

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Manejo del Pato sistema *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* Smith., con *Bacillus subtilis* Cohn., en Tomate de Cáscara *Physalis ixocarpa* Brot., Bajo Condiciones de Invernadero

Por:

**JORGE LUIS MARTÍNEZ CRUZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México.

Febrero 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Manejo del Patosistema *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* Smith.,  
con *Bacillus subtilis* Cohn., en Tomate de Cáscara *Physalis ixocarpa* Brot., Bajo  
Condiciones de Invernadero

Por:

**JORGE LUIS MARTÍNEZ CRUZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda

Asesor Principal

M.C. Abiel Sánchez Arizpe

Coasesor

M.C. Epifanio Castro Del Ángel

Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía

Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Febrero 2016.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios

Gracias por darme la vida, por brindarme confianza y sabiduría para poder hacer posible esta gran meta en mi vida.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por abrirme las puertas y permitirme ser parte de ella, por brindarme las herramientas necesarias para poder lograr mi formación académica. Gracias Alma Terra Mater.

Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda, gracias por su amistad, por la dirección, paciencia y confianza en la realización de este trabajo.

De igual manera agradecer al M.C Abiel Sánchez Arizpe y al M. C Epifanio Castro Del Ángel por ser parte importante en la realización de este trabajo de tesis.

A todos los maestros del Departamento de Parasitología con los cuales tuve el honor de estar entre sus clases y aprender un poco de su experiencia.

De manera especial agradecer a Daniela Jiménez, Adrián Bustos, Jehieli Leana, Dulce Lara, Diego Zúñiga, Andrea Romero, Fernanda Cesatti, Liliana Narváez, Guadalupe López, Yazmin Martínez, Rebeca González, gracias por brindarme su amistad y apoyo incondicional en los momentos que los he necesitado durante mi paso por la Narro.

A todos los compañeros de la Generación CXX de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo por hacerme más amena mi estancia en la Universidad.

## DEDICATORIAS

Dedicada de manera especial y con todo cariño a las personas que me dieron la vida mis padres **Elva Cruz Solórzano y Juan Martínez Gómez**, gracias por su amor, cariño, por sus regaños y los buenos consejos, los que me han ayudado a salir adelante a lo largo de mi vida, por su apoyo y comprensión incondicional para poder terminar esta etapa de mi vida. Gracias por ser un ejemplo en mi vida, los AMO.

A mis hermanos (as) **Salvador, Juan Manuel, Adolfo, Martin, Rosalba y Sergio Arturo**, por su apoyo, comprensión y confianza incondicional, gracias por ser parte de mi vida y estar presentes en ella. Gracias por sus consejos y buenos deseos, ya que sin ustedes no hubiera sido posible terminar esta etapa en mi vida. Muchísimas gracias de todo corazón, se les Quiere.

A mis abuelos maternos **Guadalupe Solórzano Jiménez (+)**, gracias Mamá Lupe gracias por su amor, porque siempre estuvo ahí en mi vida de manera incondicional haciéndome reír y sobretodo apoyándome y aconsejándome hasta los últimos días de su vida, siempre estarás en mis recuerdos, nunca te olvidaré. **Manuel Cruz Rodríguez (+)**.

A mis abuelos paternos **Salvador Martínez Barrientos y San Juana Gómez Cruz**, gracias por sus buenos consejos que de alguna manera me han ayudado para salir adelante en mi vida.

A mi tía **San Juana Cruz Solórzano (+)**, gracias por cuidarme, por esos buenos consejos que siempre me diste y que sabré agradecer, ya que sin ellos no hubiera sido posible lograr esta meta en mi vida. Gracias por darme la oportunidad de estar a tu lado hasta el último día de tu vida. Por eso y muchas cosas más siempre serás una segunda mamá para mí.

A mis tío(a) s Pablo, Macario, J. Trinidad, Manuel, Jesús, Rosa, Sara, Carmen (+), Antonio, gracias por sus consejos y buenos deseos brindados de su parte.

A mis sobrinos Juan, Emmanuel, Salvador, María José y Sergio, gracias por darle alegría y felicidad a la familia, se les quiere mucho.

A mis primos Jesús, Luz María, José, Laura, Armando, Gabriel, Juan, Julio, Fabián, Manuel, Pedro, Francisco, etc., por sus consejos y apoyo moral brindado a lo largo de mi vida.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>DEDICATORIAS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	v
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	xii
<b>RESUMEN</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Objetivos General.....	2
Objetivos Específicos.....	2
Hipótesis.....	2
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
Generalidades del Tomate de Cáscara.....	3
Importancia del tomate de cáscara.....	3
Origen del género <i>Physalis</i> .....	3
Características botánicas.....	3
Requerimientos ambientales.....	5
Clasificación Taxonómica.....	5
Variedades de tomate de cáscara.....	6
Enfermedades del Tomate de Cáscara.....	6
Hongos.....	6
Antecedentes Generales del Cáncer Bacteriano del Tomate.....	7
Importancia y distribución.....	8
Organismo causal.....	9
Clasificación Taxonómica.....	10
Etiología.....	10
Ciclo y epidemiología de la enfermedad.....	11
Sintomatología.....	13
Importancia económica.....	16
Manejo de la enfermedad.....	16
Control Biológico.....	17

<i>Bacillus sp.</i> .....	18
Clasificación Taxonómica.....	18
Modo de Acción de <i>B. subtilis</i> .....	19
Generalidades del género <i>Bacillus</i> .....	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
Sitio de Estudio.....	21
Etapa de invernadero.....	21
Acondicionamiento del área de trabajo.....	21
Material Utilizado.....	22
Tratamientos a la Semilla.....	22
Siembra en almacigo de tomate de cáscara variedad Michoacana... ..	23
Obtención y Trasplante.....	23
Establecimiento del Experimento.....	24
Etapa de Laboratorio.....	24
Reproducción e incremento de la bacteria antagónica <i>B. subtilis</i> .....	25
Reproducción de la bacteria <i>C. m. subsp. michiganensis</i> .....	25
Aplicación de la bacteria antagónica <i>B. subtilis</i> a plantas sanas.....	25
Inoculación de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> a plantas sanas.....	26
Identificación de síntomas bacterianos en tejido vegetativo.....	26
Reaislamiento de la bacteria.....	27
Resiembra de colonias bacterianas.....	28
Pruebas de caracterización de acuerdo al protocolo de Schaad <i>et al.</i> , (2001).....	28
Tinción de Gram.....	28
Prueba de (Ryu).....	28
Prueba de catalasa.....	29
Prueba de oxidasa.....	29
Parámetros Evaluados.....	29
Altura de la planta.....	29
Número de frutos/planta.....	29
Número de hojas/planta.....	29

Diámetro del tallo.....	29
Incidencia de la enfermedad.....	29
Severidad de la enfermedad.....	30
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
Obtención de Plántulas con los Tratamientos a la Semilla.....	31
Desarrollo del Cultivo.....	31
Caracterización Bioquímica de <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i> .....	31
Parámetros a evaluar.....	33
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Morfología del tomate de cáscara.....	4
2	Distribución mundial de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> .....	9
3	Ciclo del cáncer bacteriano. De abajo hacia arriba: Diseminación por medio de semilla, plantas asintomáticas y presencia de síntomas al momento de la fructificación, formas de transmisión de la enfermedad y manifestación de síntomas en hoja y frutos.....	13
4	Tallo de tomate de cáscara mostrando síntoma clásico de cáncer bacteriano.....	14
5	Hojas de tomate de cáscara con manchas típicas de cáncer bacteriano.....	14
6	Enrollamiento de hojas de tomate de cáscara, característica del cáncer bacteriano.....	14
7	Fruto de tomate de cáscara con halo, síntoma característico de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> .....	15
8	Invernadero de Parasitología, Depto. De Parasitología, UAAAN 2015.....	21
9	Aplicación del repelente a base de extracto de ajo y canela.....	22
10	Tratamiento a la semilla con <i>B. subtilis</i> y Raizal.....	22
11	Siembra de semilla inoculada con <i>B. subtilis</i> .....	23
12	Siembra de la semilla tratada con Raizal.....	23
13	Trasplante de plántulas a bolsas con sustrato (Peat-moss).....	23
14	Laboratorio de Parasitología, Depto. Parasitología. UAAAN.....	25
15	Hojas y tallos de tomate de cáscara con síntomas de <i>Clavibacter michiganensis</i> utilizados para el reaislamiento de la bacteria, Depto. De Parasitología, UAAAN.....	27
16	Maceración de tejido y disoluciones de la maceración para identificación de la bacteria, Depto. Parasitología. UAAAN.....	27

17	Crecimiento bacteriano típico de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	33
18	Comparación de medias de crecimiento de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos a la semilla. A los 102 días de la siembra.....	34
19	Comparación de medias del crecimiento de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos con Raizal a la siembra y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 102 días de la siembra.....	35
20	Comparación de medias de diámetro del tallo de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos a la semilla. A los 102 días de la siembra.....	35
21	Comparación de medias del diámetro del tallo de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos con Raizal a la siembra y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 102 días de la siembra.....	36
22	Comparación de medias del número de hojas/planta de tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 102 días de la siembra.....	37
23	Comparación de medias del número de hojas/planta de tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la semilla y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 102 días de la siembra.....	38
24	Comparación de medias del número de frutos de tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 102 días de la siembra.....	38
25	Comparación de medias del número de frutos de tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 102 días de la siembra.....	39
26	Comparación de medias del porcentaje de incidencia en tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 98 días de la siembra.....	39

27	Comparación de medias del porcentaje de incidencia en tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 98 días de la siembra. ....	40
28	Comparación de medias del porcentaje de severidad en tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 98 días de la siembra.....	41
29	Comparación de medias del porcentaje de severidad en tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 98 días de la siembra.....	42
30	Comparación de medias de crecimiento de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos a la semilla. A los 148 días de la siembra.....	44
31	Comparación de medias del crecimiento de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos con Raizal a la siembra y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 148 días de la siembra.....	45
32	Comparación de medias del diámetro del tallo de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos a la semilla. A los 148 días de la siembra.....	45
33	Comparación de medias del diámetro del tallo de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos con Raizal a la siembra y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 148 días de la siembra.....	46
34	Comparación de medias del porcentaje de incidencia en tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 148 días de la siembra.....	47
35	Comparación de medias del porcentaje de incidencia en tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 148 días de la siembra.....	47
36	Comparación de medias del porcentaje de severidad en tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 160 días de la siembra.....	48

37	Comparación de medias del porcentaje de severidad en tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y <i>B. subtilis</i> a la siembra. A los 160 días de la siembra.....	49
38	Severidad de <i>C. m. subsp. michiganensis</i> en tomate de cáscara...	49

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Tratamientos establecidos en el experimento.....	24
2	Resultado de las pruebas bioquímicas en la caracterización de <i>Clavibacter michiganensis</i> de acuerdo a (Hernández, 2013).....	32
3	Medias y parámetros a considerar en tomate de cáscara (primer muestreo).....	33
4	Medias y parámetros a considerar en tomate de cáscara (segundo muestreo).....	43

Correo electronico; Jorge Luis Martinez Cruz, [jlmzt-conza@hotmail.com](mailto:jlmzt-conza@hotmail.com)

## RESUMEN

El tomate de cáscara *Physalis ixocarpa*, Brot., como especie olerícola presenta una gran importancia tanto económica como cultural, para la población mexicana, aunque recientemente se ha visto afectado por diversas enfermedades tales como: *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis*, entre otras. Esta última enfermedad es la que nos interesa ya que en el presente trabajo se habla sobre la eficiencia del antagonismo de *Bacillus subtilis* contra el cáncer bacteriano *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Para el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se usaron 2 tipos; un control químico a base de Sulfato de estreptomicina y un biológico con *Bacillus subtilis*. En los tratamientos a la semilla se aplicó *B. subtilis* a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml en la escala de Mc. Farland y un enraizador químico (Raizal) a una dosis de 1gr/litro. Se estableció el cultivo, se expusieron ocho tratamientos a los cuales se les aplicó *B. subtilis* a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml a una dosis de 5ml/planta, se utilizó una suspensión de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de la cual se aplicó una dosis de 5 ml/planta, dicha cepa se incrementó en caldo nutritivo, se hizo una aplicación de nutrientes químicos 1gr/planta y como control químico se utilizó Sulfato de estreptomicina a una concentración de 0.6 gr/1 litro de agua, del cual se aplicó 5ml/planta.

*B. subtilis* presenta antagonismo para inhibir el crecimiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en el primer muestreo siendo los mejores el T. comercial y el T1 con *B. subtilis* a la semilla ya que estos presentaron un porcentaje de 8.33 de severidad a comparación de los tratamientos con los que se aplicó Raizal a la semilla siendo el T1 el que presentó mayor porcentaje de severidad con un 29.16 %. En el segundo muestreo no se presentó control de la enfermedad por ninguno de los tratamientos.

**Palabras clave:** Control biológico, Cáncer bacteriano, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Bacillus subtilis*, Tomate de cáscara, *Physalis ixocarpa*.

## INTRODUCCIÓN

El miltomate, tomatillo, tomate verde, tomate de fresadilla, tomate de cáscara o simplemente tomate *Physalis ixocarpa* Brot., es una especie botánica originaria de México, perteneciente a la familia de las solanáceas. Peña & Márquez (1990) señalan que *P. ixocarpa* Brot., crece en forma silvestre entre los maizales donde subsisten sistemas tradicionales de producción que no implican el uso de herbicidas recolectándose incluso para su venta.

*P. ixocarpa*, Brot., es de amplia importancia en la república mexicana, su consumo viene desde tiempos precolombinos, pues se tienen conocimientos de que los mayas y los aztecas ya hacían uso de él. En la actualidad se utiliza como condimentos en un sinnúmero de platillos, en forma de salsas para sazonar sopas, guisados, ensaladas, etc.

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* agente causal del cáncer o chancro bacteriano en tomate, está presente en muchas partes del mundo y produce pérdidas importantes en producción y superficie de cultivo (Agrios, 1993). Esta enfermedad se caracteriza por su severidad de ataque tanto al aire libre como en invernadero, siendo específica del tomate, la cual si tiene las condiciones favorables puede llegar a destruir completamente las plantaciones (Besain, 1994).

El diagnóstico del cáncer bacteriano se ve limitado debido a la dificultad de su aislamiento para la realización de pruebas biológicas y de otros métodos de diagnóstico como la prueba ELISA y la reacción en cadena de polimerasa (PCR), resultan en muchos casos poco accesibles para los productores.

Uno de los controladores es el *Bacillus subtilis* el cual ha sido evaluado como eficiente controlador de patógenos de importancia agrícola. De acuerdo a esto, podría constituirse una alternativa eficiente para reducir la incidencia de enfermedades como el cáncer bacteriano en tomate producida por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, enfermedad considerada de importancia primaria en el cultivo de tomate (Donoso, 2006).

*B. subtilis* provee un control efectivo de enfermedades causadas por hongos y bacterias. El compuesto bioquímico presente en este producto combate los agentes patógenos por su modo de acción. Posee alto espectro de acción. Aplicación foliar y radicular. Este producto es usado como tratamiento en el control de un amplio espectro de patógenos de las plántulas que causan el mal de la pudrición de la raíz. Los organismos antagónicos crecen y se multiplican alrededor del área de la raíz de los cultivos, ellos compiten con los patógenos que atacan las nuevas raíces emergentes y en consecuencia reducen los riesgos de infestación.

### **Objetivo General**

- Evaluar el manejo del Patosistema *C. michiganensis subsp. michiganensis* con *Bacillus subtilis* en tomate de cáscara *P. ixocarpa*, bajo condiciones de invernadero.

### **Objetivos Específicos**

- Evaluar el efecto de ***B. subtilis***, en el desarrollo vegetativo de las plantas de tomate.
- Determinar incidencia y severidad del cancro bacteriano *C. michiganensis subsp. michiganensis* en las plantas de tomate de cáscara.

### **Hipótesis**

- Al menos un tratamiento de *B. subtilis* mostrará un efecto de manejo sobre *C. michiganensis subsp michiganensis*.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **Generalidades del Tomate de Cáscara**

#### **Importancia del tomate de cáscara**

La importancia del tomate de cáscara en México tiene una marcada influencia regional, lo cual se manifiesta al comparar el consumo percapita nacional de 1.7 kg con el de algunas ciudades de nuestro país tales como Culiacán con 0.97 kg y Texcoco 17.11 kg., (Ledezma, 1994).

