506enf.htm](http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/2005/mm_0506enf.htm). Fecha de consulta: 18/10/2010. Hospederos: Pimiento; Tomate - Referencia: 219.

Millar, S.A., and Martin, R.R. 1988 Molecular diagnosis of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol* 26: 409-432p.

Nelson M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. Crop Management, Plant Management Network. 2004.

NICO, A. I., A. M. Alippi, E. DAL BO & L. B. Ronco. 2006. Interacción de *Pseudomonas corrugata* y *Pseudomonas viridiflava* y diferentes genotipos de tomate. Rev. Fac. Agron. 106 (1): 37-45.

Ortega, M. L. D. 2010. Efecto de los sustratos en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) bajo condiciones de invernadero. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados, Montecillos, México. 129 p.

Página oficial de Bayer. www. Bayer.com. septiembre 2012. Información técnica del Departamento de Desarrollo Técnico de Bayer. Bayer CropScience. Septiembre 2012.

Ponce, Pedro Cruz; 2013, Producción de tomates en invernadero en México, hortalizas.

Pérez, O. D. 2010. "Monografía de Moringa (*Moringa oleífera Lam.*) en el Sur de Sonora". Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Indígena de México. Sinaloa, México, 62 p.

Powers, E.M. 1995: Efficacy of the Ryu Nonstaining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and yeasts. Applied and Environmental Microbiology 61:3756-5758.

Productores de hortalizas, 1 de agosto, 2010; Producción de tomates en México

Rice, A. (1984) Allelopathy. Academic Press, New York. Consultado el 5 de mayo de 2012.

Rodríguez, R. Tavares, R. y Medina, 2001. Cultivo moderno del tomate. 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 255 p.

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?argCryptedData=GP1tktXdhRJAS2Wp3v88hMmV7C%2FJUat%2B&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivold=1645>>

SAGARPA. 2011. Sistema de información agropecuaria de consulta; estadísticas agropecuarias 2000-2011. Servicio de información .Estadística Agropecuaria y Pesquera. SAGARPA.

Scarlett, C. M., J. T. Fletcher, P. Roberts, & R. A. Lelliot. 1978. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. *Annals of applied Biology* 88: 105-114.

Schaad , N.W : Jonas and W .Chun . 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria . 5 a . Ed. APS PRESS Minnesota U.S.A. 374 p.

SIAP, 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la Producción Agrícola por Cultivo “Modalidad riego + temporal”. SAGARPA, D.F., México. Disponible en línea: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=350](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350) (consulta julio 05, 2013).

Toledo, D. B. 2004. Evaluación in vitro del efecto de cepas nativas de la bacteria *Bacillus sp.* En el biocontrol de la bacteria *Erwinia carotovora* (Memoria de título). Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía, Chile.

Tschen, S.M. 1987. Control of *Rizoctonia solani* by *Bacillus subtilis* . Trans. Micol. Soc. Japan. 28:483-493. Japan.

Valdez, I. A. 1993. Producción de Hortalizas. Tercera reimpression. Editorial Limusa S.A de C.V. México, D.F 298 p.

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.

<http://bacillus8.blogspot.mx/2010/04/bacillus-subtilis-clasificacion.html>

<http://es.scribd.com/doc/31345785/Bacillus-Subtilis-PDF>

[http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n\\_en\\_cadena\\_de\\_la\\_polimerasa](http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa)

[http://es.wikipedia.org/wiki/Solanum\\_lycopersicum](http://es.wikipedia.org/wiki/Solanum_lycopersicum)

<http://www.actividadesrurales.com/la-agricultura/tomates-cherry.php>

[http://www.agro.unlp.edu.ar/uploads/R/106\\_37\\_45.pdf](http://www.agro.unlp.edu.ar/uploads/R/106_37_45.pdf)

<http://www.inforural.com.mx/spip.php?article104783>

<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00310.pdf>

[http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/plataforma\\_conocimiento/fichas/pdf/fd\\_302.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/plataforma_conocimiento/fichas/pdf/fd_302.pdf)

<http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/47/Penyalver.pdf>

<http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/pseudomonas-corrugata>

## APENDICE

### Procedimiento ANOVA 31/05/2013

Variable dependiente: Altura de la planta de tomate

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F -Valor	Pr > F
Repetición	4	13.440000	3.360000	1.31	0.3075
Tratamiento	4	1118.640000	279.660000	109.24	<.0001
Error	16	40.960000	2.560000		
Total Correcto	24	1173.040000			

Coef. Var. 5.772006

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.**

Tukey Agrupamiento	Media	tratamiento
A	37.000	2
B	32.200	3
C	27.600	4
D	24.400	5
E	17.400	1

### Procedimiento ANOVA 23/09/2013

Variable dependiente: Altura de la planta de tomate

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F -Valor	Pr > F
Repetición	4	7.760000	1.940000	0.39	0.8136
Tratamiento	4	5546.960000	1386.740000	277.90	<.0001
Error	16	79.840000	4.990000		
Total Correcto	24	5634.560000			

Coef var 4.233948

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	tratamiento
A	79.400	2
B	56.800	3
C	46.800	4
C		
C	45.000	5
D	35.800	1

### Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: Peso de fruto

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F -Valor	Pr > F
Repetición	4	9.840000	2.460000	0.80	0.5404
Tratamiento	4	3628.240000	907.060000	296.42	<.0001
Error	16	48.960000	3.060000		
Total Correcto	24	3687.040000			

Coef. Var. 6.090827

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.**

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>tratamiento</b>
A	51.200	2
B	28.400	3
B		
B	26.400	4
C	21.800	5
D	15.800	1

