



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

## ESTRATEGIAS DE MANEJO DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN JITOMATE

**MAURO ISRAEL TLATILPA SANTAMARIA**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

JULIO 2010

La presente tesis titulada: Estrategias de manejo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en jitomate realizada por el alumno Mauro Israel Tlatilpa Santamaria, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO: \_\_\_\_\_  
**DR. CRISTIAN NAVA DIAZ**

ASESOR: \_\_\_\_\_  
**DR. LEOPOLD JAN A. FUCIKOVSKY ZAK**

ASESOR: \_\_\_\_\_  
**M.C. BERTHA TLAPAL BOLAÑOS**

Estrategias de manejo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en  
Jitomate.

Mauro Israel Tlatilpa Santamaria M.C.

Colegio de Postgraduados 2010.

Resumen

El cáncer bacteriano ocasionado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se ha convertido en la enfermedad más importante en el cultivo del jitomate en algunas regiones de México a campo abierto y en invernaderos. Generalmente el manejo que se le da a este problema es usando antibióticos y cobres, los cuales han mostrado poca eficiencia. Se intentaron varias alternativas de manejo y que sean eficientes para el manejo de este problema. La investigación se realizó en 2 etapas; en la primera se evaluaron inductores que estimulen la resistencia sistémica, se inocularon rizobacterias promotoras del crecimiento, elicitores sintéticos, mezclas de bacterias con extractos de plantas y semillas y un producto que contenía peróxido de hidrogeno. En la primera etapa, la fertilización se realizó con una fórmula comercial. En la segunda de la investigación, se combinaron los productos inductores de resistencia con una solución nutritiva que tiene un balance de nutrimentos entre aniones y cationes (solución de Steiner), como una alternativa de manejo del cáncer bacteriano. De los productos inductores de resistencia evaluados fueron los productos que contenían cepas de *Bacillus subtilis* y que mostraron los mejores resultados en varios parámetros como la altura, la concentración de nutrientes, el rendimiento, el producto sintético que elicitaba la resistencia sistémica adquirida. Este producto sintético en algunas variables fue el mejor y en los demás se mantuvo dentro de los mejores. La combinación de estrategias en un programa de manejo, es más eficiente que usando una sola, por lo que al combinar nutrición con inducción de resistencia, se obtienen mejores resultados en el manejo de los problemas fitosanitarios.

## Handling strategies of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato

Mauro Israel Tlatilpa Santamaria M.C.

Colegio de Postgraduados 2010.

### Abstract

The bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* has become the most important disease in Tomato in some regions of Mexico in open field and greenhouses. Usually management that is given to this problem is using antibiotics and copper, which have shown low efficiency. It tried several management alternatives to this problem. The research was conducted in two stages. In the first inductors were evaluated sitem stimulate resistance, were inoculated plant growth promoting rhizobacteria, synthetic elicitors, mixing bacteria with extracts of plants and seeds and a product containing hydrogen peroxide. In the first stage, fertilization was applied with a commercial formula. In the second research, combined resistance inducing products with a nutrient solution that has a balance of nutrients between anions and cations (Steiner solution), as an alternative to bacterial canker management. Products evaluated inducers of resistance the products with strains of *Bacillus subtilis* showed the best results in various parameters such as height, the concentration of ammonium and potassium, and yield, the synthetic elicits systemic acquired resistance in some variables was the best and the other remained among the best. The combination of strategies in a management program is more efficient than using a single, so that by combining nutrition with induction of resistance, will have better results in the management of plant diseases.

## AGRADECIMIENTOS

- A dios por brindarme la oportunidad de disfrutar de la maravillas de la vida y de todas las cosas buenas que me ha dado
  
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para realizar mis estudios de maestría.
  
- Al Colegio de Postgraduados por todos los conocimientos brindados durante mi estancia en esta institución.
  
- Al Dr. Cristian Nava Díaz por ser un excelente consejero y apoyarme en todos los aspectos durante mi trabajo de investigación y mi estancia en el Colegio de Postgraduados.
  
- A la M.C. Betha Tlapal Bolaños por sus concejos como parte de mi comité.
  
- Al Dr. Leopold Jan A. Ficikovsky Zak por sus aportaciones a este trabajo.
  
- A todos los profesores del área de fitopatología que de alguna u otra forma participaron en mi formación profesional.

## DEDICATORIAS

- A mis padres Felipe Tlatilpa Linares y Reyna Santamaria Banderas quienes se han esforzado tanto por darme todo lo necesario para llegar hasta estoy ahora.
- A mi esposa Cindy, que me ha apoyado en todo momento para lograr mis metas y la cual hizo crecer mi familia.
- A mis hijos Yahel e Issac, que han venido a llenar mi vida de alegría y hacerme más feliz con sus travesuras.
- A mis hermanos Ibar e Iyali por apoyarme siempre cuando he cometido errores, por estar conmigo siempre en los momentos más importantes de mi vida.
- A mis suegros Angel y Lola por el apoyo brindado durante mi estancia en el Colegio.
- A mis cuñado Miguel Angel y Hugo, por hacer las tarde más amenas.
- A mis tia Socorro, la cual siempre ha estado al pendiente de nosotros, a sus hijas Kari, Deysi, Sayda y Dana.
- A mi tia Irene y mi tio Pablo, a sus hijas Doris, Mago, Isabel y Marlen.
- A mi abuelita Florentina que siempre está al pie del caño para apoyar a mi familia.
- A todos mis compañeros de la maestría, por los momentos agradables que tuve con ustedes durante mi estancia en el Colegio.
- A todos mis amigos que no menciono pero que son parte importante en mi vida, gracias por todo.

## ÍNDICE

Resumen.....	I
Abstrac.....	II
INDICE DE CUADROS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	IX
CAPÍTULO I.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Revisión de literatura.....	3
1.3.1. Jitomate.....	3
1.3.1.1. Superficie sembrada y producción en el mundo... 3	
1.3.1.2. Superficie sembrada en México.....	5
1.3.1.3. Taxonomía.....	5
1.3.1.4. Descripción botánica.....	6
1.3.2. Nutrición y su relación con la enfermedad.....	6
1.3.3. Nutrición del jitomate.....	8
1.3.3.1. Nitrógeno.....	9
1.3.3.2. Fosforo .....	10
1.3.3.3. Potasio .....	10
1.3.3.4. Calcio .....	11
1.3.3.5. Magnesio .....	12
1.3.4. Manejo de jitomate .....	12
1.3.5. Enfermedades .....	13
1.3.6. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	15
1.3.6.1. Importancia y distribución .....	16
1.3.6.2. Taxonomía .....	16
1.3.6.3. Características .....	16
1.3.6.4. Síntomas .....	17
1.3.6.5. Ciclo de la enfermedad.....	18
1.3.6.6. Manejo de la enfermedad .....	19
1.3.7. Inducción de resistencia .....	20
1.3.7.1. Tipos de inductores .....	20
1.3.7.2. Tipos de resistencia .....	21
1.3.8. Potencial.....	25
1.4. Literatura consultada .....	26

CAPÍTULO II.....	31
2.1. Alternativas para el manejo de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	31
2.1.1. Introducción .....	31
2.1.2. Hipótesis .....	33
2.1.3. Materiales y métodos .....	32
2.1.4. Inoculación.....	37
2.1.5. Variables evaluadas .....	38
2.1.6. Diseño experimental y análisis estadístico .....	40
2.1.7. Resultados .....	40
2.1.8. Discusión .....	47
2.1.9. Conclusiones .....	51
2.1.10. Literatura consultada .....	52
 CAPITULO III .....	 54
3.1. Alternativas para el manejo de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> : nutrición.....	54
3.1.1. Introducción .....	54
3.1.2. Materiales y métodos .....	57
3.1.2.1. Aislamiento del patógeno .....	57
3.1.2.2. Identificación .....	57
3.1.2.3. Material Vegetal .....	58
3.1.2.4. Inoculación .....	59
3.1.2.5. Aplicación de los tratamientos .....	60
3.1.3. Manejo de la nutrición.....	63
3.1.4. Variables evaluadas .....	64
3.1.5. Diseño experimental .....	65
3.1.6. Resultados .....	66
3.1.7. Discusión .....	72
3.1.8. Conclusiones .....	74
3.1.9. Literatura citada .....	75

## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPITULO I.

Cuadro 1. Principales países productores de jitomate en el mundo y proporción relativa en el mercado.....	4
Cuadro 2. Principales países productores de Jitomate para uso industrial, su volumen (millones de toneladas) y su proporción relativa en el mercado (PM) en el mercado mundial.....	4

### CAPÍTULO II

Cuadro 1. Tratamientos para el manejo de <i>Clavibacter michiganensis</i> subs. <i>michiganensis</i> .....	34
Cuadro 2. Ingrediente activo de los productos aplicados .....	35
Cuadro 3. Formula de fertilización utilizada a nivel comercial en invernaderos de alta tecnología.....	36
Cuadro 4. Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, purificación e incremento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	37
Cuadro 5. Efecto de los tratamientos en la altura de plantas de jitomate a partir de la primera semana después de la aplicación .....	41
Cuadro 6. Efecto de los tratamientos en la concentración de potasio en plantas de jitomate a partir de la primera semana después de la aplicación .....	42
Cuadro 7. Efecto de los tratamientos en la concentración de amonio en plantas de jitomate a partir de la primera semana después de la aplicación .....	44
Cuadro 8. Efecto de los tratamientos en el peso fresco y peso seco de plantas de jitomate al final del experimento.....	45
Cuadro 9. Efecto de los tratamientos la concentración de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en tejido vegetal.....	46
Cuadro 10. Rangos óptimos para el extracto celular de peciolo en jitomate .....	50

### CAPÍTULO III

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para la inducción de la resistencia en jitomate contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	61
Cuadro 2. Ingrediente activo de los tratamientos utilizados para la inducción de la resistencia en jitomate contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	62
Cuadro 3. Solución de macronutrientes de la fórmula de Steiner utilizada para la nutrición de jitomate.....	64
Cuadro 4. Solución de micronutrientes de la fórmula de Steiner utilizada para la nutrición de jitomate.....	64
Cuadro 5. Efecto de los tratamientos en la altura de plantas de jitomate.....	66
Cuadro 6. Efecto de los tratamientos en la concentración de amonio en plantas de jitomate.....	67
Cuadro 7. Efecto de los tratamientos en la concentración de potasio en plantas de jitomate.....	68
Cuadro 8. Plantas positivas al cáncer bacteriano.....	69
Cuadro 9. Rendimiento de los distintos tratamientos.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1. Distribución mundial de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.....16
- Figura 2. Síntomas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: a) Síntomas en hojas. b) Planta con síntomas avanzados. c) Corte transversal de una hoja mostrando los haces vasculares necrosados y d) fruto con el síntoma de ojo de pájaro.....18
- Figura 3. Ciclo del cáncer bacteriano. De abajo hacia arriba: diseminación por medio de semilla, plantas asintomáticas y presencia de síntomas al momento de la fructificación, formas de transmisión de la enfermedad y manifestación de síntomas en hoja y fruto.....19
- Figura 4. Rutas de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y Resistencia Sistémica Inducida (ISR) diferenciadas en la base de la naturaleza de los elicitores y en la regulación de las rutas envueltas Ciclo del cáncer bacteriano. De abajo hacia arriba: diseminación por medio de semilla, plantas asintomáticas y presencia de síntomas al momento de la fructificación, formas de transmisión de la enfermedad y manifestación de síntomas en hoja y fruto..... 22

### CAPITULO II

- Figura 1. Inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mediante punción a la altura de la tercera hoja verdadera y aspersion de una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  ufc/ml..... 38
- Figura 2. Plantas de jitomate recién cortadas al final del experimento para la evaluación del peso fresco..... . 39
- Figura 3. Ionometro con electrodos para la evaluación de amonio y potasio en la suspensión de tejido macerado de las plantas de jitomate durante el experimento..... 30
- Figura 4. Efecto de los tratamientos la altura promedio de plantas de jitomate.... 47

Figura 5. Concentración de amonio y potasio en plantas de jitomate con diferentes tratamientos inductores de resistencia..... 49

### CAPITULO III

Figura 1. De izquierda a derecha: hojas con síntomas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Fragmentos de tallo que fueron utilizados para el aislamiento y colonias típicas del patógeno después de 24-48 horas de incubación a temperatura ambiente..... 57

Figura 2. Pruebas clave utilizadas para la rápida identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a partir de tejido vegetal y bacterias puras en medio de cultivo. De izquierda a derecha, ausencia de hilo mucilaginoso en una gota de KOH 3% y reacción positiva de la técnica de RIPA..... 58

Figura 3. Siembra de la variedad Dundee en charolas de unicel de 200 cavidades e incubación bajo condiciones de invernadero por 30 días..... 59

Figura 4. Material utilizado para la preparación del inóculo. De izquierda a derecha, caja con medio de cultivo, agua destilada esterilizada y palillos en la suspensión bacteriana.....59

Figura 5. Inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por medio de palillos sumergidos en una suspensión de la bacteria e incrustados en la axila de la segunda hoja verdadera..... 60

Figura 6. Medidor de ion específico y pantalla de lectura de una muestra de jitomate..... 65

Figura 7. Síntomas de plantas de jitomate clasificadas como 1. .... 65

Figura 8. Distribución de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el invernadero en tres dimensiones, de izquierda a derecha, la forma planta, la segunda en curvas y la tercera en tercera dimensión, donde 0 = planta sin síntomas y 1 = planta con síntomas..... 71

## CAPITULO I

### 1.1. Introducción

Las hortalizas son los cultivos más demandados para consumo en fresco, existe una gran variedad de productos. El cultivo que más destaca por su consumo per cápita como en importancia es el jitomate o tomate (*Solanum lycopersicum*).

El jitomate se cultiva en el país tanto en campo abierto como en invernaderos. Los principales estados productores en orden de importancia son: Sinaloa (400,401 ton/año) , Michoacán (92,545.1ton/año), San Luis Potosí (92,292.0 ton/año), Baja California Sur (76,025.8 ton/año), Morelos (68,531 ton/año), Jalisco(63,315 ton/año), Nayarit (37,025.5 ton/año), Sonora (25,081 ton/año), Guerrero (14,324.8 ton/año), Colima (12,655 ton/año), y Guanajuato(3,420.0 ton/año). Los cuales participan con el 70% de la producción (SIAP, 2009). Además, es una importante fuente de empleos por las labores culturales que demanda para lograr rendimientos altos.

La producción se exporta a Estados Unidos de Norteamérica, donde se le demanda por su sabor, presentación, calidad y la larga vida de anaquel. Este cultivo se produce principalmente en sistemas tradicionales a campo abierto y con métodos convencionales, pero últimamente se ha incrementado el uso de tecnologías como son el fertirriego y en las últimas décadas el uso de invernaderos con sistemas de riego automatizado, además, de que se han implementado el uso de variedades de rendimientos altos y con características específicas para cada tipo de mercado y de calidad excelente (Castellanos, 2004)

En los sistemas nuevos de producción, se tienen condiciones favorables para muchas enfermedades entra las que destacan los hongos que afectan las raíces como *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* y *F. o.* f sp. *radicis-lycopersici*, los cuales causan enfermedades de amarillamiento y marchitez. Otros patógenos causantes de enfermedades que ocasionan síntomas similares a los anteriores son las bacterias que

han adquirido gran importancia en jitomate, destaca, *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis* que en años recientes causado pérdidas de gran importancia económica (Castellanos, 2004) debido a su capacidad de destrucción, diseminación, la carencia de variedades resistentes y antibióticos eficientes como preventivos o curativos.

Generalmente no existen indicios visibles de la infección por *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis* sino hasta el momento de la fructificación, cuando los frutos funcionan fisiológicamente como un almacén y la mayor parte de los carbohidratos producidos por las hojas y nutrientes absorbidos por las raíces son desviados a este órgano

El manejo de esta enfermedad es complicado debido a que es una bacteria sistémica Gram positiva. El manejo de las labores culturales ha mostrado cierto control de la enfermedad en invernadero, pero son necesarias otras estrategias que reduzcan el uso de productos químicos que conduzcan a un manejo integrado de la enfermedad. Actualmente, los mercados internacionales exigen productos inocuos libres de residuos de antibióticos o patógenos que puedan tener efectos adversos en los seres humanos.

