

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



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*

Por:

LUIS ROJAS LINARES

TESIS

Presentanda como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

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*

Por:

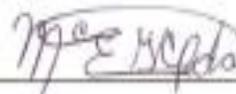
LUIS ROJAS LINARES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

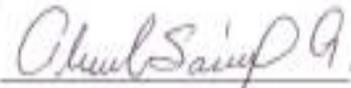
INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Aprobada

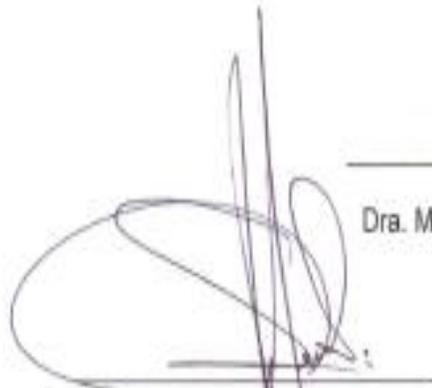


Dra. Ma Elizabeth Galindo Cepeda

Asesor Principal



M.c. Abiel Sánchez Arizpe



Dr. Melchor Cepeda Siller

Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coasesor
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2014

DEDICATORIAS

AL NIÑO DIOS

Por ser mi protector en toda ocasión desde que era pequeño y más aun cuando crecí y decidí hacer una carrera profesional fuera de casa, por estar presente en mis caídas y también en mis logros, gracias niño Dios por darme la fuerza y valor para seguir adelante y culminar mis estudios, de igual forma te agradezco la hermosa familia que me diste.

A MIS PADRES

Mario Rojas Mendoza Y Estela Linares Tellez, a quien estoy eternamente agradecido, por darme la vida, por brindarme tanto cariño, consejos y también regaños que en ocasiones necesitaba, por motivarme a seguir adelante, pero sobre todo por creer en mí, por su sacrificio en soportar mi ausencia durante mi carrera, aunque sus bendiciones siempre me acompañaron en todo momento.

A MIS HERMANOS

Biol. Ignacio, Ing. Martín Y Martha Belem, con cariño para ustedes gracias por los consejos y motivaciones para seguir adelante, por el apoyo ofrecido durante las diferentes etapas de nuestras vidas, por llenarme de momentos alegres y otros no tanto, gracias por tantos abrazos, disgustos y peleas que hemos tenido que son parte de nuestras vidas, los quiero mucho.

A MIS ABUELOS

Esther Mendoza, Gloria Tellez (+), Enrique Linares, les agradezco tantos momentos que pase y sigo pasando junto a ustedes, por que gracias a ustedes tengo a unos grandes padres magníficos, por consentirme como solo ustedes como abuelos pueden hacerlo, y ayudarme en momentos difíciles.

A MIS SOBRINAS Y SOBRINO

Dafne Aislinn , Brenda Yatziry , Vania Ximena, Mariana Guadalupe , Daniela Michell Y Axel Uriel , por ser el alma de la casa , por los tantos momentos que hemos compartido de alegría y quereme tanto y llorar con migo en mi despedida cuando tenia que regresar a la Universidad , espero y algún dia logren ver esto Hijos , siganse preparando y hechandole ganas en sus estudios que todo tiene su recompensa , los quiero mucho.

A MI NOVIA

Y en especial a mi amada compañera *Rubi Gtz. Guerra*, por regalarme tanta felicidad cada dia , por su apoyo , comprensión y tolerancia en mis momentos de Strees , pero sobre todo por mantener siempre a pesar de las circunstancias una lucecita resplandeciente de amor hacia mi , gracias mi amor .

A MIS AMIGAS DE LA CARRERA.

Rubi Soledad , Dulce Milagros , Lucero Elizabeth , Ana Laura , por su gran amistad brindada a lo largo de la carrera , por los consejos y regaños que en ocasiones me hacían , por que mas que simple amigas se convirtieron en mis hermanas , donde quiera que se vallan amigas les deseo lo mejor y las extrañare , Animo y a poner a la Narro en alto.

A MIS AMIGOS DE LA CARRERA

Obed, Fausto, Ervin, Victor, Enrique, Lizmark, Jose Luis, Gerardo, Rudi, Armando, Ever, Leonardo, Fabian , Diego , Rusver ,por que mas que simples amigos se convirtieron en mis hermanos , por nuestras visitas y convivencias a lo largo de los semestres , por la gran amistad que tengo con la mayoría de ustedes , por la perseverancia y constancia dentro de mi vida , esperando y les valla muy bien donde quiera que se vallas , espero y se lleven gratos recuerdos de un servidor y no se olviden de su amigo de Morelos.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro** ,por abrirme las puertas y ayudarme a culminar mis estudios a nivel licenciatura dentro de área de agronomía y culminar en la gran dicha de ser llamado Ingeniero orgullosamente de parasitología , asi como las gracias por facilitarme hospedaje y sustento durante toda mi carrera que de no ser asi hubiera sido muy difícil culminar con mi carrera.

Ahora podre decir orgullosamente soy Buitre de la Narro.

Un especial agradecimiento a la *Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda* , por su gran amistad , paciencia y disciplina academica con la que se dirige a todo el alumnado , por su dirección y apoyo en a realizacion del presente trabajo , del que sin su ayuda no hubiera realizado, Gracias por todo Dra, dios la Bendiga siempre.

Al *Dr. Melchor Cepeda Siller* , por su amistad y simpatía que lo caracteriza siempre , por el apoyo técnico-cientifico que apoyo en gran medida a la realizacion del presente trabajo .

Al *Dr. Abiel Sánchez Arizpe* , por su dedicado esmero en la revisión de este trabajo , por las sugerencias y aportes para el mismo , por ser un profesor muy comprometido con su trabajo y darnos las armas suficientes para ser Fitopatologos reconocidos.

A todos lo profesores , del *Departamento de Parasitologia y otro departamentos*, que me dieron clases , ya que ustedes fueron lo que me formaron como Ingeniero Agrónomo y profesionsita además de darme las armas técnico-cientificas para resolver los problemas agronómicos que se me presenten .

Al *M.c. Epifanio Castro Del Angel* , por su participación en la revisión de presente trabajo , aportes y consejos en la realizacion del mismo.

A la *M.c Rebeca Gonzales Villegas* , por su amistad , apoyo y sugerencias para la revisión del presente trabajo.

A *Candelaria Gomez , Isabel Salazar , Nicolás Atanacio* , por su compañerismo , apoyo y momentos alegres que pasamos juntos , gracia por la amistad de cada uno de ustedes.

A todos mis compañeros de la *Generación CXVIII* de Ingeniero Agrónomo Parasitólogo , aun que no con todos convivi , les deseo lo mejor , espero seguirlos viendo por el campo laboral

A mis compañeros de cuarto Palomar 2 cuarto 16, *Alfredo Plasencia, Gabriel Sosa , Isaac Rivera y Josue* , por todos lo momentos buenos que pasamos y por vernos como uno mas de la familia , al convivir el mismo hogar donde dormir.

INDICE DE CONTENIDO

	pág.
DEDICATORIAS.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE DE CONTENIDO.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	XIII
RESUMEN.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	1
objetivo General.....	3
Objetivo Especifico.....	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Cultivo de Tomate.....	4
Origen e historia.....	4
Características botánicas	5
Clasificación taxonómica.....	5
Variedades de Tomate.....	6
Crecimiento determinado.....	6
Crecimiento indeterminado.....	6
Tomate variedad Cherry.....	7
Tomate variedad Saladette.....	7
Enfermedades del Tomate.....	7
Problemática del cultivo.....	8
Antecedentes Generales del Cáncer Bacteriano del Tomate.....	9
Importancia y distribución	10
Organismo causal.....	11
Clasificación taxonómica.....	12
Etiología.....	12
Ciclo y epidemiología de la enfermedad.....	13

Sintomatología.....	14
Importancia económica.....	17
Manejo de la enfermedad.....	18
Estatus normativo de la enfermedad.....	18
Control Biológico.....	19
<i>Bacillus</i> spp.....	20
Clasificación taxonómica.....	20
Mecanismo de acción de <i>Bacillus subtilis</i>	21
Mecanismo de acción de Actinomicetos.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Descripción y Ubicación del Experimento.....	23
Etapas de campo.....	23
Material utilizado.....	24
Siembra en almacigo de tomate Variedades Cherry y Saladette	24
Establecimiento de la plántula.....	24
Tutorado de la plántula.....	26
Etapas de laboratorio.....	26
Reproducción e incremento de la cepa antagónica.....	27
Reproducción de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	27
Establecimiento del experimento.....	28
Inoculación de la bacteria a plantas sanas.....	28
Identificación de síntomas bacteriano en tejido vegetativo.....	29
Reaislamiento de la bacteria.....	30
Resiembra de colonias bacterianas.....	31
Pruebas de caracterización de acuerdo al protocolo de Schaad <i>et al.</i> , (2001).....	31
Tinción de Gram.....	31
Prueba RYO.....	32
Prueba levana.....	32
Prueba oxidasa.....	32
Prueba arginina.....	33
Prueba catasa.....	33

Prueba Hugh-Leifson.....	33
Parámetros Evaluados.....	33
Altura de planta.....	33
Numero de frutos.....	34
Frutos sanos.....	34
Frutos enfermos.....	34
Incidencia de la enfermedad.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Obtención de Plantulas.....	35
Caracterización Bioquímica de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ..	36
Caracterización Bioquímica de <i>Bacillus subtilis</i>	38
Comparación de Medias y Parámetros a Considerar en la Variedad Cherry.....	39
Comparación de Medias y Parámetros a Considerar en la Variedad Saladette.....	40
Comparación de Medias de los Parámetros a evaluar en las Dos Variedades.....	42
CONCLUSIONES.....	53
LITERATURA CITADA.....	54
APÉNDICE	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Distribución mundial de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i>	11
2.	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 hojas y frutos.....	14
3.	Péndulo y cáliz mostrando lesiones necróticas.....	15
4.	Comparación de tallo sano (arriba) y tallo enfermo (abajo).....	15
5.	Tallo mostrando síntoma clásico de cáncer bacteriano.....	15
6.	Sintomatología gradual del <i>Cmm</i> desde su inicio hasta el daño total que ocasiona en invernadero.....	16
7.	Fruto de tomate (verde) con síntoma de <i>Cmm</i> como son halo blanco amarillento, típicos del síntoma “ojo de pájaro” (Firs –The Seed).....	16
8.	Frutos maduro con síntoma de ojo de pájaro causado por <i>Cmm</i>	16
9.	Invernadero de parasitología donde se llevo acabo la etapa de campo.....	23
10.	Siembra de tomate en almacigo de las variedades (Cherry y Saladette,con sustrato certificado y charolas desinfectadas.....	24
11.	Trasplante, de charola germinadoras a bolsa con sustrato peat-moss.....	25
12.	Aplicación de extractos de algas marinas , aminoácidos y fosforo en agua de riego para la aplicación de las plántulas después de pasarlas a la bolsa de sustrato.....	25
13.	Tutoreo inicial de la plántula de Tomate para formación de un solo tallo de guía.....	26

14.	Laboratorio de Parasitología de la UAAAN, donde se llevó a cabo la etapa de laboratorio.....	27
15.	De izquierda a derecha: Hojas con síntoma de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> . Fragmentos de tallos con síntomas utilizados para el aislamiento de la bacteria.....	30
16.	Maceración de tejido y diluciones de la maceración para identificación de bacteria.....	31
17.	Desarrollo de las plántulas en el sustrato peat-moss y aplicación de enraizador y microelementos en la solución de riego.....	35
18.	Crecimiento bacteriano típico de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsps <i>michiganensis</i>	37
19.	Comparación de Medias de Crecimiento (cm) por Variedad.....	42
20.	Comparación de medias de Altura de la Planta (cm) de acuerdo a los tratamientos.....	43
21.	Comparación de Medias en Centímetros (cm) para la Variedad Cherry en los Tratamientos.....	43
22.	Comparación de Medias en Centímetros (cm) para la Variedad Saladette en los Tratamientos.....	44
23.	Comparación de Medias en Centímetros (cm) en las dos Variedades Tratadas con <i>B.subtilis</i>	44
24.	Comparación de Medias en Centímetros (cm) en las dos Variedades Tratadas con <i>B. subtilis nativo</i>	45
25.	Comparación de Medias en Centímetros (cm) en las dos Variedades tratadas con Testigo Comercial.....	45
26.	Comparación de Medias en Centímetros (cm) en las dos Variedades tratadas con Bacteria pura.....	46
27.	Comparación de medias en centímetros (cm) en las dos Variedades tratadas con testigo agua.....	47
28.	Comparación de Medias en Crecimiento de la Raíz en las dos Variedades.....	47

29.	Comparación de medias en crecimiento de la raíz por tratamiento.....	48
30.	Desarrollo radicular de las plantas tratadas con <i>Bacillus subtilis</i> en comparación con desarrollo radicular de plantas inoculadas con bacteria pura de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i>	48
31.	Comparación de medias en el número de frutos en las dos variedades.	49
32.	Comparación de medias en rendimiento (Kg) en las dos variedades.....	50
33.	Comparación de medias en rendimiento (Kg) en los tratamientos.....	50

ÍNDICE DE CUADROS

Figura		Pág.
1.	Tratamientos usados en el experimento.....	29
2.	Resultado de las pruebas bioquímicas en la caracterización de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsps. <i>michiganensis</i>	36
3.	Características y pruebas bioquímicas para identificar <i>Bacillus subtilis</i>	38
4.	Comparación de medias y parámetros a considerar de la variedad Cherry.....	40
5.	Comparación de medias y parámetros a considerar de la variedad Saladette.....	41

RESUMEN

El objetivo de este estudio consistió en evaluar la actividad de *Bacillus subtilis* como organismo de control biológico del cáncer bacteriano *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (*Cmm*) en dos variedades de tomate *Solanum lycopersicum* Mill ,variedad cherry tipo uva y variedad maya tipo saladette respectivamente. El trabajo desarrollo durante los años 2013 y 2014, utilizando un diseño experimental completamente al azar (DCA) con 5 tratamientos y 4 repeticiones. La bacteria *Cmm* se obtuvo de una cepa ya caracterizada molecularmente usando la concentración de 1×10^3 UFC/m en la escala de McFarland , para el caso de la cepa antagonista de *B.subtilis* ,se utilizaron 2 cepas , una nativa y una comercial la concentración fue 1×10^9 UFC/ml en la escala de McFarland , posterior a la aplicación de estos cinco días después se procedió a infectar las plantas con *Cmm* , para evaluar los parámetros de altura de plantas , crecimientos radicular , número y peso de frutos e incidencia y severidad de la enfermedad.