Otro aspecto importante de este cultivo es su utilización , la cual es muy variada, aunque el principal uso es el alimenticio, ya que se ha utilizado como condimento en un sinnúmero de comidas en forma de salsas, agregadas a los guisados, sopas, ensaladas, etc., (Alvarado, 1995).

#### **Origen del género *Physalis***

La palabra tomate es de origen náhuatl (*ayachtomatl*), “*ayacach (tli)*”, significa sonaja o cascabel y “*tomatl*” significa tomate. Es conocido con una diversidad de nombres comunes, entre ellos tomate, tomate de cáscara, tomate verde, tomate fresadilla y tomatillo (Santiaguillo y López, 1992).

Ayala (1992) señaló que los centros de origen de las especies son de suma importancia desde el punto de vista genético, pues son fuente de genes útiles para el mejoramiento de las mismas.

La palabra tomate se aplica a frutos de plantas de la familia Solanaceae del tipo baya, de forma globosa, con muchas semillas, pulpa acuosa, y a veces encerrados por una membrana (Alfaro, 1998).

#### **Características botánicas**

Las plantas de tomate de cáscara tienen un ciclo de vida de 70 a 110 días desde la siembra hasta la senescencia dependiendo la variedad, una vez que emerge la plántula inicia un crecimiento lento, aproximadamente 1 cm. por día; posteriormente a los 25 días, el crecimiento se acelera y se estabiliza alrededor de

los 55 que es cuando alcanza una altura de 90 cm. (en las plantas rastreras aproximadamente 60 cm.), la planta sigue creciendo lentamente y puede llegar a alcanzar poco más de 1m., (erectas), esto sucede como a los 70 días, posteriormente la planta empieza a envejecer y cae por el peso de los frutos hasta su muerte (González, 2013).

Saray & Loya (1977) describieron a *P. ixocarpa* Brot., como una planta herbácea anual de 40 a 90 cm de altura, con un diámetro de tallo de 1.1 a 1.3 cm; raíces primarias de 0.8 a 0.9 cm. Las hojas son alternas de forma ovalada, flor pentámera de color amarillo, con manchas tenues, o bien marcadas de matices azul-verdoso o morado.

El fruto es una vaya, el cáliz que cubre al fruto presenta 10 costillas.



**Figura 1.** Morfología del tomate de cáscara.

Pandey (1957) mencionó que la polinización se efectúa por medio de insectos, principalmente abejas. En esta planta no es posible la autofecundación debido a la autoincompatibilidad gametofítica que presenta, la cual está determinada por dos genes con múltiples alelos; comportándose como una alógama obligada.

## Requerimientos ambientales

El tomate de cáscara desarrolla en condiciones de pH de 6-7, el nivel adecuado de temperaturas para la germinación del tomate de cascara es de 20 a 30 °C (Ayala, 1992). Las temperaturas óptimas para su desarrollo son de 20 a 25°C, con temperaturas de 30°C el crecimiento disminuye y puede cesar a los 40. En la floración se requiere temperaturas de 30 a 32 °C, mayores de 32 pueden provocar deshidratación del tubo polínico, provocando una polinización incompleta y frutos mal formados. El suelo que requiere este cultivo es del tipo arcillo-arenoso, con disponibilidad de riego en regiones donde la humedad suficiente para el desarrollo del cultivo (Castillo, 1990).

## Clasificación Taxonómica

La taxonomía de *Physalis* presenta gran controversia debido a la heterogeneidad presente en este taxón, así como a la presencia de poblaciones intermedias y a la ambigüedad de muchas descripciones, todo lo cual dificulta la definición de las especies. Sin embargo, Benson (1957), citado por Santiaguillo y López (1992), presenta la siguiente clasificación hecha por Brot:

Reino: Vegetal

División: Espermatofita

Clase: Angioespermae

Subclase: Dicotyledonae

Orden: Polemoniales

Familia: Solanaceae

Género: *Physalis*

Especie: *ixocarpa*

Se ha estimado que existen alrededor de 80 especies dentro del género *Physalis*, confinadas en su gran mayoría a zonas templadas y tropicales de

América y muy pocas especies en el Este de Asia, India, Australia, Europa y África tropical. De todas las especie de este género aproximadamente 70 se encuentran en México (Valtierra *et al.*, 2003).

### **Variedades de tomate de cáscara**

Güemes *et al.*, (2001) mencionó que entre las variedades existe gran variación en el tamaño de los frutos, ya que unos son demasiado grandes y rompen la bolsa, en tanto que otros no alcanzan a llenar la misma. También existe variación en cuanto al color y sabor de los frutos, ya que pueden presentarse tanto de tono verde como amarillo, así como de sabor ácido o dulce. En el 65 por ciento de la superficie cultivada con tomate de cáscara se siembra con la variedad rendidora generada por el INIFAP, esta variedad se recomienda porque tiene buen rendimiento y calidad de fruto. El color del fruto es verde-limón, y su sabor es agridulce. La firmeza del fruto es buena lo cual facilita su transporte. Las 2 variedades **Salamanca** y **Michoacán**, originarias de esos lugares del país, las cultivan los productores porque producen frutos más grandes que la variedad Rendidora, aun cuando el fruto no queda expuesto, ya que se mantiene cubierto por la cáscara.

### **Enfermedades del Tomate de Cáscara**

Las principales enfermedades documentadas en tomate de cáscara son ocasionadas por virus y hongos, cuyo manejo debe ser preventivo para evitar disminución de la cantidad y calidad de la producción.

#### **Hongos**

Saray & Loya (1978) mencionan que en el estado de Morelos, la cenicilla *Oidium* sp., daña al tomate de cáscara después de la floración y puede defoliar por completo las plantas, lo que ocasiona que los frutos quedan expuestos al sol y caigan prematuramente.

Piña & Ponce (1990) señalan que el carbón u ojo de rana *Entyloma australe* ocasiona manchas blancas redondas en forma de pústulas que inician en las hojas inferiores y pueden cubrir toda la planta hasta defoliarla por completo. Mendoza (1996) mencionó también los patógenos asociados al tomate de cáscara: *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinérea*, *Sclerotinia sclerotium* y *Cercospora physalidis*. También existen reportes de la presencia de *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani* y *Phythium* sp. (PRODUCE, 2005).

### **Antecedentes Generales del Cáncer Bacteriano del tomate**

El Cáncer bacteriano es una enfermedad muy seria del tomate, causada por *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*. La enfermedad se descubrió por primera vez en 1909 en Grand Rapid, Michigan, Estados Unidos, pero no fue hasta 1926 cuando se le dio importancia, actualmente se ha reportado en áreas de producción de todo el mundo y anualmente ocurren ataques de la enfermedad ocasionando grandes pérdidas en producción (Aguirre, 1965).

En México fue reportada por Fucikovsky en 1998. Aunque Ramírez & Sáinz (2006), mencionan que el primer reporte se hizo en el Estado de Sinaloa, en el Valle de El Fuerte y que desde que apareció se ha presentado en diversos grados de incidencia y severidad y después en el Valle de Culiacán (1994-1996) en campo abierto ocasionando incidencias de hasta 40 %.

En México esta enfermedad se diseminó rápidamente y se estableció en las principales áreas hortícolas de exportación de nuestro país, en donde se destacan los estados de Sinaloa, Jalisco, San Luis Potosí, Baja California Sur y Baja California Norte en donde se ha identificado la enfermedad a nivel de injertos, semilla, en invernadero y en malla sombra (Holguin *et al.*, 2006 y García *et al.*, 2007).

El cáncer bacteriano se ha convertido en una de las principales enfermedades de este cultivo sobretodo en invernadero por las pérdidas que puede ocasionar que van desde un 70 % hasta la pérdida total , y aunque su

presencia de considera esporádica puede ser devastadora , la enfermedad es específicamente severa tanto en plantas trasplantadas o en siembra directa (Lewis & Miller 2005).

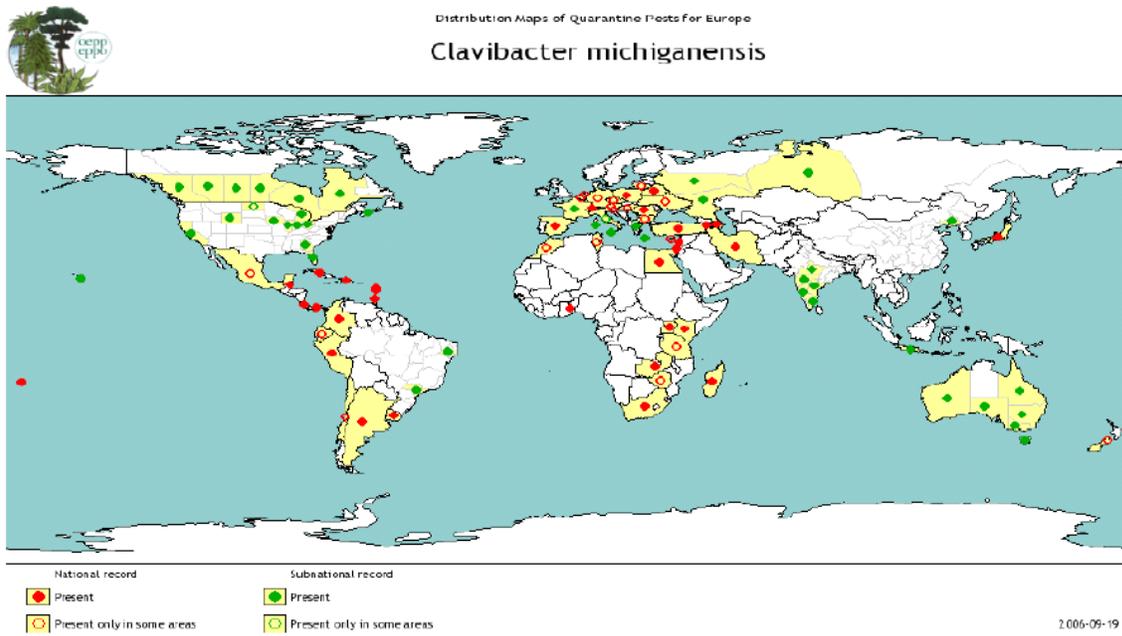
La enfermedad se transmite de una zona a otra principalmente por semilla ya que el patógeno puede sobrevivir al menos ocho meses en esta, la distribución de la enfermedad en campo y bajo condiciones de invernadero se ve favorecida por el agua (salpicadura, viento, aspersión) así como las prácticas culturales como las podas o tutoreo donde la planta sufre heridas mecánicas por el manejo (Tlapa, 2008).

Las plántulas son vulnerables a cualquier etapa de desarrollo. Las plántulas infectadas se mueren rápidamente o producen plántulas débiles , si las condiciones para el desarrollo de la enfermedad no son favorables las plántulas pueden generar plántulas aparentemente sanas hasta el trasplante a campo (Blancar, 2005).

### **Importancia y distribución.**

Esta bacteria se presenta de manera esporádica pero cuando se presenta llega a ser muy destructiva por la capacidad que tienes de diseminarse fácilmente por semilla o de manera mecánica por las manos , herramientas de trabajo , poda y otras labores culturales.

Cuando se presenta puede acabar con todas las plantas en parcelas o invernaderos en cuestión de semanas. Se encuentra distribuida prácticamente en todas las zonas donde se cultiva tomate (Figura 2.), (EPPO, 2010).



**Figura 2.** Distribución mundial de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Fuente: EPPO, 2010.

### Organismo causal

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es una bacteria perteneciente a los *Actinomycetes*, no forma esporas, mide de 0.6X0.7 a 1.2 micras, tiene forma bacilar, sin flagelos aeróbica y a diferencia de las otras bacterias que atacan al tomate es la única hasta la fecha que se encuentra dentro de las Gram-positivas, lo que la hace una bacteria única en este cultivo (Lewis, 2005).

La reproducción es caracterizada por la división “snapping” o “encajarse a presión”, la cual da como resultado los arreglos en V y en forma de Y de las células. Las colonias en agar son de color amarillo característico y alcanzan un diámetro de 2 a 3 mm en cinco días. Estas son lisas y tienen márgenes enteros y una consistencia butirosa (Jones *et al.*, 1993).

## Clasificación Taxonómica.

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

**Dominio:** Bacteria

**Phyllum:** Actinobacteria

**Clase:** Actinobacteriales

**Sub-clase:** Actinobacteridae

**Orden:** Actinomycetales

**Género:** *Clavibacter*

**Especie:** *michiganensis*

**Sub-especie:** *michiganensis*

## Etiología

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

*C. m.* subsp. *michiganensis*, es una bacteria Gram positiva, las células pueden ser pleomórficas, pequeñas, en forma de cocos o de bastón, dependiendo de las condiciones de crecimiento, no forma esporas, es aeróbica, sin movilidad por la carencia de flagelos (EPPO, 1999 de acuerdo a Bradbury, 1986).

En medio de cultivo YDC , a los tres días la pigmentación de sus colonias es de color amarillo o naranja pálido, puntiforme, mucoloides, a los 4 días mide 1 mm de diámetro, son ovaladas o redondas, semifluidas y levantadas, a los 7 días miden de 2-3 mm de diámetro, son lisas enteras,

convexas, semifluidas en aislamiento reciente y de color amarillo pálido que se va obscureciendo, su crecimiento es relativamente lento .

Las colonia en agar nutritivo son característicamente amarillas y alcanzan un diámetro de 2-3 mm en cinco días, lisas de márgenes enteros y de consistencia butirosa.

Lelliot *et al.*, (1987) mencionan que el aislamiento se puede realizar por medio de Glucosa Agar Nutritivo (NGA) o Levadura Peptona Glucosa Agar (YPGA). La apariencia de la colonia en medios selectivos varia, dependiendo del medio (Jones *et al.*, 1993). La bacteria se desarrolla bien a 28°C (OEPP/EPPO,2005) Hidroliza esculina , la utilización de la glucosa es oxidativa (aerobia estricta), oxidasa positiva , prueba de Ryo positiva (MAPA/DGSPA, 1991)

### **Ciclo y epidemiología de la enfermedad**

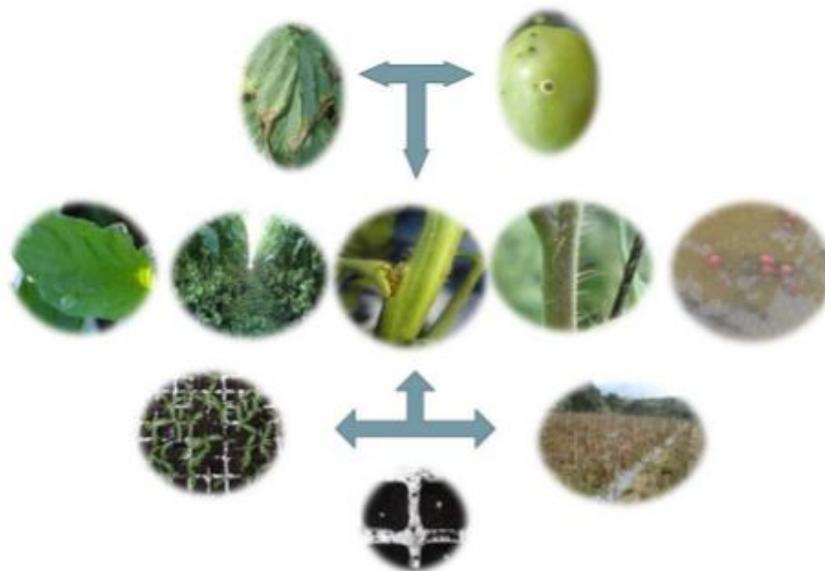
La bacteria *C. m. subsp michiganensis*, en campo se desarrolla mejor a temperatura de 25-30 °C y requiere periodos de alta evapotranspiración (OEPP/EPPO, 2005). Por otro lado León *et al.*, (1982), menciona que la bacteria muestra un crecimiento optimo a temperaturas de 28 °C, condiciones bajo las cuales la planta de tomate se desarrolla durante el ciclo de cultivo. La semilla es la principal fuente de inculo del patógeno. El comercio de la semilla ha facilitado la distribución mundial de la enfermedad. Localmente, la transferencia de equipo contaminado puede permitir la transmisión de la enfermedad, a otros campos (OEPP/EPPO, 2005).