Dentro de las alternativas que han mostrado eficacia en el control de otras enfermedades en jitomate destacan el uso de variedades resistentes, manejo de la nutrición del cultivo, uso de bacterias como agentes de control biológico e inductores de resistencia (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997). En este sentido, la presente investigación tuvo como objetivos los siguientes:

- ❖ Evaluar el efecto de la resistencia sistémica inducida y adquirida como estrategia para el control de *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis* y otras enfermedades.
- ❖ Evaluar la nutrición de la planta y relacionarla con el ciclo del cultivo y la enfermedad.

- ❖ Combinar diferentes estrategias de control (inducción de resistencia y nutrición) para el control de *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*.

## **1.2. Hipótesis**

- ❖ La resistencia sistémica inducida por Rhizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas reduce la incidencia y severidad de *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*.
- ❖ La variación de la concentración de nutrimentos durante el ciclo de la planta está relacionada con la expresión de síntomas de la bacteria en jitomate.
- ❖ La combinación de nutrición e inductores de resistencia es una alternativa para el control de la enfermedad.

## **1.3. Revisión de literatura**

### **1.3.1. Jitomate**

#### **1.3.1.1. Superficie sembrada y producción en el mundo**

El 75% de la producción mundial del jitomate para el consumo en fresco, y el 25% es para propósitos industriales (p.e. pastas, concentrados, salsas, jitomate pelado y rebanado). China, India, Turquía, Egipto y Estados Unidos de Norteamérica son los cinco países responsables del 56% de la producción mundial de jitomate y el 55% del área cosechada. China produce el 26% del volumen mundial para el consumo en fresco (Cuadro 1) mientras que los Estados Unidos de Norteamérica (principalmente California) produce el 35% del volumen mundial para la industria (Cuadro 2 FAOSTAT data, 2009).

Cuadro 1. Países productores de jitomate en el mundo y proporción relativa en el mercado (Fuente: FAOSTAT data, 2009).

<b>Posición</b>	<b>País/Área</b>	<b>Producción (millones ton/año)</b>	<b>Proporción relativa en el mercado (%)</b>
<b>1</b>	China	30,1	26
<b>2</b>	EE.UU.	12,4	11
<b>3</b>	Turquía	8,0	7
<b>4</b>	India	7,6	7
<b>5</b>	Egipto	6,8	6
	Subtotal	64,9	56
	Resto del mundo	50,0	44
	Total del mundo	114,9	100

Cuadro 2. Países productores de jitomate para uso industrial, su volumen (millones de toneladas) y su proporción relativa en el mercado mundial (Fuente: FAOSTAT data, 2009).

<b>Posición</b>	<b>País/Área</b>	<b>Producción para la industria</b>	<b>PM (%)</b>
<b>1</b>	EE.UU.	10,0	35
	California	9,4	33

2	Italia	4,8	17
	Norte (50% pasta)	2,4	8
	Sur (50% sin piel)	2,4	8
3	España	1,4	5
4	Turquía	1,3	5
5	China	1,2	4
	Subtotal	18,7	65
	Resto del mundo	10,1	35
	Todo el mundo	28,8	100

---

### 1.3.1.2. Superficie sembrada en México

En México, los principales estados por superficie sembrada en los ciclos primavera-verano y otoño-invierno son: Sinaloa (15,783.98 ha), Michoacán (5,351.75 ha), Baja California (3,722.70 ha), Veracruz (3,245.50 ha), San Luis Potosí (3,129.50 ha), Nayarit (2,933.50 ha), Baja California Sur ( 2,569 ha), Jalisco (2449.50 ha), Morelos (2370.89 ha), Zacatecas (2,253.50 ha), Tamaulipas (2,138 ha). El resto de los estados cuenta con superficies menores (SIAP, 2008).

### 1.3.1.3. Taxonomía

**Reino** *Plantae*

**Subreino** *Tracheobionta*

**División** *Magnoliophyta*

**Clase** *Magnoliopsida*

**Subclase** *Asteridae*

**Orden** *Solanales*

**Familia** *Solanaceae*

**Género** *Solanum*

**Especies** *Solanum lycopersicum*

**Variedad** *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum*

The PLANTS Database (versión 5.1.1), 2009.

#### **1.3.1.4. Descripción botánica**

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia Solanácea. Los miembros de esta familia presentan haces bicolaterales y una estructura floral modelo K (5) [C (5) A (5)] G (2). Esto es, sus flores son radiales y con cinco estambres. El ovario, súpero, bicarpelar, contiene primordios seminales, produciendo bayas polispermas. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor (Nuez, 2001).

Posee una semilla discoidal comprimida y con embrión enrollado, de diámetro más o menos uniforme. Todos los miembros de esta familia tienen el mismo número de cromosomas básico ( $x = 12$ ). El embrión tiene los cotiledones incumbentes, con endospermo abundante. Las yemas florales nunca presentan los lóbulos de la corola solapantes; la estivación nunca es retorcida-conduplicada. Los filamentos de los estambres se insertan en la base de las anteras, no sobre la corola dorsal (Nuez, 2001).

#### **1.3.2. Nutrición y su relación con la enfermedad**

Las necesidades nutricionales de las plantas se pueden desglosar en dos grupos, nutrientes orgánicos e inorgánicos. Los primeros representan entre el 90-95% del peso seco de la planta y están constituidos por los elementos carbono, oxígeno e hidrógeno

obtenidos a partir del CO<sub>2</sub> atmosférico y del agua del suelo. El restante 5-10% constituyen la denominada fracción mineral (Mengel and Kirkby, 2001).

El sistema radical es el que les va a permitir a las plantas absorber el agua y los nutrientes inorgánicos del suelo. Posteriormente, éstos son transportados hacia diferentes órganos, donde son metabolizados o almacenados. Por otra parte, los nutrientes orgánicos (fotoasimilados) de la planta producidos en las hojas por la fotosíntesis son traslocados a través del floema hacia donde sean necesarios (órganos demandantes). Según esto cualquier alteración que ocasionen los organismos fitopatógenos sobre el movimiento de agua y nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos, ocasionará la enfermedad (por deficiencia) en las partes de la planta que carezcan de esos nutrientes. Esos órganos enfermos serán incapaces de llevar a cabo sus funciones, por lo que afectarán al resto de la planta. Así, cuando un patógeno es capaz de penetrar en una planta establece una relación parasítica directa y completa. Si la reacción entre ambos es compatible, se producen los siguientes procesos (Mengel and Kirkby, 2001):

- Debilitamiento de la planta hospedante a causa de la absorción continua de los nutrientes a sus células a favor del crecimiento del patógeno.
- Alteración o inhibición del metabolismo de las células vegetales debido a la secreción de enzimas, toxinas o sustancias reguladoras del crecimiento por parte del patógeno.
- Bloqueo de la translocación de nutrientes minerales y agua a través de los tejidos conductores de la planta.
- Transmisión de los agentes causales de una planta enferma a una sana.

A pesar de que se pueda establecer esta relación parasitaria entre la planta y el patógeno, hemos de tener en cuenta que el estado nutricional en que se encuentra una planta puede aumentar o disminuir la resistencia o la tolerancia de la misma a las plagas, en definitiva influye sobre la interacción planta-patógeno. Aunque la resistencia y la tolerancia están controladas genéticamente, los factores ambientales tienen influencia sobre estos. La nutrición mineral puede considerarse un factor ambiental que puede ser manipulado con relativa facilidad (Huber and Graham, 1999).

Una nutrición mineral equilibrada asegura un crecimiento óptimo de la planta y al mismo tiempo, permite una resistencia óptima de la misma, aunque pueda haber algunas excepciones. La tolerancia puede aumentarse mediante el aporte del nutriente deficitario, ya que una planta que crece de forma vigorosa tiene mayor capacidad de compensar la pérdida de fotoasimilados, o la disminución de superficie foliar producida por la infección y ser tolerante a las plagas y enfermedades (Gunes *et al* 1998).

### **1.3.3. Nutrición del jitomate**

Los elementos esenciales se clasifican normalmente en macronutrientes (Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Azufre, Calcio, Magnesio, junto con el Hidrógeno, el Carbono y el Oxígeno) y micronutrientes (Cloro, Hierro, Manganeso, Zinc, Cobre, Níquel, Molibdeno), según su concentración relativa en los tejidos vegetales: superior a 0.1 % o inferior a 0.1 % respectivamente. Los términos macronutriente y micronutriente no tienen ninguna implicación cualitativa y algunos investigadores argumentan que esta clasificación es difícil de justificar en términos fisiológicos. Mengel y Kirkby (2001), propusieron que los elementos esenciales deberían clasificarse en función del papel bioquímico y fisiológico que éstos desempeñan en las plantas. El primer grupo incluye los elementos que forman compuestos orgánicos de la planta. Las plantas los asimilan mediante reacciones bioquímicas de oxidación y reducción. Los elementos del segundo grupo son importantes en las reacciones de transferencia de energía o en el mantenimiento de la integridad estructural. Se encuentran presentes en la planta como ésteres de fosfato, borato, y silicato en los que el elemento mineral se encuentra ligado

a un grupo hidroxilo de una molécula orgánica (por ejemplo, azúcar fosfato). Los elementos del tercer grupo se encuentran en la planta bien como iones libres o ligados a sustancias como las pectinas presentes en las paredes celulares. De particular relevancia es su participación como cofactores enzimáticos y en la regulación del potencial osmótico. Los compuestos del cuarto grupo desempeñan un importante papel en las reacciones de transferencia de electrones.

### **1.3.3.1. Nitrógeno**

El nitrógeno es un constituyente de muchos componentes de la célula, entre los que se incluyen los aminoácidos y los ácidos nucleicos y junto con el carbono, nutriente que las plantas requieren en cantidad mayor. En las zonas templadas, el nitrógeno del suelo suele ser el factor principal que limita el crecimiento de las plantas debido a las pérdidas por lixiviación y consumo microbiano. El nitrógeno elemental, que es la forma más abundante en la naturaleza, no puede ser asimilado directamente por las plantas, salvo unas pocas especies (principalmente leguminosas) que pueden establecer relaciones simbióticas con microorganismos fijadores de nitrógeno.

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos para hacer frente al bajo aporte de nitrógeno como son entre otros, sistemas de absorción muy selectivos y específicos y la posibilidad de crecer con diferentes fuentes de nitrógeno. Por tanto, la asimilación del nitrógeno en plantas es un proceso muy regulado y estrechamente coordinado con la asimilación del carbono para mantener un balance nutricional que permita un crecimiento óptimo de la planta. Entre las principales fuentes de nitrógeno se encuentran:

- Amonio, utilizado por varias especies arbóreas forestales, especialmente en suelos con pH bajo, y por algunos cultivos como el arroz, y nitrato que es la principal fuente de nitrógeno para la mayoría de las plantas y, en menor medida aminoácidos. Los aminoácidos también puede ser utilizados por

las plantas sobre todo en aquellas zonas donde la nitrificación y la mineralización está limitada por el clima (Stitt, 1996).

### **1.3.3.2. Fosforo**

A diferencia del nitrato, el fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) no se reduce incluso cuando se liga a compuestos orgánicos. El fosfato es un componente clave en multitud de procesos metabólicos como fotosíntesis, respiración, biosíntesis de macromoléculas, metabolismo energético, ruta de transducción de señal e interviene en la regulación de varias rutas metabólicas. Asimismo, el fósforo tiene un papel estructural importante en muchas biomoléculas y estructuras celulares como en el caso de los enlaces diéster presentes en los ácidos nucleicos y en los fosfolípidos. En consecuencia, las plantas no pueden crecer cuando no existe un aporte adecuado de este nutriente. Además de actuar como sustrato en muchas reacciones, el fosfato libre actúa como efector de algunas enzimas y regula de este modo muchos procesos metabólicos. Así, el fosfato induce la acción de la fosfofructoquinasa, determinando el flujo de azúcares por la secuencia glicolítica. En los cloroplastos, reduce la síntesis de almidón debido a la inhibición alostérica de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa. Como además el fosfato se intercambia en la membrana interna del cloroplasto por triosas fosfato, que es la forma en la que el  $\text{CO}_2$  fijado en la fotosíntesis se exporta al citosol, la incorporación de fosfato en el cloroplasto determina la distribución del carbono fijado entre el cloroplasto (almidón) y el citoplasma (sacarosa) (Schachtman *et al*, 1998).

### **1.3.3.3. Potasio**

El potasio es un componente imprescindible en todas las células. En las células vegetales es el catión más abundante en la vacuola y en el citoplasma, donde puede alcanzar concentraciones de 100 mM. El potasio desempeña un papel clave en el crecimiento y en el desarrollo celular, entre las funciones que regula se incluyen el mantenimiento de la presión de turgencia, los procesos de osmoregulación celular, la abertura y el cierre de los estomas, las nastias y tactismos, y el alargamiento celular.

Además, el potasio activa a más de 50 enzimas, como oxidoreductasas, deshidrogenasas, transferasas, sintetisas y quinasas. Existen numerosas evidencias experimentales que sugieren que el potasio es necesario para el cambio conformacional de la apoenzima. La activación no es específica, en muchos casos, para el potasio, y puede ser sustituido *in vitro* por otros cationes univalentes. Sin embargo, por las elevadas concentraciones necesarias para alcanzar la máxima activación, es improbable que el potasio pueda ser sustituido *in vivo* (Fernández y Maldonado, 2000).

#### **1.3.3.4. Calcio**

El calcio es esencial en muchos aspectos del crecimiento y del desarrollo en plantas; entra en la planta por la ruta apoplástica, sin embargo, a diferencia de otros nutrientes, su movilidad fisiológica es muy baja, como queda de manifiesto por el escaso o nulo movimiento de éste entre células y a través del floema. La concentración intracelular de calcio es muy baja, aunque la planta absorbe grandes cantidades de calcio y su presencia es similar a la que puede tener el fósforo o el azufre. La mayor parte del calcio se localiza en la pared celular, en los pectatos de la lámina media, y en las membranas e interviene en la estabilización de ambas estructuras. En el interior de la célula se encuentra en las vacuolas y, dado el pH ácido de las mismas, puede precipitar como sales de oxalato, carbonato, o sulfato, según las especies. También se acumula en el retículo endoplasmático, mitocondrias y el cloroplasto (Sanders *et al*, 1999).

El calcio estabiliza las membranas celulares, impidiendo la difusión de los componentes citoplásmicos y regulando la selectividad de la absorción iónica. Como resultado, la acumulación de iones por las células es estimulada por el calcio extraprotoplásmico, a pesar de que este ion a concentraciones más elevadas impide la absorción de otros cationes.

Una de las funciones más relevantes del calcio es la de formar parte de la cadena de señalización celular. La concentración de calcio libre citosólico es crucial para controlar muchas respuestas celulares. Una posible explicación del papel único que desempeña el calcio es que el metabolismo de todas las células requiere la presencia de ortofosfato (Pi) y de compuestos orgánicos fosforilados, sobre todo para las reacciones citosólicas relacionadas con el intercambio de energía libre (Sze *et al*, 2000).

#### **1.3.3.5. Magnesio**

El magnesio se absorbe como ion divalente,  $Mg^{2+}$ , y es un elemento muy móvil en la planta así como en el interior de las células. Aproximadamente, el 20 % del Mg total de las hojas se encuentra en los cloroplastos: entre un 10-20 % en las moléculas de clorofila y el resto en el espacio tilacoidal de forma iónica soluble. Al iluminarse el cloroplasto, el Mg pasa al estroma y activa a varias enzimas como la rubisco, la fosfoenol pirúvico carboxilasa y la glutamato sintasa. La asignación fotosintética del carbono y el nitrógeno depende, en gran medida, de la concentración de  $Mg^{2+}$  en el cloroplasto. El Mg Interviene además en el metabolismo energético de la planta al formar complejos con el ATP, ya que las ATPasas utilizan como sustrato los complejos Mg-ATP. Incluso la propia fosforilación del ATP a partir de ADP necesita  $Mg^{2+}$ . Esta propiedad de establecer uniones tanto iónicas como covalentes, lleva al  $Mg^{2+}$  a estar presente en procesos claves, como la unión y estabilización de las subunidades del ribosoma y, por tanto, en la biosíntesis proteica y en la síntesis del ADN y del ARN (Carvajal *et al*, 1999).