Los cuales al final nos arrojó que el uso de *B.subtilis* ayuda al control preventivo del cáncer bacteriano provocado por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* , además de aumentar el crecimiento radicular y por ende una mayor nutrición y un rendimiento de cosecha considerable

Palabras clave : Control biológico, Cáncer bacteriano, *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*, *Bacillus subtilis*, Tomate, Variedades, *In situ*.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate *Solanum lycopersicum* ocupa un lugar muy importante en relación al desarrollo económico y social de la horticultura en México, ya que es uno de los principales generadores de divisas para el país. En 2011 fue una de las hortalizas mexicanas de mayor exportación hacia los Estados Unidos, éstas acumularon 1,800 millones de dólares, según datos de la secretaria de economía (SAGARPA 2011)

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

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

El tomate Variedad Cherry *Solanum lycopersicum*, también conocido como tomate cereza o tomate coctel, se caracteriza por ser de tamaño pequeño (uno a tres centímetros de diámetro), bajo peso (10 a 15 g) y sabor dulce, lo que lo hace muy indicado para acompañar ensaladas o para la decoración de platos; además, con los mismos usos, existe el tomate Variedad Cherry tipo uva (Nuez, 1995).

El tomate Variedad Saladette es de apariencia algo alargada por ello se le da el nombre de fruto huaje, el color es rojo uniforme, su firmeza es muy buena por lo que tiende a perdurar mayor vida de anaquel, llegando a ser cortado en color naranja e inducir su maduración a temperatura ambiente o bien meterlos a cámaras frías para que madure en conforme en consumidor lo valla demandando (Nuez, 1995).

La producción se ha visto limitada por diversos factores, tanto tipo biótico como abióticos, debido a que el constante cambio climático altera los procesos fenológicos del cultivo, sumado de las diferentes enfermedades que teniendo las condiciones se desarrollan adecuadamente.

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 del 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 de 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 (Donoso,2006).

Objetivo General

- ✓ Determinar el efecto inhibitorio de las dos cepas de *Bacillus*: *Bacillus subtilis* comercial y *Bacillus subtilis* nativo sobre el agente causal de chancro bacteriano en tomate *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Objetivos Específicos

- ✓ Determinar el efecto de dos cepas de control biológico de *B.subtilis* , en el desarrollo vegetativo de las plantas de tomate.
- ✓ Comparar las dos cepas de *B.subtilis* y verificar su eficiencia de cada una para el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Hipótesis

- ✓ Se espera que *B.subtilis* nativa resulte más eficiente en el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en comparación de la cepa comercial de *B.subtilis*.

REVISION DE LITERATURA

Cultivo de Tomate

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

Los principales países productores de tomate son China, Estados Unidos, Turquía, Egipto, India e Italia, de los cuales el mayor es China, el cual en el 2002 alcanzó una producción de 25,466,211 ton (FAO, 2012).

Origen e historia

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

Vives (1984) menciona que el jitomate se introdujo en la Europa Meridional por los españoles en el siglo XVI, y pronto se extendió a los países europeos y a casi todas las partes del mundo. Al principio, en el viejo continente la planta de jitomate se consideraba como planta de ornato e incluso en aquellas épocas en Francia y Alemania creían que los jitomates eran nocivos, que producían vómito y diarreas incontenibles y mil calamidades más.

Los tomates silvestres se agrupaban hasta hace poco tiempo en el Género *Lycopersicum*. Actualmente incluidas en el género *Solanum*, se siguen descubriendo y clasificando nuevas especies de tomate, como por ejemplo *Solanum arcanum* y *S. huaylasense* en el 2005 (Peralta *et al.*,2005).

Características botánicas

Es una planta anual y puede ser semiperenne en regiones tropicales. Su sistema de raíces es fibroso y robusto, pudiendo llegar hasta 1.80 m de profundidad; los tallos son cilíndricos en plantas jóvenes y angulosos en plantas maduras, alcanzan altura de 0.40 a 2.0 m presentando crecimiento simpodico, el racimo floral o inflorescencia está compuesta de varios ejes, cada uno de los cuales tiene una flor amarilla brillante. El cáliz y la corola está compuesta de 5 sépalos y 5 pétalos, respectivamente. En las plantas con crecimiento determinado, la inflorescencia se forma a partir de 6 ó 7 nudo y cada 1°, 2° hojas y en las de habito indeterminado el racimo se forma a partir de 7 0 10 nudo y cada cuatro hojas (Valdez, 1993).

El fruto es una baya compuesta por varios lóculos; pudiendo constar desde dos (bilocular) o de tres o más (multilocular); las variedades cultivadas pertenecen a la del tipo multilocular (Valdez, 1993).

Clasificación taxonómica

(Cronquist, 1984, Esquinas y Nuez, 1995; Peralta *et al.*, 2005), es la siguiente :

Reino: Vegetal

Sub-Reino: Embryobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub-Clase: Dicotyledonae

Orden: Tubiflorae

Familia: *Solanaceae*

Género: *Solanum*

Especie: *lycopersicum L.*

Variedades de tomate

El tipo de tomate dependerá del propósito del consumo y del mercado de destino; ya que podemos clasificarlo en tomate de mesa o ensalada y tomate de pasta, industrial o de cocina. Dependiendo de cuál tipo de tomate seleccionemos, la variedad deberá de cumplir con los requerimientos que el mercado demande ya sea tomate saladette, bola o Cherry, siendo características tales como: buena firmeza, buen porcentaje de sólidos solubles, resistencia al manipuleo y al transporte etc. Además, el productor deberá de seleccionar aquellos materiales que tengan características favorables de tolerancia o resistencia a enfermedades, plagas insectiles, virus o suelos salinos según sea el caso del lugar a cultivar (Corpeño, 2004).

Nuño (2007), mencionó otro criterio para decidir la variedad de tomate a sembrar según el hábito de crecimiento de las plantas, el cual las clasifica como:

Crecimiento determinado

Son plantas arbustivas, con un tamaño de planta definido, donde cada extremo del crecimiento aparece una yema floral, tiene periodos restringidos de floración y cuajado. El tamaño de la planta varía según el cultivar, ya que podemos encontrar plantas compactas, medianas y largas, en donde en las dos últimas clasificaciones necesitamos poner tutores.

Crecimiento indeterminado

Son plantas donde su crecimiento vegetativo es continuo, pudiendo llegar tallo principal hasta los 10 m de largo o más, si es manejado a un solo eje de crecimiento, las inflorescencias aparecen lateralmente en el tallo, Florece y cuaja uniformemente. Se eliminan los brotes laterales y el tallo generalmente se enreda en torno a un hilo de soporte. Podemos encontrar cultivares de cocina y ensalada. Este tipo de crecimiento es el preferido para cultivar en invernaderos.

Tomate variedad Cherry

Denominado de este modo por su color rojo intenso, tamaño, dulzura y su aspecto similar al de una cereza, el tomate cherry tiene un diámetro de fruto entre 1 y 3 cm y su peso oscila entre 10 y 15 gr, el ramillete floral es muy amplio el cual puede llegar a alcanzar hasta un máximo de 12 a 15 flores por sitio floral (Hortalizas, 2010).

Su sabor es menos ácido y más dulce que el tomate tradicional, el consumo de este es generalmente crudo, aunque puede también ingerirse cocido.

Tomate variedad Saladette

El fruto es de apariencia algo alargada por ello se le da el nombre de fruto huaje, el color es rojo uniforme, su firmeza es muy buena por lo que tiende a resistir vario tiempo en vida de anaquel y puede ser cortado en etapa de madurez comercial y madurar bien en cámaras frigoríficas o a temperatura ambiente (Anónimo 2002).

Enfermedades del tomate

Son aquellas causadas por bacterias, virus, hongos y nematodos fitopatógenos. Para que una enfermedad se desarrolle debe haber un huésped susceptible un patógeno virulento y un ambiente apropiado para el desarrollo de la enfermedad (Jones *et al.*, 1993).

El tomate es muy sensible al ataque de enfermedades y plagas. La incidencia y la severidad del ataque va a estar en función del tipo de patógeno o plaga que este atacando al cultivo, las condiciones de clima y suelo de la localidad y principalmente la de la variedad de semilla utilizada.

Las enfermedades del tomate se convierten en él un factor limitante en la producción. Hay casi 200 enfermedades conocidas de esta especie, con diversas causas y etiologías. El control de estas enfermedades implica el uso de variedades

resistentes; evitar que el patógeno entre en contacto con la planta : la erradicación que considera la eliminación del patógeno después de establecido en el área que ocupa el cultivo. Así se busca un control integrado de las enfermedades (Jones *et al.*, 1993).

Entre las bacterias que provocan enfermedades en tomate están *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* agente causal del chancro bacteriano en tomate; *Pseudomonas syringae* subsp. *Tomato* responsable de la peca bacteriana y *Xanthomonas campestris* subsp. *vesicatoria* agente causal de mancha bacteriana (Blancard, 1990). Dentro de los hongos se encuentran *Alternaría sp.* y *Botrytis sp.*, los cuales son los principales agentes causales de problemas de tomate en México. También se puede nombrar *Phytophthora infestans* que causa tizón tardío y *Alternaría solanum* que causa tizón temprano. El virus más importante en tomates es el virus mosaico del tabaco *TMV* (Izquierdo *et al.*, 1992).

En cuanto a nematodos el de mayor acción en el cultivo es *Meloidogyne* spp. Que ataca las raíces provocando agallas, nódulos o tumores, reduciendo en forma importante el crecimiento de la planta (Bravo y Aldunate, 1998).

Problemática del cultivo

La fitopatología incide directamente e directamente sobre la producción agraria. Podría admitirse que la disminución de las cosechas por las enfermedades es la inmediatez directa de las pérdidas. Las medidas de exclusión, erradicación, control, etc., compondrían los cambios para evitar una pérdida en la producción. Por ello en todos los países del mundo existen normas legales para regular todos estos procedimientos. Medidas legales que trascienden los conocimientos de los especialistas hasta el ciudadano común (Nuez *et al.*, 1999).

Los procedimientos cuarentenarios en México, se aplican a cualquier organismo que presente un peligro para la nación, y no permiten la entrada al país y/o movilización del mismo de zonas afectadas a zonas libres. Para prevenir la entrada o movilización, se requiere de inspecciones en puntos de ingreso, así como la identificación y diagnóstico de los agentes sujetos a cuarentenas.

Se define enfermedad cuarentenaria a aquella que no está presente en México o que estándolo se encuentra en una área localizada y está regulada oficialmente.

Cuando son detectadas en cargamentos de productos de importación los terceros especialistas fitosanitarios reportan el hallazgo a la autoridad, que en este caso es centro nacional de referencia de la dirección general de sanidad vegetal (López,1996).

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

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 y 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 (1994-996) 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, & Miller2005).

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, aspersion) 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 tiene de diseminarse fácilmente por semilla o de manera mecánica por las manos, herramientas de trabajo , poda y otras labores culturales(OEPP/EPPO,2005). 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 1), (EPPO, 2010).



Clavibacter michiganensis

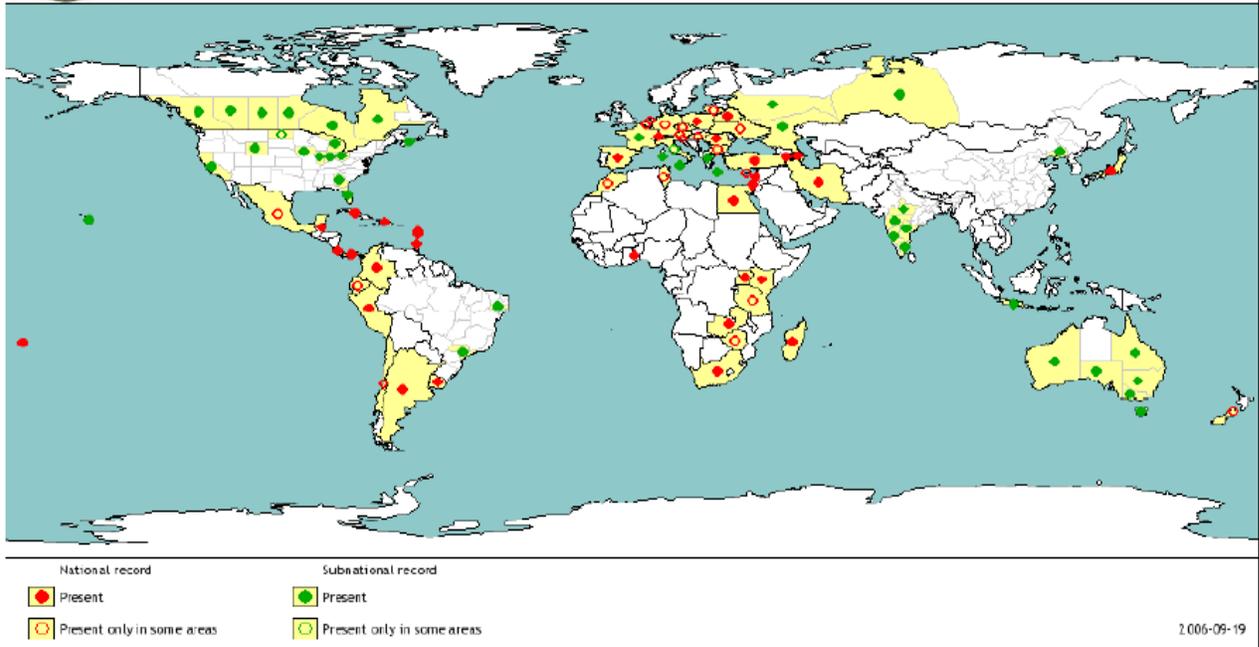


Figura 1. Distribución mundial de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.

Fuente: EPPO, 2010.

Organismo causal

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* es una bacteria perteneciente a los Actinomicetes, no forma esporas, mide de 0.6X0.7 a 1.2 micras, tiene forma bacilar, sin flagelos aeróbica y a diferencia de 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, & Miller2005).