Messiaen (1968), comenta que la semilla que se hallan altamente contaminadas desde un principio, pueden motivar el nacimiento de más de un 1 % de las plantas enfermas, lo que puede originar ataques generalizados debido a que una transmisión en semilla del 1 % puede propiciar la infestación del 100 % del cultivo.

Las bacterias fitopatógenas invernan en o sobre la semilla , y en algunas áreas del resto de la planta cercanos al suelo. La infección primaria pueden deber a la propagación de la bacterias desde la semilla hasta los cotiledones u hojas, pero la mayoría se debe a la penetración de dichas bacterias a través de heridas en raíces, tallos, hojas y frutos (García *et al*; 2000) .

La bacterias son llevadas hasta las plantas a través de la manipulación ,la cual tiene lugar durante el transporte, aunque también son diseminadas por el riego, lluvia, acarreadas por el viento y las prácticas agrícolas como el atado y la poda donde la planta llega a tener heridas por el manejo. Una vez que se encuentra dentro de la planta, las bacterias llegan al sistema vascular se desplazan y propagan principalmente en los vasos xilemáticos espirales, para después salir de ellos e invadir el floema, médula y corteza, donde forman las grades que originan chancros (Figura 3.), (Agrios, 1993).

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



**Figura 3.** Ciclo del cáncer bacteriano. De abajo hacia arriba: Diseminación por medio de semilla, plantas asintomáticas y presencia de síntomas al momento de la fructificación, formas de transmisión de la enfermedad y manifestación de síntomas en hoja y frutos.

### **Sintomatología**

El cáncer bacteriano es una enfermedad que desafortunadamente no suele presentar síntomas en etapas tempranas por lo que es difícil detectar a tiempo para tener un buen control los síntomas iniciales se presentan cuando inicia el periodo de floración donde se llegan a ver plantas con una marchitez unilateral que posteriormente se expande a toda la planta.

Los primeros síntomas de la enfermedad son marchitez, rizado y bronceado de las hojas, a menudo en un solo lado de la planta si se hace un corte en el tallo puede observarse una coloración café en el sistema vascular, (Figura 4.), los síntomas son superficiales y sistémicos, aparecen lesiones necróticas de hasta 6mm de diámetro en la superficie de las hojas superiores o puntos circulares ligeramente protuberantes de 3mm de diámetro, (Figura 5.) (Tlapa, 2008).

Los primeros síntomas observables son el manchado o el marchitamiento de los folíolos de las partes externas e inferior de la planta. El manchado de las hojas se producen cuando el clima es húmedo y aparece inicialmente en forma de manchas ampulosas blancas que se ponen cafés conforme maduran (Figura 5), (Rodríguez *et al.*, 1997).



**Figura 4.** Tallo de tomate de cáscara mostrando síntoma clásico de cáncer bacteriano.



**Figura 5.** Hojas de tomate de cáscara con manchas típicas de cáncer bacteriano.



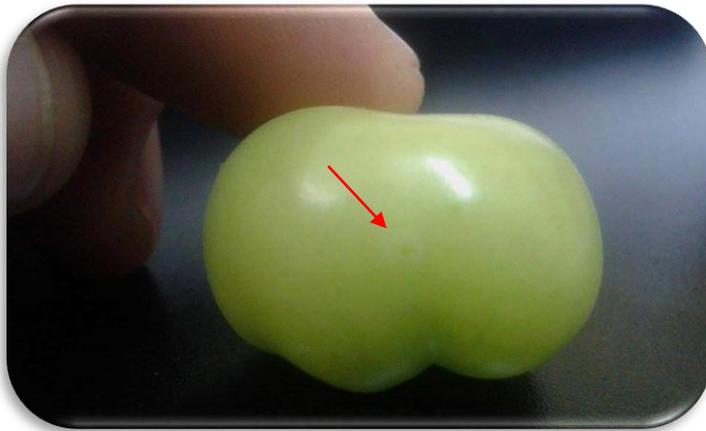
Rodríguez *et al.*, (1997) mencionan que las hojas marchitas se enrollan hacia arriba y hacia adentro y más tarde se enardecen y marchitan, pero no se desprenden. Con frecuencia, la enfermedad sólo afecta a los folíolos de un lado de la hoja o de un costado de la planta (Figura 6.).



**Figura 6.** Enrollamiento de hojas de tomate de cáscara, característica del cáncer bacteriano.

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

Los síntomas de la enfermedad en los frutos se presenta en forma de pequeñas manchas blancas, aguanosas y superficiales cuya parte central sobre sale más tarde la cual adquiere un color canela y se vuelve rugosa, pueden no formarse y caer, o madurar irregularmente. El aspecto final de las manchas tiene la forma de “ojo de pájaro” con un diámetro de 3-6 mm; la cual es característica propia de la enfermedad (Figura 7), aunque no ocurren estos síntomas en el fruto (Messiaen *et al.*, 1968; Colloch, 1972; León *et al.*, 1982, 1988).



**Figura 7.** Fruto de tomate de cáscara con halo, síntoma característico de *C. m. subsp. michiganensis*.

En condiciones naturales, la bacteria es específica de tomate *Solanum lycopersicum* citándose con excepción un ataque a *Solanum douglassi* y a *Capsicum annum*, como nuevo hospedante en condiciones naturales. La principal fuente de primaria de inóculo es la semilla que transporta a la bacteria en forma epifita o como una infección latente, pero debido al largo periodo de incubación que presenta la enfermedad solo se manifiesta a los 30-40 días 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 sobreviven en hospedantes alternantes en plantas guachas (Chang *et al.*, 1992).

## **Importancia económica**

*C. m. subsp. michiganensis*, está considerada como una de las enfermedades vasculares del tomate más importantes en diferentes regiones productoras a nivel mundial (Ramírez y Sainz, 2006). El cancro, puede afectar al tomate en cualquier etapa fenológica y acabar con todas las plantas e parcelas o invernaderos en cuestión de semanas (EPPO, 2010). En invernaderos, la enfermedad es particularmente más severa debido a condiciones de mayor humedad relativa y más baja intensidad luminosa (Ramírez y Sainz, 2006). La reducción en la producción esta quizá relacionada con la capacidad productiva del cultivo ya que se reduce el tamaño y número de frutas por plantas. En evaluaciones realizadas se contabilizaron pérdidas del 20 % en Ontario Canadá. En Francia del 20 al 30% y 46 % en Illinois. Estados unidos (CAB Internacional, 2010). En promedio puede ocasionar pérdidas del 80 al 100 % (EPPO, 2010). En invernaderos se han reportado pérdidas hasta del 70 %, y reducción en el rendimiento de 20 al 30 % (Rat *et al.*, 1991).

En México, en el 2006 se presentaron daños del cancro bacteriano en 200 ha en sistemas reproducción protegida en el Estado de Sonora, con pérdidas de comercialización estimadas en 40 millones de dólares (Borboa, *et al.*, 2006).

## **Manejo de la enfermedad**

Al ser una enfermedad que se transmite por semilla lo primero que hay que hacer es sembrar semilla certificada que esté libre de la bacteria en caso de que la semilla no sea certificada o aunque lo sea, se puede dar un tratamiento hidrotermico a 50<sup>0</sup>C durante 25 min, este tratamiento está comprobado que elimina las bacterias completamente de la semilla y sin causar efectos dañinos en la germinación de la misma (EPPO, 2010).

En el semillero donde se vaya a poner a germinar la semilla, es importante que cuente con las medidas sanitarias necesarias para evitar que se contaminen las plántulas, por lo que se recomienda que el sustrato que se utilice sea

esterilizado el personal que realiza la siembra se desinfecte las manos con una solución de ácido o con sal de cuaternario de amonio (EPPO, 2010).

Cuando la plántula esta lista para el trasplante lo primero que hay que hacer es desinfectar el suelo con productos fumigantes que tengan efecto bactericida como MTC (Metilen Bistiocianato) que ha mostrado buen efecto en aplicaciones al suelo si se tienen antecedentes de que en años anteriores se ha presentado la enfermedad se pueden iniciar aplicaciones de cobres en las primeras etapas cuando se realicen prácticas de poda es recomendable “sellar” de inmediato con productos que contengan cobre como ingrediente activo. El único ingrediente activo que ha mostrado efecto contra bacterias Gram positivas es el Clorhidrato de Oxitetraciclina (Tlapa, 2008).

### **Control Biológico**

En un sentido amplio, el control biológico se puede definir como la reducción del agente causante de la enfermedad por la acción de microorganismos vivos (Barker, 1987).

En la práctica el control biológico consiste en el uso de agentes antagonicos, usualmente aislados de la superficie de los frutos o del material vegetal, que al ser estimulados in situ o reintroducidos artificialmente actúan contra poblaciones del patógeno suprimiendo o disminuyendo así el desarrollo de las enfermedades de postcosecha (Barkai, 2001).

A diferencia del control químico en el control biológico, los efectos sobre el patógeno son más específicos y además, sus repercusiones sobre el medio ambiente son mayores por la biodegradación de estas moléculas. En este sentido, las bacterias productoras de toxinas se han relevado también como un agente de gran potencial en el biocontrol de organismos fitopatógenos (Cozorla y Duran, 2003), citado por (Flores, 2004).

## ***Bacillus sp.***

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 quimioheterótrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos. Son anaeróbicos o aeróbicos facultativos, son catalasa positiva. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía de 0.5 a 2.5 µm x 1.2-10 µm. 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).

### **Clasificación Taxonómica**

Jensen (2004). La clasificación taxonómica es la siguiente:

**Dominio:** Bacteria

**Phylum:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Ordenes:** Bacillales

**Género:** *Bacillus*

**Especie:** *subtilis*

Venegas *et al.*, (2005) señalan que: “existen cepas bacterianas silvestres del género *Bacillus* que son capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de cepas patógenas *Fusarium solani* y *F. oxysporum*”. Las cepas silvestres del género *Bacillus sp.*

Aislados de la rizosfera 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.

### **Modo de Acción de *B. subtilis***

Aun cuando el modo de acción contra los patógenos de plantas más ampliamente descrito para *B. subtilis* es la antibiosis a través de lipopéptidos antifúngicos, otros mecanismos menos conocidos como competencia por espacio e inducción de defensas secundarias en el huésped han sido también descritos. Avances recientes muestran que este microorganismo y sus lipopéptidos no sólo pueden actuar como antagonistas al inhibir el crecimiento de los patógenos, sino también como bloqueadores del crecimiento mediante competencia y como inmuno estimuladores por reforzar la resistencia del huésped (Ongena *et al.*, 2008).

### **Generalidades del género *Bacillus*.**

El potencial de *B. subtilis* se basa en su capacidad para una amplia gama de moléculas bioactivas, que muestran fuertes propiedades antifúngicas, junto con una baja toxicidad, alta biodegradación y características amigables con el medio ambiente en comparación con los pesticidas químicos (Chen *et al.*, 2008). Adicionalmente, la capacidad para formar endosporas, que le proporciona un alto nivel de resistencia a condiciones ambientales extremas, hace que estas bacterias sean buenas candidatas para el desarrollo de bioproductos (Errington, 2003; Ongena *et al.*, 2009).

Hoy en día se conoce la existencia de una gran variedad de microorganismos que habitan diferentes tipos de suelos, donde degradan o transforman la materia orgánica muerta que proviene principalmente de la vegetación, de los animales y microorganismos que habitan estos ecosistemas (Tate, 2000; Maragaño, 2003).

Uno de los principales microorganismos que se encuentran en los suelos son las bacterias y dentro de este grupo, las formadoras de endosporas, el género *Bacillus*. La endospora es una estructura especializada resistente a los efectos letales del calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos (Foster, 2001; Starr, 1981). En consecuencia, las bacterias forman esta estructura para

resistir las condiciones adversas del ambiente, también la pueden llegar a formar como una defensa metabólica (Foster, 2001). Por lo tanto, la formación de la endospora está dada por las condiciones del medio en que se encuentran estas bacterias (Schelegel, 1997). Estas endosporas pueden sobrevivir independientemente de la célula madre y pueden ser aisladas desde una gran variedad de sustratos, dada su resistencia al aire seco, al largo periodo de sobrevivencia bajo condiciones adversas (Holt *et al.*, 1984), y a sus características termorresistentes, ya que pueden llegar a soportar desde 80°C a 100°C de temperatura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de Estudio

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), ubicada en la calzada Antonio Narro 1923, a un costado de la carretera Saltillo-Zacatecas en Saltillo, Coahuila de Zaragoza, teniendo las coordenadas, 25° 22' latitud Norte y 101° longitud Oeste del meridiano de Greenwich a una altura de 1743 msnm.

El experimento se hizo en dos etapas una que comprendió las actividades efectuadas en invernadero (*In Situ*) y la otra más de las actividades en laboratorio (*In vitro*).

### Etapa de Invernadero

Esta etapa se llevó a cabo en el invernadero del Depto. de Parasitología de la Universidad (Figura 8). Se inició con la visita al lugar para su acondicionamiento y posteriormente trabajar en el proyecto.



**Figura 8.** Invernadero de Parasitología, Depto. De Parasitología, UAAAN.

### Acondicionamiento del área de trabajo

El área de trabajo está dentro del invernadero, en el cual se realizó limpieza de residuos de trabajos anteriores y algunas malezas presentes, se realizó una

aplicación de un extracto a base de ajo y canela para el control de la mosquita blanca a una dosis de 1 ml/litro de agua (Figura 9).



**Figura 9.** Aplicación del repelente a base de extracto de ajo y canela.

### **Material Utilizado**

Se utilizaron para el presente trabajo semillas de tomate de cáscara variedad Michoacana, charolas germinadoras, peat-moss y bolsas negras de plástico de 2 Kg de capacidad.

### **Tratamientos a la Semilla**

Se usaron tanto el tratamiento químico como el biológico: el químico fue después de haber colocado las semillas en la charola aplicando un producto llamado raizal a una dosis de 1gr/litro de agua, el tratamiento biológico a la semilla fue sumergiéndolas y dejándolas humedecer en un caldo de *B. subtilis* a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC a escala de Mc Farland, durante 4 horas, con el fin de inocular la semilla y posteriormente sembrarla (Figura 10).



**Figura 10.** Tratamiento a la semilla con *B. subtilis* y Raizal.

## Siembra en almacigo de tomate de cáscara variedad Michoacana

El día 01 de noviembre de 2014 se procedió a sembrar en una charola de 200 cavidades que anteriormente fue desinfectada, el sustrato que se utilizó fue humedecido, posteriormente se colocaron 200 semillas del tratamiento de *B. subtilis* en la mitad de la charola (Figura 11), en la otra mitad se colocaron las mismas semillas las cuales fueron tratadas con el Raizal (Figura 12), ya puestas las semillas se procedió a tapar todas las cavidades con el mismo sustrato y al final se dio un riego para saturar el sustrato.



**Figura 11.** Siembra de semilla inoculada con *B. subtilis*.



**Figura 12.** Siembra de la semilla tratada con Raizal.

### Obtención de Plántulas y Trasplante

El día 18 de noviembre de 2015 después de haber obtenido las plántulas con un buen tamaño y desarrollo de la raíz, se procedió a pasarlas en bolsas de plástico con sustrato Peat-moss certificado y previamente humedecido (Figura 13).



**Figura 13.** Trasplante de plántulas a bolsas con sustrato Peat-moss.

## Establecimiento del Experimento

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con un total de 8 tratamientos y 6 repeticiones cada uno, cada repetición tiene una plántula, se tienen 2 testigos comerciales: uno con el tratamiento de inoculación a la semilla con *B. subtilis* y otro con la aplicación de Raizal a la semilla en la siembra, dependiendo del tratamiento se les aplicó nutrición química y Sulfato de estreptomicina (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Tratamientos establecidos en el experimento.

Tratamientos	Componentes
Testigo comercial	Raizal + N. químicos
T1	Raizal + N. químicos + Sulfato de Estreptomicina + <i>C.m.m.</i>
T2	Raizal + N. químicos + <i>C.m.m.</i>
T3	Raizal + <i>B. subtilis</i> + <i>C.m.m.</i>
Testigo comercial	<i>B. subtilis</i> + N. químicos
T1	<i>B. subtilis</i> + N. químicos + Sulfato de estreptomicina + <i>C.m.m.</i>
T2	<i>B. subtilis</i> + N. químicos + <i>C.m.m.</i>
T3	<i>B. subtilis</i> + <i>B. subtilis</i> + <i>C.m.m.</i>

## Etapa de Laboratorio

La etapa de laboratorio se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología (Figura 14).