#### **1.3.4. Manejo de jitomate**

Esta hortaliza es una de las pocas que tiene dos tipos de crecimiento, determinado e indeterminado, el primer tipo es sembrado principalmente en sistemas a campo abierto donde las extensiones de siembra son grandes, algunos productores no le ponen soportes y lo dejan a ras de suelo, pero otros si optan por usar soportes para el tutoreo de las plantas. Los materiales de crecimiento indeterminado, son utilizados en sistemas

bajo invernadero aunque algunas variedades también pueden sembrarse a campo abierto, donde las plantas se llevan a uno o dos tallos. Conforme crece la planta va formando los racimos, a diferencia de las variedades determinadas donde el crecimiento es arbustivo. En las variedades de invernadero es más común que se realicen prácticas de poda (eliminación de los brotes laterales) que en las de campo abierto (Nuez 2001).

### 1.3.5. Enfermedades

Jones *et al.* (2009) reportan varias enfermedades del jitomate ocasionadas por bacterias, hongos, nematodos, virus, fitoplasmas y desordenes genéticos. Los problemas bacterianos del jitomate son: **cáncer cacteriano** *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*, **peca bacteriana** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young *et al.*, **mancha bacteriana** *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, **Pudrición del tallo y frutos** *Pectobacterium carotovora* (Jones) Bergey *et al.*, **marchites bacteriana** *Ralstonia solanacearum* (Smith) Smith., **necrosis de médula** *Pseudomonas corrugata* Roberts & Scarlett, **mancha de las hojas** *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall). Las enfermedades fungosas importantes de este cultivo son: **cáncer de tallos** *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl. f. sp. *lycopersici* Grogan *et al.* **antracnosis** *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S.J. Hughes *C. dematium* (Pers.) Grove, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. in Penz. (teleomorph: *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk) **moho negro** *Stemphylium botryosum* Wallr. (teleomorph: *Pleospora tarda* E. Simmons) *S. herbarum* E. Simmons (teleomorph: *Pleospora herbarum* (Pers.:Fr.) Rabenh. = *P. lycopersici* El. Marchal & Em. Marchal) *Ulocladium consortiale* (Thuem.) E. Simmons = *S. consortiale* (Thuem.) Groves & Skolko, **pudrición negra de la raíz** *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Broome) Ferraris (synanamorph: *Chalara elegans* Nag Raj & Kendrick), **marchites radicular** *Phytophthora capsici* Leonian *P. dreschleri* Tucker *P. nicotianae* Breda de Haan var. *Parasitica* (Dastur) G.M. Waterhouse = *P. parasitica* Dastur, **moho de la hoja** *Pseudocercospora fuligena* (Roldan) Deighton = *Cercospora fuligena* Roldan, **pudrición gris**

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich, **podrición de la raíz** *Pyrenochaeta lycopersici* R. Schneider & Gerlach, **podrición del tallo** *Didymella lycopersici* Kleb., **tizón temprano** *Alternaria solani* Sorauer, **fusarium de la corona** *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *radicis-lycopersici* W.R. Jarvis & Shoemaker, **marchitez por Fusarium** *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *Lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hans., **mancha gris** *Stemphylium botryosum* Wallr. f. sp. *lycopersici* Rotem et al. *S. lycopersici* (Enjoji) W. Yamamoto = *S. floridanum* Hannon & G.F. Weber *S. solani* G.F. Weber, **moho gris** *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), **tizón tardío** *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, **moho de la hoja** *Passalora fulva* = *Cladosporium fulvum* Cooke, **podrición por Phoma** *Phoma parasitica* Plowr., **cenicilla polvorienta** *Oidiopsis sicula* Scalia (teleomorph: *Leveillula taurica* (Lév.) G. Arnaud), **Ahogamiento y podrición de frutos** *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. *P. arrhenomanes* Drechs. *P. debaryanum* Auct. non R. Hesse *P. myriotylum* Drechs. *P. ultimum*, **Ahogamiento por Rhizoctonia** *Rhizoctonia solani* Kühn (teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk) **podrición por Rhizopus** *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., **mancha de la hoja por Septoria** *Septoria lycopersici* Speg., **podrición agria** *Geotrichum candidum* Link (teleomorph: *Galactomyces geotrichum* (E.E. Butler & L.J. Petersen) Redhead & Malloch) *G. penicillatum* (do Carmo Sousa) Arx, **marchitez sureña** *Sclerotium rolfsii* Sacc. (teleomorph: *Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough) **mancha por Corynespora** *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, **Marchites vascular** *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthier *V. dahliae* Kleb. **Moho blanco** *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary *S. minor* Jagger. De las enfermedades ocasionadas por nematodos destacan **nematodo agallador** *Meloidogyne* spp. y *Nacobbus aberrans*, *Belonolaimus longicaudatus* Rau, *Paratrichodorus* spp. *Trichodorus* spp. Las enfermedades provocadas por virus, viroides y fitoplasmas son: Tobacco mosaic virus, Curly top Curly virus, Potato virus Y, Pseudo curly top virus, Tomato bushy stunt virus, Tobacco etch virus, Tomato fern leaf, Cucumber mosaic virus, Tomato mosaic virus (ToMV), Aspermy tomato virus Tomato mottle gemini virus, Alfalfa mosaic virus, Tomato spotted wilt virus, Tomato yellow leaf curl virus, Tomato,

Tomato yellow top virus, Tomato bunchy top viroid, Tomato planto macho viroid, Aster yellows, Tomato big bud). Otras enfermedades y desordenes que afectan al cultivo son la **necrosis autógena**, **viruela de la fruta** Fruit pox factor genético, **mancha dorada** factor genético y **pared gris**.

De todos los patógenos el Cáncer Bacteriano (*C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) es una de las bacterias que tienen la capacidad de terminar con los cultivos por completo, por lo que en algunos países está considerada como una plaga de importancia cuarentenaria, en México está reportada como una plaga A2 (presente pero delimitada a algunas regiones) (EPPO, 2010). La bacteria se trasmite por semilla lo que hace fácil su dispersión.

#### **1.3.6. *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis***

El cáncer bacteriano ocasionado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, fue reportado por primera vez en USA en 1909, después en 1977 y en el año de 1992, en jitomate en los invernaderos de Grand Rapid en Minnesota. Actualmente, esta enfermedad se puede encontrar en todas las regiones donde se cultive esta hortaliza. La principal forma de diseminación de la bacteria es por medio de la semilla, posteriormente infecta en las primeras etapas de crecimiento de las plantas provocando marchitez y muerte temprana, en muchos de los caso los cultivares no alcanzan a llegar a la cosecha por los daños que ocasiona de manera epidémica en todo un invernadero y en campo abierto (Hausbeck *et al.* 2000).

### 1.3.6.1. 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 trabajo, poda y otras labores culturales. Cuando se presenta puede acabar con todas las plantas en parcelas o invernaderos en cuestión de semanas. Se encuentra distribuida prácticamente en todas las zonas donde se cultiva jitomate (Figura 1), (EPPO, 2010).

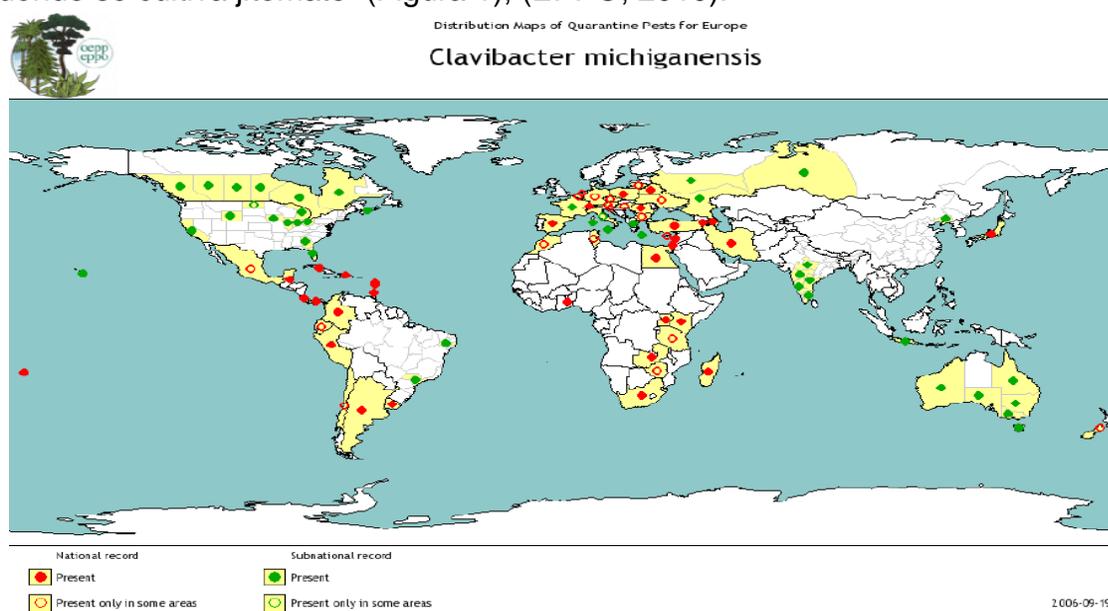


Figura 1. Distribución mundial de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.  
Fuente: EPPO, 2010.

### 1.3.6.2. Taxonomía

Bacteria

Actinobacteria

Actinomycetales

Microbacteriaceae

Clavibacter

*Clavibacter michiganensis*

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

(PQR, 2007)

### **1.3.6.3. Características**

Las células bacterianas tienen forma recta, ligeramente curvada o de varilla, miden 1.5 - 4 por 0.5 - 0.9 micrómetros. En ocasiones tienen segmentos irregulares o ligeramente manchados o granulados e hinchados. Las bacterias son generalmente inmóviles, pero algunas especies son móviles por medio de uno o dos flagelos polares. La bacteria es Gram positivas, sin crecimiento anaeróbico, con crecimiento aeróbico, forma colonias amarillas en medio de cultivo YDC, colonias mucoides cuando es cultivada a 30°C, ureasa negativa, oxidasa negativa, sin formación de esporas y sin crecimiento a 40°C (Agrios, 2005; Shaad *et al.* 2001).

### **1.3.6.4. Síntomas**

Los síntomas en jitomate inician por las hojas de la parte basal donde se observa un color amarillo que conforme avanza cambia a color café mostrando las quemaduras en los bordes de las hojas (Figura 2a) que se extienden a toda la hoja matando la planta por completo (Figura 2b). Las hojas se curvan hacia el envés quedando adheridas a la planta. En los tallos se observa una necrosis de color parda en los haces vasculares (Figura 2c), ocasionando taponamientos. En el fruto se observa una mancha oscura rodeada de un halo blanco, conocido como “ojo de pájaro” (Figura 2d).

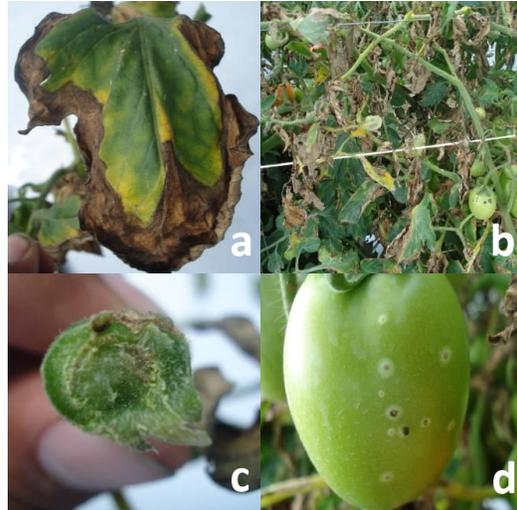


Figura 2. Síntomas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: a) Síntomas en hojas. b) Planta con síntomas avanzados. c) Corte transversal de una hoja mostrando los haces vasculares necrosados y d) fruto con el síntoma de ojo de pájaro.

#### 1.3.6.5. Ciclo de la enfermedad

La semilla de jitomate contaminada con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es la principal fuente de diseminación de la enfermedad. En cultivos establecidos, las labores culturales son la forma en la cual se contagia de planta a planta. Las plantas se muestran asintomáticas hasta los periodos de mayor estrés nutrimental como son la floración y el más crítico que es amarre y llenado de fruto, en este periodo es frecuente encontrar los primeros síntomas de la enfermedad que son: necrosis en los bordes de las hojas, que avanzan rápidamente hasta quemar la planta por completo. Cuando ya se tienen antecedentes de la presencia de cáncer bacteriano existe una alta posibilidad de que se repita presencia de la enfermedad en el siguiente ciclo, debido a que la bacteria sobrevive en los residuos de cosecha y puede sobrevivir en el suelo hasta por 2 años (Ramírez y Sainz, 2009) (Figura 3).

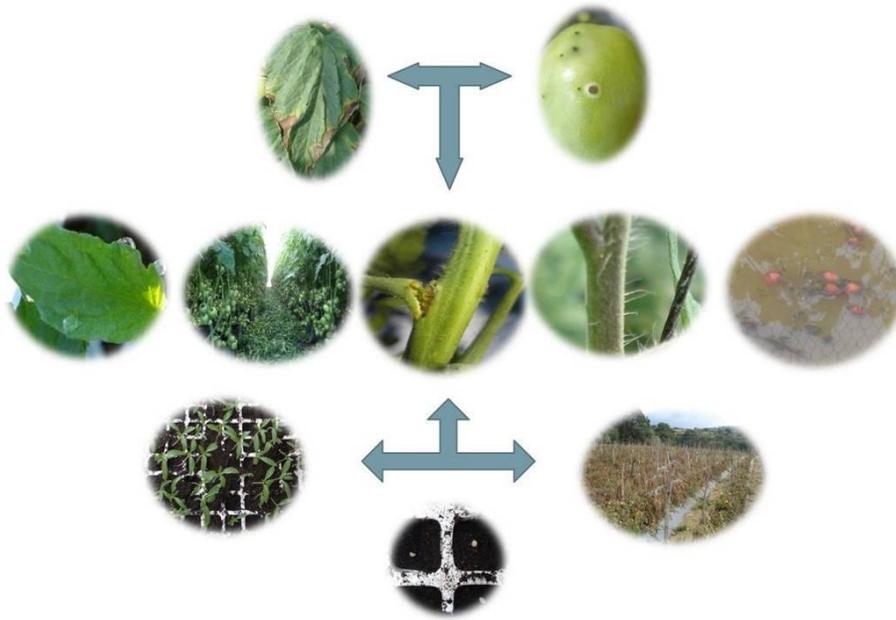


Figura 3. Ciclo del cáncer bacteriano. De abajo hacia arriba: diseminación por medio de semilla, plantas asintomáticas y presencia de síntomas al momento de la fructificación, formas de transmisión de la enfermedad y manifestación de síntomas en hoja y fruto.

#### 1.3.6.6. Manejo de la enfermedad

El manejo de la enfermedad se ha hecho principalmente con medidas preventivas como el tratamiento hidrotérmico de la semilla, eliminando residuos de cosecha, desinfestación de herramientas y con aplicaciones preventivas de cobres y productos antibióticos (Ramírez y Sainz, 2009). Los productos químicos utilizados para el manejo de esta bacteria solo eliminan las bacterias que se encuentran en la superficie para reducir el riesgo de infección y diseminación. Los productos cúpricos, tienen buen efecto bactericida pero no tienen la capacidad de penetrar a la planta para eliminar la bacteria y eliminar la infección, por lo que solo se recomiendan como preventivos o como selladores de heridas cuando se realizan podas o cuando cae granizo. Los antibióticos en jitomate están restringidos y solo la Kasugamicina tiene registro en este cultivo para el manejo de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* una bacteria Gram

negativa (PLM, 2009). Se han hecho pruebas *in vitro* con otros ingredientes activos como Estreptomicina, Gentamicina y Oxitetraciclina, de los cuales se ha observado efecto mínimo de control sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con los dos primeros antibióticos.