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).

Clavibacter michiganensis 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).

En medio de cultivo YDC, a los tres días la pigmentación de sus colonias es de color amarillo o naranja pálido, puntiforme, mucosoide, 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.

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 varía, dependiendo del medio (Jones *et al.*, 1991). 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 inóculo 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 (1995), 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 xilémicos espirales, para después salir de ellos e invadir el floema, médula y corteza, donde forman las grades que originan chancros (Figura 2), (Agrios, 1993).

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

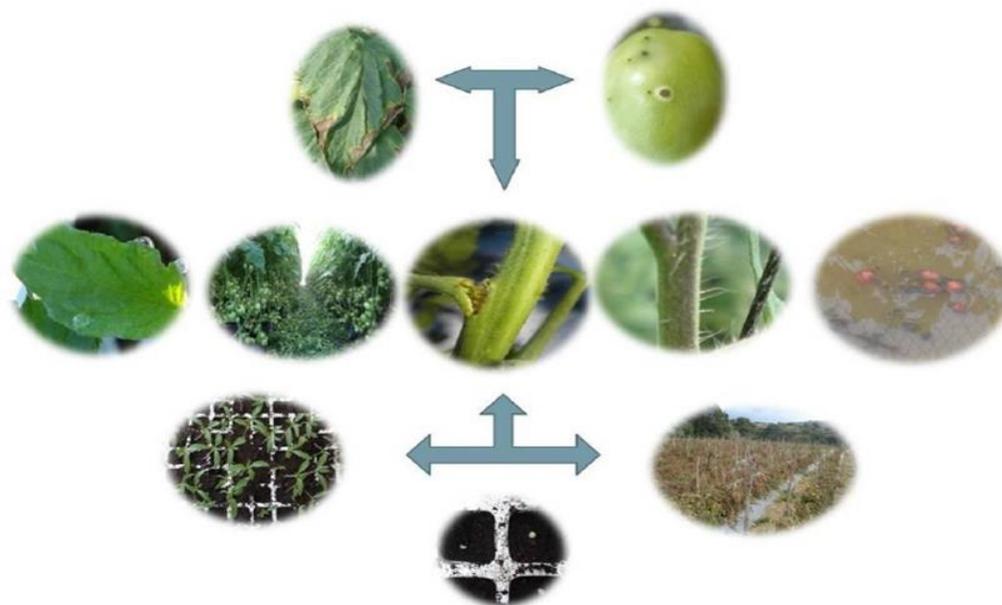


Figura 2. Ciclo del cáncer bacteriano. De abajo hacia arriba: Diseminación por medio de semilla , plantas asintomáticas y presencia de síntomas al momento de la fructificación, formas de transmisión de la enfermedad y manifestación de síntomas en hojas y frutos.

Sintomatología

El cáncer bacteriano es una enfermedad que desafortunadamente no suele presentar síntomas en etapas tempranas por lo que es difícil detectarla a tiempo para tener un buen control lo 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 elemento 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 3 mm de diámetro, (Figura 3) pueden observarse manchas similares en tallos y peciolo (Figura 5) (Tlapal, 2008).



Figura 3. Pendulo y cáliz mostrando lesiones necróticas.



Figura 4. Comparación de tallo sano (arriba) y tallo enfermo (abajo).



Figura 5. Tallo mostrando síntoma clásico de cáncer bacteriano

Las plántulas infectadas pueden morir rápidamente o mostrar los síntomas hasta que han sido trasplantadas en ocasiones los síntomas se pueden presentar hasta que llegan a su estado adulto en la etapa de floración o producción (Lewis, & Miller 2005).

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 (Figuras 4 y 5) (Agrios, 1988 y Rodríguez *et al.*, 1997).

Agrios (1988) y Rodríguez *et al.*, (1997), mencionan que las hojas marchitas se enrollan hacia arriba y hacia adentro y más tarde se enardecen y marchitan, pero no se desprenden. Con frecuencia, la enfermedad sólo afecta a los folíolos de un lado de la hoja o de un costado de la planta (Figura 6).



Figura 6. Sintomatología gradual del *Cmm* desde su inicio hasta el daño total que ocasiona en invernadero

A veces se puede observar una coloración rosa muy ligera del tejido vascular. El cáncer bacteriano entonces se confunde con la marchitez causada por *Verticillium* ó *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 (Figuras,7 y 8), aunque no siempre ocurren estos síntomas en el fruto (Messiaen *et al.* , 1968; Colloch, 1972; León *et al.* , 1982; Agrios, 1988).



Figura 7. Fruto de tomate (verde) con síntoma de *Cmm* como son halo blanco amarillento, típicos del síntoma “ojo de pájaro” (Firs –The Seed).

Figura 8. Frutos maduro con síntoma de ojo de pájaro causado por *Cmm*.

En condiciones naturales, la bacteria es específica de tomate (*Solanum lycopersicum*) citándose con excepción un ataque a *Solanum douglasii* y a *Capsicum annum*, como nuevo hospedante en condiciones naturales. La principal fuente primaria de inóculo es la semilla, que transporta a la bacteria en forma 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

Clavibacter michiganensis 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 bacteriano, puede afectar al tomate en cualquier etapa fenológica y acabar con todas las plantas en 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 está quizá relacionada con la capacidad productiva del cultivo ya que se reduce el tamaño y número de frutos 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 International, 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 de 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 °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 valla 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 acético 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 (Tlapal,2008) .

Estatus normativo de la enfermedad

En México la enfermedad se encuentra regulada en la NOM-007-FITO-1995, por la que se establecen los requisitos fitosanitarios y especificaciones para la importación de material vegetal propagativo, en este caso plántulas de tomate proveniente de EUA.

Holguín *et al.*, (2006), publicaron el primer reporte de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el cultivo de tomate tanto en campo como invernadero en San Quintín y zonas de San Simón, pertenecientes a la Península de Baja California, México.

También se detectó el cancro bacteriano en el cultivo de jitomate bajo diferentes modalidades de producción (casa sombra, invernadero y cielo abierto), en el Estado de Sonora, México (Borboa *et al.*, 2006).

Talpa (2008) y Ramírez *et al.*, (2009) mencionan que el cancro bacteriano ha sido reportado en Zacatecas, Querétaro, Sinaloa, Michoacán, Morelos, Hidalgo, Guanajuato y Estado de México.

La bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se encuentra reglamentada en la NOM-007-FITO-1995, y en la Lista de Oficial de Plagas Reglamentadas (CIPF, 2011) con reportes de presencia no oficial en varios estados de la República.

Control Biológico

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

El control biológico de enfermedades microbianas de plantas normalmente aplica el uso de organismos específicos, antagonistas del patógeno, limitando así la iniciación y propagación de la enfermedad.

Se ha probado que la inoculación de las semillas con el agente antagonista del patógeno produce efectos benéficos sobre el crecimiento de las plantas. Un claro ejemplo es el uso de la cepa de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* que se inoculan en la semilla de girasol para protegerlas frente a la marchitez producida por *Sclerotinia sclerotium* (Anónimo, 2002).

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 menores por la biodegradación de estas moléculas. En este sentido, las

bacterias productoras de toxinas se ha relevado también como un agente de gran potencial en el biocontrol de organismos fitopatógenos (Duran y Cazorla, 2003)

***Bacillus* spp**

El género *Bacillus* pertenece a la familia *Bacillaceae*, es un Género que hoy en día incluye más de 60 especies de bacilos. Este género está formado por microorganismos bacilares Gram positivos, formadores de endosporas quimiheterotrofos que normalmente son móviles y rodeados de flagelos peritricos. Son anaerobios o aerobios facultativos son catalasa positivos. Las células bacterianas de este género tienen un amplio tamaño que varía 0,5 a 2,5 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

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

Dominio: Bacteria

Phyllum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: 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 genero *Bacillus* sp.

Aislados de la rizofera 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 la plantas del estudio.

Mecanismo de acción de *Bacillus subtilis*

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

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

El cobre es el elemento que ha dado mejores resultados en el control de enfermedades bacterianas. Sin embargo estos has sido erráticos cuando se presentan condiciones ambientales favorables para el desarrollo y diseminación de las bacterias., a ello se suma la aparición de cepas bacterianas resistentes a compuestos cúpricos. Resultados igualmente erráticos se obtienen cuando se aplican

antibióticos contra bacterias fitopatógenas, como las formulaciones de estreptomina y oxytetraciclina, debido al desarrollo de razas resistentes (SAG,2004).

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

Mecanismo de acción de Actinomicetos

Los Actinomicetos son bacterias filamentosas Gram-positivas , las cuales forman el grupo microbiano más abundante en suelos y compostas. Este grupo comprende además a los microorganismos más importantes desde el punto de vista industrial tanto químico como farmacéutico (Anomino, 2002).

Dentro de los Actinomicetos se encuentra el Género *Streptomyces* que es conocido como el productor más importante de metabolitos secundarios, las evaluaciones recientes de Streptomicetos como organismos potencialmente antagonistas contra patógenos de plantas (Duran y Cazorla, 2003).

MATERIALES Y METODOS.

Descripción y Ubicación del Experimento

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 consto de dos etapas una que comprendió las actividades efectuadas en invernadero (*In Situ*) y la otra mas de las actividades en laboratorio (*In Vitro*).

Etapa de campo

La etapa de campo se llevó cabo en el invernadero del Departamento Parasitología de la Universidad (Figura 9). Se inicio con la visita al lugar para su acondicionamiento y posteriormente trabajar en el proyecto.



Figura 9. Invernadero de parasitología donde se lleva acaba la etapa de campo, Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Material utilizado

Se utilizaron para el presente estudio semilla de tomate variedad Maya y variedad cherry tipo uva , charolas germinadoras, peat-moss , y bolsas de plástico negras de 10 Lt de capacidad.

Siembra en Almacigo de Tomate Variedades Cherry y Saladette.

El día 19 de febrero del año 2013 se procedió a sembrar en almacigo el tomate cherry en con sustrato certificado libre de patógenos, y el día 1 de marzo del 2013 el tomate saladette variedad maya con las mismas condiciones de asepsia que el tomate cherry, en total se sembraron 4 charolas es decir 2 charolas de cada variedad (Figura 10)



Figura 10. Siembra de tomate en almacigo de las Variedades Cherry y Saladette), con sustrato certificado y charolas desinfectadas, Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Establecimiento de la plántula

El día 9 de mayo de 2013 después de haber tenido una buen porte en cuanto a tamaño de la plántula y buen desarrollo radicular se procedió a pasar las plantas en bolsas de plástico con sustrato peat-moss y se les dio un riego con fertilizante a base de algas marinas, aminoácidos, y fosforo esto con el fin de nutrir a la plántula y no dejarla susceptible al estrés causado por el movimiento de

raíces o daños al trasplantar, además de ayudarla al buen desarrollo vegetativo durante su establecimiento, (Figura 11 y 12).



Fig.11. Transplante de charola germinadoras a bolsa con sustrato peat-moss, Depto. Parasitología, UAAAN 2014.



Figura 12. Aplicación de extractos de algas marinas, aminoácidos y fosforo en agua de riego para la aplicación de las plántulas después de pasarlas a la bolsa de sustrato, Depto. Parasitología, UAAAN 2014 .

Tutorado de la plántula

A los 15 días del trasplante y presentando el desarrollo vegetativo deseado para esta labor, se procedió a hacer el tutoreo y sostenimiento de plántula, sujetándola con rafia de la parte baja del tallo y haciendo un amarre de sostenimiento de los alambrones de la casahuate colocados para este fin (Figura 13).



Figura 13 .Tutoreo inicial de la plántula de Tomate para formación de un solo tallo de guía, Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Etapa de laboratorio

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



Figura 14. Laboratorio de Parasitología de la UAAAN, donde se llevó a cabo la etapa de laboratorio, Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Reproducción e Incremento de la cepa antagónica .

Las cepas seleccionadas se reprodujeron masivamente en caldo nutritivo utilizando 2.0 L, 1.0 L para cada tratamiento (*Bacillus comercial* y *Bacillus nativo*.) a una concentración de 1×10^9 UFC/ml en la escala de McFarland, pasando 48 hr el inoculo está listo para ser aplicado a las plantas.

Las suspensiones de *B. subtilis* se aplicó a cada tratamiento haciendo una aplicación a la raíz de la planta de tomate con ayuda de una jeringa, la dosis fue de 5 mililitros por planta . Se mantuvieron a temperatura ambiente en el invernadero, se le dio el riego requerido a las plantas esto con el fin de que el inoculo tuviera las condiciones necesarias y se replicara en la planta brindándole protección ante el agente causal de la bacteria estudiada.

Reproducción de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Se obtuvo la bacteria de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pura de una cepa ya caracterizada bioquímica y molecularmente, proporcionada por la Dra. María Elizabeth Galindo Cepeda.

Una vez teniendo la bacteria ya caracterizada se procedió a reproducirla masivamente en medio de cultivo KB para después ser retirada con la ayuda de una espátula, mechero y alcohol para desinfectar y puesta en caldo nutritivo, la concentración para esta fue 1×10^3 UFC/m en la escala de McFarland, posteriormente se aplicó en las plantas según fuera el caso del tratamiento.

Establecimiento del experimento

Para llevar a cabo este experimento se realizaron cinco tratamientos: diluciones con cepa de *Bacillus subtilis* nativo, dilución con cepa de *Bacillus subtilis* comercial, testigo comercial (bactericida), bacteria pura y un testigo absoluto; con cuatro repeticiones cada uno y haciendo un experimento completamente al azar (DCA), la unidad experimental estuvo integrada por 20 macetas con una plántula de cada variedad a evaluar (Saladette y Cherry). En total se observaron 40 unidades experimentales.

Inoculación de la bacteria a plantas sanas

El inóculo infeccioso de la enfermedad se aplicó a los cinco días después de haber aplicado el tratamiento de *Bacillus subtilis* comercial y *Bacillus subtilis* nativo esto con el fin de que cuando se aplicara el inóculo de la enfermedad la planta ya contara con algo de protección por parte de los tratamientos evaluados además que como bien se sabía los tratamientos además de proporcionar protección ante hongos y bacterias del suelo, fungen también como nutrientes a las plantas por ello después del trasplante no se les realizó ningún tipo de plan nutricional.