**Figura 14.** Laboratorio de Parasitología, Depto. Parasitología. UAAAN.

### **Reproducción e incremento de la bacteria antagónica *B. subtilis*.**

La cepa de *B. subtilis* pura y caracterizada bioquímicamente fue proporcionada por la Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda, dicha cepa se reprodujo masivamente en caldo nutritivo a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/ml en escala de Mc Farland, pasando 2 días estuvo listo para ser aplicado a cada tratamiento según sea el caso.

### **Reproducción de la bacteria *C. m. subsp. michiganensis***

Se obtuvo la bacteria de *C. michiganensis subsp. michiganensis* pura de una cepa ya caracterizada bioquímica y molecularmente, proporcionada por la Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda. De igual manera fue reproducida masivamente tomando una asada de una colonia y colocándola en un litro de caldo nutritivo, realizando esto en un área con la mayor asepsia posible, la cual posteriormente sería aplicada a las plantas de tomate según el tratamiento.

### **Aplicación de la bacteria antagónica *B. subtilis* a plantas sanas**

Se aplicó la suspensión de *B. subtilis* a una concentración de  $1 \times 10^6$  a cada tratamiento haciendo una aplicación directamente a la raíz, con una dosis de 5 ml/planta con ayuda de una jeringa. Dichas plantas se mantuvieron a temperatura ambiente en el invernadero, dándoles el riego con el fin de que el

inoculo tuviera las condiciones necesarias y se replicara en la planta para brindarles protección a las plantas ante el agente causal de la bacteria estudiada.

### **Inoculación de *C. m. subsp. michiganensis* a plantas sanas**

El inóculo de *C. m. subsp. michiganensis* se aplicó a los 8 días después de haber aplicado el tratamiento de *B. subtilis* con el fin de que cuando se aplicara el inoculo de la enfermedad la planta ya contara con algo de protección por parte del *Bacillus*, además como ya se sabe *B. subtilis* trabaja como nutriente en las plantas, por ello después del trasplante no se realizó ningún tipo de plan nutricional.

El inoculo infectivo se aplicó vía raíz a una dosis de  $1 \times 10^6$  UFC/ml en escala de Mc Farland, para que la infección fuera más rápida y así poder recolectar síntomas más rápidamente y en poco tiempo.

### **Identificación de síntomas bacterianos en tejido vegetativo**

Se recolectaron muestras de plantas enfermas con sospecha de *Clavibacter michiganensis*, es decir, plantas con síntomas de marchitez unilateral en tallos como dice la literatura citada, frutos con manchas de “ojo de pájaro”, plantas con raíces adventicias y hojas con el síntoma típico de “hojas de papel” (Figura15). Para corroborar los postulados de Koch. Las muestras se llevaron al laboratorio de Parasitología para verificar y corroborar que la bacteria que en verdad se trate de la bacteria que se está estudiando.



**Figura 15.** Hojas y tallos de tomate de cáscara con síntomas de *Clavibacter michiganensis* utilizados para el reislamiento de la bacteria, Depto. De Parasitología, UAAAN.

### Reislamiento de la bacteria

Se tomaron partes aéreas de la planta con síntomas de la bacteria, separando el tejido sano del enfermo, el cual fue lavado con agua de la llave y se cortaron pequeños trozos, que se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % y lavado con agua destilada estéril, estos fueron colocados en bolsas de maceración con 10ml de agua destilada estéril (Figura 16); posteriormente se usaron para hacer las primeras tres disoluciones ( $10^{-1}$ -  $10^{-2}$  - $10^{-3}$ ); que inicialmente tenían 9ml de agua destilada estéril y 1 ml de solución bacteriana; las cuales consistieron en tomar 1 ml de la bolsa de maceración y colocarlo en el tubo correspondiente de  $10^{-1}$ , de ahí se realizó la segunda disolución, tomando 1 ml para  $10^{-2}$  y la tercera disolución se tomó 1ml para  $10^{-3}$ ., la disolución  $10^{-3}$  de la que se sembró colocando 0.1ml por aspersion en el medio diferencial KB, con las medidas asépticas en la cámara de flujo laminar y fue incubada a  $28^{\circ}\text{C}$ /3 días, a partir de los cuales se diferenciaron por sus características y se tomaron en cuenta las que presentaron las características morfológicas correspondientes a *Clavibacter michiganensis*; colonias convexas, enteras y de color amarillo pálido, y la velocidad de crecimiento lento 0.2mm a 7 días (OEPP/EPPO, 2005).



**Figura 16.** Maceración de tejido y disoluciones de la maceración para identificación de la bacteria, Depto. Parasitología, UAAAN:

## **Resiembra de colonias bacterianas**

La siembra de colonias bacterianas se realizó con medidas asépticas mediante el uso de una asa bacteriológica, debidamente esterilizada para evitar la contaminación, la resiembra se hizo por estrías múltiple en medio KB, se incubaron a 28<sup>0</sup>C/5 días con la finalidad de contar con suficiente inóculo para las pruebas preliminares de identificación y las pruebas de patogenicidad.

## **Pruebas de Caracterización de Acuerdo al Protocolo de Schaad *et al.*, (2001).**

### **Tinción de Gram**

La tinción de Gram es muy importante en la bacteriología debido a que con este método se puede diferenciar organismos Gram positivos y Gram negativos.

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 1 minuto, se decantó con agua, se agregó Lugol por 1 minuto, se decantó con agua, se agregó etanol para decantar, posteriormente se agregó safranina 1% y se dejó decantar, se lavó con agua corriente y se dejó secar, se colocó en el microscopio y se enfocó a 4X, 10X, 40X y ya para enfocar a 100X se colocó una gota de aceite de inmersión sobre el frotis para observar las características más a detalle , y poder determinar color de la tinción, la colonia, la forma de acomodo y tipo de las células.

### **Prueba de Ryu**

La prueba de Ryu se hizo para corroborar el resultado de la tinción de Gram., consintió en colocar una gota de Hidróxido de potasio (KOH) al 3% en un porta objetos, posteriormente colocar con el asa bacteriológica flameada la colonia en la gota y diluir, observar si es mucoide levantando el asa de la gota, si se forma una tira de mezcla se considera positiva.

## **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 oxidasa**

Otra prueba realizada fue la de la oxidasa, para la 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 cultivo joven.

## **Parámetros Evaluados**

Los parámetros a considerar en este experimento fueron los siguientes:

**Altura de la planta:** Este parámetro presento con mucha significativa por efectos de los factores en estudio y por la interacción de estos. Pero tomando en cuenta cada tratamiento el factor de crecimiento no presento gran significancia.

**Número de frutos/ planta:** Este parámetro es una de las más importantes para determinar la productibilidad y rentabilidad que puede generar el cultivo.

**Número de hojas/planta:** Este parámetro sirve para saber si la planta tiene buen desarrollo foliar, el cual nos va a indicar que está produciendo mucha fotosíntesis.

**Diámetro del tallo:** Este parámetro no presento diferencia significativa considerable entre los tratamientos.

**Incidencia de la enfermedad:** Se evaluó el porcentaje de la enfermedad en las plantas, causado por *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* para saber el daño que causa en la planta, con la siguiente formula.

$$\text{incidencia(\%)} \frac{\text{plantas enfermas} - \text{plantas sanas}}{\text{Número total de plantas}} \times 100$$

**Severidad de la enfermedad:** también puede medirse en% esta variable, y la escala tomada fue de 0%, 25%, 50% y 100%, esto de acuerdo a los síntomas característicos de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* presentes en las plantas esto a un aproximado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención de Plántulas con los Tratamientos a la Semilla

Como resultados obtenidos se tiene que de las 200 semillas de cada tratamiento con *B. subtilis* y Raizal puestas a germinar se obtuvo un 94 % de germinación en el caso del Raizal y un 81 % en el caso del *B. subtilis* la diferencia de germinación pudo ser a que al momento de inocular el *B. subtilis* se selló la caja donde se tenían las semillas por más de 4 horas. De las cuales se trasplantaron 24 plántulas de cada tratamiento el día 01 de noviembre de 2014, para iniciar con el trabajo de investigación.

### Desarrollo del Cultivo

En el método de trasplante hubo un 100% de adaptabilidad de plantas, para poder corregir las deficiencias nutricionales se aplicó Urea y Triple17., tanto en la etapa vegetativa como reproductiva de la planta se presentó la mosquita blanca *Bemisia tabaci* para la cual se aplicó un repelente a base de extracto de ajo y canela, además se colocó una trampa amarilla al ras del cultivo.

Las enfermedades que se presentaron principalmente fueron cenicilla polvorienta *Erysiphe sp*; tizón tardío *Phytophthora infestans*, mancha foliar *Cercospora physalidis*, secadera de almarcigos *Damping off* y la bacteria estudiada cáncer bacteriano *Clavibacter michiganensis*.

Un problema fuerte durante la etapa vegetativa del cultivo fue la presencia de la rata de campo, para poder controlarla se colocaron trampas pegajosas y cebos con carbofuran.

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

Los resultados expresados en las pruebas bioquímicas correspondientes a *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* fueron las siguientes: colonias convexas, enteras y de color amarillo pálido, y la velocidad de crecimiento lento

2mm en 7 días de acuerdo a lo que encontró OEPP/EPPO (2005), con lo referente a las pruebas bioquímicas se compararon con Hernández (2013) lo cual se expresa en el siguiente (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Resultado de las pruebas bioquímicas en la caracterización de *Clavibacter michiganensis* de acuerdo a (Hernández, 2013).

Prueba	Literatura	Cepa caracterizada
Crecimiento en B de King	+	+
Tinción de Gram	+	+
Prueba de Ryu	-	-
Oxidasa	-	-
Catalasa	+	+

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

Entre las técnicas de tinción diferencial más importante 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 la acción del alcohol (Gram negativo) y las que conservan su coloración (Gram positivo), para el caso de *Clavibacter michiganensis* debe ser positivo. Hay casos inciertos, especialmente en bacterias corineformes, en ellos se recomienda utilizar la prueba de Ryu la cual nos resulta negativo (Noval, 1991).

King *et a.*, (1954) menciona que el medio de cultivo de B de King (KB) ,puede emplearse como medio rutinario de aislamiento y multiplicación, con la mayor parte de los patógenos, efectivamente este medio es muy apto para incrementar la cepa, por lo que en su mayoría se utilizó este medio (Figura 17).



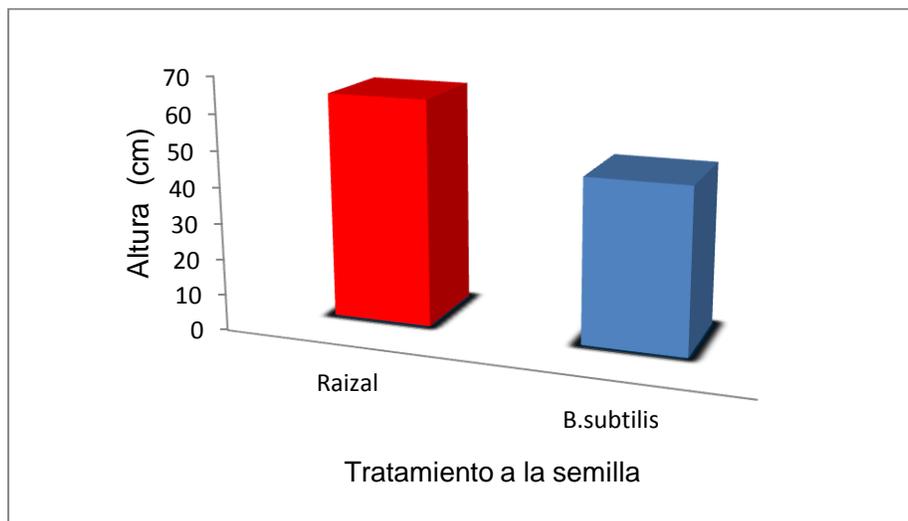
**Figura 17.** Crecimiento bacteriano típico de *C. michiganensis subsp. michiganensis* aislado de tomate de cáscara, Depto. Parasitología, UAAAN.

### Parámetros a Evaluar

**Cuadro 3.** Medias y parámetros a considerar en tomate de cáscara (primer muestreo).

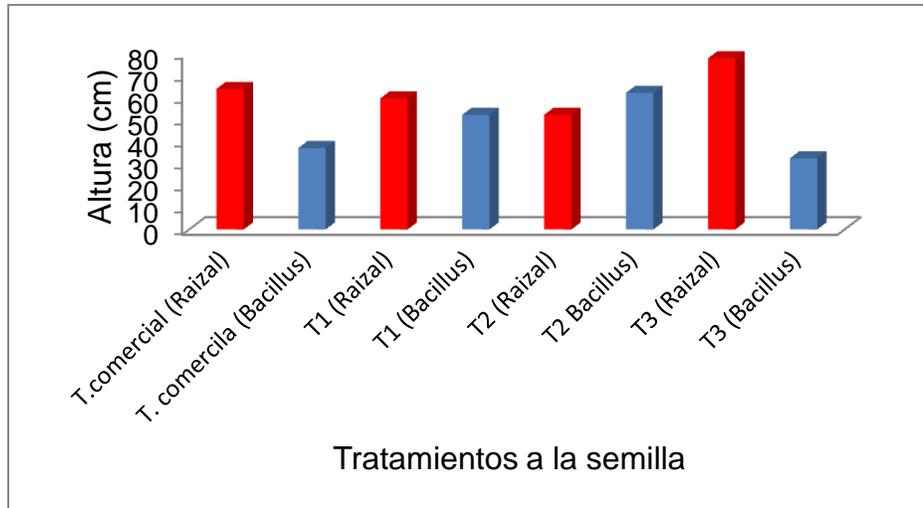
Promedios de Tomate de Cáscara Variedad Michoacana						
Tratamiento	Altura	Ø del tallo	# de	# de	%	%
	cm	cm.	hojas	frutos	Incidencia	severidad
	28/02/15	28/02/15	28/02/15	28/02/15	24/02/15	24/02/15
<b>T. comercial (Raizal)</b>	63.83	0.533	128.67	7.00	83.33	20.833
<b>T 1 (Raizal)</b>	59.42	0.400	165.83	1.17	100.00	29.167
<b>T2 (Raizal)</b>	52.08	0.400	191.67	19.00	66.67	16.667
<b>T3 (Raizal)</b>	77.75	0.450	149.50	11.50	100.00	25.000
<b>T. comercial (B. subtilis)</b>	37.00	0.450	64.33	0.00	50.00	8.333
<b>T1 (B.subtilis)</b>	52.25	0.500	98.50	4.83	33.33	8.333
<b>T2 (B. subtilis)</b>	62.08	0.533	122.50	7.50	50.00	12.500
<b>T3 (B. subtilis)</b>	32.33	0.367	38.83	0.00	66.67	16.667

El análisis de varianza detectó diferencia significativa entre tratamiento a nivel de  $P \leq 0.05$ . Conforme a la figura (Figura 18) se observa que se obtuvo mayor crecimiento con el tratamiento de Raizal aplicado a la semilla. En comparación con Bustos (2015) menciona lo contrario, que al usar *B. subtilis* se obtiene mayor crecimiento en las plantas de rábano.



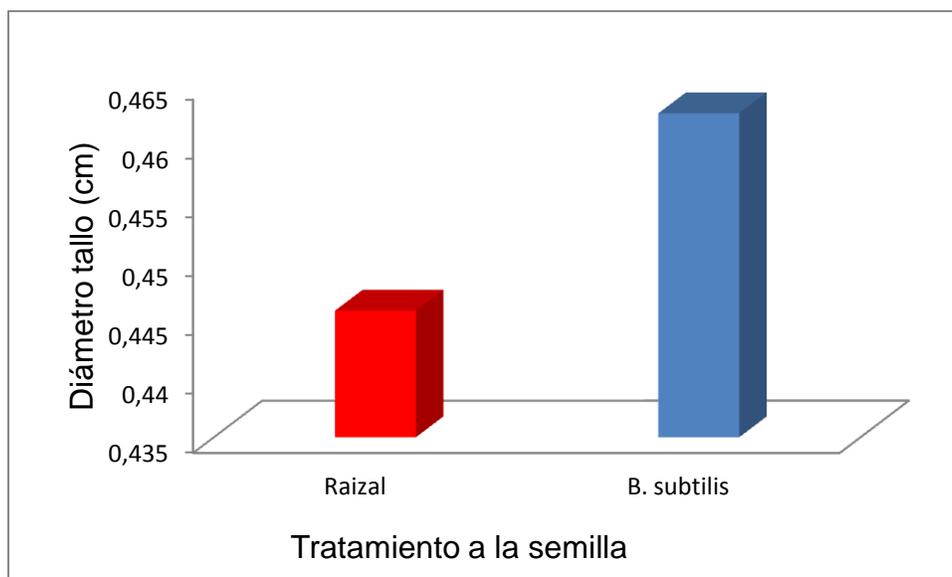
**Figura 18.** Comparación de medias de crecimiento de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos a la semilla. A los 102 días de la siembra.