### **1.3.7. Inductores de resistencia**

#### **1.3.7.1. Tipos de inductores**

Investigaciones por cerca de 100 años han demostrado que las plantas pueden ser precondicionadas contra enfermedades. Inicialmente las investigaciones se referían a la inmunidad fisiológica que adquirirían. Tomó otros 60 años antes que los resultados del experimento de Ross fueran publicados. Ross, utilizó el Virus Mosaico del Tabaco, para sensibilizar el tabaco. Las inoculaciones las realizó cerca y lejos de hojas después inoculada con otros patógenos para definir el concepto de “resistencia localizada adquirida” y “resistencia sistémica adquirida (SAR)”. Estos estudios permitieron desarrollar el modelo clásico de SAR durante 1980’s en otras plantas tales como pepino (*Cucumis sativus* L.), frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) y *Arabidopsis thaliana*, demostrando que SAR se conservó a través de diversas familias de plantas y fue efectiva contra un amplio rango de virus, bacterias y hongos fitopatógenos (Sticher *et al.*, 1997).

El interés en el control biológico de enfermedades del suelo, permitió el descubrimiento de otra forma de inducir resistencia asociada con la colonización de las raíces de las plantas por rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR por sus siglas en inglés), refiriéndose a la “resistencia sistémica inducida” (ISR por sus siglas en inglés) ., ISR es distinta de SAR en varias rutas fisiológicas y bioquímicas. Los fenotipos que son bien definidos en *A. thaliana*. Resultados de laboratorio y de campo

mostraron que al igual que la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), la Resistencia Sistémica Inducida (ISR) es efectiva contra un amplio rango de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos (Murphy *et al.*, 2000).

El uso del SAR o ISR para controlar enfermedades en la agricultura convencional parece ser prometedor. Desde la síntesis de elicitores y cepas de PGPR, este tipo de estrategias en general no exhiben ninguna actividad directa antimicrobial, a diferencia de los plaguicidas tradicionales, los inductores de resistencia proveen una forma de controlar enfermedades sin acertar directamente en una presión selectiva sobre la población del patógeno. El uso de elicitores sintéticos y cepas de PGPR parece ser una alternativa benéfica al medio ambiente a diferencia de lo que ocurre con los plaguicidas de uso común. Esta característica hace que SAR y ISR y otras formas de inducir resistencia, son un distinto enfoque para el manejo de enfermedades en una sostenible manera dentro del alcance de un sistema de agricultura convencional (Vallad and Goodman, 2004).

#### **1.3.7.2. Tipos de resistencia**

La resistencia sistémica es un “estado fisiológico de mejora en la capacidad defensiva de la planta” elicitado por un específico estímulo medioambiental, mediante el cual las defensas innatas de las plantas son potenciadas contra cualquier cambio biótico (Van Loon *et al.*, 1998). Este estado de resistencia es efectivo contra un rango amplio de patógenos y parásitos, incluyendo hongos, bacterias, virus, nematodos, plantas parasitas y algunos insectos herbívoros (Benhamou and Nicole, 1999). Las dos formas más claras que definen la inducción de resistencia son la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y la Resistencia Sistémica Inducida (ISR), las cuales pueden ser diferenciadas en la base de la naturaleza de los elicitores y en la regulación de las rutas envueltas (Knoester *et al.*, 1999) (Figura 4). La forma clásica de SAR puede ser disparada por la exposición de las plantas a patógenos virulentos, avirulentos y no patogénicos o artificialmente con químicos tales como el ácido salicílico, ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA) o benzo (1,2,3) thiazole-7-carbothioic ácido S-methyl

ester (BTH) (Sticher *et al.*, 1997). Dependiendo de la planta y del elicitador, un periodo de tiempo es requerido para el establecimiento de la resistencia que corresponde al tiempo requerido para la coordinada acumulación de proteínas relacionadas con la patogenicidad (y transcripciones) y ácido salicílico a través de la planta (Cameron *et al.*, 1994). Cualquier disrupción en la habilidad de las plantas para acumular ácido salicílico resulta en la pérdida de la expresión de genes relacionados con la patogenicidad y atenuación de la respuesta (Gaffney *et al.*, 1994).

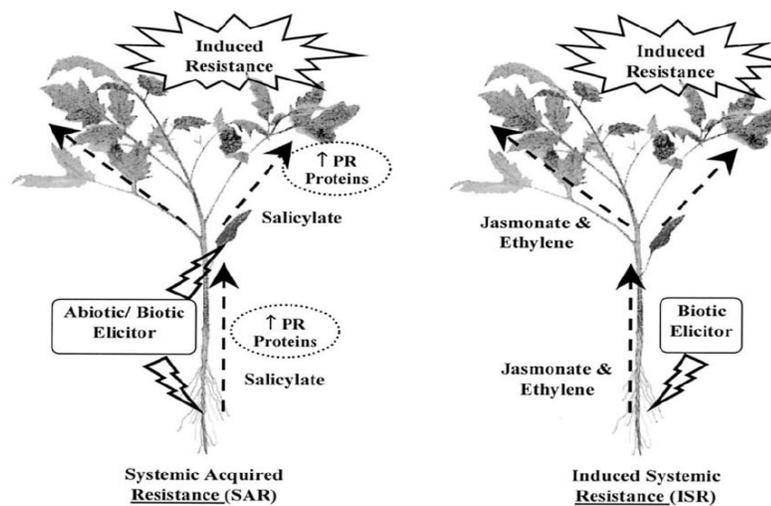


Figura 4. Rutas de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y Resistencia Sistémica Inducida (ISR) diferenciadas en la base de la naturaleza de los elicitores y en la regulación de las rutas envueltas (Tomado de Vallad y Goodman, 2004).

La Resistencia Sistémica Inducida es elicitada por algunas cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR por sus siglas en inglés) de las cuales sobresalen especies del género *Pseudomonas*. ISR no involucra la acumulación de proteínas relacionadas con la patogenicidad o ácido salicílico (Pieterse *et al.*, 1996). ISR se basa en rutas reguladas por jasmonato y etileno (Knoester *et al.*, 1999) según la información derivada de unos pocos estudios. Otro ejemplo de ISR está ligado a la producción de sideroforos o ácido salicílico por cepas de PGPR (De Meyer and Höfte, 1997). Ni la naturaleza del agente elicitador ni el sitio de acción de este en las plantas es tan crítica en la clasificación de fenómenos de resistencia inducida como las respuestas bioquímicas incitadas dentro de la planta. ISR es efectivo contra un amplio rango de

patógenos, considerando que se ha demostrado especificidad en la habilidad de cepas de PGPR para inducir ISR en ciertas especies de plantas y genotipos (Van Wees *et al.*, 1997).

Existe un gran número de bacterias que se han descubierto como posibles agentes de control. Las Enterobacteriaceas, habitantes de la rizosfera, generan condiciones ácidas, inducen mecanismos de defensa en la planta y sintetizan compuestos antimicrobiales. Dentro de este grupo, destaca *Bacillus* como productor de antibióticos con características antifúngicas, además de que el género *Bacillus* está considerado como promotor del crecimiento con potencial para incrementar el rendimiento en las plantas. Varias especies han sido objeto de investigación para su implementación como agentes de control biológico debido a sus características de alta capacidad de colonización de la raíz y de supervivencia que le confieren las esporas. Actualmente *Bacillus subtilis* se distribuye comercialmente como agente de control de hongos fitopatógenos. (Kloepper *et al.*, 1992; Van Veen *et al.*, 1997).

De las especies de *Bacillus*, *B. subtilis* ha sido ampliamente investigada debido a su alta capacidad de inhibición de fitopatógenos. Investigaciones conducidas por el grupo del Dr. Paul Backman sobre el tratamiento bacteriano de semillas de cacahuate, fueron fundamentales en el desarrollo del primer producto a base de una bacteria supresora de enfermedades en los E.U. El producto contiene a *B. subtilis* y fue registrado en 1988 por Gustafson Inc., como “Quantum 400” y “Kodiak”. Las bacterias colonizan el sistema radicular de la semilla recién emergida, compitiendo con los microorganismos, principalmente hongos fitopatógenos que atacan a las raíces. Conforme la raíz se desarrolla y madura, el bacilo se distribuye con ésta (Lara, 2000)..

En 1990 había más de 4 millones de hectáreas de algodón tratadas con este producto. Actualmente existen otros productos comerciales a base de esta especie que son utilizados en el control de bacterias y hongos en los cultivos de papa, maíz, algunas legumbres y plantas de ornato (Lara, 2000). También se ha sugerido que el tratamiento con *B. subtilis* tiene un efecto en los mecanismos de resistencia de la plántula, ya que

en semillas de chícharo infectadas con *Fusarium udum* y tratadas con la bacterias se incrementó la cantidad de PAL (fenil alanina amonio liasa) y la actividad de la peroxidasa (Podile y Laxmi, 1998).

El fenómeno en el cual las plantas pueden activar sus mecanismos de protección contra patógenos que llegan a los cultivos o que los invaden, se le conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR). Recientemente algunos productos llamados “activadores de plantas” que inducen SAR en plantas han sido identificados; uno de estos compuestos es el acibenzolar-S-methyl (Actigar 50 WG, Syngenta) el cual ha mostrado actividad contra algunas enfermedades bacterianas como *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y el tizón del fuego de manzano causado por *Erwinia amylovora*, también se reporta que reduce la incidencia de la marchitez bacteriana en cultivares susceptibles de tomate (Pradhanang *et al.* 2005).

Una amplia evidencia soporta la efectividad de acibenzolar-S-methyl en contra de una gran variedad de hongos, bacterias y virus de solanáceas en experimentos realizados en condiciones de campo (Abbasi *et al.*, 2002). La actividad elicitora del acibenzolar-S-methyl fue efectivo contra enfermedades foliares ocasionadas por bacterias. En una serie de experimentos de campo en el este de los Estados Unidos, el acibenzolar-S-methyl aplicado a una dosis de 35 g i.a/ha cada 7 a 10 días redujo la severidad de la mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) y la peca bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) en el follaje y los frutos de jitomate (*Solanum lycopersicon*). El acibenzoalr-S-methyl fue efectivo especialmente para en el control de epidemias de la peca y mancha bacteriana cuando predominan cepas resistentes al cobre. Se observó que incrementa la expresión de los niveles de genes relacionados con la patogenicidad, P4 (equivalente al PR-1 del tabaco y *A. thaliana*) extendiendo los resultados que se realizaron en el laboratorio al campo. (Thaler *et al.*, 1999).

### **1.3.8. Potencial**

El cáncer bacteriano es una enfermedad que al ser transmitida por la semilla no se puede detectar en las etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad, al no mostrar síntomas al inicio del crecimiento, sino cuando inicia la fructificación. En esta etapa del crecimiento la bacteria ya se ha establecido dentro de la planta y es difícil erradicarla. Lo anterior hace necesario buscar estrategias que ayuden a prevenir el ataque de esta bacteria en las primeras etapas de crecimiento del jitomate, o antes de la infección, situación que puede ser cubierta por la inducción de resistencia, ya sea con cepas de Rhizobacterias Promotoras de Crecimiento de las Plantas que induzcan Resistencia Sistémica Inducida, o con elicitores químicos como el acibenzolar-S-methyl aplicados durante el periodo de plántula para lograr que induzcan resistencia a temprana edad y evitar que la bacteria penetre a las plantas o retrasar la colonización en el interior de estas logrando que los tejidos se mantengan sanos sin alterar ninguna función metabólica o bioquímica en la planta.

#### 1.4. Literatura consultada

- Abbasi, P.A., J. Al-Dahmani, F. Sahin, H.A.J. Hoitink, and S. A. Miller. 2002. Effect of compost amendment on diseases severity and yield of tomato in conventional and organic production system. *Plant Dis.* 86:156-161.
- Agrios G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5a Ed. Academic Press.USA. 922 p.
- Benhaumou, N., and M. Nicole. 1999. Cell biology of plant immunization against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol. Biochem.* 37:703-719.
- Carvajal, Micaela, Martínez, Vicente and Cerdá, Antonio(1999). Influence of magnesium and salinity on tomato plants grown in hydroponic culture. *Journal of Plant Nutrition*,22:1,177 — 190 .
- Cameron, R. K., R.A. Dixon, and C.J. Lamb. 1994. Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 5:715-725.
- Castellanos, Z. J. 2004. Manual de producción hortícola en invernadero. INTAGRI. 2ª Edición. 429p.
- De Meyer, G. and M. Höfte. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology* 87:588-593.
- EPPO, 2010. Data sheets on quarantines Pest. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO A2 List. No. 50
- FAOSTAT data. 2008. En Línea en <http://www.fao.org>
- Fernández J., A. Maldonado J.,M. 2000. Absorción y transporte de nutrientes minerales. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. J Azcón-Bieto y M. Talón (eds.). McGraw-Hill Interamericana, pp. 99-112,

- Gaffney, T., L. Friedrich, B. Vernooij, D. Negrotto, G. Nye, S. Uknes, E. Ward, H. Kessmann, and J. Ryals. 1994. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Gunes, A., Alpaslan, M. Inal, A. 1998. Critical nutrient concentrations and antagonistic and synergistic relationships among the nutrients of NFT-grown young tomato plants, *Journal of Plant Nutrition*, 21:10,2035 — 2047.
- Huber, D. M., and Graham, R. D. 1999. The role of nutrition in crop resistance and tolerance to diseases. *In: Mineral nutrition of crops: Fundamental mechanisms and implications*. Z. Regel (ed). Food Products Press, New York pp: 169 – 204.
- Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina, M. C., Podolsky, R. and Fulbright, D. W. 2000. Effect of bactericides on population size and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology* 90(1): 38-44
- J. P. Jones, J. B. Jones, R. E. Stall, and T. A. Zitter. 2009. <http://apsnet.org/online/common/names/tomato.asp> [en linea] Fecha de consulta 21 de Enero de 2009.
- Kloepper, J. W., Rodríguez-Kabana, K. R., Mc Inroy, J. A. and Young, R. W. 1992. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: identificación by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant and Soil* 139:75-84.
- Knoester, M., C.M.J. Pieterse, J.F. Bol, and L.C. van Loon. 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signalin at the site of application. *Mol. Plant-Microb. Interac.* 12:720-727.
- Lara R. J. 2000. Marcaje por recombinación ilegítima con un plásmido integrativo de cepas de *Bacillus subtilis* nativas de la rizosfera y detección por PCR en suelo. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-Irapuato, Gto.

- Mengel K, Kirkby E. A. 2001. Principles of Plant Nutrition. 5<sup>th</sup> ed. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands 478 p.
- Murphy, J.F., G.W. Zehnder, D.J. Schuster, E.J. Sikora, J.E. Polston, and J.W. Kloepper. 2000. Plant growth-promoting rhizobacteria mediated protection in tomato against *Tomato mottle virus*. Plant Dis. 84:779-784.
- Nuez, F. 2001. El cultivo del tomate. Editorial Mundi-Prensa. Barcelona, España. 793 p.
- Piesterse, C.M.J., S.C.M. van Wees, E. Hoffland, J.A. van Pelt, and L.C. van Loon. 1996. Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. Plant Cell 8:1225-1237.
- PLM. 2009. Diccionario de especialidades agroquímicas. 19<sup>th</sup> ed. Thomson. Distrito Federal. México.
- Podile, A. R. and Laxmi, V. D. V. 1998. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonia lyase and reduce the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. Journal of Phytopathology 146:255-259.
- PQR, 2007. EPPO plant quarantine information retrieval system Version 4.6.
- Pradhanang, P. M., Ji, M., Momol, M. T., Olson, S. M., Mayfield, J. L. and Jones, J. B. 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum*.
- Ramírez, V. J., Sainz, R. R. A. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1<sup>a</sup> Ed. Once Ríos Editores. Culiacán Sinaloa, México 360 p.
- Ross, A.F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. Virology 14:340–358.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant Physiol, 116:447-453

- Shaad, N.W., Jones, J. B. and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria. 3th ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA.
- SIAP, 2008. [http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar\\_comdeagr.html](http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_comdeagr.html) [en linea] Fecha de consulta 23 de marzo de 2009.
- Sticher, L., B. Mauch-Mani, and J. P. Metraux. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35:235-270.
- Stitt M.1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol*, 2:178-186.
- Sze, H, Liang, F. Hwang I. 2000. Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup> pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51:433-462
- The PLANTS Database (versión 5.1.1); (National Plant Data Center, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA 70874-4490 USA. <http://plants.usda.gov>)
- Thaler, J.S., A.L. Findantsef, S.S. Duffey, and R.M. Bostock. 1999. Trade-offs in plant defence against pathogens and herbivores: A field demonstration of chemicals elicitor of induced resistance. *J. Chem. Ecol.* 25:1597-1609.
- Van Veen, J. A., Van Oberbeek, L.S. and Van Elsas, J. D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Review* 61:121-135.
- Van Loon, L.C., P. A. H. M. Bakker, and C.M.J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.
- Van Wees, S.C.M., C.M.J. Pieterse, A. Trijssenaar, Y.A.M. van't Westende, F. Hartog, and L.C. van Loon. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant-Microb. Interac.* 6:716-724.