El inóculo infeccioso se aplicó vía raíz con una dosis de 5 ml/planta, a una concentración de 1×10^9 UFC/ml en la escala de McFarland además de hacer una aplicación más en los entrenudos de las plantas esto con el fin que las plantas subieran la bacteria por vía xilema y la infección fuera más rápida y así poder recolectar síntomas más rápidamente y en poco tiempo.

Cuadro 1. Tratamientos usados en el experimento.

Tratamiento	Dosis	# De aplicaciones y lugar donde se aplicó.
T1.- <i>Bacillus subtilis</i> + Cmm	5 ml	2 aplicaciones a la raíz
T2.- <i>B. subtilis</i> nativo + Cmm	5 ml	2 aplicaciones a la raíz
T3.- Testigo comercial + Cmm	10ml	2 aplicaciones a la raíz
T4.-Bacteria pura (Cmm)	10 ml	2 aplicaciones al tallo/raíz
T5.- Testigo absoluto (agua)	0	0

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 nos ilustra la literatura citada, frutos con manchas de “ojo de pájaro”, plantas con raíces adventicias y hojas con el síntomas típico de “hojas de papel” (Figura 15). Para corroborar los postulados de Koch.

Este tipo plantas se llevaron al laboratorio de parasitología para ser estudiados y verificar y corroborar que en verdad se trate de la bacteria que se está estudiando .Cabe señalar que las plantas fueron llevadas en bolsas de papel estraza y plástico según fuera el caso de la muestra para evitar la contaminación por exudación de los tejidos o frutos los cuales podrían alterar los resultados además de asegurar que las partes a estudiar lleguen lo más limpias y con una turgencias buena para poder ser disectadas.



Figura 15. De izquierda a derecha: Hojas con síntoma de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. Fragmentos de tallos con síntomas utilizados para el reislamiento de la bacteria, Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Reislamiento de la bacteria

Para realizar el reislamiento se tomaron partes aéreas de la planta y se separó el follaje del fruto, seleccionando tejido sano y enfermo, el cual fue lavado con agua de la llave y se cortó en 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 10 ml de agua destilada estéril (Figura 16), y posteriormente se usaron para hacer las primeras tres diluciones (10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3}); que inicialmente tenían 9ml de agua destilada estéril y un 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 dilución, tomando 1 mL para 10^{-2} y la tercera dilución 1 ml para 10^{-3} . la dilución 10^{-3} de la que se sembró colocando 0.1 ml por dispersión en el medio diferencial KB, con las medidas asépticas en la cámara de flujo laminar y fue incubada a 28 °C/3 días, a partir de los cuales se diferenciaron por sus características y se tomaron en cuenta las que presentan las características morfológicas correspondientes a

Clavibacter michiganensis; colonias convexas, enteras y de color amarillo pálido, y la velocidad de crecimiento lento 0.2 mm a 7 días (OEPP/EPPO,2005).



Figura 16. Maceración de tejido y diluciones de la maceración para identificación de bacteria , Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Resiembra de colonias bacterianas

La resiembra de colonias bacteriana 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 KB, se incubaron a 28°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 un minuto, se decantó con agua, se agregó lugol por un minuto, se decantó con agua, se agregó

etanol para decantar, posteriormente se agregó safranina 1% y se dejó decantar, se lavó con agua corriente, y se dejó secar. consecutivamente se colocó una gota de aceite de inmersión sobre el frotis y se observaron sus características al microscopio, en 100X, para determinar color de la tinción, la colonia, la forma de acomodo y tipo de las células.

Prueba RYO

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

Prueba levana

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

Prueba de oxidasa

La oxidasa es una enzima pigmento que se encuentra presente en las especies de *Pseudomonas fluorescens* grupo *Fluorescentes* y en las *Pseudomonas saprofiticas* a diferencia de las *Pseudomonas fluorescentes* grupo *Syringae* que carece de ella, esta característica se utiliza para fines de identificación de las especies por primer grupo.

Prueba de arginina

La deshidrolasa de arginina es una enzima que se encuentra presente en la especie del género *Pseudomonas*. El complejo enzimático está constituido por las enzimas arginina desaminasa y la citrulina ureidasa. La primera metaboliza la arginina a citrulina y NH_3 y la segunda, transforma la citrulina en ornitina CO_2 y NH_3 .

Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno libre. La función de esta enzima es la de remover el producto tóxico (peróxido de hidrógeno) formado en la célula bacteriana mediante el proceso de oxidación-reducción. Esta enzima se encuentra presente en la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas.

Prueba Hugh-Leifson

Es una prueba que indica del tipo de metabolismo energético: respiratorio (O) o fermentador (F). Se suele utilizar glucosa como sustrato. Se detecta la acumulación de ácidos con un indicador ácido-base (azul de bromotimol). La bacteria se inocula con el hilo recto (por picadura) y se incuba en condiciones de aerobiosis (sin parafina) y de anaerobiosis (con parafina, tubo cerrado), simultáneamente.

Parametros Evaluados

Los parámetros a considerar en este experimento fueron los siguientes:

Altura de planta: Esta variable 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 diferencia.

Numero de frutos: Esta variable es una de las más importantes para determinar la productibilidad y rentabilidad que puede generar el cultivo, sobre todo cuando se clasifican por categorías comercializables, además el uso de *Bacillus subtilis* produjo un incremento en el peso del fruto logrando así que sobresaliera en rendimiento en comparación con los otros tratamientos.

Frutos sanos: Esta categoría es primordial, porque representa los frutos representan los frutos de mayor calidad para el mercado, de donde se generan los ingresos y la rentabilidad del cultivo . Los frutos sanos fueron recolectados de plantas del tratamiento de *Bacillus subtilis* comercial y testigos absolutos (testigos agua) los cuales contaban con una firmeza y color uniforme sin presentar síntomas de la enfermedad (ojo de pájaro).

Frutos enfermos: Esta categoría refleja la perdida de la producción de frutos puestos que estos frutos pierden vista estéticamente por contar con el síntoma muy específico de la enfermedad lo conocido como ojo de pájaro y son en su mayoría rechazados por el mercado y el agricultor tiende a tener un bajo precio por su mercancía o viéndose obligado a tirar estos frutos por su poca comercialización por el poco agrado del cliente., se encontró que la mayor cantidad de frutos enfermos se recolectaron de plantas cuyo tratamiento no se aplico es decir donde solo se aplicó la bacteria de *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* y el daño por esta fue mucho mayor en comparación con las otros tratamientos.

Incidencia de la enfermedad: Se evaluó el porcentaje de la enfermedad en las plantas, causado *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* para saber el daño en todo el ciclo de cultivo, con ayuda de la siguiente formula.

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de Plántulas

Como resultado obtuvimos un un 90 % de germinación, las cuales se trasplantaron a los 30 días de la siembra en almacigo , 20 plántulas de cada variedad para así iniciar el trabajo de investigación (Figura 17).

En la fase vegetativa y reproductiva las plagas más importantes fueron: mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), minador de la hojas (*Liriomisa spp*), arañita rojas (*Tetranychus urticae*), estas plagas fueron controladas en un principio con un repelente orgánico a base de extracto de ajo , posterior a ello se hicieron 2 aplicaciones de Imidacloprid a a una concentración de 1 ml / lt de agua con un intervalo de aplicación de 5 días .



Figura 17. Desarrollo de las plántulas en el sustrato peat-moss, y la aplicación de enraizador y microelementos en la solución de riego, Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Las enfermedades más comunes fueron: principalmente la bacteria estudiada cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis*), tizón temprano (*Alternaría solani*) , tizón tardío (*Phytophthora infestans*), secadera de almacigos (*Damping off*)

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 a 7 días (OEPP/EPPO, 2005).

El resultado obtenido concuerda con Rodríguez (1994), la cual señala que las colonias del género *Clavibacter*, son pequeñas de crecimiento lento, mucoides, convexas de color amarillo y variantes; naranjas, rosas y rojas dependiendo del medio. Por lo cual la literatura esta congruente con los resultados obtenidos (Cuadro 2).

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

Prueba	Literatura	Cepa
Crecimiento en B de King	+	+
Tinción de Gram	+	+
Prueba de RYO	-	-
oxidasa	-	-
Catalasa	+	+
Oxido fermentación	+/-	+/-
Hidrolisis de almidón	-	-

Entre las técnicas de tinción diferencial mas importante y utilizadas esta la Tincion de Gram que refleja diferencias biofísicas y bioquímicas en la pared celular bacteriana y permite su división en dos grupos; las que se decoloran totalmente por la acción del alcohol (Gram negativo) y las que consevan su coloración (Gram positivo), para el caso de *Clavibacter* el resultado debe ser positivo. Hay casos inciertos, especialmente en bacterias corineformes ,en ellos se recomienda utilizar la prueba de RYO la cual nos resultara negativo (Noval, 1991).

(King *et al* .,1959) menciona que el medio de cultivo 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 al igual que YDC que es un medio específico (Figura 18)



Figura18. Crecimiento bacteriano típico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Caracterización Bioquímica de *Bacillus subtilis*

La cepa de *B. subtilis* que se utilizó para las pruebas bioquímicas, arrojaron lo siguiente: tinción de Gram positiva, endospora central, crecimiento aeróbico, catalasa positiva, hidrolisis de almidón positiva y reduce los nitratos, no produce indol, forma escasa cantidad de ácido sulfúrico al 7 %, D-manitol negativo y utiliza el Citrato. con base a las pruebas y resultados obtenidos en ellas la cepa corresponde a *Bacillus subtilis* (Bergeys, 2000) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características y pruebas bioquímicas para identificar *Bacillus subtilis* de acuerdo a (Hernandez,2013).

Pruebas	Literatura	Reaccion
Tinción de Gram	+	+
Crecimiento anaeróbico	-	-
Posición de la espora	Central	Central
Oxidasa	-	-
Catalasa	+	+
Fermentación de glucosa	+	+
L-arabinosa	+	+
D-Xilosa	+	+
D-Manitol	-	-
Hidrolisis de almidón	+	+
Hidrolisis de Caseína	+	+
Hidrolisis de la Urea	-	-
Movilidad	+	+
Utilización de Citrato	+	+
Reducción de Nitrato	+	+
Crecimiento en NaCl al 7%	+	+
Crecimiento a PH 5.7	-	-
Hidrolisis de la gelatina	+	+

Comparación de Medias y Parámetros a Considerar en la Variedad Cherry

En la variedad de tomate Cherry se observó en la toma de datos de altura que *Bacillus subtilis* comercial obtuvo un desarrollo de altura considerable comparado con los demás tratamientos. Cabe mencionar también que el crecimiento radicular se incremento en un 48% en comparación con el testigo (T5) y un 52% comparado con el (T4). Así también se vio incremento en el rendimiento por el uso de *B. subtilis* en un 35% en comparación al testigo (T5) y un 30% comparado con el (T4) (Cuadro 4).

En el tratamiento de *B. subtilis* nativo se observó un desarrollo radicular favorable pues hubo un incremento radicular de un 39 % en comparación con el testigo (T5) y un 43% en comparación con el tratamiento (T4) .En cuanto a rendimiento se vio favorecido en un 27% comparado con el (T5) y un 19% comparado con en (T4), (Cuadro 4).

El tratamiento comercial fue el tratamiento menos recomendado ya que obtuvo más parámetros desfavorables, como son., menor altura en cm en comparación con todos los tratamientos ,crecimiento radicular de un 3.5% por debajo del testigo absoluto, el rendimiento bajó un 1.5% en comparación con el tratamiento (T5). La incidencia registrada de la enfermedad fue del 25 % por lo que se puede citar que el uso de productos químicos en algunas ocasiones no logra ser muy eficiente en la prevención (Cuadro 4).

En el tratamiento de bacteria pura se observó que presentó un crecimiento radicular de 4.3% abajo del testigo absoluto y un 48% en comparación con los tratamiento inoculados con *B. subtilis* (T1 Y T2) , un rendimiento de un 35% comparado con los tratamiento de *B.subtilis* y un 20 % comparado con el testigo (T5) ,además de ser tratamiento de mayor incidencia de la enfermedad con un 75 %, en tallos y frutos (Cuadro 4).

El testigo absoluto ó testigo agua fue un tratamiento que en un principio llevo ventaja en crecimiento vegetativo al solo ser regado por agua su crecimiento se reflejo en follaje y crecimiento , sin embargo en desarrollo radicular obtuvo un 50 % de menor desarrollo comparado con los tratamietos de *B. subtilis*, en rendimiento se observó que contaba con pocos frutos y de bajo peso de esos, la incidendia y severidad de la enfermedad se encontró en un 25% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de Medias y Parámetros a Considerar en la Variedad Cherry, Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Promedios Variedad Cherry						
Tratamiento	Altura en cm 21/06/13	Crecimiento radicular en cm 13/01/14	# frutos /plantas	Peso de frutos en gr.	Peso total de frutos /planta kg	# plantas enfermas/cm (incidencia)
T1 (<i>Bacillus subtilis</i>)	77.0	64.74	9.75	21	1.1405	0%
T2 (<i>B. subtilis</i> nativo)	74	53.75	10.75	22.25	1.106	0%
T3 (Testigo comercial)	69	31.75	8.75	17	.730	25%
T4 (Bacteria pura)	77.75	31.25	10	17	.802	75%
T5 (Testigo agua)	121.75	34	11	15	.746	25%

Comparación de Medias y Parámetros a Considerar en la Variedad Saladette.

Los tratamientos (1 y 2) inoculados con *B. subtilis* obtuvieron un buen desarrollo radicular obteniendo un 25 % de crecimiento comparado con el tratamiento (T5) y un 57.5% de crecimiento radicular comparado con el tratamiento (T4), un rendimiento del 4.1% comparado con el testigo (T5) y un 13.5 % en comparación con el tratamiento (T4) . Cabe mencionar que en estos tratamientos la incidencia de la enfermedades fue de un 0% (Cuadro 5).

El tratamiento comercial obtuvo bajos parámetros , comenzando con un 17% menor que de crecimiento radicular comparado con el testigo (T5) y un 33.5% tratamiento (T5) y un 13 % comparado con el tratamiento (T4), aunque se observó un 25% de incidencia de la enfermedad (Cuadro 5).