### **Procedimiento ANOVA**

**Variable dependiente: Longitud de raíz**

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	4	3.440000	0.860000	0.23	0.9155
<b>Tratamiento</b>	4	1602.640000	400.660000	108.73	<.0001
<b>Error</b>	16	58.960000	3.685000		
<b>Total Correcto</b>	24	1665.040000			

**Coef. var. 9.734459**

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.**

Tukey Agrupamiento	Media	tratamiento
A	33.600	2
B	23.400	3
C	16.200	4
C		
D C	14.000	5
D		
D	11.400	1

### Procedimiento ANOVA

**Variable dependiente: Ancho de raíz**

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F -Valor	Pr > F
Repetición	4	7.04000000	1.76000000	2.32	0.1018
Tratamiento	4	81.84000000	20.46000000	26.92	<.0001
Error	16	12.1600000	0.7600000		
<b>Total Correcto</b>	24	101.0400000			

Coef var 18.46991

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.**

Tukey Agrupamiento	Media	tratamiento
A	7.6000	2
B	5.4000	3
B		
C B	4.8000	5
C		
C D	3.6000	4
D		
D	2.2000	1

## Procedimiento ANOVA

**Variable dependiente: Peso de raíz**

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	4	6.6400000	1.6600000	2.00	0.1432
<b>Tratamiento</b>	4	122.5960000	30.6490000	36.92	<.0001
<b>Error</b>	16	13.2840000	0.8302500		
<b>Total Correcto</b>	24	142.5200000			

**Coef var** 23.24440

**Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.**

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>tratamiento</b>
A	7.7200	2
B	4.9600	3
C	3.1000	4
C		
C	2.2600	5
C		
C	1.5600	1

**Cuadro de concentración de los parámetros evaluados de tomate saladette variedad Maya.**

31/05/2013	<b>ALTURA DE LA PLANTA DE TOMATE</b>					
<b>TRAT</b>	<b>Rep. 1</b>	<b>Rep.2</b>	<b>Rep.3</b>	<b>Rep. 4</b>	<b>Rep. 5</b>	<b>Media</b>
<b>Trat.1</b>	16	18	20	17	16	17.4
<b>Trat. 2</b>	40	35	38	35	37	37
<b>Trat. 3</b>	33	34	33	31	30	32.2
<b>Trat.4</b>	28	26	29	27	28	27.6
<b>Trat.5</b>	25	22	24	26	25	24.4

23/09/2013	<b>ALTURA DE LA PLANTA DE TOMATE</b>					
<b>TRAT</b>	<b>Rep. 1</b>	<b>Rep.2</b>	<b>Rep.3</b>	<b>Rep. 4</b>	<b>Rep. 5</b>	<b>Media</b>
<b>Trat.1</b>	36	34	35	38	36	35.8
<b>Trat. 2</b>	82	78	79	81	77	79.4
<b>Trat. 3</b>	58	55	57	58	56	56.8
<b>Trat.4</b>	49	46	43	47	49	46.8
<b>Trat.5</b>	41	48	47	44	45	45

		Peso de Frutos grs.				
<b>TRAT</b>	<b>Rep. 1</b>	<b>Rep.2</b>	<b>Rep.3</b>	<b>Rep. 4</b>	<b>Rep. 5</b>	<b>Media</b>
<b>Trat.1</b>	15	17	18	14	15	15.8
<b>Trat. 2</b>	52	49	51	50	54	51.2
<b>Trat. 3</b>	30	27	29	30	26	28.4
<b>Trat.4</b>	28	25	24	27	28	26.4
<b>Trat.5</b>	23	21	20	22	23	21.8

		Peso de Raiz / cm					
<b>TRAT</b>	<b>Rep. 1</b>	<b>Rep.2</b>	<b>Rep.3</b>	<b>Rep. 4</b>	<b>Rep. 5</b>	<b>Media</b>	
<b>Trat.1</b>	0.5	0.6	0.5	0.8	0.9	0.66	
<b>Trat. 2</b>	8.2	7.3	6.2	8.5	8.4	7.72	
<b>Trat. 3</b>	5.7	4.5	4.8	4.6	5.2	4.96	
<b>Trat.4</b>	3.2	3.1	2.9	3	3.3	3.1	
<b>Trat.5</b>	2.1	2	2.5	2.4	2.3	2.26	

		Long. Raiz/ cm					
<b>TRAT</b>	<b>Rep. 1</b>	<b>Rep.2</b>	<b>Rep.3</b>	<b>Rep. 4</b>	<b>Rep. 5</b>	<b>Media</b>	
<b>Trat.1</b>	11	10	12	11	13	11.4	
<b>Trat. 2</b>	33	34	30	37	34	33.6	
<b>Trat. 3</b>	24	21	24	25	23	23.4	
<b>Trat.4</b>	18	15	18	16	14	16.2	
<b>Trat.5</b>	14	16	15	12	13	14	

		Ancho de Raiz / cm					
<b>TRAT</b>	<b>Rep. 1</b>	<b>Rep.2</b>	<b>Rep.3</b>	<b>Rep. 4</b>	<b>Rep. 5</b>	<b>Media</b>	
<b>Trat.1</b>	3	2	2	1	3	2.2	
<b>Trat. 2</b>	9	8	6	8	7	7.6	
<b>Trat. 3</b>	6	5	4	6	6	5.4	
<b>Trat.4</b>	4	4	3	2	5	3.6	
<b>Trat.5</b>	5	6	5	4	4	4.8	