Vallad G. E. and Goodman R. M. 2004. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science Society of America* 44:1920–1934

## CAPITULO II

### 2.1. Alternativas para el manejo de *Clavibacter michiganensis* susp. *michiganensis*

#### 2.1.1. Introducción

Las plantas poseen un amplio rango de defensas que puede ser activado en respuesta de patógenos o parásitos. El tiempo de respuesta de esta defensa es crítico y puede ser la diferencia entre ser capaz de hacer frente o sucumbir a los retos de un patógeno o parásito. Los mecanismos de defensa pueden ser activados mediante compuestos sintéticos (SAR) o microorganismos inoculados en las raíces (ISR)

Existen algunos productos llamados “activadores de plantas” que inducen SAR en plantas. Uno de estos compuestos es el acibenzolar-S-methyl (Actigar 50 WG, Syngenta) el cual ha mostrado actividad contra algunas enfermedades bacterianas en jitomate y el tizón del fuego del manzano (Abbasi et al., 2002). En jitomate, acibenzolar-S-methyl aplicado a una dosis de 35 g i.a/ha cada 7 a 10 días fue efectivo al reducir la severidad la mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) y peca bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) en el follaje y frutos de jitomate (*Solanum lycopersicon*). Efectivo especialmente para controlar epidemias de la peca y mancha bacteriana cuando predominan cepas resistentes al cobre además incrementa la expresión de los niveles de genes relacionados con la patogenicidad como el P4 (equivalente al PR-1 del tabaco y *A. thaliana*) (Thaler et al., 1999). También, hay evidencia de que la aplicación de acibenzolar-S-methyl reduce la incidencia de la marchitez bacteriana en cultivares susceptibles de tomate (Pradhanang et al. 2005).

*B. subtilis* ha sido ampliamente investigado debido a su alta capacidad de inhibición de fitopatógenos (ISR). Investigaciones conducidas por el grupo del Dr. Paul Backman sobre el tratamiento bacteriano de semillas de cacahuate, fueron fundamentales en el desarrollo del primer producto a base de una bacteria supresora de enfermedades en

los E.U. El producto que contiene a *B. subtilis*, fue registrado en 1988 por Gustafson Inc., como “Quantum 400” y “Kodiak”. Las bacterias colonizan el sistema radicular de la semilla recién emergida, compitiendo con los microorganismos, principalmente hongos fitopatógenos que atacan a las raíces. Conforme la raíz se desarrolla y madura, el bacilo se distribuye con ésta. En 1990 había más de 4 millones de hectáreas de algodón tratadas con este producto. Actualmente existen otros productos comerciales a base de esta especie que son utilizados en el control de bacterias y hongos en los cultivos de papa, maíz, legumbres y plantas de ornato (Lara, 2000). El tratamiento con *B. subtilis* en plántulas de chícharo incrementó la cantidad de PAL (fenil alanina amonio liasa) y la actividad de la peroxidasa (Podile y Laxmi, 1998).

El cáncer bacteriano se ha convertido en un problema serio en las regiones donde se cultiva jitomate debido a que merma la producción y la calidad de los frutos además de que acorta los ciclos de cultivo al devastar los cultivos cuando encuentra las condiciones favorables. En promedio puede ocasionar pérdidas que van desde el 80 al 100%, pero en invernaderos puede acabar con el cultivo en cuestión de días. En campo abierto las condiciones son distintas pero cuando se encuentran con los factores que la favorecen puede terminar con parcelas en cuestión de semanas (EPPO, 2010).

Debido a su importancia se han buscado diferentes métodos para su control, desde los preventivos hasta los curativos. El uso de antibióticos no han mostrado buena eficiencia en el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y solo han ayudado a prevenir o retardar el periodo de aparición de los síntomas. Además la aplicación de antibióticos en jitomate se encuentra restringida y los productos no pueden ser exportados. Otras medidas de control incluyen la desinfección de la semilla. Actualmente se requieren medidas de control que sean compatibles con el ambiente y que permitan obtener productos inocuos. En el presente trabajo se plantea hacer tratamientos preventivo para activar los mecanismos de resistencia de la planta con la finalidad de reducir los daños ocasionados por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con los siguientes objetivos:

- ❖ Evaluar el efecto de la resistencia sistémica inducida y adquirida como estrategia para el control de *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*.
- ❖ Evaluar la nutrición de la planta y relacionarla con el ciclo del cultivo y la enfermedad.

### **2.1.2. Hipótesis**

- ❖ La resistencia sistémica inducida por Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas y la resistencia sistémica adquirida (por productos sintéticos) reduce la concentración de *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*.
- ❖ La variación de la concentración de nutrimentos durante el ciclo de la planta está relacionada con la expresión de síntomas de la bacteria en jitomate.

### **2.1.3. Materiales y métodos**

Se utilizaron plantas de jitomate un mes de edad de la variedad Dundee, que fueron proporcionadas por la empresa de invernaderos San José y su Agricultura S.A. de C.V. las cuales llegaron en contenedores de lana de roca de 10 x 10 cm. Las plántulas fueron regadas por una semana con agua purificada. Posteriormente se pasaron a contenedores de unicel de 1 litro de capacidad con sustrato esteril Peat-most (Turba negra) donde se colocó una planta por contenedor. En el cuadro 1 se muestra los tratamientos aplicados, las dosis utilizadas comercialmente y la forma de aplicación. En el cuadro 2 se indican los ingredientes activos de cada producto utilizado, la compañía que lo produce y el país de origen.

Cuadro 1. Tratamientos para el manejo de *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*.

Tratamiento	Producto	Dosis	Modo de aplicación
1	<i>Bacillus</i> 1	5ml/L	Raíz
2	<i>Bacillus</i> 2	5ml/L	Raíz
3	<i>Bacillus</i> 3	5ml/L	Raíz
4	<i>Bacillus</i> 1 x <i>Bacillus</i> 2	5ml/L + 5ml/L	Raíz
5	<i>Bacillus</i> 1 x <i>Bacillus</i> 3	5ml/L + 5ml/L	Raíz
6	<i>Bacillus</i> 2 x <i>Bacillus</i> 3	5ml/L + 5ml/L	Raíz
7	<i>Bacillus</i> 1 x <i>Bacillus</i> 2 x <i>Bacillus</i> 3	5ml/L + 5ml/L + 5ml/L	Raíz
8	Biobacter	325ml/ha	Raíz
9	Best ultra R	2ml/L	Raíz
10	Best ultra F	1ml/L	Follaje
11	Oxidate	1ml/L	Follaje
12	Bela Plus	500ml/100L	Follaje
13	Activar	56mg/L	Follaje
14	Control no inoculado	250 ml Agua destilada	Follaje
15	Control inoculado	1 x 10 <sup>8</sup> UFC de <i>Cmsubsp</i>	Follaje Follaje

Cuadro 2. Ingrediente activo de los productos aplicados

Productos a utilizar	Compañía	País
<b>Bacillus Cepa 1 (C1)</b> Bacillus subtilis	CINVESTAV	México
<b>Bacillus Cepa 2 (C2)</b> Bacillus subtilis	CINVESTAV	México
<b>Bacillus Cepa 3 (C3)</b> Bacillus subtilis	CINVESTAV	México
<b>Biobacter</b> Aceite de lípidos graveoles 5.00%, extracto de semillas de Citrus paradisiaca 1.00%, extracto de <i>Equinacea angustifolia</i> 5.00%, extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> 30.00%, Salicilato de Potasio, Ácidos Grasos Omega 3, Chitosan hidrolizado, Sorbato de potasio.	Green Corp.	México
<b>Best Ultra R</b> Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> ( $1 \times 10^8$ UFC/ml) 30.00% Metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. Chitosan hidrolizado.	Green Corp.	México
<b>Best Ultra F</b> <i>Bacillus subtilis</i> ( $1 \times 10^8$ UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liqueniforme</i> ( $1 \times 10^5$ UFC/ml) 10.00%, Lactobacilo ( $1 \times 10^5$ UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp.	Green Corp.	México

(1x10<sup>5</sup>UFC/ml) 10.00%, *Azotobacter* spp. (1x10<sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%

**Oxidate**

Dióxido Hidrogeno 270 g.i.a.L<sup>-1</sup> Dupocsa Ecuador

**Bela Plus**

Extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*) 231 g.i.a.L<sup>-1</sup> Intrakam México

**Actigar**

(azibensolar-S-metyl) Syngenta Holanda

Cuadro 3. Formula de fertilización utilizada a nivel comercial en invernaderos de alta tecnología.

Fertilizante	Cantidad	Cantidad de agua
Ácido fosfórico	100 ml	Para 1000 Litros de agua.
Sulfato de potasio	1000 g	
Sulfato de magnesio	1230 g	
Nitrato de potasio	750 g	
Nitrato de calcio	2600 g	
Sulfato ferroso	50 g	
Sulfato de manganeso	5 g	
Sulfato de zinc	2 g	
Sulfato de cobre	2 g	
Bórax	10 g	

De plantas de jitomate del estado de Morelos que presentaban los síntomas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se aisló la bacteria en medio selectivo YDC (Extracto de levadura dextrosa CaCO<sub>3</sub> (Cuadro 4).

Cuadro 4. Medio de cultivo utilizado para el aislamiento, purificación e incremento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Reactivo	Cantidad para 1 Litro.
Extracto de levadura	10.0 g
Dextrosa (Glucosa)	20.0 g
Carbonato de calcio	20.0 g
Agar	15.0 g

Las colonias amarillo pálido fueron purificadas por la técnica de estría cruzada en cajas Petri que contenían mas medio de cultivo. Colonias puras fueron utilizadas para la identificación. Dos pruebas clave fueron utilizadas para la identificación: la tinción de Gram y una prueba serológica utilizando inmunotiras. Las colonias que fueron positivas a estas dos pruebas se fueron identificadas bioquímicamente (Schaad, *et al.* 2001). La cepa identificada fue conservada mediante re-siembras a intervalos semanales.

#### **2.1.4. Inoculación**

La cepa purificada e identificada fue incrementada (durante 24 horas a temperatura ambiente) en medio de cultivo YDC. Las colonias obtenidas en cajas Petri fueron suspendidas en agua esterilizada. La concentración deseada (  $1.2 \times 10^7$  a  $2.6 \times 10^8$  ufc/ml) se midió mediante el método de refractancia a 590nm en un espectrofotómetro (Pradhanang, 2005) diluyendo con agua destilada esterilizada la concentración inicial. La suspensión se dejó reposar por media hora, para posteriormente inocularla, esta actividad se realizó con la ayuda de atomizadores con capacidad para 250ml (Figura 1). Se utilizó una aguja de disección recta flameada para provocar una herida en el tallo a la altura de la 3 hoja e inmediatamente después se asperjó 5 veces el inóculo procurando que la herida fuera cubierta con la aspersion. La inoculación se realizó por

la tarde cuando la temperatura del ambiente ya había disminuido, al término de la inoculación se regó el piso para incrementar la humedad relativa y se cerró el invernadero para que durante la noche existieran condiciones favorables para la penetración e infección de la bacteria. Los testigos fueron inoculados solo con agua destilada esterilizada.



Figura 1. Inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mediante punción a la altura de la tercera hoja verdadera y aspersion de una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  ufc/ml.

### **2.1.5. Variables evaluadas**

Las variables evaluadas en este primer experimento fueron: altura (semanalmente con regla de un metro de longitud, tomada de la base del tallo hacia la hoja mas joven), concentración de nutrientes en la planta (ion amonio  $\text{NH}_4$  y ion potasio K), peso fresco de la planta (al final del experimento, Figura 2), peso seco (las plantas fueron secadas en el invernadero por 20 días). En el nivel de la enfermedad se evaluó indirectamente al cuantificar el número de colonias en el tejido vegetal bajo los diferentes tratamientos. Para ello, se tomaron fragmentos de tallo de la planta a la altura en donde se inoculo de un tamaño de 3 centímetros de longitud, se colocaron en agua destilada esterilizada y se maceraron con la ayuda de un mortero para después tomar 100 microlitros y

sembrarlos en medio de cultivo YDC. El número de colonias fue cuantificado 48 horas después de incubación a temperatura ambiente. Además se verifico que la causa de la marchitez no fuera algún hongo de la raíz. El color amarillo y Gram positivas fueron características útiles para el caso de *Clavibacter*.



Figura 2. Plantas de jitomate recién cortadas al final del experimento para la evaluación del peso fresco.

La cantidad de nutrientes se evaluaron con un electrodo para ion específico (Figura 3) previamente calibrado de acuerdo a las especificaciones del productor (Mettler, Toledo, USA). Se colecto la hoja más madura de la planta que fueron pesadas. Las hojas fueron colocadas en una bolsa de polietileno con agua destilada (5 veces el peso). Después de macerar el tejido con el mortero, se colocaron los electrodos dentro de la suspensión para cuantificar el amonio y potasio en partes por millón. Después de cada muestra, los electrodos se lavan con agua destilada.

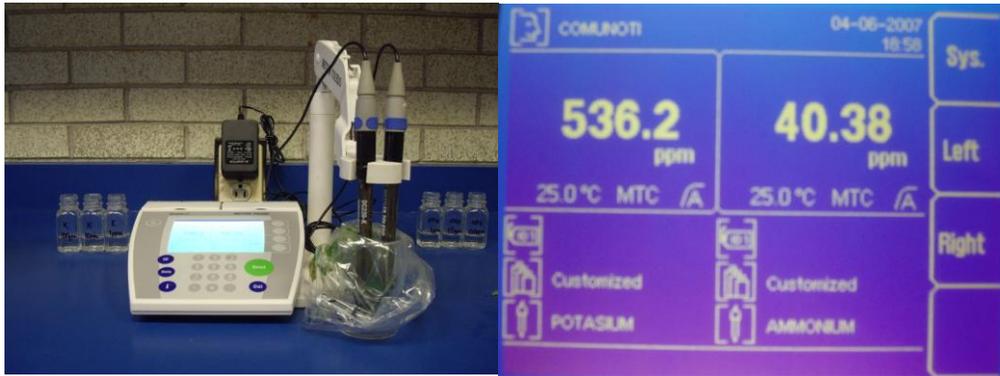


Figura 3. Ionómetro con electrodos para la evaluación de amonio y potasio en la suspensión de tejido macerado de las plantas de jitomate durante el experimento.

### 2.1.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Para el ordenamiento de los tratamientos se utilizó un diseño experimental factorial y el análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SAS (ver. 8.0). La comparación de medias se realizó mediante la prueba LSD con un nivel de significancia de 0.05.

### 2.1.7. Resultados

La primera toma de datos de altura de las plantas fue el 16 de Marzo de 2007 cuando la planta ya 4 hojas verdaderas. En la primera lectura, las plantas tratadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1 (C1) y la cepa 2 (C2) presentaron la mayor altura (50.63 cm), seguidas por el control inoculado (49.72 cm), y *Bacillus subtilis* (C2 49.03). Siete días después (23 de Marzo de 2007), se observó que el crecimiento fue uniforme (sin diferencias estadísticas) oscilando entre 54 a 58 centímetros. Durante la tercera evaluación (30 de Marzo de 2007), las plantas tratadas con dióxido de hidrógeno (Oxidate) tenían la mayor altura (77,39 cm) seguido de *Bacillus subtilis* cepa 1 y 2 (75.91cm). En la cuarta evaluación (06 de Abril de 2007), el dióxido de hidrógeno mantuvo las plantas con mayor altura (96.23cm), Biobacter (94.62). En la quinta evaluación (13 de Abril de 2007), las plantas tratadas con Biobacter presentaron la

mayor altura (103.53 cm), seguidas de las tratadas con dióxido de hidrógeno (103.09cm). En la sexta y última evaluación (4 de Mayo de 2007) las plantas tratadas con Biobacter tenían la mayor altura (121.0 cm), seguidas de las tratadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1 y 3 (118.27 cm) y Best Ultra F con 96.71 centímetros (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de los tratamientos en la altura (cm) de plantas de jitomate a partir de la primera semana después de la aplicación (dda).