El tratamiento de bacteria pura fue el que obtuvo los resultados mas bajos ya que en crecimiento radicular bajo un 33% comparado con el testigo absoluto y un 58%

comparado con los tratamientos inoculados con *B.subtilis*, además en peso de frutos también salió decadente y por consiguiente el rendimiento de frutos bajo un 10 % comparado con el testigo (T5), y en su mayoría estos frutos presentaban prueba de la enfermedad como es “ojo de pájaro”. En comparación con demás tratamientos tuvo un 100 % de incidencia de la enfermedad (Cuadro 5).

El tratamiento agua, fue el que más desarrollo vegetativo obtuvo, su desarrollo radicular fue de un 75% en comparación con los tratamiento inoculados con *B.subtilis* (T1Y T2), en rendimiento obtuvo un 90% comparado con los tratamientos de *B.subtilis* lo cual lo coloca en un buen tratamiento, sin embargo se registró una incidencia del 50 % quizás por la cercanía que tenía con el tratamiento de bacteria pura y la susceptibilidad con la que contaba al no tener ningún nutriente mas que el agua.(Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de Medias y Parámetros a Considerar de la Variedad Saladette Depto. Parasitología, UAAAN 2014.

Promedios Variedad Saladette						
Tratamiento	Altura en cm 21/06/13	Crecimiento radicular en cm 13/01/14	# frutos /plantas	Peso de frutos en gr.	Peso total de frutos /planta kg	# plantas enfermas/cm (incidencia)
T1 (<i>Bacillus subtilis</i>)	77.75	71.25	5	50	1.255	0%
T2 (<i>B. subtilis</i> nativo)	62	71.25	5	47	1.224	0%
T3 (Testigo comercial)	69.75	41.5	5	50	1.251	25%
T4 (Bacteria pura)	74.5	30.25	5.25	40	1.086	100%
T5 (Testigo agua)	86	54	5.5	48	1.203	50%

Comparación de Medias de los Parámetros a Evaluar en las Dos Variedades.

Dentro de las 2 Variedades que fueron estudiadas se observó que la variedad que mejor resultados en cuanto a crecimiento radicular obtenido fue la variedad Cherry

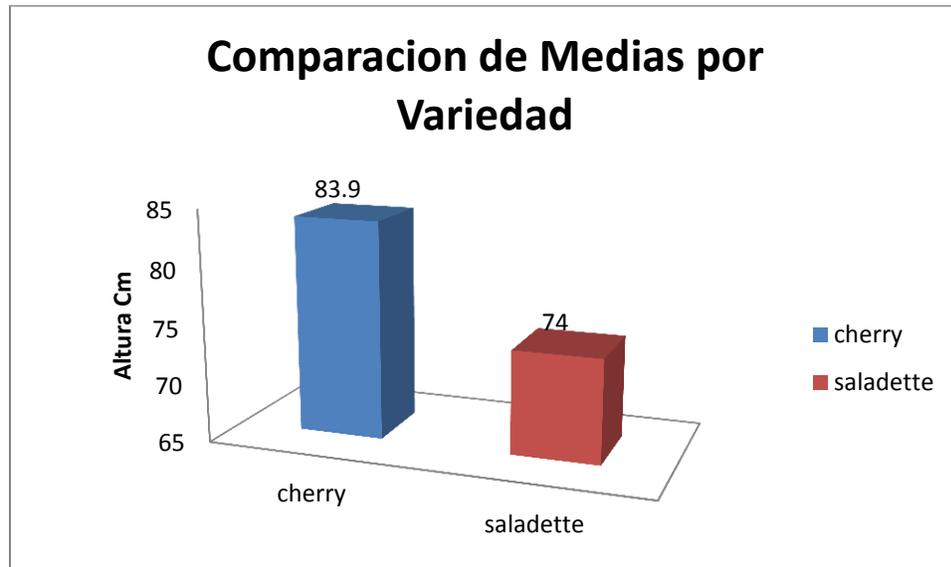


Figura 19. Comparación de Medias de Crecimiento en centímetros (cm)/Variedad.

De acuerdo a las (Figura 19) se observa que el mejor crecimiento se obtuvo en la variedad cherry, muy seguramente por su tipo de desarrollo (indeterminado) a diferencia de la variedad saladette (determinado).

Por otra parte en las (Figuras 20, 21 y 22) se observa que el testigo agua resultó con buen porcentaje en crecimiento tanto en variedades como en tratamientos, muy probablemente por la aplicación de pura agua la cual solo hacía crecer vegetativamente las plantas pero con escasa raíz y producción de frutos y peso de los mismos que era lo que se busca.

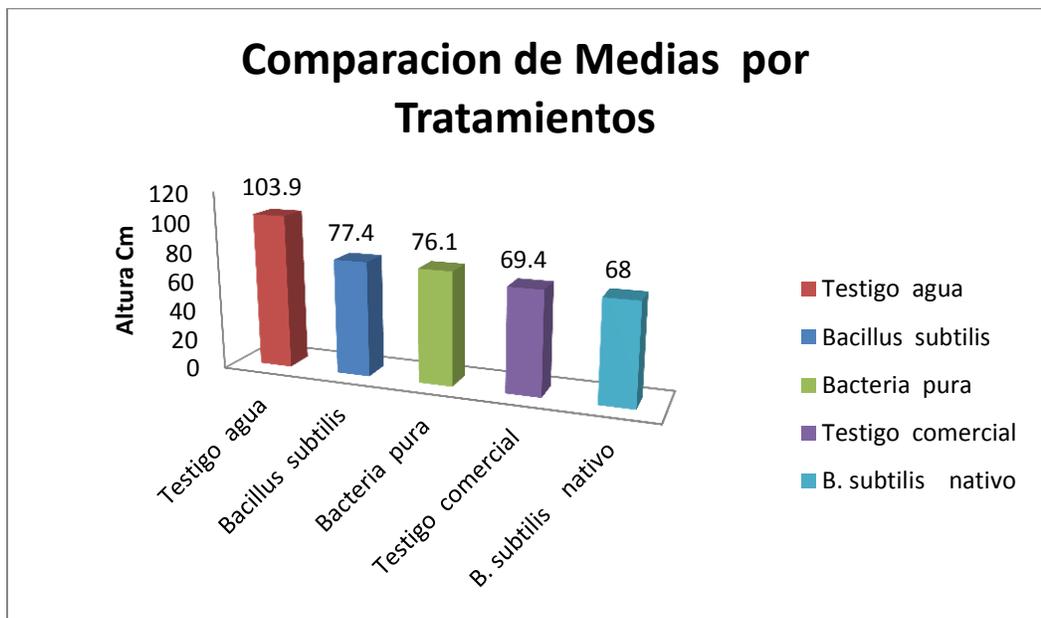


Figura 20. Comparación de Medias de Altura de la Planta (cm) de acuerdo a los Tratamientos.

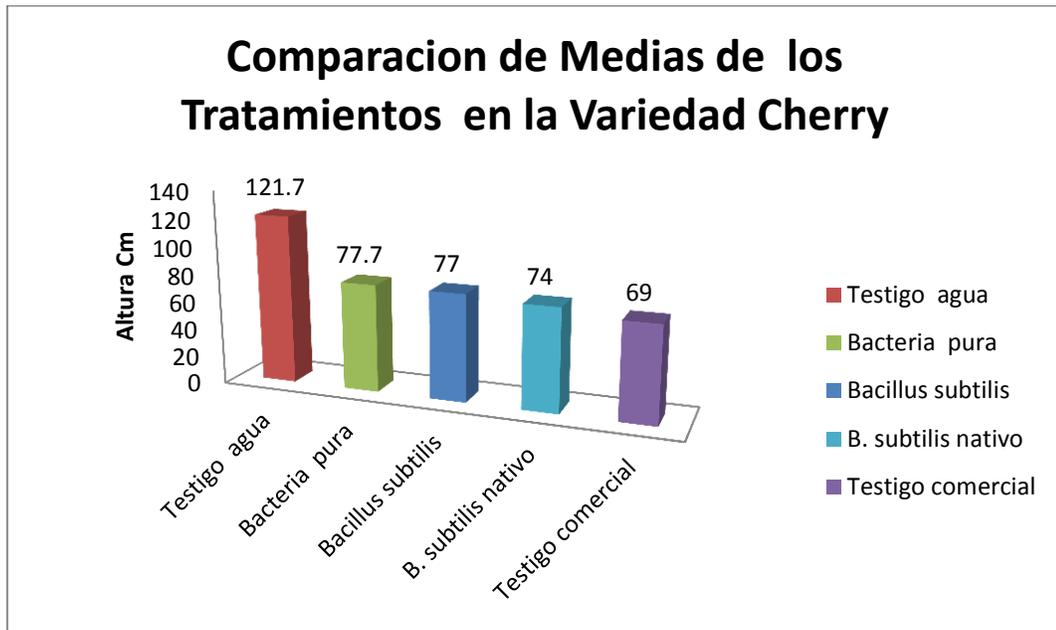


Figura 21. Comparación de Medias en Centímetros (cm) para la variedad cherry en los Tratamientos.

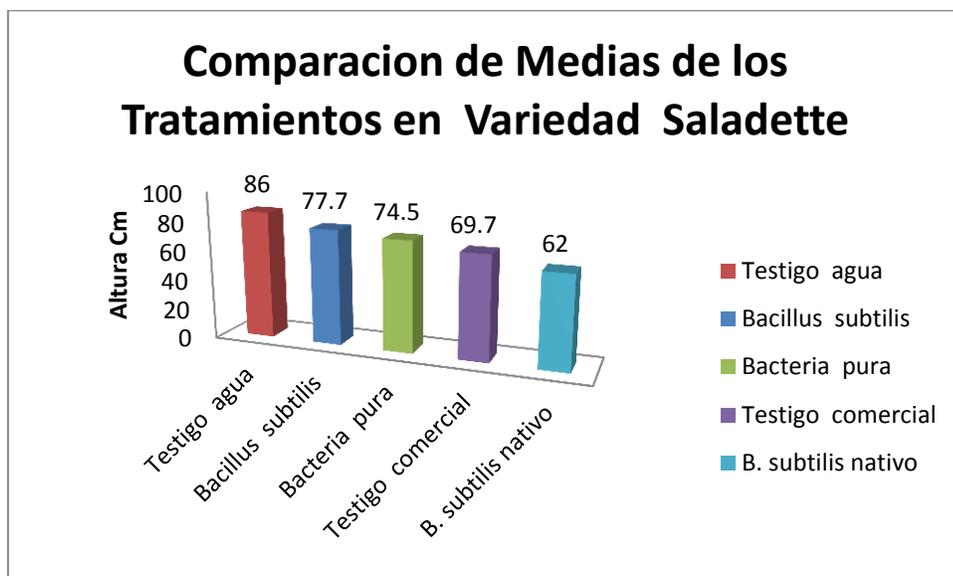


Figura 22. Comparación de Medias en Centímetros (cm) para la Variedad Saladette en los Tratamientos.

Como se puede observar en el tratamiento 1 tomando en cuenta las dos variedades el que mayor crecimiento vegetativo obtuvo fue la variedad saladette estadísticamente no presento diferencia. (Figura 23).

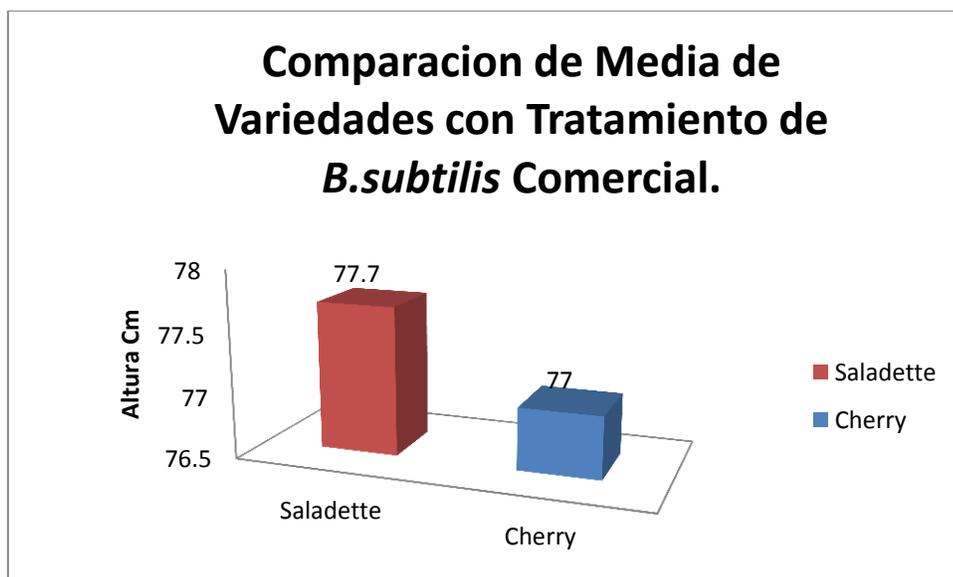


Figura 23. Comparación de Medias en Centímetros (cm) en las dos Variedades Tratadas con *B.subtilis* comercial.

En el tratamiento 2 se presento diferencia significativa puesto que la variedad cherry desarrollo más crecimiento dejando a la variedad saladette algo abajo (Figura 24).

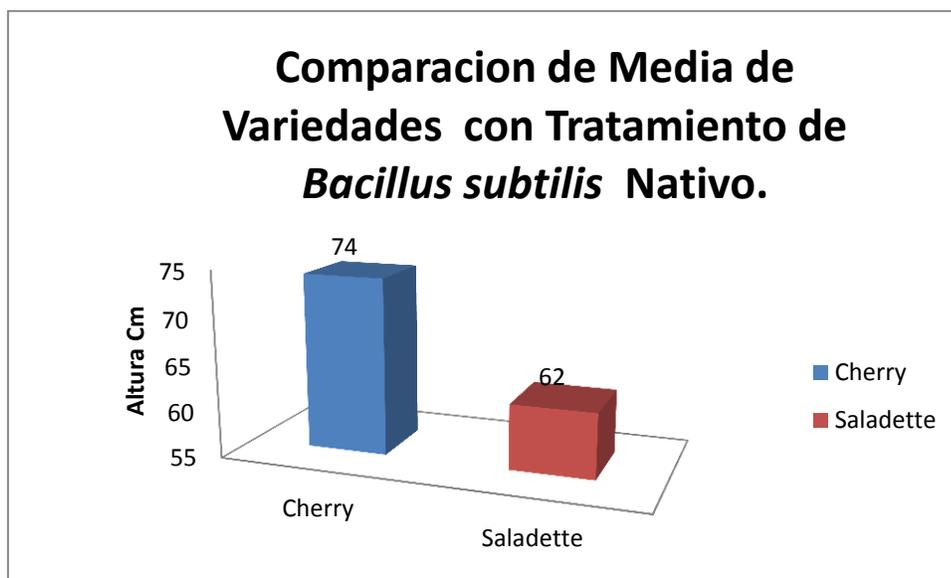


Figura 24. Comparación de Medias en Centímetros (cm) en las dos Variedades tratadas con *Bacillus subtilis* Nativo.