La comparación de las medias muestran que la mayoría de los tratamientos con Raizal a la semilla a excepción del T2 presentan mayor crecimiento como se puede observar en la (Figura 19) al igual que los T1 Y T2 con *B. subtilis* a la siembra, el tratamiento que presento mayor crecimiento fue el T3 con Raizal a la siembra, cabe mencionar que el Testigo comercial con *B. subtilis* a la siembra y el T3 son los que presentan un menor crecimiento, siendo el T3 con *B. subtilis* el de menor crecimiento.



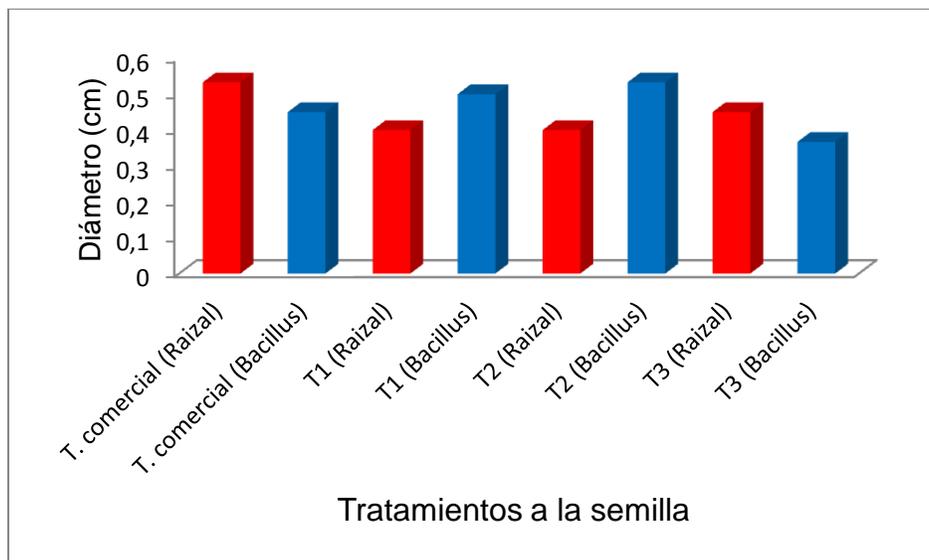
**Figura 19.** Comparación de medias del crecimiento de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos con Raizal a la siembra y *B. subtilis* a la siembra. A los 102 días de la siembra.

El análisis de varianza detecto diferencia significativa entre tratamientos a nivel de  $P \leq 0$ . De acuerdo a la (Figura 20) a pesar de que no hay gran diferencia entre los tratamientos, el tratamiento de *B. subtilis* tuvo mejor resultado en cuanto al diámetro del tallo en tomate de cáscara.



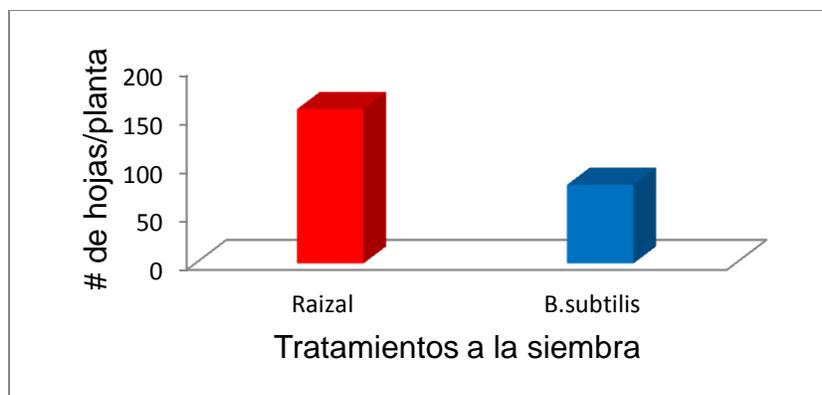
**Figura 20.** Comparación de medias del diámetro del tallo de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos a la semilla. A los 102 días de la siembra.

Al comparar las medias de la (Figura 21) muestran que el T. comercial de Raizal a la siembra y los T1 con inoculación de *B. subtilis* a la siembra son los tratamientos con mayor diámetro, pero estos junto con el T2 con *B. subtilis* a la siembra tienen similitud que va desde 0.5-0.533 cm., el tratamiento que presentó una media menor fue el T3 con *B. subtilis* a la siembra. De igual forma el T. comercial con *B. subtilis*, T1 y T2 con raizal a la siembra y T3 con inoculación Raizal a la siembra tienen similitud en cuando a la media de sus diámetros que va de 0.4-0.45.



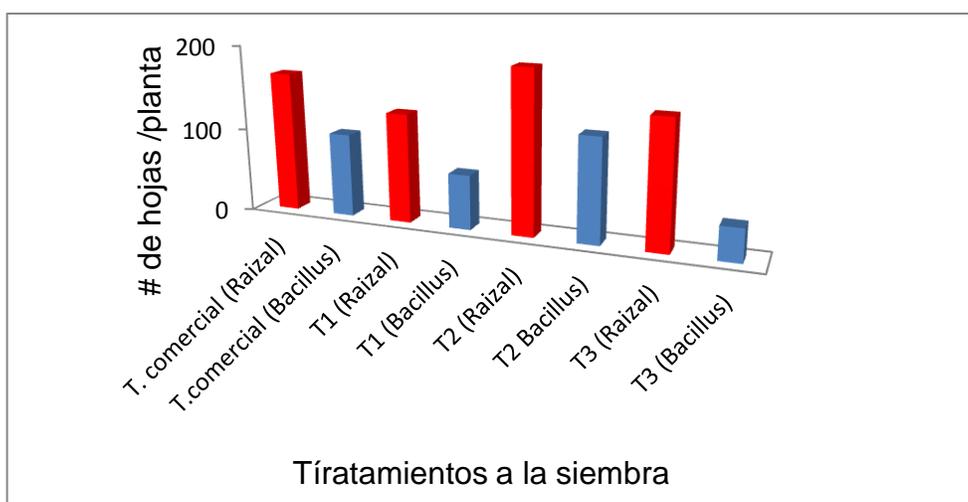
**Figura 21.** Comparación de medias del diámetro del tallo de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos con Raizal a la siembra y *B. subtilis* a la siembra. A los 102 días de la siembra.

El análisis de varianza detectó una diferencia significativa entre los tratamientos a nivel de  $P \leq 0$ , observar la (Figura 22), se puede distinguir la diferencia entre las medias, siendo el tratamiento de Raizal el que obtuvo un mayor número de hojas/planta, este resultado puede ser porque en este tratamiento siembre hubo mayor desarrollo foliar.



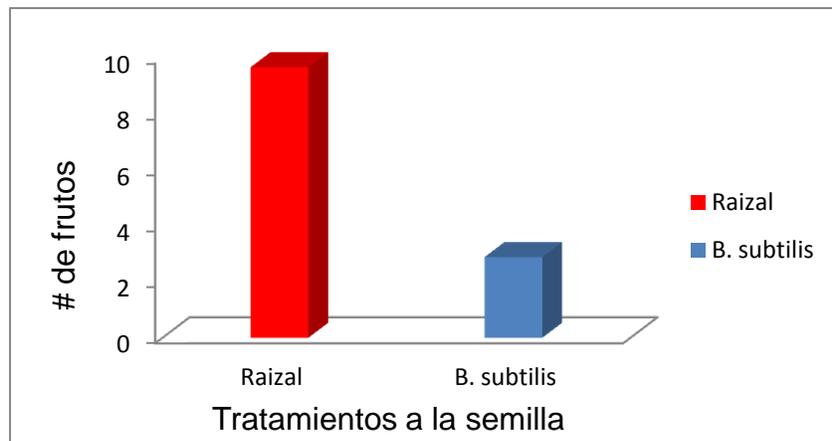
**Figura 22.** Comparación de medias del número de hojas/planta de tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 102 días de la siembra.

Comparando las medias de la (Figura 23) nos dice que los T1 y T2 con Raizal a la siembra son los tratamientos que presentan mayor número de hojas, siendo de estos el T2 con Raizal a la siembra el tratamiento con mayor número de hojas, al observar el T. comercial y T3 con Raizal a la siembra junto con el T2 con *B. subtilis* a la siembra nos muestra que hay una similitud en cuanto al número de hojas, con un rango de 122-150 hojas. De la misma forma el T. comercial, T1 y T3 con *B. subtilis* a la siembra son los tratamientos que presentaron el menor número de hojas, siendo de estos el T3 con *B. subtilis* a la siembra el de menor número de hojas.



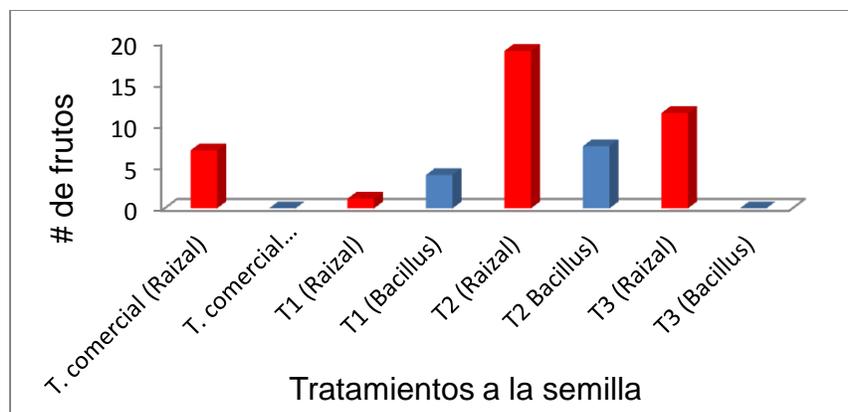
**Figura 23.** Comparación de medias del número de hojas/planta de tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la semilla y *B. subtilis* a la siembra. A los 102 días de la siembra.

El análisis de varianza mostró diferencia significativa entre los tratamientos a nivel de  $P \leq 0$ , de acuerdo a la (Figura 24), como hay una marcada diferencia entre los tratamiento, el tratamiento de Raizal a la siembra es el que mostro el mayor número de frutos, esto puede ser porque desde siempre este tratamiento presento más desarrollo foliar.



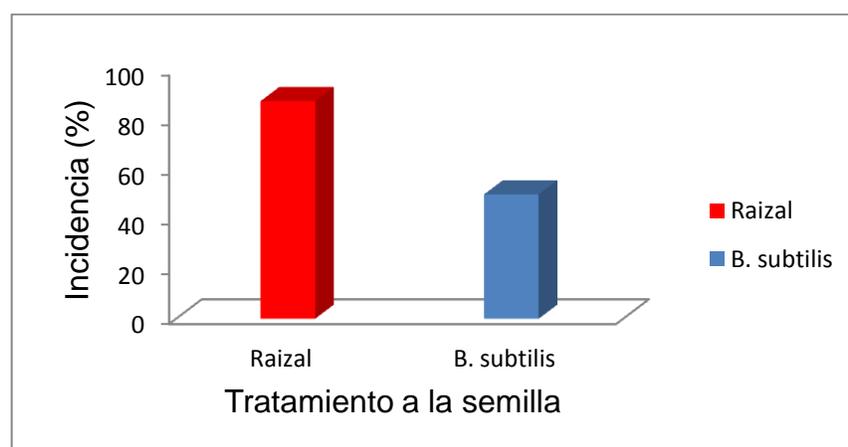
**Figura 24.** Comparación de medias del número de frutos de tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 102 días de la siembra.

De acuerdo a la (Figura 25) muestra que el mejor tratamiento en cuanto al número de frutos fue el T2 con Raizal a la siembra pero que no marca gran diferencia con el T3 de raizal a la siembra. Así mismo el T. comercial con Raizal a la siembra y los T1 y T2 con *B. subtilis* a la siembra muestran una similitud en cuanto a sus medias. Cabe señalar que el T1 de Raizal a la siembra, el T. comercial y T3 de *B. subtilis* a la siembra muestran una semejanza en sus medias, siendo los 2 últimos tratamientos los de menor número de frutos.



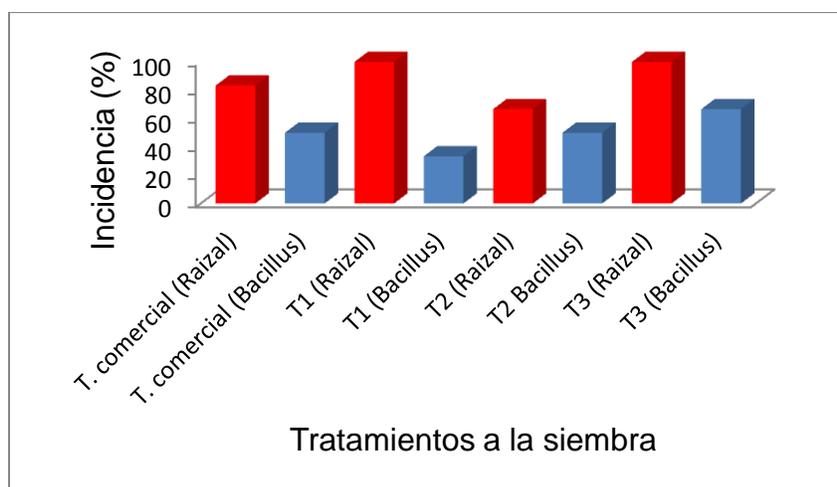
**Figura 25.** Comparación de medias del número de frutos de tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y *B. subtilis* a la siembra. A los 102 días de la siembra.

El análisis de varianza detectó diferencia significativa entre los tratamientos a nivel de  $P \leq 0$ , de acuerdo a la incidencia en el tomate de cáscara, donde el tratamiento de Raizal a la semilla presento mayor porcentaje de incidencia, este resultado puede ser porque el *B. subtilis* ya está haciendo su trabajo de controlar la bacteria patógena. De acuerdo a Virgen y García (1990) obtuvieron una reducción en la incidencia de *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*, en plantas de sandía, mediante el tratamiento de la semilla con *Bacillus subtilis* ( $1.6 \times 10^4$  bacterias g<sup>-1</sup> de semilla).



**Figura 26.** Comparación de medias del porcentaje de incidencia en tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 98 días de la siembra.

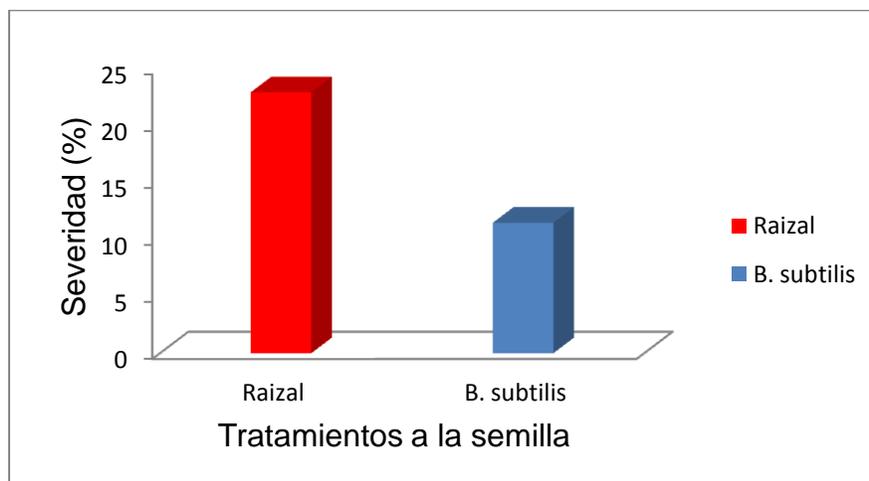
Conforme las medidas expresadas en porcentajes en la (Figura 27), muestran una similitud, ya que entre algunos tratamientos los porcentajes de incidencia son similares. El T1 y T3 con Raizal a la semilla y T. comercial de Raizal son los tratamientos de mayor % de incidencia, los 2 primeros con un 100 %, este último con un 83.33 %, siendo que este no debería de haber presentado síntoma alguno pero fue infectado por la cercanía entre los tratamientos, de la misma forma el T2 con raizal a la semilla y T3 con *B. subtilis* a la semilla presentan la misma incidencia, los tratamientos con menor de incidencia son el T1, T. comercial y el T2 con *B. subtilis* a la semilla, el T1 de *B. subtilis* con un 33.33 % es el de menor p incidencia, cabe señalar que el T. comercial con *B. subtilis* a la siembra arrojó un 50 % de incidencia y no debería de mostrar síntoma alguno pero se contaminó por la cercanía entre los tratamientos.