Tratamiento	1 semana dda	2 semana dda	3 semana dda	4 semana dda	5 semana dda	6 semana dda
Aceite de lípidos graveoles 5.00%, Extracto de semillas de <i>Citrus paradisiaca</i> 1.00%, Extracto de <i>Equinacea angustifolia</i> 5.00%, Extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> 30.00%, Salicilato de Potasio, Ácidos Grasos Omega 3, Chitosan hidrolizado, Sorbato de potasio (Biobacter).	46.77 ab	57.2 a	75.91 ab	94.62 ab	103.53 a	121.00 a
Acibensolar-S-metyl (ctigar)	49.01 ab	57.84 a	75.83 ab	93.83 ab	101.12 ab	111.45 abc
<i>Bacillus subtilis</i> (1x108 UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liquiforme</i> (1x105 UFC/ml) 10.00%, Lactobacilo (1x105 UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp. (1x105UFC/ml) 10.00%, <i>Azotobacter</i> spp. (1x105 UFC/ml) 10.00%. (Best Ultra F)	47.95 ab	57.18 a	72.97 ab	88.77 ab	95.74 bc	96.71 c
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1)	47.97 ab	56.29 a	72.65 ab	89.02 ab	99.19 abc	116.07 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	44.24 b	54.86 a	75.91 ab	91.96 ab	97.54 abc	110.86 abc
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	46.99 ab	55.74 a	74.63 ab	93.53 ab	101.66 ab	110.46 abc
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	50.63 a	58.97 a	73.41 ab	92.86 ab	102.1 ab	118.27 a
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	49.03 ab	57.2 a	74.72 ab	92.24 ab	97.47 abc	106.62abc
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	48.74 ab	58.3 a	74.62 ab	90.95 ab	100.97abc	109.78 abc
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	49.01 ab	57.1 a	75.53 ab	93.96 ab	101.22 ab	113.63 ab
Control inoculado	49.72 a	57.38 a	75.79 ab	94.21 ab	99.417 abc	106.86 abc
Control no inoculado	48.35 ab	54.84 a	71.04 b	87.24 b	95.63 bc	114.95 ab
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x108 UFC/ml) 30.00%, Metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, Flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. Chitosan	47.24 ab	54.9 a	71.35 b	87.81 b	93.57 c	100.41 bc

hidrolizado (Best ultra R)

Extracto de gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) (Bela Plus)	46.75 ab	54.05 a	71.07 b	88.1 b	99.13 abc	113.61 ab
Dióxido de hidrógeno (Oxidate)	48.281 ab	58.55 a	77.39 a	96.23 a	103.09 ab	113.04 abc

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

La concentración de potasio en las plantas de jitomate tratadas se presenta en el cuadro 6. Durante la primera evaluación (16 de marzo de 2007) las plantas tratadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1 x 3 tenían la concentración más alta de potasio (7534 ppm) seguidas de las tratadas con *Bacillus subtilis* cepa 3 (7235 ppm). En la segunda evaluación (23 de marzo de 2007), las plantas tratadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1 x 3 presentaban la mayor concentración de potasio (7551 ppm), seguida de Biobacter (7464 ppm) y acibensolar-S-metyl (7447 ppm). En la tercera y cuarta evaluación (30 de marzo de 2007 y 6 de abril de 2007) se observó una disminución la concentración de potasio en todas las plantas (floración-fructificación) sin diferencias estadísticas entre los tratamientos. En la evaluación final (13 de abril de 2007), a pesar de que existió un incremento en la concentración de potasio, no se alcanzaron los niveles detectados al inicio del experimento. Las plantas tratadas con *Bacillus sutillis* cepa 1 x 2 presentaban la mayor concentración (3120.6 ppm).

Cuadro 6. Efecto de los tratamientos en la concentración de potasio (ppm) en plantas de jitomate a partir de la primera semana después de la aplicación (dda).

Tratamiento	1 semana dda	2 semana dda	3 semana dda	4 semana dda	5 semana dda
Aceite de lípidos graveoles 5.00%, Extracto de semillas de <i>Citrus paradisiaca</i> 1.00%, Extracto de <i>Equinacea angustifolia</i> 5.00%, Extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> 30.00%, Salicilato de Potasio, Ácidos Grasos Omega 3, Chitosan hidrolizado, Sorbato de potasio (Biobacter)	5716 abc	7464 ab	2025.6 a	2362.2 a	2698.8 ab
Acibensolar-S-metyl (Actigar)	4817 c	7447 ab	1758.4 a	2045 a	2331.6 b
<i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liqueniforme</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, <i>Lactobacilo</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, <i>Azotobacter</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%. (Best Ultra F)	5187 bc	6268 ab	1761.5 a	2155.6 a	2549.6 ab

<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1)	5367 bc	6774 ab	1826.2 a	2198.9 a	2571.7 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	5280 bc	6910 ab	1822.2 a	2471.4 a	3120.6 a
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	5865 abc	7366 ab	2104.4 a	2375.3 a	2646.2 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	7534 a	7551 a	1944.6 a	2437 a	2929.3 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	6117 abc	5876 ab	1750.2 a	2103.6 a	2457.0 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	5066 c	6288 ab	1713.4 a	2045.8 a	2378.3 b
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	7235 ab	5387 b	2047.9 a	2297.8 a	2547.6 ab
Control inoculado	5720 abc	6060 ab	1662.4 a	2040.3 a	2418.2 b
Control no inoculado	6315 abc	6225 ab	1953.0 a	2256.5 a	2560.0 ab
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 30.00%, Metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, Flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. Chitosan hidrolizado (Best ultra R)	5021 c	5840 ab	1469.4 a	1895.6 a	2321.8 b
Extracto de gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) (Bela Plus)	6583 abc	7246 ab	1958.8 a	2331.1 a	2703.4 ab
Dióxido de hidrogeno (Oxidate)	4880 c	5442 ab	2315.0 a	2384.5 a	2453.4 ab

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

En la primera evaluación, la concentración de amonio (cuadro 7) fue mayor en las plantas tratadas con *Bacillus subtilis* cepa 1 y 3 (74.43 ppm), seguido del tratamiento con *Bacillus subtilis* cepa 3 (73.40 ppm). En la segunda evaluación no se detectaron diferencias significativas en la concentración de amonio de las plantas tratadas con los diferentes compuestos. En la tercera evaluación las plantas tratadas con la mezcla *Bacillus subtilis* cepas 1 x 2 x 3 presentaron la mayor concentración de este nutrimento (336.8 ppm), seguidas de las plantas tratadas con *Bacillus subtilis* cepa 3 (326.48 ppm). En la cuarta evaluación (6 de Abril de 2007), las plantas tratadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1 x 2 presentaron la mayor concentración de amonio (360.64 ppm), seguida de las plantas tratadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1 x 3 (345.44 ppm). En la última evaluación (13 de abril) las plantas tratadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1 x 2 presentaron 434.12 ppm seguidas de las plantas inoculadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1 x 3 (405.49 ppm). Los tratamientos

con menor concentración de amonio fueron Best ultra R (277.54 ppm) y la cepa 2 de *Bacillus subtilis* con 270.35 ppm.

Cuadro 7. Efecto de los tratamientos en la concentración de amonio (ppm) en plantas de jitomate a partir de la primera semana después de la aplicación (dda).

Tratamiento	1 semana dda	2 semana dda	3 semana dda	4 semana dda	5 semana Dda
Aceite de lípidos graveoles 5.00%, Extracto de semillas de <i>Citrus paradisiaca</i> 1.00%, Extracto de <i>Equinacea angustifolia</i> 5.00%, Extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> 30.00%, Salicilato de Potasio, Ácidos Grasos Omega 3, Chitosan hidrolizado, Sorbato de potasio (Biobacter).	56.44 c	303.97 a	303.85 abc	322.24 ba	340.63 ba
Acibensolar-S-metyl (actigar)	49.82 c	307.82 a	271.32 abc	277 ba	282.67 b
<i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liqueniforme</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, Lactobacilo (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, <i>Azotobacter</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%.(Best Ultra F)	52.58 c	268.97 a	271.69 abc	289.55 ba	307.4 ba
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1)	56.36 c	280.22 a	258.91 abc	314.03 ba	369.16 ba
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	54.85 c	290.26 a	287.14 abc	360.64 a	434.14 a
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	58.91 abc	301.70 a	336.8 a	344.99 ba	353.18 ba
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	74.43 a	304.57 a	285.4 abc	345.44 ba	405.49 ba
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	57.91 bc	241.40 a	303.52 abc	286.93 ba	270.35 b
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	55.56 c	260.15 a	231.5 c	265.88 ba	300.26 ba
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	73.40 abc	269.45 a	326.48 ba	326.88 ba	327.28 ba
Control inoculado	54.47 c	244.58 a	233.81 bc	261.52 ba	289.22 b
Control no inoculado	63.32 abc	283.73 a	283.1 abc	306.82 ba	330.54 ba
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 30.00%, Metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, Flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. Chitosan hidrolizado (Best ultra R)	52.17 c	259.19 a	236.71 bc	257.12 b	277.54 b
Extracto de gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) (Bela Plus)	52.23 c	300.07 a	307.39 abc	327.28 ba	347.17 ba
Dióxido de hidrogeno (Oxidate)	51.85 c	249.97 a	262.48 abc	289.04 ba	315.6 ba

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

El peso fresco se evaluó al final del experimento (cuadro 8). Las plantas tratadas con la cepa 2 de *Bacillus subtilis* presentaban el mayor peso fresco (351.54 gramos), seguidas de las plantas tratadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 2 x 3 (346.26 gramos) y Acibenzolar-S-metyl (342.82 gramos). Los tratamientos que obtuvieron el menor peso fueron la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1 x 2 con 283.38 gramos y la cepa 1 de *Bacillus subtilis* con 276.5 gramos. Por otro lado, las plantas tratadas con dióxido de hidrogeno (Oxidate) presentaban el mayor peso seco (89.94 gramos), seguidas de las plantas control inoculadas (89.12 gramos). Las plantas con menor peso seco fueron las tratadas con acibenzolar-S-metyl (59.29g) y las tratadas con la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 1x2x3 (58.90g).

Cuadro 8. Efecto de los tratamientos en el peso fresco y peso seco (g) de plantas de jitomate al final del experimento.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Aceite de lípidos graveoles 5.00%, Extracto de semillas de <i>Citrus paradisiaca</i> 1.00%, Extracto de <i>Equinacea angustifolia</i> 5.00%, Extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> 30.00%, Salicilato de Potasio, Ácidos Grasos Omega 3, Chitosan hidrolizado, Sorbato de potasio (Biobacter).	283.6 ab	69.76 ab
Acibenzolar-S-metyl (actigar)	342.82 ab	59.28 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (1x108 UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liqueniforme</i> (1x105 UFC/ml) 10.00%, <i>Lactobacilo</i> (1x105 UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp. (1x105UFC/ml) 10.00%, <i>Azotobacter</i> spp. (1x105 UFC/ml) 10.00%. (Best Ultra F)	284.88 ab	60.86 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1)	276.5 ab	66.00 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	283.38 ab	66.26 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	306.6 ab	58.90 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	301.94 ab	66.72 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	351.54 a	71.18 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	346.26 ab	76.62 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	303.28 ab	66.92 ab
Control inoculado	325.62 ab	89.12 a
Control no inoculado	315.62 ab	79.18 ab
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x108 UFC/ml) 30.00%, Metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, Flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. Chitosan hidrolizado (Best ultra R)	340.68 ab	69.68 ab
Extracto de gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) (Bela Plus)	317.1 ab	69.76 ab
Dióxido de hidrogeno (Oxidate)	342.76 ab	89.94 a

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

El cuadro 9 muestra el efecto de los tratamientos sobre la cantidad de colonias en tejido vegetal. La menor cantidad de unidades formadoras de colonia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tejido vegetal se observó en las plantas tratadas con acibenzolar-S-metyl (0.0 ufc/ml), control no inoculado (0.0 ufc/ml), cepa 3 de *Bacillus subtilis* (0.0 ufc/ml) y la mezcla de la cepa 2 y cepa 3 (0.0 ufc/ml). En contraste, las plantas que mayor cantidad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fueron la tratadas con *Bacillus subtilis* cepa 1 x 2 x 3 (0.8 ufc/ml) y *Bacillus subtilis* cepa 1 x 3 (0.4 ufc/ml).

Cuadro 9. Efecto de los tratamientos la concentración de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tejido vegetal.

Tratamiento	Concentración (UFC/ml)*¶
Aceíte de lípidos graveoles 5.00%, Extracto de semillas de <i>Citrus paradisiaca</i> 1.00%, Extracto de <i>Equinacea angustifolia</i> 5.00%, Extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> 30.00%, Salicilato de Potasio, Ácidos Grasos Omega 3, Chitosan hidrolizado, Sorbato de potasio (Biobacter).	0.2 b
Acibensolar-S-metyl (actigar)	0.0 b
<i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liqueniforme</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, <i>Lactobacilo</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, <i>Azotobacter</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%. (Best Ultra F)	0.2 b
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1)	0.2 b
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	0.2 b
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	0.8 a
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C1) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	0.4 ab
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2)	0.2 b
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C2) x <i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	0.0 b
<i>Bacillus subtilis</i> (Bacillus C3)	0.0 b
Control inoculado	0.2 b
Control no inoculado	0.0 b
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 30.00%, Metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, Flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. Chitosan hidrolizado (Best ultra R)	0.2 b
Extracto de gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) (Bela Plus)	0.2 b
Dióxido de hidrogeno (Oxidate)	0.2 b

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. ¶ Los datos se transformaron a logaritmo.

### 2.1.8. Discusión

En promedio, la altura de las plantas tratadas con Biobacter fue la mayor. Este tratamiento fue aplicado a la raíz y es considerado como inductor de resistencia sistémica. Los resultados muestran un incremento en la altura de la planta, lo cual coincide con lo reportado por Vallad y Goodman (2004), quienes mencionan que algunos inductores de resistencia no solo pueden activar mecanismos de defensa sino que también promueven un efecto favorable en calidad y rendimiento de los frutos. Otro ejemplo es el de *Bacillus subtilis* cepa 1 x 3, una rizobacteria que ha sido reportada como promotora del crecimiento (van Loon et al. 1998), posiblemente debido a que tienen la capacidad de ayudar a las plantas a asimilar los nutrimentos más fácilmente, además de que liberan sustancias reguladoras de crecimiento que favorecen el desarrollo de las plantas.

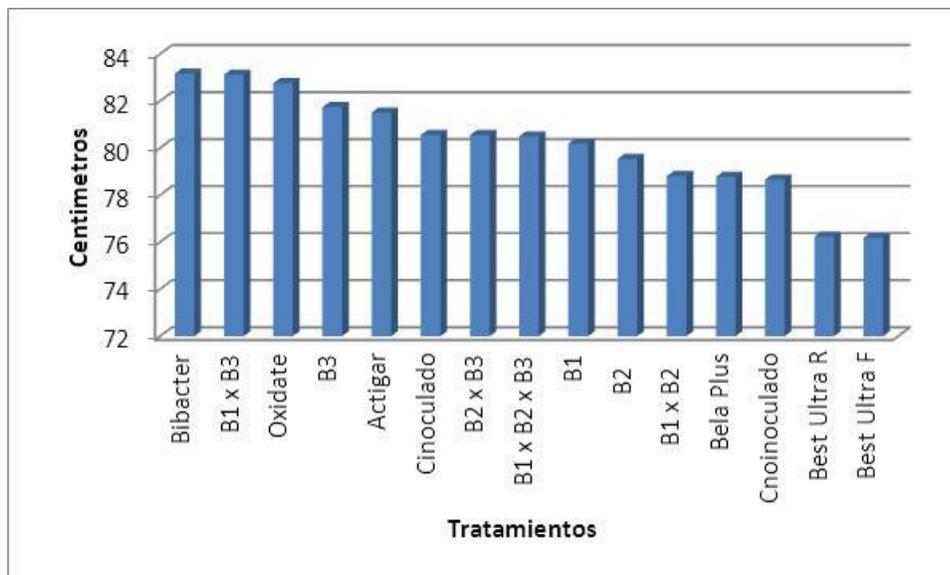


Figura 4. Efecto de los tratamientos la altura promedio de plantas de jitomate.