En el tratamiento 3 de testigo comercial al igual al tratamiento 1 la diferencia fue muy poca lo que nos dice que la variedad cherry es una variedad con tolerancia a la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Figura 25).

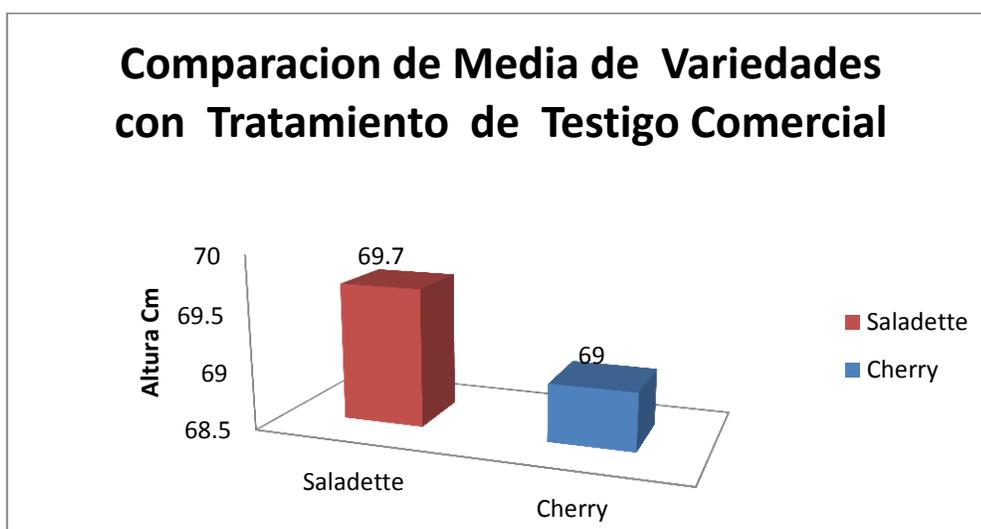


Figura 25. Comparación de Medias en Centímetros (cm) en las dos Variedades Tratadas con Testigo Comercial.

De igual forma en el tratamiento 4 de bacteria pura el crecimiento vegetativo de la planta se vio de una forma uniforme entre ambas variedades y con una diferencia muy poca sobresaliendo la variedad cherry (Figura 26)

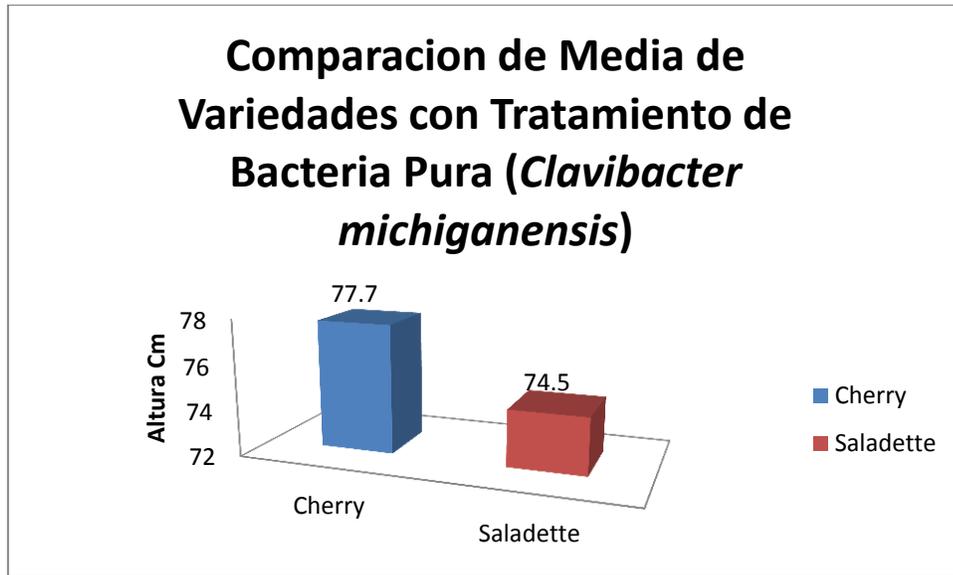


Figura 26. Comparación de Medias en Centímetros (cm) en las dos Variedades Tratadas con Bacteria Pura (*C.m.subsp. m*)

En el caso del tratamiento agua fue el que mayor resultados favorables en cuanto crecimiento vegetativo tuvo ya que en la 2 variedades se pudo notar que obtuvieron buenos resultados en crecimiento pero aun así la variedad más notable fue la variedad cherry, lo que es indicativo nuevamente de la vigorosidad de estas variedad en crecimiento (Figura 27).

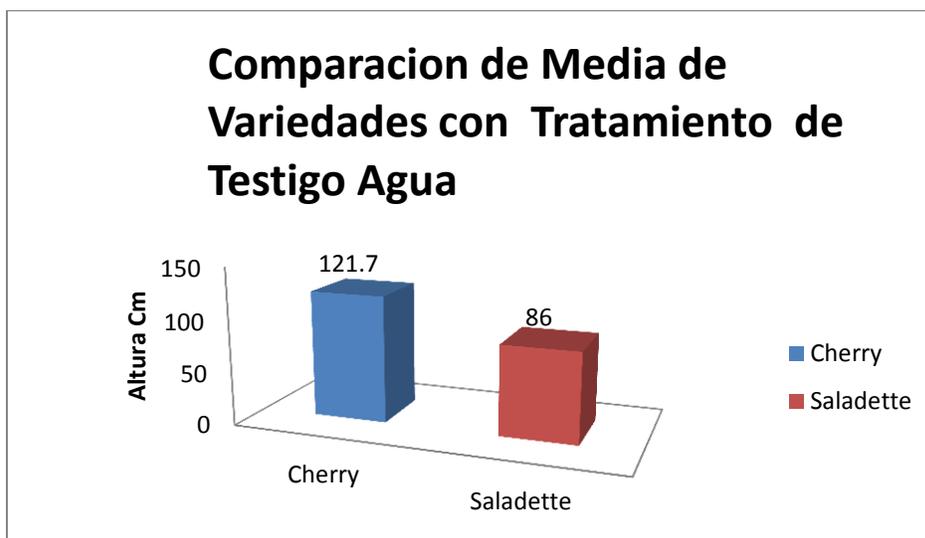


Figura 27. Comparación de Medias en Centímetros (cm) en las dos Variedades Tratadas con Testigo Agua.

La comparación de medias nos muestran que las plantas que fueron inoculadas con *B. subtilis* son las que mayor desarrollo de raíz tuvieron , y en particular la variedad saladette la cual por el desarrollo de los frutos de mayor tamaño debe de tener un mayor anclaje para poder nutrir y formar frutos de buen tamaño. Incluso investigaciones recientes avalan y demuestran que *B. subtilis* no solo inhibe el patógeno causante de *Clavibacter michiganensis*, sino que además, promueve el crecimiento de la raíz (Figura 28 y 29),(Filipon, 2002).

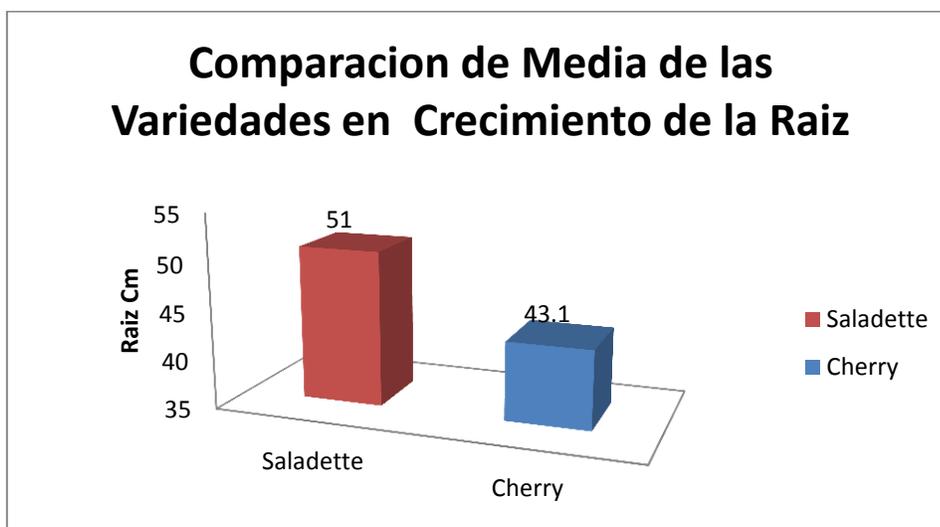


Figura 28. Comparación de Medias en Crecimiento de la Raíz en las dos Variedades.

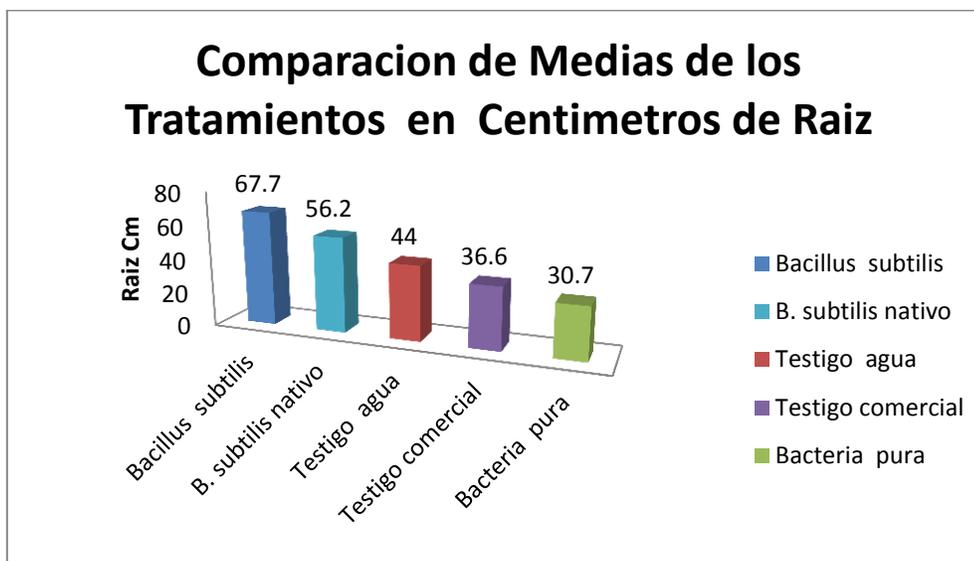


Figura 29. Comparación de Medias en Crecimiento de la Raíz por Tratamiento.



Figura 30. (Izquierda) desarrollo radicular de planta tratada con *Bacillus subtilis*, (Derecha), Desarrollo radicular de planta tratada con bacteria pura e infectada con *C.m* subsp. *m*.

Como era de esperarse la variedad con mayor número de frutos fue la variedad cherry (Figura 31) por el alto índice de numero de flores por racimo que va

desde los 8 a 14 frutos en condiciones apropiadas en comparación con la variedad saladette que solo llega a tener de 5 a 8 frutos por racimo pero de mayor tamaño y peso.

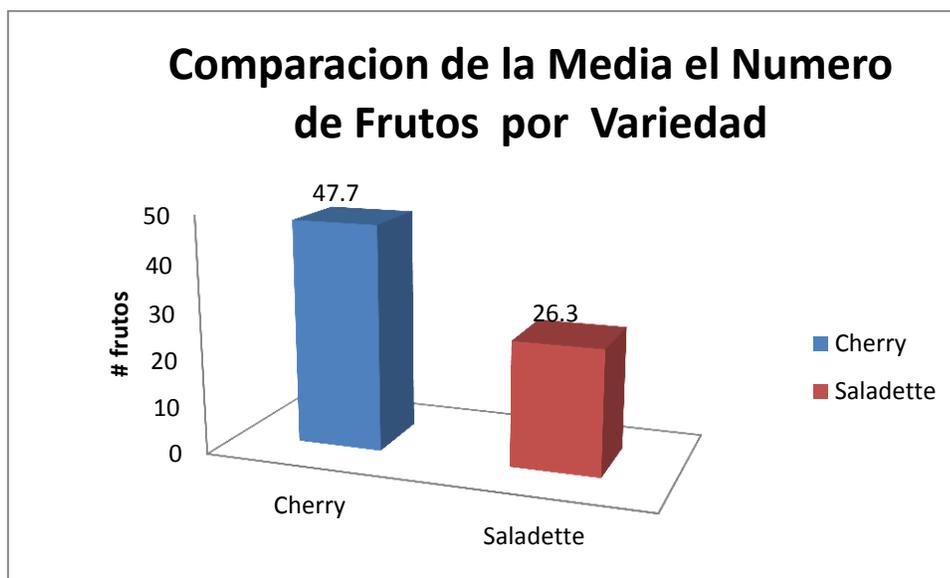


Figura 31. Comparación de Medias en el Número de Frutos en las dos Variedades.

La comparación de medias en las (Figuras 32 y 33) nos muestra que el mayor rendimiento en cuanto peso lo obtuvo la variedad saladette por el tamaño mayor y por consiguiente el peso de frutos, pero en particular nos muestra que las plantas del tratamiento 1 inoculadas con *B. subtilis* comercial resultaron ser las que mayor peso tuvieron en comparación con *Bacillus subtilis* nativo y el tratamiento comercial lo que nos da a entender que con el uso de la cepas de *B. subtilis* se puede obtener resultados superiores a los tratamientos con bactericidas, lo que permitirá integrar el control biológico en un esquema de manejo integrado de enfermedades en el cultivo de tomate con beneficios al medio ambiente, reducir toxicidad al humano y reducir la resistencia de patógenos de suelo a los bactericidas (Yuen *et al.*, 1985).