**Figura 27.** Comparación de medias del porcentaje de incidencia en tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y *B. subtilis* a la siembra. A los 98 días de la siembra.

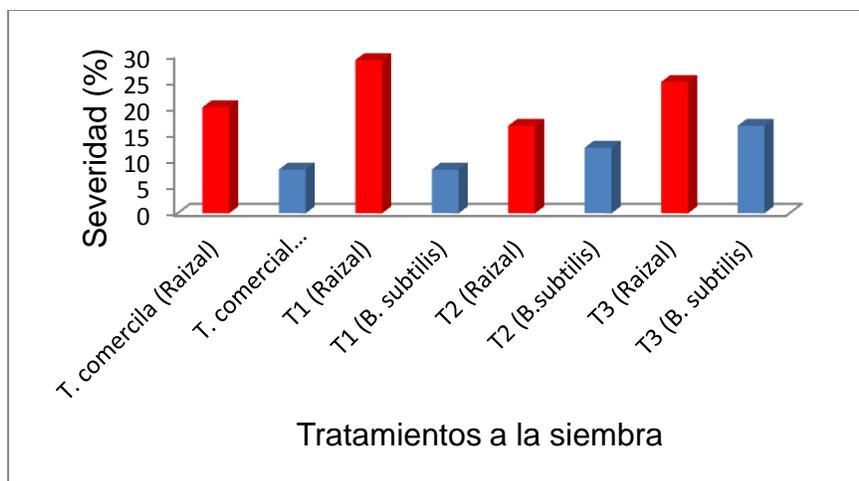
El análisis de varianza no detectó diferencia significativa entre los tratamientos a nivel de  $P \leq 0$ , en cuanto al daño foliar que es lo que se presentaba hasta entonces ya que aún no había ningún fruto, fue el tratamiento de *B. subtilis* el que ofreció mayor protección a comparación con la media de los tratamientos de Raizal a la siembra (Figura 28). Rojas (2014) trabajó con el mismo agente de control en tomate rojo de la variedad cherry, encontrando que los tratamientos con

*Bacillus* no presentaron síntomas, solo el testigo absoluto con *C. m.m.*, presentó un 75% de incidencia al igual que en la variedad saladatte con un 100% de incidencia.



**Figura 28.** Comparación de medias del porcentaje de severidad en tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 98 días de la siembra.

Como se observa los tratamientos con *B. subtilis* a la semilla son los que presentan un bajo porcentaje de severidad en todos sus tratamientos (Figura 29). Los tratamientos con más baja severidad son T1 y T. comercial con *B. subtilis* a la semilla con un 8.33 %, seguido de T2 con el mismo tratamiento con un 12.5 %, el tratamiento T3 con el mismo tratamiento y el T2 con Raizal a la siembra tienen el mismo % que es de 16.66 %, los T1, T3 y el T. comercial con Raizal a la siembra son los que presentan un mayor % que va de 20-30 %, pero fue el T1 con Raizal a la siembra el de mayor % con un 29.16%.



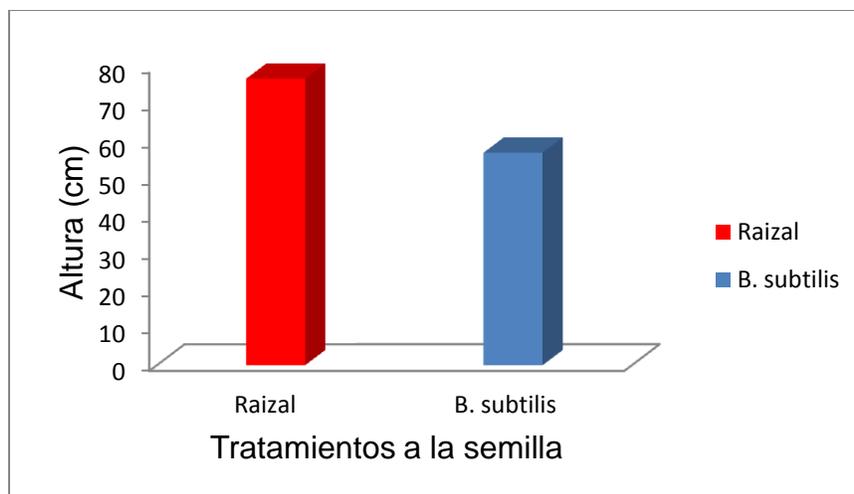
**Figura 29.** Comparación de medias del porcentaje de severidad en tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y *B. subtilis* a la siembra. A los 98 días de la siembra.

En el segundo muestreo ya no se contaron el número frutos/planta ni el número de hojas /planta, ya que hubo un ataque masivo de ratas, por lo que solo, se midió el diámetro y longitud de la raíz midiendo dos plantas de seis por tratamiento, de las cuales se sacó el promedio como se observa en el siguiente cuadro (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Medias y parámetros a considerar en tomate de cáscara (segundo muestreo).

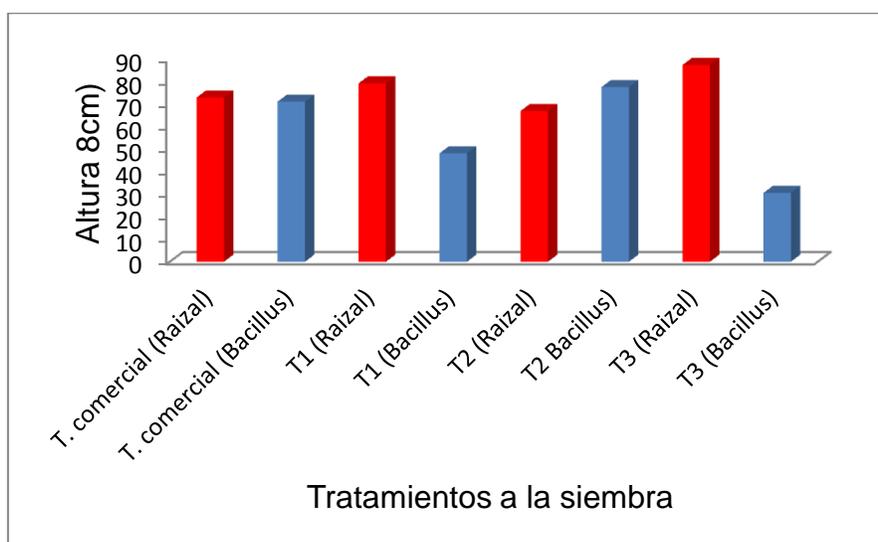
<b>Promedios de Tomate de Cáscara Variedad Michoacana</b>						
<b>Tratamiento</b>	<b>Altura cm 15/04/15</b>	<b>Ø del tallo cm. 15/04/15</b>	<b>% incidencia 15/04/15</b>	<b>% severidad 27/04/15</b>	<b>Ø de Raíz 26/05/15</b>	<b>Long. De raíz 26/05/15</b>
<b>T. comercial (Raizal)</b>	79.50	0.583	100	55.52	11.5	26.25
<b>T1 (Raizal)</b>	73.17	0.500	100	43.03	14	13.5
<b>T2 (Raizal)</b>	67.17	0.367	100	90.27	18.5	20.5
<b>T3 (Raizal)</b>	87.67	0.533	100	65.25	12.5	14
<b>T. comercial (<i>B. subtilis</i>)</b>	48.33	0.433	100	84.70	22	21
<b>T1 (<i>B. subtilis</i>)</b>	71.33	0.533	100	84.70	13.5	19.5
<b>T2 (<i>B. subtilis</i>)</b>	77.83	0.583	100	52.75	22	17
<b>T3 (<i>B. subtilis</i>)</b>	30.67	0.316	100	63.87	12.5	10.5

El análisis de varianza no detectó diferencia significativa entre los tratamientos a nivel de  $P \leq 0$ . De acuerdo a la (Figura 30) se observa que se obtuvo mayor crecimiento en el tratamiento con Raizal aplicado a la semilla. Comparando con Vallad & Goodman (2004) quienes mencionan que algunos inductores de resistencia no sólo pueden activar mecanismos de defensa sino que también promueven un efecto favorable en cuanto la altura de las plantas.



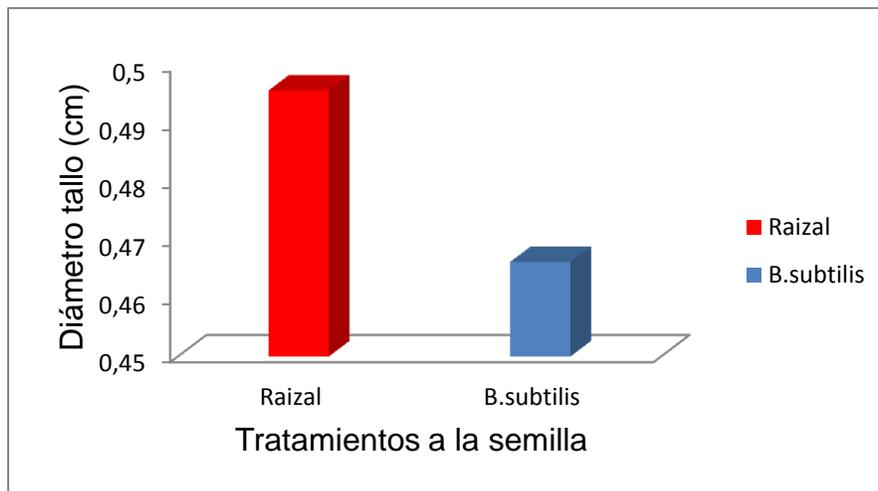
**Figura 30.** Comparación de medias de crecimiento de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos a la semilla. A los 148 días de la siembra.

La comparación de las medias muestran que la mayoría de los tratamientos con Raizal a la siembra mostraron un mayor crecimiento (Figura 31), siendo el T3 en de mayor crecimiento, en tanto los tratamientos que presentaron una similitud en su crecimiento fueron T1, T. comercial y T2 con Raizal a la semilla, así como el T1 y T2 con *B. subtilis* a la semilla, por otro lado el T. comercial y T3 con *B. subtilis* a la semilla presentan semejanza en su crecimiento, siendo el T3 con *B. subtilis* a la semilla en de menor crecimiento.



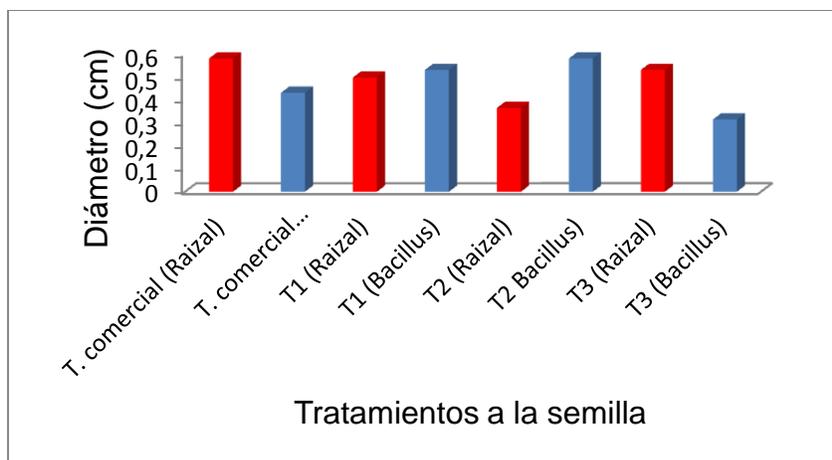
**Figura 31.** Comparación de medias del crecimiento de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos con Raizal a la siembra y *B. subtilis* a la siembra. A los 148 días de la siembra.

El análisis de varianza no detectó diferencia significativa entre los tratamientos a nivel de  $P \leq 0$ . De acuerdo a la (Figura 32) a pesar de no haber tanta diferencia el tratamiento de Raizal a la semilla tuvo mejor resultado de diámetro del tallo, esta diferencia puede ser porque desde el principio las plantas con el tratamiento de Raizal a la semilla tuvieron un buen desarrollo foliar.



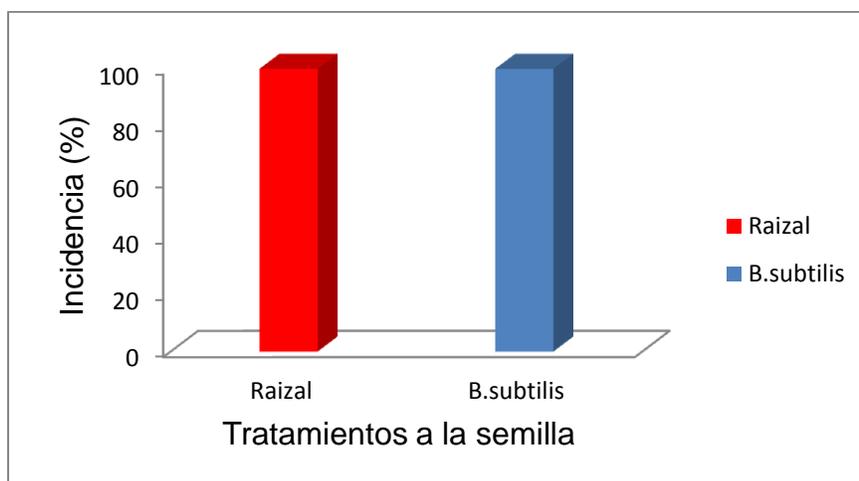
**Figura 32.** Comparación de medias del diámetro del tallo de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos a la semilla. A los 148 días de la siembra.

Comparando las medias de la (Figura 33) muestra que el T. comercial, T1 y T3 con Raizal a la siembra presentan semejanzas en los diámetros con el T1 y T2 con *B. subtilis* a la semilla, siendo los T1 con Raizal y T2 con *B. subtilis* los de mayor diámetro. Así mismo el T. comercial y el T2 con Raizal junto con el T3 con de *B. subtilis* a la siembra presentan similitud en sus diámetros, resultando el T3 con *B. subtilis* en la semilla con el menor diámetro.



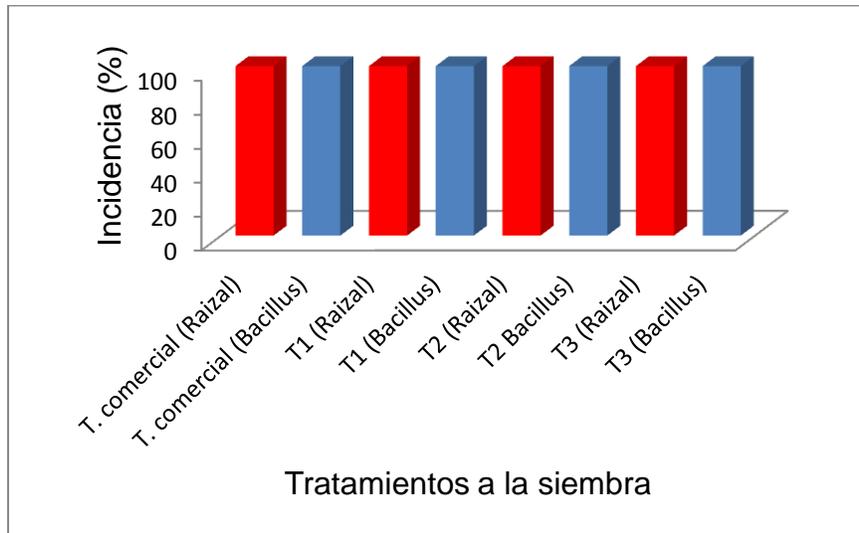
**Figura 33.** Comparación de medias del diámetro del tallo de tomate de cáscara en (cm) entre los tratamientos con Raizal a la siembra y *B. subtilis* a la siembra. A los 148 días de la siembra.