En lo que respecta a la concentración de amonio y potasio en la planta se observaron en la primera lectura valores entre los 50 y 85 partes por millón (amonio) y entre 5000 y

7500 ppm (potasio). Una semana después el amonio aumento hasta 250 a 300 ppm, pero el potasio se mantuvo constante. Doce semanas después (tercera evaluación), el amonio continuo incrementándose, mientras el potasio disminuye (1500 y 2000 ppm). Este decremento en los niveles de potasio coincide con la aparición de los primeros frutos. Uno de los roles esenciales del potasio se encuentran en la síntesis de proteínas, los procesos fotosintéticos y el transporte de azúcares de las hojas a los frutos. Un buen suministro de potasio sustentará, por consiguiente, desde el principio de la función de la hoja en el crecimiento de la fruta y contribuirá al efecto positivo del potasio en el rendimiento y en el alto contenido de sólidos solubles en el fruto al momento de la cosecha. Aproximadamente entre el 60 y 66% de potasio absorbido por la planta se encuentra en la fruta (Voogt, 2002).

En lo que respecta a la toma de datos de las concentración de nutrientes en la planta se observó un efecto importante, en las primera toma de las lecturas de los concentración de los elementos en las plantas en el caso del amonio oscilaron entre los 50 y 85 partes por millón y en el caso del Potasio entre los 5000 y 7500 ppm, pero en la segunda toma de datos, el amonio aumento considerablemente hasta los rangos de 250 a 300 ppm y el potasio se mantuvo constante, pero en la tercera evaluación hubo un cambio muy drástico, mientras que el amonio continuo incrementándose, el potasio bajo considerablemente como se muestra en la Figura 9 y 10 donde el potasio una fecha anterior se encontraron concentraciones entre 5000 y 7500 ppm y en la tercera evaluación solo entre 1500 y 2000 ppm, este decremento en los niveles de potasio coincide con la aparición de los primeros frutos, los roles esenciales del potasio se encuentran en la síntesis de proteínas, los procesos fotosintéticos y el transporte de azúcares de las hojas a las frutas. Un buen suministro de potasio sustentará, por consiguiente, desde el principio de la función de la hoja en el crecimiento de la fruta y contribuirá al efecto positivo del potasio en el rendimiento y en el alto contenido de sólidos solubles (más azúcares) en la fruta en el momento de la cosecha. Aproximadamente entre el 60 y 66% de potasio absorbido por la planta, se encuentra en la fruta (Voogt, 2002).

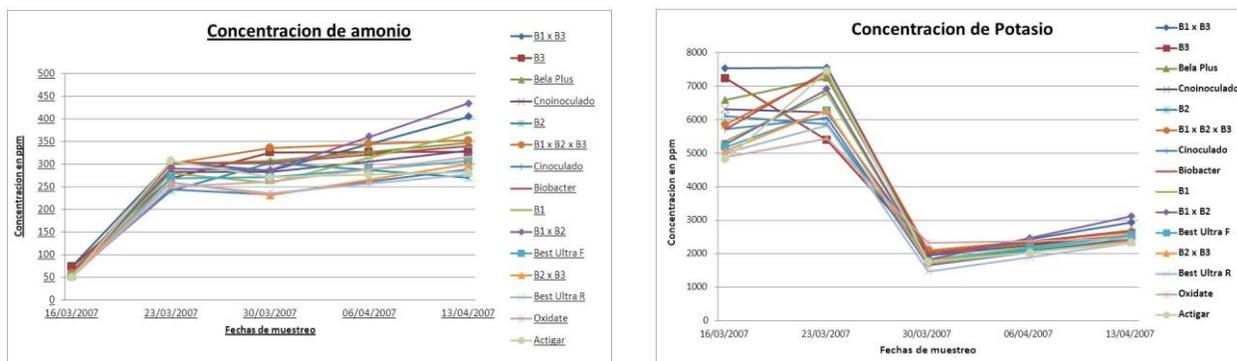


Figura 5. Concentración de amonio y potasio (ppm) en plantas de jitomate con diferentes tratamientos inductores de resistencia.

Sánchez (2008) menciona como la concentración iónica de nutrientes en la savia informa sobre el ritmo de absorción en el momento del muestreo, con la posibilidad de mejorar la fertilización durante el mismo ciclo de cultivo. El mismo autor presenta los rangos óptimos en las diferentes etapas fenológicas de la planta (Cuadro 10).

Desafortunadamente no presenta los valores de nitrógeno cuantificado como amonio, variable que fue cuantificada en esta investigación. Sin embargo, los datos permiten apreciar que las plantas de todos los tratamientos aumentaron la concentración de amonio conforme pasa el tiempo, lo que pudo aumentar la susceptibilidad a plagas y enfermedades así como permitir un mayor crecimiento, pues el nitrógeno es uno de los elementos que constituye aminoácidos, amidas, proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas, hexoaminas, etc. (Mengel y Kirkbi, 1987). En las plantas tratadas, la concentración del potasio presentó valores catalogados como exceso de acuerdo a Sánchez (2008) en las dos primeras evaluaciones, y posteriormente la concentración decreció por la formación y llenado de frutos. Los frutos de jitomate en crecimiento activo son los órganos más demandantes de potasio con niveles de 70% a 80% (Bungarin-Montoya *et al*, 2002). Las observaciones revelan que una de las fórmulas comerciales de fertilización no es la adecuada para cubrir las demandas del cultivo, resultando en niveles de potasio por debajo de los rangos óptimos (3500 – 5000 ppm). El potasio es un catión que está involucrado en el mantenimiento del potencial osmótico de la planta (turgencia de la célula), una implicación de esto es el movimiento del estoma, la apertura estomática permite a las plantas intercambiar gas y agua con la

atmósfera. Esto permite a las plantas mantener un estado adecuado de hidratación bajo las condiciones de stress como salinidad o escasez de agua. El cultivo del jitomate con alto contenido de potasio generalmente muestra una eficiencia mayor de uso de agua, o sea, este consume relativa menos agua que cultivos deficientes de potasio para producir la misma cantidad de biomasa (Bugarin-Montoya *et al*, 2002). La nutrición de cultivos es quizá la principal herramienta para el manejo de cultivos de alto rendimiento. Desafortunadamente se le ha dado poca importancia a la estrecha relación que existe entre nutrición y fitopatología. Los resultados presenta evidencia de que la aparición de síntomas de marchitez debido a la infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* está regulada por la concentración de potasio en la planta.

Cuadro 10. Rangos óptimos para el extracto celular de peciolo en jitomate (Sánchez, 2008).

Etapa fenológica	N-NO <sub>3</sub> Concentración (mgL <sup>-1</sup> /ppm)	K
Vegetativa	500 – 800	3000 – 4000
Floración	400 – 800	3000 – 4000
1er cosecha – Última cosecha	400 – 800	3500 – 5000

Respecto a la concentración de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tejido vegetal (cuadro 9), los resultados muestran que *Bacillus subtilis* 1 x 2 x 3 incrementa la cantidad de bacterias en el tejido. Vallad y Goodman (2002) mencionan que algunas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), activan la ruta del ácido jasmonico y etileno, lo que hace que las plantas activen sus defensas inhibiendo la severidad de los patógenos o reduciendo los daños que ocasionan. A pesar de que las plantas tratadas con las tres cepas de *Bacillus* tenían la mayor cantidad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, no mostraron efecto negativo en el crecimiento, ni mostraron síntomas severos de marchitez o daños en los frutos (datos no presentados). El uso de inductores de resistencia sistémica adquirida como acibenzolar-S-metyl parece ser una buena alternativa para reducir la población

de la bacteria patógena en la planta. Sin embargo, mas experimentos son necesarios para confirmar esta información así como la evaluación de la producción.

### **2.1.9. Conclusiones**

- ❖ La resistencia sistémica inducida por Rhizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas y la resistencia sistémica adquirida por productos sintéticos reduce la concentración de *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis* en tejido vegetal. Los mejores tratamientos fueron: acibenzolar-S-metyl, cepa 3 de *Bacillus subtilis* y la mezcla de la cepa 2 y cepa 3.
  
- ❖ La variación de la concentración de nutrimentos durante el ciclo de la planta está relacionada con la expresión de síntomas de la bacteria en jitomate. Al momento de la aparición de los síntomas de quemaduras de los bordes y marchitez, las plantas presentaban un incremento en la concentración de nitrógeno (como amonio) y una baja en potasio.

### 2.1.10. Literatura consultada

- Abbasi, P.A., J. Al-Dahmani, F. Sahin, H.A.J. Hoitink, and S. A. Miller. 2002. Effect of compost amendment on diseases severity and yield of tomato in conventional and organic production system. *Plant Dis.* 86:156-161.
- Bugarin-Montoya R., Galvis-Spinola A., Sánchez-García P. y Gacia-Paredes D. 2002. Demanda de potasio tipo saladette. *Terra.* 20: 391- 399.
- EPPO, 2010. Data sheets on cuarantines Pest. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO A2 List. No. 50
- Lara R. J. 2000. Marcaje por recombinación ilegítima con un plásmido integrativo de cepas de *Bacillus subtilis* nativas de la rizosfera y detección por PCR en suelo. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-Irapuato, Gto.
- Mengel K., Kirkby EA 1987. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Bern.,
- Ryals J, Ward E, Ahl-Goy P.A, Métraux J.P. 1992. Systemic acquired resistance: an inducible defense mechanism in plants. In *The Biochemistry and Molecular Biology of Inducible Enzymes and Proteins in Higher Plants*, ed. J.L. Wray, pp. 205-229.
- Podile, A. R. and Laxmi, V. D. V. 1998. Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonia lyase and reduce the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. *Journal of Phytopathology* 146:255-259.
- Pradhanang, P.M., Ji, P., Momol, M. T., Olson, S. M. Mayfield, J.L. and Jones, J.B. 2005. Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* *Plant Dis.* 89:989-993.

- Shaad, N.W., Jones, J. B. and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of plant pathogenic bacteria. 3th ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA.
- Sticher. L., B. Mauch-Mani, and J.P. Metraux. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathology*. 35: 235-270.
- Sanchez, G. P. 2008. Diagnostico nutrimental en tomate. *In: Jitomate tecnología para su producción en invernadero*. Bautista, M. N., Chavarin, P. C., Valenzuela, E. F. (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Estado de México. pp.: 113 – 140.
- Thaler, J.S., A.L. Findantsef, S.S. Duffey, and R.M. Bostock. 1999. Trade-offs in plant defence against pathogens and herbivores: A field demonstration of chemicals elicitor of induced resistance. *J. Chem. Ecol.* 25:1597-1609.
- Vallad G. E. and Goodman R. M. 2004. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science Society of America* 44:1920–1934
- Van Loon, L.C., P. A. H. M. Bakker, and C.M.J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.
- Voogt, W. 2002. Potassium management of vegetables under intensive growth conditions. *In: Potassium for sustainable crop production*. Pasricha N. S. y Bansal S. K. (eds.) International Potash Institute, Bern. pp.: 347 – 362.

## CAPITULO III

3.1. Alternativas para el manejo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: nutrición.

### 3.1.1. Introducción

Una de las principales enfermedades vasculares del jitomate es el cáncer bacteriano ocasionado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Esta enfermedad causa graves daños, en invernaderos se han reportado perdidas hasta del 70%, y reducción en el rendimiento de 20 al 30% (Rat et al. 1991). El cáncer bacteriano fue reportado por primera vez en 1992. Actualmente se puede encontrar en todas las regiones en donde se cultive tomate. En México en el libro manejo fitosanitario de las hortalizas en México (1998) fue reportada por el Dr. L. Fucikovsky, además se ha reportado en Zacatecas, Querétaro, Sinaloa, Michoacán, Morelos, Hidalgo, Guanajuato y Estado de México (Tlapal, 2008; Ramírez et al. 2009).

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es una bacteria que se trasmite principalmente por semillas. Los síntomas son poco probables que aparezcan antes de la formación de los frutos y existe evidencia de que este fenómeno esté relacionado con condiciones nutrimentales de la planta (Capítulo II). esto dificulta el manejo de la enfermedad debido a que no puede ser detectada en las primeras etapas e implementar alguna estrategia de manejo para que la enfermedad no se disperse en toda la parcela como ocurre cuando se realizan las labores culturales y de manejo de cultivo (OEPP/EPPO, 2004).

El control químico de la enfermedad ha resultado poco eficaz y los antibióticos que funcionan in vitro, aun no tienen registro para su uso en jitomate. Una de las estrategias de manejo de la enfermedad y cultivo es la nutrición. La nutrición es un punto clave en la producción de cualquier tipo de cultivo ya que si se tiene una nutrición balanceada, la

planta se desarrolla de forma correcta, expresando todas sus características en calidad y en rendimiento, además de que la hace menos susceptible a enfermedades, debido que la planta al no tener desbalances como deficiencias o excesos de los nutrimentos le da menos oportunidad a que los organismos fitopatógenos se establezcan en el interior de las plantas (Huber and Graham, 1999).

El nitrógeno es uno de los elementos que ha sido relacionado con las enfermedades de las plantas y es también el elemento nutrimental aplicado en mayor cantidad y del que se observan comúnmente deficiencias en los cultivos. La asociación del nitrógeno con las enfermedades es a menudo basada en la observación de los efectos después de la aplicación con fertilizantes nitrogenados. Una generalización común es que el nitrógeno tiende a incrementar las enfermedades, mientras que el potasio a decrecerlas y el fósforo puede disparar una respuesta. Sin embargo, esta generalidad no toma en cuenta los efectos de rangos de aplicación (deficiencia, suficiencia o exceso), el tiempo de aplicación (estado de crecimiento de los cultivos o la actividad del patógeno) la forma del nitrógeno ( $\text{NH}_4$  o  $\text{NO}_3$ ), las condiciones del suelo y la interacción con otros elementos y factores (Huber and Thompson, 2007). Por ejemplo, las enfermedades del jitomate causadas por los hongos como *Sclerotinia* sp. *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* disminuyen con la aplicación de nitrógeno en forma de nitratos y un pH alcalino y las causadas por *Gloesporium phomoides*, Virus X de la Papa, *Ralstonia solanacearum* y *Verticillium dahliae* se reducen con aplicaciones de amonio y un pH ácido (Humber and Graham, 1999). La pudrición de raíz y corona (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*) incrementan su severidad cuando se incrementan las aplicaciones nitrógeno como amonio (Duffy and Defago, 1999).

Por otro lado, el contenido de fósforo en los tejidos y la aceleración en la maduración de los tejidos puede aumentar o disminuir el desarrollo de las enfermedades. El ácido fosforoso ( $\text{H}_3\text{PO}_3$ ) promueve el crecimiento de las plantas incluso en presencia de patógenos (Rickard, 2000). En jitomate, la nutrición con fósforo tiene efecto negativo en enfermedades ocasionadas por *Alternaria solani* y *Septoria* spp. En contraste, la

aplicación de fósforo incrementa la severidad de la marchitez del tomate provocada por *Fusarium* spp. Sin embargo, altos niveles de calcio y bajos de fósforo ayudan a reducir la severidad de esta enfermedad (Waltz and Jones, 1973).

El potasio solo o en combinación con otros nutrimentos como nitrógeno y fósforo altera la severidad de las enfermedades de las plantas. Aunque no es posible generalizar sobre el efecto del potasio en el desarrollo de la enfermedad en las plantas, este nutriente ha sido reportado como un reductor de intensidad de muchas enfermedades. Desafortunadamente, muchos investigadores no han considerado los efectos de aniones asociados, el balance de nutrientes y el estatus de estos a fin de que el rol definitivo del potasio sea determinado. Por ejemplo, es posible que exista una mayor respuesta al potasio en plantas deficientes que en plantas que tienen cubiertas sus necesidades nutrimentales o en plantas que tengan excesos de este nutriente más allá de los requeridos por la planta. En el caso de *Alternaria solani*, *Pantoea herbicola*, *Pectobacterium carotovora* y *Ralstonia solanacearum*, se ha observado que las enfermedades que ocasionan estos patógenos decrecen con la aplicación correcta de potasio (Huber and Arny, 1995). Se ha observado que la aplicación de potasio promueve un crecimiento normal en plantas de jitomate infectadas con *Meloidogyne incognita* como resultado de una mayor disponibilidad y absorción de nutrientes que compensan los daños del nematodo agallador, pero estas aplicaciones también acortan el ciclo de vida y pueden favorecer el mantenimiento y la posterior acumulación de las poblaciones de nematodos (Oteifa, 1953).