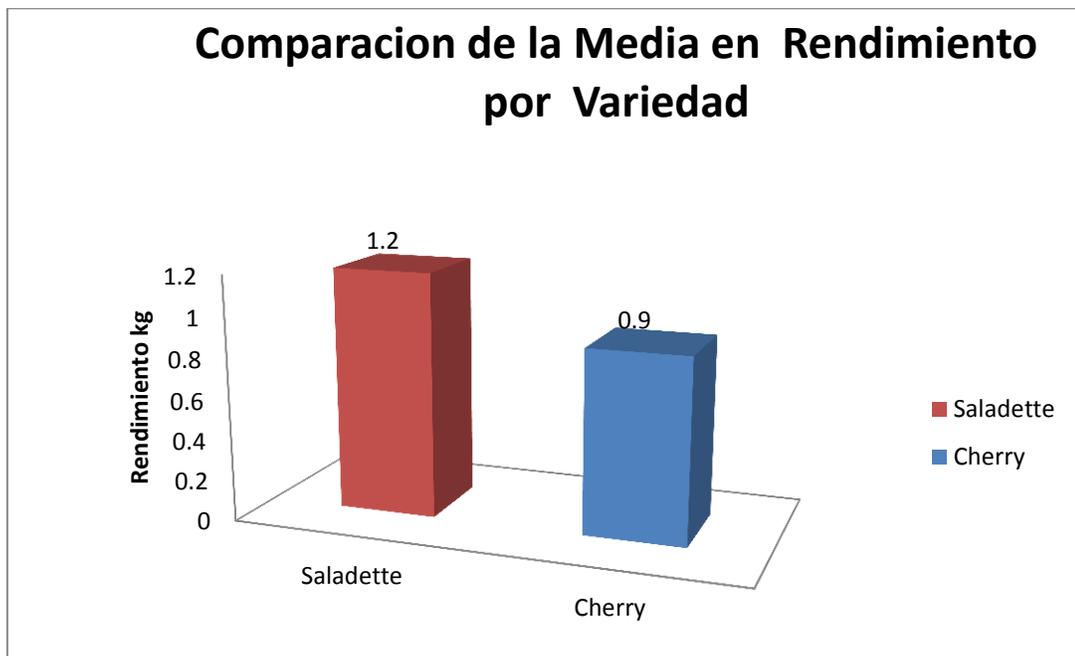


Figura 32. Comparación de Medias en Rendimiento (Kg) en las dos Variedades

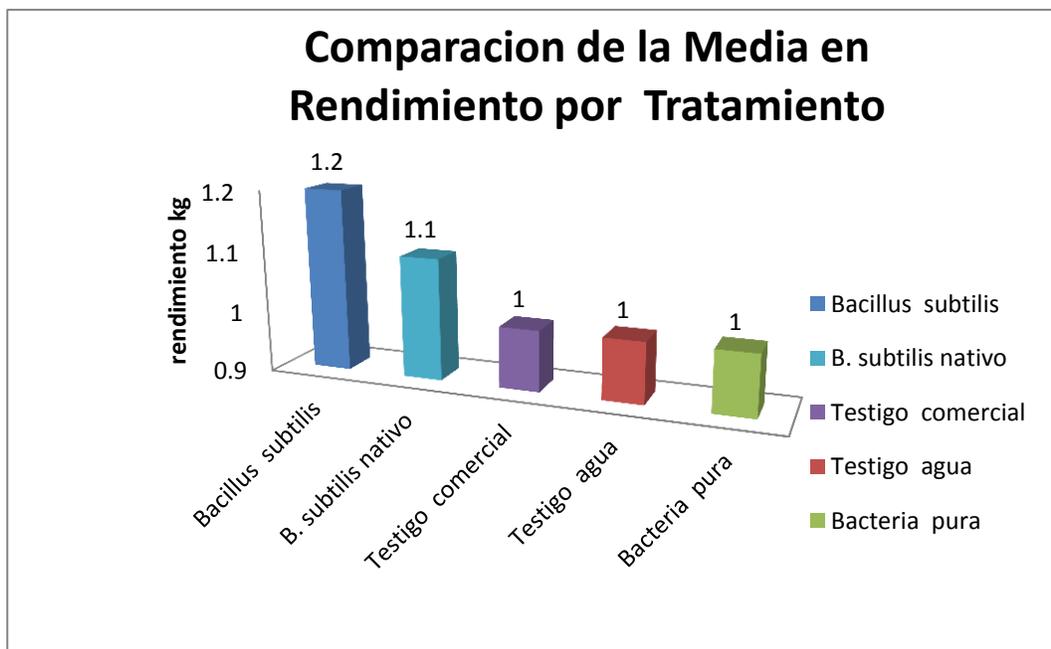


Figura 33. Comparación de Medias en Rendimiento (Kg) en los Tratamiento

De los resultados obtenidos , se puede observar que los tratamientos aplicados con *B. subtilis* fueron donde se redujo al 100% los síntomas de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* , así como un incremento en el peso de los frutos y un buen desarrollo radicular en ambas variedades.

Esta reducción de síntomas de la enfermedad , pudo deberse por la competición por nutrientes , espacio y probablemente inducción de la resistencia por *B. subtilis* , además de la producción de sustancias antibióticas que son liberadas (Baker, 1987). Estos antibióticos han sido identificados como péptidos antifúngicos pertenecientes a la familia Iturinas (Gueldner., et al 1988). Sin embargo a la fecha no hay un solo estudio a nivel campo donde se determine cual de los diferentes mecanismos antagónicos es el de mayor significado en la protección contra las enfermedades de la raíz. Por ejemplo se ha determinado que *B. subtilis* produce un antibiótico inhibidor al desarrollo micelial de *Phytophthora cactorum* sobre harina-maiz –agar, pero no se encontró evidencia de que el antibiótico estuviera envuelto en la protección de plántulas atacadas.

Resultados similares encontró Diaz (1990), donde determino que a nivel laboratorio *B. subtilis* inhibe a *F. oxysporum f sp. niveum*, pero en condiciones de invernadero los resultados fueron mejores ya que la humedad ayuda al incremento de espacio físico .

Aunque muchas investigaciones destacan que el principal efecto antagonico de *B. subtilis* sobre fitopatógenos de suelo es debido a la liberación de antibióticos mas que a la presencia física por espacio ya que *B. subtilis* posee una actividad antibiótica contra gran numero de hongos y bacterias de suelo (Rodgers, 1989). Estas sustancias antibióticas liberadas por *B. subtilis* pueden ser capaces de difundirse a través del suelo , como lo demostró Tschén(1987) Sin embargo no se determino el mecanismo antagonico que redujo la incidencia de la enfermedad.

La cantidad de inoculo de *B. subtilis* es muy importante en la colonización de raíz , ya que si alguna queda desprotegida por ahí puede penetrar el patógeno. Esto probablemente suceda en las raíces mas viejas ya que son menos ricas en compuestos organicos necesarios para el desarrollo de la bacteria

Filippi .,et al (1987) demostraron algo similar a lo anterior , al inocular *B. subtilis* en las raíces de clavel al momento de transplante contra *F. oxysporum f sp. dianthi*, y

mediante observaciones histológicas , determinaron que la colonización de *B. subtilis* fue al 100% en la base de las raíces nuevas , concluyendo que cuando la colonización decrece de un 20-30% la enfermedad inicia, mencionaron además que un 80% o mas raíces colonizadas son efectivas en la protección y debajo de este nivel no existe diferencia entre los tratamientos y testigos.

El control biológico es una alternativa que puede combinarse con otras practicas culturales. Esto cobra gran importancia si se considera que los fungicidas constituyen el 60 % de los compuestos de peligro. (Wilson y Wisniewsk , 1989)

CONCLUSIONES

El uso de *Bacillus subtilis* como agente de control biológico resulta muy eficaz en el control de bacterias fitopatógenas como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, tal como se puede observar en los tratamientos de *B. subtilis* nativo y comercial.

En la Variedad Cherry, los tratamientos inoculados con *B. subtilis* (T1 y T2) no presentaron sintomatología alguna por parte de la enfermedad, sin embargo en el tratamiento (T4) donde se aplicó la bacteria pura de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se encontró un 75 % de incidencia.

En la Variedad Saladette, los tratamientos que fueron inoculados con *B. subtilis* (T1 y T2), la incidencia de la enfermedad fue de un 0%, mientras que los tratamientos inoculados con bacteria pura fueron devastadores pues se encontró una incidencia del 100% de daño en tallos (haces vasculares), frutos y hojas.

En desarrollo radicular los tratamientos (T1 y T2) de las dos Variedades (Saladette y Cherry) fueron las que tuvieron mayor índice de crecimiento en centímetros (cm). Cabe mencionar que en rendimiento de igual forma los tratamientos inoculados con *B. subtilis* fueron los que tuvieron un mayor número de frutos y mayor peso que los demás tratamientos.

Las plantas del testigo absoluto (T5), solo tuvieron un crecimiento vegetativo amplio, pero los frutos no llegaron a alcanzar la calidad de los frutos, de las plantas inoculadas con *B. subtilis*, muy probablemente por que sus raíces no podían absorber nutrientes para que estos se desarrollaran de buena manera.

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.
- Anónimo. 2002. Agrobiologicals. [En línea:
<http://www.agrobiologicals.com/glossary/G1667.html>]
- Besoain, X. 1994. Factores de desarrollo y control de cáncer bacterial del tomate. Empresa y Avance Agrícola: 31:24-27.
- Baker, F.K. 1975. Elucidation and exploitation of naturally occurring biological control. An Introduction. In: Bruehl, G.W. (ed). Biology and control of soil-borne plant pathogens p. 136 A.P.S. St Minn. U.S.A.
- Blancar, D. 2005. Enfermedades del tomate. Mundi-Prensa. Madrid, España. 212p.
- Blancard, D. 1990. Enfermedades del tomate, Observar, Identificar, Luchar. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España. 212 p.
- Borboa, 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 *michiganensis* en el tomate del Estado de Sonora, México. Revista Fitotecnia Mexicana, 32(4): 319-32. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. México.
- Bravo, A., Aldunate, P. 1998. El cultivo del tomate. El campesino 7:24-53.
- Corpeño, B. 2004. Manual del cultivo del tomate. El Salvador. 43 p.
- Cazorla, F. M; Durán V. E. 2003. Perspectivas del control biológico de enfermedades en plantas. [En línea:
<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS35/microb35.html>]
- Chang, R. J.; Ries, S. M and Pataky, J. K. 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. Phytopathology 82:553-560.

- CNRDF-DGSV, 1999. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. Memorias. Centro Nacional de Referencias Fitosanitarias, Dirección General de Sanidad Vegetal. México
- Colloch, H. M., H. T. Cook and W.R. Wright. 1972. Market diseases of tomatoes peppers and eggplants. U.S. Department of Agriculture. Washington, D.C. 102 P.
- Diaz. P.A. 1990. Antagonismo de *Bacillus subtilis* contra *Fusarium oxysporum f sp niveum* y su eficiencia en el control del marchitamiento de la sandía en el invernadero . Tesis profesional . UAAAN. Saltillo, Coah, Méx. 34 p.
- Donoso, E., Lolas, M. y Muñoz, C. 2006. Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* en el biocontrol de enfermedades bacterinas 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 cuarantines pest. *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. EPPO A2 List.N°. 50.
- FAO, 2002. Agriculture data. Obtenida de la red www.FAO.org.
- Filippi , C.G. Bagnoli ., M Volterrani and G . Picci. 1987. Antagonistic effects of soil bacteria on *Fusarium oxysporum f sp. Dianthi*. Snyder and Hans . III. Relation between protection against *Fusarium* wilt in carnation and bacterial antagonistic colonization an root. Plant an soil . 98: 161-167. Netherlands.
- Filipon, Z. 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically related biological parameters. Agriculture Ecosystems & Enviromenet.: 88 169-174.
- García, E. R., Carrillo, 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.
- Garcia, S.R., Carrillo , A.J.,Allende-molar, R., Marquez Z.I.y Cruz-Ortega , J.2000.Sintomas e identifiacion de bacterias en plantas de tomate cultivadas con alta tecnologia en Sinaloa. Resumenes del XXVII Congreso nacional de fitopatología. Soc.Mex. de fitopatología . L-32.

- Gueldner, R.C., Ch.C.Reilly., P.L. Pusey ., C.E. Coatello R.F. Arrendale and R.H. Cox. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis* . J. Agric. Food Chem. 36: 366.370. U.S.A
- Guillén, R.; F. Hernández; G. Gallegos; R. Rodríguez; C. Aguilar; E. Padrón; M. Reyes. 2006. «*Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kûhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile», Revista Mexicana de Fitopatología 24(2):105114, México, <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/612/61224204.pdf>.
- Hernandez. P. M.2013. Manejo del patosistema Tomate (*Solanum lycopersicum* L) Cancer Bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*) con *Bacillus subtilis*
- Holguín, P. R. J., Vázquez, J., R. C., Rueda, P., E. O. 2006. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. The American Phytopathological Society. Plant disease. 90 (12):1550.
- Hortalizas. 2010. Tomates de México. [\[http://www.hortalizas.com/arciculo/18142/tomates-de-mexico\]](http://www.hortalizas.com/arciculo/18142/tomates-de-mexico).
- Hunziker, A. T. 1979. South American *Solanaceae*: a synoptic survey. In: "Hawkes, J. G.; Lester, R. N.; Skelding, A. D (Eds.). The biology and taxonomy of the *Solanaceae*. Academic Press, New York & London":4985.
- Izquierdo, J., Paltrinieri, G., Arias, C.1992. Producción, Postcosecha, Procesamiento y comercialización de Ajo, Cebolla y Tomate. Publicado por la FAO.
- Janse, J. D, 2004. Fatty acid analysis in the identification, taxonomy and ecology of (plant pathogenic) bacteria. In: Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans AD, van Elsas JD, eds. Molecular Microbial Ecology Manual, 2 nd 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.
- Koneman, E. W. 2001. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta edición . Editorial Medica Panamericana .Buenos Aires.