El análisis de varianza no detectó diferencia significativa entre los tratamientos a nivel de  $P \leq 0$ , los tratamientos no mostraron ninguna diferencia en las medias de incidencia como se observa en la (Figura 34) esto puede ser porque al momento de regar se salpicaban las plantas, o estar dentro del invernadero se movían las plantas al pasar entre las hileras. De acuerdo a León *et al.*, (1982) las bacterias son llevadas hasta las plantas a través de la manipulación, la cual tiene lugar durante el transporte, aunque también son diseminadas por el riego, lluvia, acarreadas por el viento y las prácticas agrícolas como el atado y la poda donde la planta llega a tener heridas por el manejo.



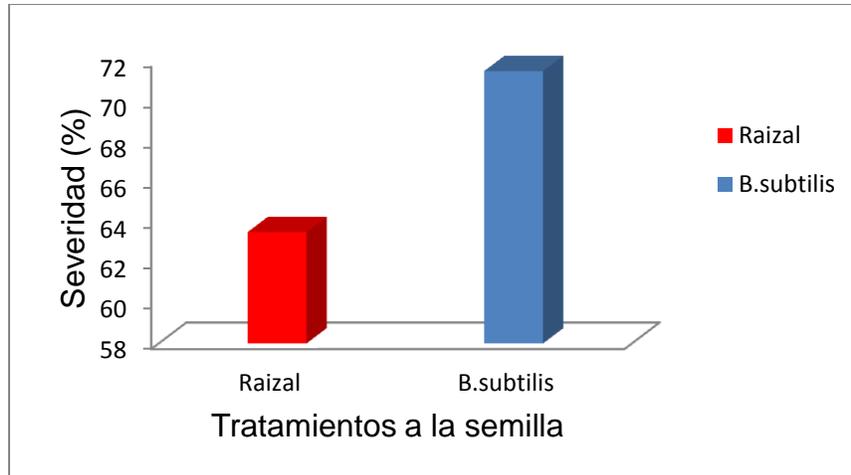
**Figura 34.** Comparación de medias del porcentaje de incidencia en tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 148 días de la siembra.

Al observar las medias en la (Figura 35) se muestra una similitud ya que los porcentajes de incidencia son similares entre sí. Esto quiere decir que la enfermedad está presente en todas las plantas de tomate de cáscara.



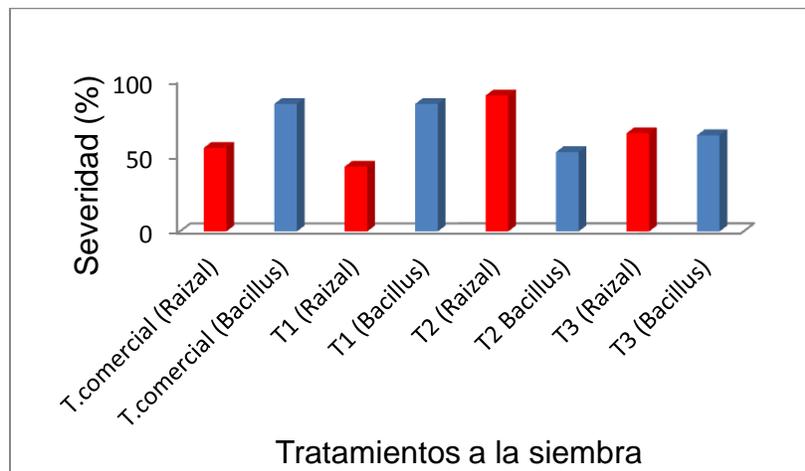
**Figura 35.** Comparación de medias del porcentaje de incidencia en tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y *B. subtilis* a la siembra. A los 148 días de la siembra.

El análisis de varianza detectó diferencia significativa entre los tratamientos a nivel de  $P \leq 0$ , el tratamiento con *B. subtilis* a la semilla es el tratamiento con mayor porcentaje de severidad, estos porcentajes pueden ser porque las condiciones que se presentaron dentro del invernadero fueron favorables a la bacteria y también pudo haber contaminación en los tratamientos con inoculación de *B. subtilis* a la semilla. Tal como dice Tlapa (2008) la distribución de la enfermedad en campo y bajo condiciones de invernadero se ve favorecida por el agua (salpicadura, viento, aspersion) así como las prácticas culturales como las podas o tutoreo donde la planta sufre heridas mecánicas por el manejo. Se llevó a cabo una segunda inoculación de *C.m.m* en febrero 2015 ya que la planta sufrió un ataque de ratas y la parte área fue totalmente consumida.



**Figura 36.** Comparación de medias del porcentaje de severidad en tomate de cáscara entre los tratamientos a la semilla. A los 160 días de la siembra.

Al comparar los tratamientos la (Figura37) muestra que el T1 y el T. comercial con *B. subtilis* a la semilla tiene una semejanza con T2 con Raizal aplicado a la semilla en cuanto al porcentaje de severidad, siendo el T2 con Raizal a la semilla el de mayor severidad con un 90%, de la misma forma el T1, T. comercial y el T3 con Raizal a la semilla presentan un rango que va de 43-65 % de severidad con el T2 y T3 con *B. subtilis* a la semilla, siendo el T1 con Raizal a la semilla el de menor porcentaje de severidad.



**Figura 37.** Comparación del porcentaje de severidad en tomate de cáscara entre los tratamientos con Raizal a la siembra y *B. subtilis* a la siembra. A los 160 días de la siembra.



**Figura 38.** Severidad de *C. m. subsp. michiganensis* en tomate de cáscara.

## CONCLUSIONES

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

1. Se determinó la presencia de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en tomate de cáscara.
2. En cuanto, a la diferencia significativa entre los tratamientos a la semilla con *B. subtilis* y Raizal, el de *B. subtilis* presento un porcentaje más bajo en la germinación.
3. En cuanto a la producción el T2 con Raizal a la siembra es el que presentó mayor número de frutos, a comparación con el T. comercial y el T3 con inoculación de *B. subtilis* a la siembra que no presentaron ningún frutos, de acuerdo a la fecha que se hizo el muestreo.
4. Los resultados de severidad en el primer muestreo nos dió un 11%, cambiando totalmente en el segundo muestreo con un 71.5% lo cual nos indica que haciendo más aplicaciones de *B. subtilis* sería lo ideal para un mejor manejo de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*; sin embargo el los tratamientos con Raizal nos dio un 22% de severidad en el primer muestreo y en el segundo un 63.5 % de severidad.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, N. G. 1993. Fitopatología. 1ª Ed. Limusa. México. 756 p.
- Aguirre, A. 1965. Patología Vegetal. Ediciones Omega S. A. Barcelona, España. 816 p.
- Alfaro, S. 1998. "Caracterización agronómica de 40 variedades de Tomate de cascara *Physalis ixocarpa*, Brot., en el sur de Nayarit. Bermejillo, Durango.
- Alvarado, N. J. 1995. Estimación de varianza aditiva y heredabilidad en tomate (*Physalis ixocarpa*, Brot), Material SB 1200-93, derivado del cultivar "rendidora" Tesis de Licenciatura, Depto. de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.
- Ayala, P., J., P. 1992. Caracterización de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot) en Chapingo, México. Tesis de Licenciatura, Departamento de Fitotecnia, UACH. 62 pp.
- Barboa, F. J., Rueda, P. E. O., Acedo, F. E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo, J. O., García, O. A. M. 2006. Detección de *Clavibacter michiganensis subsp. mihiganensis* en el tomate del Estado de Sonora, México. Evista Fitotecnia Mexicana, 32(4): 319-32. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. México.
- Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables. Development and control. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Barker, K. F. 1987. Evaluating concepts of biological control of plant pathogens. *Ann Rev Pbytopbatbol* 25, 67-85.
- Besain, X. 1994. Factores de desarrollo y control de cáncer bacterial del tomate. Empresa y Avence Agrícola: 31:24-, 27.

- Blancar, D. 2005. Enfermedades del tomate. Mundi-Prensa. Madrid, España. 212 p.
- Bustos T. J. A. 2015. Manejo del Patosistema *Streptomyces scabies* Thaxter en Rabanito *Raphanus sativus* L. con *Bacillus subtilis* Conh Bajo Condiciones de Invernadero. Tesis Profesional. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México. Pp.27.
- Castillo, P. I. 1990. Estudio de dos densidades de población, dos sistemas de manejo y tres arreglos topológicos en tomates de cascara (*Physalis ixocarpa*, Brot). Tesis de licenciatura, Depto. De Fitotecnia Universidad Autónoma Chapingo. 59 pp.
- Chang, R. J.; Ries, S. M and Pataky, J. K. 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the devolpment of becterial canker on tomatoes. *Phytopathology* 82:553-560.
- Chen, H., Wang L., Gong G. H., Wang, P., Yu, A.L. 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* 47, 180-186.
- CNRDF-DGSV. 1999. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Memorias. Centro Nacional de Referencias Fitosanitarias, Dirección General de Sanidad Vegetal. México.
- Colloch, H. M., T. Cook and W.R. Wright. 1972. Market diseases of tomatoes peppers and eggplants. U.S. department of Agriculture. Estados Unidos. 102 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. 32p.

- EPPO, 1999. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. Data sheets on Quarantine Pests Prepared by the EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) for the E.U.
- EPPO. 2010. Data sheet on quarantine pest. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. EPPO A2 List. N<sup>o</sup>. 50.
- Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. Nat Rev Microbiol 1, 117-126.
- Flores, R. F. E. 2004. Evaluación *in vitro* del control de *Bacillus sp.* Sobre *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. Memoria Profesional. Universidad de Talca, Talca-Chile. [Consulta: 03 de diciembre de 2015] [En línea: [http://dspace.otalca.cl:8888/ciencias\\_agrarias/FFloresR.pdf](http://dspace.otalca.cl:8888/ciencias_agrarias/FFloresR.pdf) ]
- Foster, A. 2001. Magazine: Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, UK. 91(2):364-72.
- García, E. R., Carillo, F. y Siller, C. 2007. Presencia de cáncer bacteriano en tomate injertado. Confederación de Asociaciones Agrícolas del estado de Sinaloa CAADES. 18a Ed. 82 p.
- García, S. R., Carrillo, A. J., Allende- molar, R., Márquez, Z. I. y Cruz, O. J. 2000. Síntomas e identificación de bacterias en plantas de tomate cultivadas con alta tecnología en Sinaloa. Resúmenes del XXVII Congreso nacional de fitopatología. Soc. Mex. De Fitopatología. L-32.
- González, M. R. 2013. MONOGRAFÍA DEL TOMATE DE CÁSCARA (*Physalis ixocarpa*, Brot). Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional de Zonas Áridas. [Consulta: 15 de diciembre de 2015] [En línea: <http://genetica-rey.blogspot.mx/2013/01/tomate-de-cascara.html>]

- Gûemes, G. M.; Palacios, A. A.; Ramírez, R. S.; García, P. F.; Salazar, P. A y Inoue, K. 2001. Guía para cultivar tomate de cáscara en el estado de Morelos. Folleto para productores No. 29. Zacatepec, Morelos, México. Pp. 2-3. [Consulta: 15 de noviembre de 2015.] [En línea: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/2948/hortalizas12.pdf?sequence=1> ]
- Hernández, P. M. 2013. Manejo del patosistema Toamate (*Solanum lycopersicum* L.) Cáncer Bacteriano (*Clavibacter michiganensis subsp.michiganensis*) con *Bacillus subtilis*. Tesis Profesional. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México.
- Holguín, P. R., Vázquez, J. R. C., Rueda, P. E. O. 2006. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* in tomato in the Baja California Peninsula of México. The American Phytopathological Society. Plant disease. 90 (12): 1550.
- Holt, J., Sneath, P., Mair, N. & Sharpe, M. 1984. Bergey's, Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA. 965-1599 p.
- Jansen, 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 ad ed. New York, USA: Spring Publishing, 973-982.
- Jones, J. B., Jones J. P. 1993. Compendium of tomato Diseases. The America Phytopathological Society. Minnesota, Estados Unidos.
- 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.
- Koneman, E. W. 2001. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires.

- Ledezma, H., A. 1994. Micropropagacion en tomate de cascara (*Physalis ixocarpa*). Tesis de licenciatura, Depto. de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.
- Lelliott, R.A. & D. E. Stead. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- León, G. y Y. M. Arosamena D. 1982. El cultivo de tomate para el consumo fresco en el valle de Culiacán. INIA-SARH. 183 p.
- Lewis, I. M, L. and Miller, S. A. 2005. Evaluation of hot mater seed treatment for the control of bacterial leaf spot and banterial canker on fresh market and processing tomatoes. Acta Horticultura 695: 197-204.
- MAPA/DGSPA, 1991. Manual de laboratorio. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Dirección General de la Producción Agraria. Mundi-prensa. Madrid, España.
- Maragaño, M. 2003. Efectos de las plantaciones de *Pinus radiata* D. Don sobre el recurso agua en la localidad de Gualleco, zona de secano costero, VII Región. Tesis para título de Ingeniero Forestal. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile. 40 p.
- Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades Fungosas de Hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología. Chapingo, Estado de México. Pp. 65-80.
- 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.

- OEPP/EPPO. 2005. No. 39, Diagnostic protocol for *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. – Data Sheets on Quarantine Pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 275-283.
- Ongena M, Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopéptidos: armas versátiles para el control biológico de enfermedades de plantas. Trends Microbiol; 16: 115-125.
- Ongena, M., Henry, G., Thonart, P. 2009. The roles of lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. En: Gisi, u., Chet, L., Gullino, M. L. Recent Developments in Management of Plant Diseases, Plant Pathology in the 21 st Century Springer Verlag. Berlin, pp. 59-69.
- Pandey, K. K. 1957. Genetics of Self Incompatibility; *Physalis ixocarpa* Brot. A New System. Amer. J. Bot. 44: 879-887.
- Peña, L. A. y Márquez, S. F. 1990. Mejoramiento Genético del Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). Rev. Chapingo 71-72: 84-88.
- Piña, A. J. y F. Ponce G. 1990. Etiología y Control del Carbón del Tomate de Cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) en Luvianos y Villa Guerrero, México. Rev. Chapingo. 67/68: 22:25.
- PPRODUCE. 2005. Memoria: Jornada de Tecnología de Producción de Tomatillo. Fundación PRODUCE, Sinaloa A. C. Culiacán, Sinaloa, México. 72 p.
- Ramírez, R. J. y Sáinz, R. R. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1ra. Ed. Once Ríos (eds). Culiacán, Sinaloa, México. 19-160 pp.
- Rat, B., Poissonner, J.; Goisque, M. J., and Burgaud, A. 1991. Le Point. Sur le chancro bactérien. Frutas y hortalizas. Prepared by CABI and EPPO for the EU. 86. 38-40 pp.
- Rodríguez, M. M. L. 1994. Manual de identificación de bacterias Fitopatógenas. UACH. México.

- Rodríguez, R. R.; Tabares, R. J. M.; Medina, J. J. A. 1997. Cultivo Moderno del Tomate 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 167 p.
- Rojas L. L. 2014. Control Biológico del Cáncer bacteriano *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* con Dos Cepas de *Bacillus subtilis* en Tomate *Solanum lycopersicum* Mill. Variedad Cherry y Saladette *In situ*. Tesis Profesional. UAAAN. Saltillo, Coahuila, México. Pp. 64.
- Santiaguillo, H., J. F y López, M.R. 1992. Colecta, conservación y evaluación de germoplasma de tomate de cascara (*Physalis spp*), en México. Tesis de Licenciatura departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 107 pp.
- Saray, M. C. R. y J. Loya R. 1978. El cultivo de Tomate de Cáscara en el Estado Morelos. El campo. 54 (1040): 30-40.
- Saray, M. C. R. y L. Loya. 1977. El cultivo del Tomate Cáscara en el Estado de Morelos. SARH, INIA, CIAMEC, CAEZACA, México. Pp. 3-11.
- Schaad, N. W; Jonas and W.Chau. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 5ª.Ed. APS PRESS Minnesota U.S.A. 374 p.
- Schlegel, H. 1997. Microbiología general, Ediciones Omegas, S.A., Barcelona. P. 654.
- Starr, M. 1981. The Prokaryotes, vol. 2. Edited by Springer-Verlag, Berlín Heidelberg. 1106-2284 p.
- Tate, R. 2000. Soil Microbiology, segunda edición. Edited by John Wiley & Sons, Canadá. 508p.
- Tlapa, B. B. 2008. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de tomate (*Solanum esculentum*) In Jitomate tecnoligas para su producción en invernadero.

- Vallad G. E. and Goodman R. M. 2004. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. Crop Science Society of America. 44:1920-1934.
- Valtierra, P. E; Ramos S. A. 2003. Programa estratégico de necesidades de Investigación y Transferencia de Tecnología de la cadena productiva de TOMATE VERDE en el Estado de Puebla. [Consulta: 30 de septiembre de 2014.] [En línea: <http://www.cofupro.org.mx/cofupro/Publicacion/Archivos/penit100.pdf>]
- Venegas, E. Ciampi L., collado L., Costa M., Fuentes R., Nissen J., Schobitz R. y Schobitz M. 2005. Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género bacillus cohn antagonistas de cepas patógenas de fusarium link. En *cala. Agro* su.vol.33,no.2 p.1-12 [En línea: [http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304](http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304) ]
- Virgen C., G. y J. García C. 1990. Resultados preliminares sobre control biológico de *Fusarium oxysporum f. sp. niveum* con *Bacillus subtilis* en sandía, bajo condiciones de campo. pp. 106.

## ANEXO

### Parámetros a Evaluar en Tomate con Tratamiento de Raizal a la Semilla (1<sup>re</sup> muestreo)

		Incidencia	% Severidad	Ø del tallo cm.	Altura cm.	No. Hojas/P	No. Frutos/P
		<b>Tratamiento 1</b>	<b>R1</b>	100	25	0.6	96
	<b>R2</b>	100	50	0.2	38	79	0
	<b>R3</b>	100	25	0.2	38	38	0
	<b>R4</b>	100	25	0.4	57.5	138	1
	<b>R5</b>	100	25	0.5	81	296	2
	<b>R6</b>	100	25	0.5	46	193	0
	<b>Promedios</b>	100	29.1666667	0.4	59.42	165.83	1.16666667
		Incidencia	% Severidad	Ø del tallo cm.	Altura cm.	No. Hojas/P	No. Frutos/P
		<b>Testigo comercial</b>	<b>R1</b>	0	0	0.4	52.5
	<b>R2</b>	100	25	0.4	27.5	50	0
	<b>R3</b>	100	25	0.9	36	104	0
	<b>R4</b>	100	25	0.5	84.5	105	0
	<b>R5</b>	100	25	0.3	84.5	133	0
	<b>R6</b>	100	25	0.7	98	279	42
	<b>Promedios</b>	83.33	20.000	0.533333	63.83	128.67	6

		<b>Incidencia</b>	<b>% Severidad</b>	<b>Ø del tallo cm.</b>	<b>Altura cm.</b>	<b>No. Hojas/P</b>	<b>No. Frutos/P</b>
<b>Tratamiento 2</b>	<b>R1</b>	100	25	0.4	65	245	3
	<b>R2</b>	0	0	0.5	18	12	3
	<b>R3</b>	100	25	0.5	54	589	109
	<b>R4</b>	100	25	0.4	77	82	0
	<b>R5</b>	100	25	0.4	84	205	0
	<b>R6</b>	0	0	0.2	14.5	17	0
	<b>Promedios</b>	66.67	16.667	0.40	52.08	191.67	19.17

		<b>Incidencia</b>	<b>% Severidad</b>	<b>Ø del tallo cm.</b>	<b>Altura cm.</b>	<b>No. Hojas/P</b>	<b>No. Frutos/P</b>
<b>Tratamiento 3</b>	<b>R1</b>	100	25	0.4	76	81	10
	<b>R2</b>	100	25	0.5	79	206	42
	<b>R3</b>	100	25	0.3	73	208	0
	<b>R4</b>	100	25	0.6	72.5	168	7
	<b>R5</b>	100	25	0.5	77	138	10
	<b>R6</b>	100	25	0.4	89	96	0
	<b>Promedios</b>	100	25.000	0.45	77.75	149.50	11.5

**Parámetros a Evaluar en Tomate con Tratamiento de Raizal a la Semilla (2<sup>do</sup> muestreo)**

		% Severidad		Ø del tallo	Altura cm.
		Incidencia		cm.	
<b>Tratamiento 1</b>	<b>R1</b>	100	50	0.7	115
	<b>R2</b>	100	58.3	0.3	47
	<b>R3</b>	100	25	0.3	55
	<b>R4</b>	100	41.6	0.6	74
	<b>R5</b>	100	58.3	0.5	90
	<b>R6</b>	100	25	0.6	58
	<b>Promedios</b>	100	43.03	0.5000	73.17

		% Severidad		Ø del tallo	Altura cm.
		Incidencia		cm.	
<b>Testigo comercial</b>	<b>R1</b>	100	33.3	0.6	91
	<b>R2</b>	100	41.6	0.4	30
	<b>R3</b>	100	58.3	0.9	48
	<b>R4</b>	100	66.6	0.5	98
	<b>R5</b>	100	33.3	0.4	110
	<b>R6</b>	100	100	0.7	100
	<b>Promedios</b>	100	55.52	0.5833	79.50

		Incidencia	% Severidad	Ø del tallo cm.	Altura cm.
<b>Tratamiento 2</b>	<b>R1</b>	100	83.3	0.4	77
	<b>R2</b>	100	100	0	0
	<b>R3</b>	100	83.3	0.5	78
	<b>R4</b>	100	75	0.6	120
	<b>R5</b>	100	100	0.5	100
	<b>R6</b>	100	100	0.2	28
	<b>Promedios</b>	100	90.27	0.3667	67.17

		Incidencia	% Severidad	Ø del tallo cm.	Altura cm.
<b>Tratamiento 3</b>	<b>R1</b>	100	83.3	0.5	76
	<b>R2</b>	100	100	0.6	79
	<b>R3</b>	100	25	0.4	90
	<b>R4</b>	100	66.6	0.6	102
	<b>R5</b>	100	91.6	0.5	79
	<b>R6</b>	100	25	0.6	100
	<b>Promedios</b>	100	65.25	0.5333	87.67

**Parámetros a Evaluar en Tomate con Tratamiento de *B. subtilis* a la semilla (1<sup>er</sup> muestreo)**

		% Severidad		Ø del tallo		No.	
		Incidencia		cm.	Altura cm.	Hojas/P	Frutos/P
<b>Tratamiento 1</b>	<b>R1</b>	0	0	0.2	16	18	0
	<b>R2</b>	0	0	0.7	43	44	0
	<b>R3</b>	0	0	0.3	25	16	0
	<b>R4</b>	100	25	0.7	112	234	29
	<b>R5</b>	100	25	0.6	46.5	92	0
	<b>R6</b>	0	0	0.5	71	187	0
	<b>Promedios</b>	33.33	8.333	0.500	52.25	98.50	4.83
<b>Testigo comercial</b>	<b>R1</b>	0	0	0.5	55	138	0
	<b>R2</b>	0	0	0.4	36	50	0
	<b>R3</b>	0	0	0.4	30	34	0
	<b>R4</b>	0	0	0.4	12	1	0
	<b>R5</b>	100	25	0.6	63	133	0
	<b>R6</b>	100	25	0.4	26	30	0
	<b>Promedios</b>	33.33	8.333	0.450	37.00	64.33	0

		Incidencia	% Severidad	Ø del tallo cm.	Altura cm.	No. Hojas/P	No. Frutos/P
<b>Tratamiento 2</b>	<b>R1</b>	100	25	0.6	85	210	22
	<b>R2</b>	0	0	0.8	55	140	0
	<b>R3</b>	0	0	0.4	78	208	23
	<b>R4</b>	0	0	0.4	58.5	73	0
	<b>R5</b>	100	25	0.4	52	56	0
	<b>R6</b>	100	25	0.6	44	48	0
	<b>Promedios</b>	50.00	12.500	0.533	62.08	122.50	7.5

		Incidencia	% Severidad	Ø del tallo cm.	Altura cm.	No. Hojas/P	No. Frutos/P
<b>Tratamiento 3</b>	<b>R1</b>	100	25	0.4	46	91	0
	<b>R2</b>	100	25	0.3	35	31	0
	<b>R3</b>	0	0	0.4	48	22	0
	<b>R4</b>	100	25	0.5	46	75	0
	<b>R5</b>	100	25	0.3	16	10	0
	<b>R6</b>	0	0	0.3	3	4	0
	<b>Promedios</b>	66.67	16.667	0.367	32.33	38.83	0

**Parámetros a Evaluar en Tomate con Tratamiento de *B. subtilis* a la Semilla (2<sup>do</sup> muestreo)**

		Incidencia	%	Ø del tallo	Altura cm.
			Severidad	cm.	
Tratamiento 1	R1	100	100	0	0
	R2	100	66.6	0.8	75
	R3	100	50	0.4	51
	R4	100	100	0.7	130
	R5	100	91.6	0.7	78
	R6	100	100	0.6	94
	Promedios	100	84.70	0.5333	71.33

		Incidencia	%	Ø del tallo	Altura cm.
			Severidad	cm.	
Testigo comercial	R1	100	100	0.6	79
	R2	100	66.6	0.4	38
	R3	100	66.6	0.4	46
	R4	100	100	0	0
	R5	100	75	0.7	75
	R6	100	100	0.5	52
	Promedios	100	84.70	0.4333	48.33

		Incidencia	%	Ø del tallo	Altura cm.
			Severidad	cm.	
Tratamiento 2	R1	100	33.3	0.7	94
	R2	100	100	0.8	77
	R3	100	66.6	0.5	83
	R4	100	25	0.5	74
	R5	100	25	0.4	68
	R6	100	66.6	0.6	71
	Promedios	100	52.75	0.5833	77.83

		Incidencia	%	Ø del tallo	Altura cm.
			Severidad	cm.	
Tratamiento 3	R1	100	25	0.5	46
	R2	100	100	0	0
	R3	100	33.3	0.6	58
	R4	100	33.3	0.5	52
	R5	100	91.6	0.3	28
	R6	100	100	0	0
	Promedios	100	63.87	0.3167	30.67

**Procedimiento ANOVA *Clavibacter michiganensis* (1<sup>er</sup> muestreo)**

Variable dependiente: Incidencia

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -V</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	5	14375.00000	2875.00000	1.57	0.1932
<b>Tratamiento</b>	7	24791.66667	3541.66667	1.94	0.0928
<b>Error</b>	35	63958.3333	1827.3810		
<b>Total</b>	47	103125.0000			

**Correcto**

Coef var 62.17873

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>A</b>	100.00	1
<b>A</b>	100.00	4
<b>A</b>	83.33	2
<b>A</b>	66.67	3
<b>A</b>	66.67	8
<b>A</b>	50.00	7
<b>A</b>	50.00	6
<b>A</b>	33.33	5

Variable dependiente: % Severidad

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -V</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	5	742.187500	148.437500	1.14	0.3595
<b>Tratamiento</b>	7	2382.812500	340.401786	2.61	0.0282
<b>Error</b>	35	4570.312500	130.580357		
<b>Total</b>	47	7695.312500			

**Correcto**

Coef var 66.48539

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Tratamiento</b>
A	29.167	1
A	25.000	4
A	20.833	2
A	16.667	3
A	16.667	8
A	12.500	7
A	8.333	6
A	8.333	5

Variable dependiente: Diámetro de tallo

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -V</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	5	0.02166667	0.00433333	0.17	0.9731
<b>Tratamiento</b>	7	0.16916667	0.02416667	0.93	0.4950
<b>Error</b>	35	0.90833333	0.02595238		
<b>Total</b>	47	1.09916667			

**Correcto**

Coef var 35.47099

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Tratamiento</b>
A	0.5333	7
A	0.5333	2
A	0.5000	5
A	0.4500	6
A	0.4500	4
A	0.4000	1
A	0.4000	3
A	0.3667	8

Variable dependiente: Altura (cm)

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -V</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	5	3821.671875	764.334375	1.42	0.2405
<b>Tratamiento</b>	7	9106.786458	1300.969494	2.42	0.0393
<b>Error</b>	35	18810.86979	537.45342		
<b>Total</b>	47	31739.32813			

**Correcto**

Coef var 42.46464

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>A</b>	77.75	4
<b>AB</b>	63.83	2
<b>AB</b>	62.08	7
<b>AB</b>	59.42	1
<b>AB</b>	52.25	5
<b>AB</b>	52.08	3
<b>AB</b>	37.00	6
<b>B</b>	32.33	8

Variable dependiente: # Hojas/planta

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -V</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	5	30963.8542	6192.7708	0.55	0.7359
<b>Tratamiento</b>	7	110024.8125	15717.8304	1.40	0.2362
<b>Error</b>	35	392786.3125	11222.4661		
<b>Total</b>	47	533774.9792			

**Correcto**

Coef var 88.29545

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
A	191.67	3
A	165.83	1
A	149.50	4
A	128.67	2
A	122.50	7
A	98.50	5
A	64.33	6
A	38.83	8

Variable dependiente: # Frutos

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F -V	Pr > F
Repetición	5	1069.000000	213.800000	0.59	0.7094
Tratamiento	7	1788.583333	255.511905	0.70	0.6701
Error	35	12737.66667	363.93333		
Total	47	15595.25000			

Correcto

Coef var 299.2476

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	Tratamiento
A	19.00	3
A	17.50	4
A	7.50	7
A	7.00	2
A	4.83	5
A	1.17	1
A	0.00	6
A	0.00	8

**Procedimiento ANOVA *Clavibacter michiganensis* (2<sup>do</sup> muestreo)**

Variable dependiente: Diámetro del tallo

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -V</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	5	0.04937500	0.00987500	0.20	0.9613
<b>Tratamiento</b>	7	0.41479167	0.05925595	1.19	0.3361
<b>Error</b>	35	1.74895833	0.04997024		
<b>Total</b>	47	2.21312500			

**Correcto**

Coef var 46.44992

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>A</b>	0.5833	7
<b>A</b>	0.5833	2
<b>A</b>	0.5333	5
<b>A</b>	0.5333	4
<b>A</b>	0.5000	1
<b>A</b>	0.4333	6
<b>A</b>	0.3667	3
<b>A</b>	0.3167	8

Variable dependiente: Altura (cm)

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -V</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	5	7642.66667	1528.53333	1.84	0.1306
<b>Tratamiento</b>	7	14556.58333	2079.51190	2.50	0.0340
<b>Error</b>	35	29082.66667	830.93333		
<b>Total</b>	47	51281.91667			

**Correcto**

Coef var 43.05053

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>A</b>	87.67	4
<b>AB</b>	79.50	2
<b>AB</b>	77.83	7
<b>AB</b>	73.17	1
<b>AB</b>	71.33	5
<b>AB</b>	67.17	3
<b>AB</b>	48.33	6
<b>B</b>	30.67	8

Variable dependiente: 2<sup>da</sup> Incidencia

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -V</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	5	0	0	-	-
<b>Tratamiento</b>	7	0	0	-	-
<b>Error</b>	35	0	0		
<b>Total</b>	47	0			

**Correcto**

Coef var 0

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>A</b>	100.0	1
<b>A</b>	100.0	2
<b>A</b>	100.0	3
<b>A</b>	100.0	4
<b>A</b>	100.0	5
<b>A</b>	100.0	6
<b>A</b>	100.0	7
<b>A</b>	100.0	8

Variable dependiente: 2<sup>da</sup> Severidad

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Anova SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F -V</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Repetición</b>	5	4332.31854	866.46371	1.43	0.2385
<b>Tratamiento</b>	7	12528.26646	1789.75235	2.95	0.0154
<b>Error</b>	35	21236.41979	606.75485		
<b>Total</b>	47	38097.00479			

**Correcto**

Coef var 36.48681

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>Tukey Agrupamiento</b>	<b>Media</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>A</b>	90.27	3
<b>A</b>	84.70	6
<b>A</b>	84.70	5
<b>A</b>	65.25	4
<b>A</b>	63.87	8
<b>A</b>	55.52	2
<b>A</b>	52.75	7
<b>A</b>	43.03	1