- Koneman, E. W. 2001. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- 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 water seed treatment for the control of bacterial leaf spot and bacterial canker on fresh market and processing tomatoes. Acta Horticulture 695: 197-204.
- López, N. J. E. 1996. Bacterias de importancia cuarentenaria con su rango de hospederos y su principal área de inspección. Métodos de diagnóstico de bacterias de importancia cuarentenaria. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Comisión Nacional de Sanidad Vegetal Agropecuaria "Dirección General de Sanidad Vegetal". Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Capitulo V.
- MAPA/DGSPA, 1991. Manual de laboratorio. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Dirección General de la Producción Agraria. Mundi-prensa. Madrid, España.
- Messiaen, C. M., y R. Lafon. 1968. Enfermedades de las hortalizas. Editorial Oikos tau. Barcelona, España. 361p.
- Noval, C. 1991. Parte II, Las Bacterias. Manual de laboratorio; Diagnóstico de hongos, Bacterias, y Nematodos Fitopatógenos. Ministerio de Agricultura, Pesca, y Alimentación. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Madrid, España.
- Nuez, F. 1995; Rodríguez del R., A; Tello, J.; Cuartero, J.; Segura, B. 1999. El cultivo de tomate. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- Nuño, M. R. 2007. Manual de producción de tomate rojo bajo condiciones de invernadero para el Valle de Mexicali. Baja California. Pp 4,10.
- La Universidad Estatal de Ohio en [HTTP://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3120.html](http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3120.html)
- La Universidad de Cornell en http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/tomato_Bacterial.htm.

- OEPP/EPPO. 2005. No. 39, Diagnostic protocol for *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. – Data Sheets on Quarantine Pests. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 275-283.
- Peralta, I., S. Knapp, and D.M. Spooner. 2005. New species of wild tomatoes (*solanum* section *Lycopersicum*: Solanaceae) from northern Peru. *Syst . Bot.* 30:424-434.
- Peralta, I., S. Knapp, and D.M. Spooner. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru. *Syst. Bot.* 30:424-434
- Ramírez, R. S., Osuna, C. F. J., Vázquez, A. J. M. P., Bustamante, O. J. D., Canul, K. J; Ocampo, O. T. 2009. Plagas y enfermedades del jitomate cultivado en invernaderos y bioespacios del Estado de Morelos. Folleto técnico. INIFAP.79 p.
- Ramírez, V. J. y Sáinz, R. R. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1ra. ed. Once Ríos (Eds). Culiacan, Sinaloa, México. 19-160 pp.
- Rat, B., Poissonnier, J.; Goisque, M. J., and Burgaud, A. 1991. Le Point. sur le chancro bactérien. Frutas y Hortalizas. Prepared by CABI and EPPO for the EU. 86. 38-40 pp.
- 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.
- Rodgers, P.B.1989. Potential of biological control organisms as source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development *pestic. Sci.* 27: 155-164. England.
- SAG. 2004. Declaración de Ventas de Plaguicidas, año 2004. 152 pp. [En línea]. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). <http://www.sag.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedDta=GP1tkXdhRJAS2Wp3v88hMmV7C%2FJUat%2B&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGraados=&argArchivold=1645>
- SAGARPA. 2011. Sistema de información agropecuaria de consulta; estadísticas agropecuarias 2000-2011. Servicio de información .Estadística Agropecuaria y Pesquera. SAGARPA.
- Schaad , N.W : Jonas and W .Chun . 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria . 5ª . Ed. APS PRESS Minnesota U.S.A. 374 p.
- Tschen, S.M. 1987. Control of *Rizoctonia solani* by *Bacillus subtilis* . *Trans. Micol. Soc. Japan.* 28:483-493. Japan.

- Tlapa, B. B. 2008. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de tomate (*Solanum esculentum*) In Jitomate tecnoligas para su producción en invernadero. Bautista M, N. Chavarin P, C., Valenzuela E, F. Colegio de Postgraduados. Montecillos Texcoco, Estado de México. Pp: 65-94.
- Valdez, I. A. 1993. Producción de Hortalizas. Tercera reimpresión. Editorial Limusa S.A de C.V. México, D.F 298 p.
- Venegas, E. Ciampi L., Collado L., Costa M., Fuentes R., Nissen J., Schobitz R. y Schoebitz M. 2005. Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género bacillus cohn antagonistas de cepas patógenas de fusarium link. en cala. Agro sur.vol.33,no.2 p.1-12. Disponible: http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304
- Vidaver, A. K., and Starr, M. P. 1982. Phytopathogenic coryneforme and related Bacteria. In: The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, ed. M. P. Starr, H. G. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, H. G. Shlegel, *: 1989- 1987.
- Vives, M. E. 1984. El cultivo de tomate. Editorial síntesis, S.A. Madrid España 2006 p.
- Wilson, Ch. L. and M.E Wisniewwski . 1989 Biological control of postharvest divseases of fruit an vegetables : An emerging technology . An. Rev. Phytopathol. 27:425-441. U.S.A.
- Wulff, E.; C. Mguni; K. Mansfeld-Giese; J. Fels; M. Lübeck; H. Hockenhull. 2002.: «Biochemical and Molecular Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilis* Isolates with Distinct Antagonistic Potencial Against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*», European Journal of Plant Pathology 51:574-584, Holanda.
- Yuen, G. Y., Schroth, M. N., and McCain, A. H., 1985. Reduction of Fusarium wilts of Carnation with suppressive and antagonistic bacteria. Plant Disease 69:1071-1075.

APENDICE

ANALISIS DE VARIANZA ALTURA EN TOMATE

FV	GL	SC	CM	F	P>F
FACTOR A	1	980.109375	980.109375	18.0610	0.000
FACTOR B	4	6746.406250	1686.601563	31.0799	0.000
INTERACCION	4	1887.390625	471.847656	8.6950	0.000
ERROR	30	1628.000000	54.266666		
TOTAL	39	11241.906250			

C.V. = 9.33%

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A (Variedades)

TRATAMIENTO	MEDIA
1	83.9000 A
2	74.0000 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 4.7605

VALORES DE TABLAS:

$q(0.05) = 2.89$ $q(0.01) = 3.89$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B (Tratamientos)

TRATAMIENTO	MEDIA	
5	103.8750	A
1	77.3750	B
4	76.1250	B
3	69.3750	B
2	68.0000	B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 10.6784

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 4.10 \quad q(0.01) = 5.05$$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B DENTRO DEL NIVEL 1 (Cherry) DEL FACTOR A

TRATAMIENTO	MEDIA	
5	121.7500	A
4	77.7500	B
1	77.0000	B
2	74.0000	B
3	69.0000	B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 15.1015

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 4.10 \quad q(0.01) = 5.05$$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B DENTRO DEL NIVEL 2 (Saladette) DEL FACTOR A

TRATAMIENTO	MEDIA
5	86.0000 A
1	77.7500 AB
4	74.5000 ABC
3	69.7500 BC
2	62.0000 C

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 15.1015

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 4.10 \quad q(0.01) = 5.05$$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A DENTRO DEL NIVEL 1 (*B. subtilis* comercial) DEL FACTOR B.

TRATAMIENTO	MEDIA
2	77.7500 A
1	77.0000 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 10.6447

VALORES DE TABLAS:

$q(0.05) = 2.89$ $q(0.01) = 3.89$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A DENTRO DEL NIVEL 2 (*B.subtilis* nativo.) DEL FACTOR B

TRATAMIENTO	MEDIA
1	74.0000 A
2	62.0000 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 10.6447

VALORES DE TABLAS:

$q(0.05) = 2.89$ $q(0.01) = 3.89$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A DENTRO DEL NIVEL 3 (Testigo comercial) DEL FACTOR B

TRATAMIENTO	MEDIA
2	69.7500 A
1	69.0000 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 10.6447

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 2.89 \quad q(0.01) = 3.89$$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A DENTRO DEL NIVEL 4 (Bacteria pura) DEL FACTOR B

TRATAMIENTO	MEDIA
1	77.7500 A
2	74.5000 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 10.6447

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 2.89 \quad q(0.01) = 3.89$$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A DENTRO DEL NIVEL 5 (testigo absoluto) DEL FACTOR B

TRATAMIENTO	MEDIA
1	121.7500 A
2	86.0000 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 10.6447

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 2.89 \quad q(0.01) = 3.89$$

ANALISIS DE VARIANZA LONGITUD RADICULAR

FV	GL	SC	CM	F	P>F
FACTOR A	1	632.023438	632.023438	13.2569	0.001
FACTOR B	4	7174.398438	1793.599609	37.6214	0.000
INTERACCION	4	482.101563	120.525391	2.5281	0.061
ERROR	30	1430.250000	47.674999		
TOTAL	39	9718.773438			

C.V. = 14.67%

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A

TRATAMIENTO	MEDIA
2	51.0500 A
1	43.1000 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 4.4620

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 2.89 \quad q(0.01) = 3.89$$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B

TRATAMIENTO	MEDIA
1	67.7500 A
2	56.2500 B
5	44.0000 C
3	36.6250 CD
4	30.7500 D

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 10.0089

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 4.10 \quad q(0.01) = 5.05$$

ANALISIS DE VARIANZA NÚMERO DE FRUTOS

FV	GL	SC	CM	F	P>F
FACTOR A	1	4579.597656	4579.597656	116.4798	0.000
FACTOR B	4	98.148438	24.537109	0.6241	0.652
INTERACCION	4	48.652344	12.163086	0.3094	0.869
ERROR	30	1179.500000	39.316666		
TOTAL	39	5905.898438			

C.V. = 16.92%

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A

TRATAMIENTO	MEDIA
1	47.7500 A
2	26.3500 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 4.0520

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 2.89 \quad q(0.01) = 3.89$$

ANALISIS DE VARIANZA RENDIMIENTO

FV	GL	SC	CM	F	P>F
FACTOR A	1	0.892815	0.892815	22.0885	0.000
FACTOR B	4	0.443867	0.110967	2.7453	0.046
INTERACCION	4	0.282440	0.070610	1.7469	0.165
ERROR	30	1.212597	0.040420		
TOTAL	39	2.831718			

C.V. = 19.06%

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR A

TRATAMIENTO	MEDIA
2	1.2040 A
1	0.9052 B

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 0.1299

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 2.89 \quad q(0.01) = 3.89$$

COMPARACION DE MEDIAS DEL FACTOR B

TRATAMIENTO	MEDIA
1	1.1978 A
2	1.1656 A
3	0.9907 A
5	0.9749 A
4	0.9440 A

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 0.2914

VALORES DE TABLAS:

$$q(0.05) = 4.10 \quad q(0.01) = 5.05$$

Cuadro de concentración de los parámetros evaluados de la variedad cherry.

		ALTURA EN CM 31-05-13	ALTURA EN CM 21-06-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-14	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOSE EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T1. B.subtilis Comercial.	R1	32	76	73	54	28	1.512
	R2	31	71	65	48	21	1.008
	R3	40	79	45	42	24	1.008
	R4	44	82	76	47	22	1.034
	Promedios	36.75	77	64.75	9.75	21	1.1405

		ALTURA EN CM 31-05-14	ALTURA EN CM 21-06-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-14	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOS EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T2. <i>B. subtilis</i> <i>nativo</i>	R1	46	72	45	56	22	1.232
	R2	32	70	54	48	24	1.152
	R3	31	72	48	48	22	1.056
	R4	44	82	68	47	21	.987
	Promedios	38.25	74	53.75	10.75	22.25	1.106

		ALTURA EN CM 31-05-13	ALTURA EN CM 21-06-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-14	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOS EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T3. testigo Comercial	R1	25	63	38	50	17	.850
	R2	25	66	32	42	15	.630
	R3	34	72	30	49	18	.882
	R4	36	75	27	35	16	.560
	Promedios	30	69	31.75	8.75	17	.730

		ALTURA EN CM 31-05-13	ALTURA EN CM 21-05-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-14	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOS EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T4. Bacteria pura	R1	53	77	28	40	14	.560
	R2	40	82	29	36	16	.576
	R3	55	74	31	46	20	.920
	R4	42	78	37	64	18	1.152
	Promedios	47.5	77.75	31.25	10	17	.802

		ALTURA EN CM 31-05-13	ALTURA EN CM 21-06-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-13	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOS EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T5. Testigo agua	R1	60	124	35	45	11	.495
	R2	54	104	27	46	15	.690
	R3	62	134	38	58	18	1.044
	R4	55	125	36	54	14	.756
	Promedios	57.75	121.75	34	11	15	.746

Cuadro de concentración de los parámetros evaluados de la variedad saladette.

		ALTURA EN CM 31-05-13	ALTURA EN CM 21-06-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-14	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOS EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T1. <i>B.subtilis</i> <i>comercial</i>	R1	36	75	73	30	40	1.200
	R2	36	82	68	24	62	1.488
	R3	35	76	78	26	44	1.144
	R4	33	78	64	22	54	1.188
	Promedios	35	77.75	71.25	5	50	1.255

		ALTURA EN CM 31-05-14	ALTURA EN CM 21-06-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-14	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOS EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T2. <i>B.subtilis</i> <i>nativo.</i>	R1	36	65	63	26	42	1.092
	R2	41	62	57	21	46	.966
	R3	34	57	61	23	52	1.352
	R4	39	64	54	31	48	1.488
	Promedios	37.5	62	58.75	5	47	1.224

		ALTURA EN CM 31-05-13	ALTURA EN CM 21-06-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-14	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOS EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T3. testigo Comercial	R1	37	60	43	32	48	1.536
	R2	50	73	45	23	54	1.242
	R3	43	68	37	21	56	1.176
	R4	50	78	41	25	42	1.050
	Promedios	45	69.75	41.5	5	50	1.251

		ALTURA EN CM 31-05-13	ALTURA EN CM 21-05-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-14	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOS EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T4. Bacteria pura	R1	43	76	28	28	34	.952
	R2	33	67	32	23	42	.966
	R3	45	79	34	36	38	1.368
	R4	47	76	27	23	46	1.058
	Promedios	42	74.5	30.25	5.25	40	1.086

		ALTURA EN CM 31-05-13	ALTURA EN CM 21-06-13	CRECIMIENTO RADICULAR EN CM 13-01-14	N. DE FRUTOS POR PLANTA	PESO DE FRUTOS EN GR	PESO TOTAL DE FRUTOS POR PLANTA KG
T5. Testigo agua	R1	43	94	55	29	42	1.218
	R2	34	86	60	34	38	1.292
	R3	44	97	45	24	44	1.056
	R4	28	67	56	26	48	1.248
	Promedios	37.25	86	54	5.5	48	1.203