En este capítulo se planteó la combinación de inductores de resistencia y nutrición para el manejo de *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis* con la siguiente hipótesis:

La combinación de inductores de resistencia con un manejo de la nutrición reducen la severidad de *Clavibacter michiganensi* subsp. *michiganensis*.

### 3.1.2. Materiales y métodos

#### 3.1.2.1. Aislamiento del patógeno

Fragmentos de hoja y tallo de plantas enfermas con síntomas de cáncer bacteriano, se maceraron en agua destilada esterilizada y se sembraron por la técnica de estría cruzada medio de cultivo YDC (10g extracto de levadura; 20g dextrosa; 20g CaCO<sub>3</sub>; 15g agar; 1000ml agua destilada). Las cajas Petri se incubaron por 24-48h a temperatura ambiente bajo luz artificial. Las colonias aisladas se separaron y purificaron en otra caja con medio de cultivo (figura 1).



Figura 1. De izquierda a derecha: hojas con síntomas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Fragmentos de tallo que fueron utilizados para el aislamiento y colonias típicas del patógeno después de 24-48 horas de incubación a temperatura ambiente.

#### 3.1.2.2. Identificación

La identidad de la bacteria fue verificada mediante la prueba rápida de Ryu (Figura 2) y la técnica de RIPA o de inmunodetección en papel filtro (Figura 2). Este método fue desarrollado como una técnica de detección serológica simple, rápida y de alta sensibilidad para virus de plantas (Shohara, et al., 1999). En la técnica de RIPA se utilizan anticuerpos específicos a determinados virus o bacterias fitopatógenos unidos a

partículas de látex blanco. Las partículas conjugadas (anticuerpo-látex blanco) se inmovilizan como una línea sólida cerca de la base de una tira de papel filtro. Este extremo de la tira se sumerge por aproximadamente tres minutos en un extracto vegetal (por lo general hojas infectadas por virus o bacterias en cuestión) mezclado con anticuerpos conjugados con partículas de látex, coloreadas preferentemente rojo, por ser más fácilmente visibles). Después de este periodo de tiempo, aparece una línea coloreada en la línea que contiene los anticuerpos conjugados a las partículas de látex blancos previamente inmovilizados en la tira de papel filtro (Shohara et al., 1999). Con esta técnica es posible detectar hasta 5ng de partículas purificadas de Tobacco mosaic tobamovirus (TMV) o 50ngml<sup>-1</sup> de partículas purificadas de Cucumber mosaic cucumovirus (CMV) (Tsuda, et al., 1992).

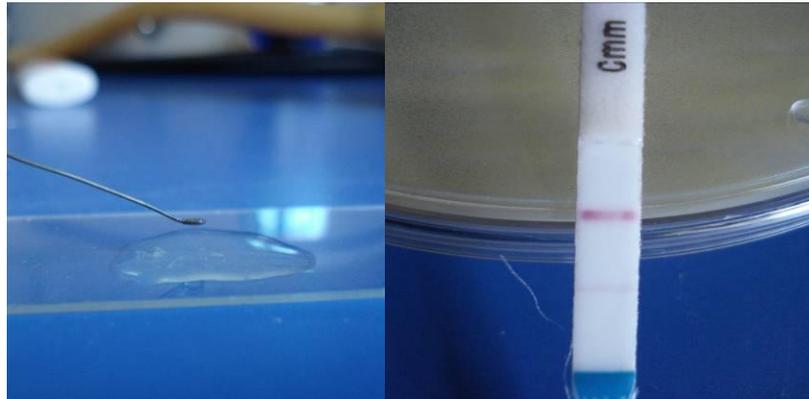


Figura 2. Pruebas clave utilizadas para la rápida identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a partir de tejido vegetal y bacterias puras en medio de cultivo. De izquierda a derecha, ausencia de hilo mucilaginoso en una gota de KOH 3% y reacción positiva de la técnica de RIPA.

### 3.1.2.3. Material vegetal

Se sembraron semillas de jitomate la variedad Dundee, en contenedores de unicel de 200 cavidades que contenían sustrato Peat most (Turba). Se depositó una sola semilla por cavidad y se taparon con la misma turba, se humedecieron y se cubrieron con una bolsa negra de plástico por 6 días hasta que germinaron. Una vez germinadas se

trasladaron al invernadero por 30 días hasta que la plántula pudiera ser trasplantada (figura 2).



Figura 3. Siembra de la variedad Dundee en charolas de unicel de 200 cavidades e incubación bajo condiciones de invernadero por 30 días.

### 3.1.2.4. Inoculación

Las cepas aisladas e identificadas, se resembraron cada 7 días hasta la inoculación de las plantas con un tamaño de 40 cm. Para preparar el inóculo, las cajas que contenían la cepa bacteriana de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se les agregó agua destilada esteril y con la ayuda de un tubo de vidrio se desalojaron las cepas bacterianas y se vaciaron en un recipiente que contenía palillos de madera (los cuales se utilizaron para inocular a las plantas), los cuales se dejaron dentro de la suspensión con la bacteria durante una hora para asegurar que el inóculo se adsorbieran en los palillos de madera (Figura 4).



Figura 4. Material utilizado para la preparación del inóculo. De izquierda a derecha, caja con medio de cultivo, agua destilada esterilizada y palillos en la suspensión bacteriana.

De la suspensión bacteriana donde se sumergieron los palillos se obtuvo un mililitro que fue depositado en un tubo de ensayo con nueve mililitros de agua destilada esterilizada. Esta suspensión fue diluida (1:9) en dos ocasiones más y 100 microlitros fueron dispersados por duplicado en una caja con medio de cultivo YDC para contar las colonias y cuantificar la concentración del inóculo.

Los palillos de madera (sumergidos durante una hora en una suspensión bacteriana) se insertaron en la axila que forma la hoja y el tallo, a la altura de la segunda hoja, procurando que llegara hasta los haces vasculares de las plantas. En las plantas control se realizó la misma operación con palillos de color verde sumergidos en agua destilada esteril (figura 5).



Figura 5. Inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por medio de palillos sumergidos en una suspensión de la bacteria e incrustados en la axila de la segunda hoja verdadera.

### 3.1.2.5. Aplicación de tratamientos

La aplicación de los productos a evaluar se realizó con la ayuda de aspersores manuales con capacidad de 250 ml, en los cuales se prepararon los tratamientos (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para la inducción de la resistencia en jitomate contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Tratamiento	Producto	Dosis	Modo de aplicación
1	<i>Bacillus</i> C1	5ml/L	Raíz
2	<i>Bacillus</i> C2	5ml/L	Raíz
3	<i>Bacillus</i> 3	5ml/L	Raíz
4	<i>Bacillus</i> C1 x <i>Bacillus</i> C2	5mL <sup>-1</sup> + 5mL <sup>-1</sup>	Raíz
5	<i>Bacillus</i> C1 x <i>Bacillus</i> C3	5mL <sup>-1</sup> L + 5mL <sup>-1</sup> L	Raíz
6	<i>Bacillus</i> C2 x <i>Bacillus</i> C3	5mL <sup>-1</sup> L + 5mL <sup>-1</sup>	Raíz
7	<i>Bacillus</i> C1 x <i>Bacillus</i> C2 x <i>Bacillus</i> C3	5mL <sup>-1</sup> + 5mL <sup>-1</sup> + 5mL <sup>-1</sup>	Raíz
8	Biologic	5mL <sup>-1</sup>	Raíz
9	Biobacter	325mlha <sup>-1</sup>	Raíz
10	Best Ultra R	2mL <sup>-1</sup>	Raíz
11	Trichoderma	300g400L <sup>-1</sup>	Raíz
12	Best ultra F	1mL <sup>-1</sup>	Follaje
13*	Oxidate	1mL <sup>-1</sup>	Follaje
14	Bela Plus	500ml100L <sup>-1</sup>	Follaje

15	Actigar	56mgL <sup>-1</sup>	Follaje
16	Control no inoculado	250 ml Agua destilada	Follaje
17	Control inoculado	1 x 10 <sup>8</sup> UFC de Cmsubspm	Follaje

Cuadro 2. Ingrediente activo de los tratamientos utilizados para la inducción de la resistencia en jitomate contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Productos a utilizar	Compañía	País
<b>Bacillus C1</b> <i>Bacillus subtilis</i>	CINVESTAV	México
<b>Bacillus C2</b> <i>Bacillus subtilis</i>	CINVESTAV	México
<b>Bacillus C3</b> <i>Bacillus subtilis</i>	CINVESTAV	México
<b>Biologic</b> <i>Bacillus subtilis</i>	Bayer de México	Alemania
<b>Biobacter</b> Aceite de lípidos graveoles 5.00% Extracto de semillas de Citrus paradisiaca 1.00% Extracto de equinacea angustifolia 5.00% Extracto de Mimosa tenuiflora 30.00% Salicilato de Potasio Ácidos Grasos Omega 3 Chitosan hidrolizado Sorbato de potasio.	Green Corp.	México
<b>Best Ultra R</b> Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 30.00% metabolitos de fermentación de hongos benéficos	Green Corp.	México

múltiples, Flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal. *Azotobacter* spp. Chitosan hidrolizado.

**Bio-bich**

*Trichoderma harzianum*

**Best Ultra F**

Green Corp.

México

*Bacillus subtilis* (1x10<sup>8</sup> UFC/ml) 40.00%, *Bacillus liqueniforme* (1x10<sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, *Lactobacilo* (1x10<sup>5</sup> UFC/ml) 5.00%, *Pseudomonas* spp. (1x10<sup>5</sup>UFC/ml) 10.00%, *Azotobacter* spp. (1x10<sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%.

**Oxidate**

Dupocsa

Ecuador

Dióxido de hidrogeno

**Bela Plus**

Intrakam

Extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*)

**Actigar**

(azibensolar-S-metyl)

Syngenta

Holanda

**3.1..3. Manejo de la nutrición**

La fertilización se realizó cada tercer día con una solución universal o solución de Steiner (Cuadro 3 y 4), la cual es una mezcla balanceada de nutrientes indispensables para las plantas. Generalmente se prepara a un pH de 5.5 y una presión osmótica de 0.072 atmósferas, o su equivalente de 40 miliequivalentes de iones, lo cual equivale a aproximadamente 1dS/m (Sandoval, 2008).

Cuadro 3. Solución de macronutrientes de la fórmula de Steiner utilizada para la nutrición de jitomate.

Fertilizante o sal	g/1000 L
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (15.5% N)	1062
KNO <sub>3</sub> (13%N, 38% K)	303
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (52% K <sub>2</sub> O, 45%K, 18% S)	348
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85%, densidad 1.7 g/mL)*	22.56
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (9.7% Mg)	492

Cuadro 4. Solución de micronutrientes de la fórmula de Steiner utilizada para la nutrición de jitomate.

Nombre del reactivo	Fórmula del reactivo	Partes por millón	gL <sup>-1</sup>
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.5	2.8
Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.7	2.2
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.09	0.4
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.02	0.08
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.04	0.1
Fe-quelato (7% Fe)	Fe-EDTA*	3	42.85

### 3.1.4. Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron:

Altura de planta (regla de 1 metro de longitud) a intervalos de 15 días, de la base del tallo a la hoja más joven de la planta.

Se evaluó la concentración de amonio y potasio al tomar la hoja más madura de la planta que fue macerada en agua (5 veces el peso de la hoja). Los electrodos sensibles a amonio y potasio (previamente calibrados de acuerdo a las instrucciones de Mettler,

Toledo, USA) se introducían en la suspensión para obtener la concentración en partes por millón. Después de cada lectura, los electrodos se lavaban con agua destilada esterilizada (Figura 5).

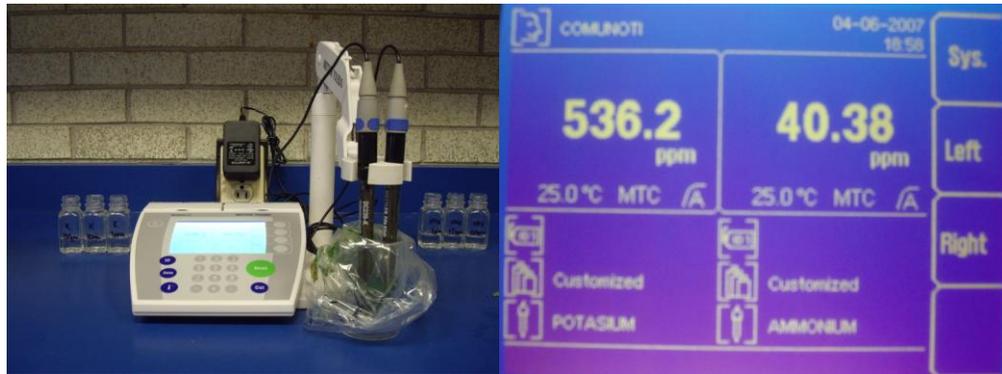


Figura 6. Medidor de ion específico y pantalla de lectura de una muestra de jitomate.

Severidad de la enfermedad. Se evaluó la presencia o ausencia de la enfermedad: las plantas en el invernadero que mostraban síntomas de *Clavibacter* (Figura 7) fueron evaluadas como 1 y 0 a las plantas que no mostraban síntomas.



Figura 7. Síntomas de plantas de jitomate clasificadas como 1 en hojas y frutos.

### 3.1.5. Diseño experimental

Los tratamientos se organizaron bajo un diseño experimental factorial y el análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SAS (version 8.0) con una comparación de medias mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

### 3.1.6. Resultados

La altura es un parámetro que se tomó quincenalmente y que al final se evaluó el promedio de estos datos. Se observó que aunque estadísticamente no existen diferencias significativas, si hay tratamientos que fueron superiores en cuanto al promedio en el tamaño, las cepas de *Bacillus subtilis* fueron las que indujeron en las alturas mayores. Los productos que indujeron la mayor altura fue la cepa de *Bacillus subtilis* (Biologic) con 84.55 centímetros, seguido de la cepa 3 de esta misma bacteria (83.32 cm). El azibensoalr-S-metyl (Actigar) también fue uno de los tratamientos de mayor altura con 82.67 centímetros. Los tratamientos que presentaron un crecimiento menor fueron el que contenía dióxido de hidrogeno (Oxidate) con 73.06 centímetros y el control no inoculado con 61.67 centímetros.

Cuadro 5. Efecto de los tratamientos en la altura de plantas de jitomate.

Tratamientos	Media* (cm)
<i>Bacillus subtilis</i> (Biologic)	84.55 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa3	83.32 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	82.69 a
Azibensolar-S-metyl (Actigar)	82.67 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	82.60 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2	81.03 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 2	80.35 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1	79.85 a
Control inoculado	78.72 a
<i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liqueniforme</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, <i>Lactobacilo</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, <i>Azotobacter</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00% (Best Ultra F).	78.61 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 2 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	76.79 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	76.75 a
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 30.00%, metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. chitosan hidrolizado. (Best Ultra R).	76.7 a
Extracto de gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) (Bela Plus).	75.53 a
Aceite de lípidos graveoles 5.00%, extracto de semillas de citrus paradisiaca 1.00%, extracto de <i>Equinacea angustifolia</i> 5.00%, extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> 30.00%, salicilato de potasio,	74.96 a

ácidos grasos omega 3, chitosan hidrolizado, sorbato de potasio. (Biobacter).

Dióxido de hidrogeno (Oxidate)	73.06 a
Control no inoculado	61.67 a

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

Las concentraciones de nutrientes en la sabia de las plantas es la mejor referencia para saber si la planta se está desarrollando de forma normal, el elemento mineral que mayor se absorbe es el nitrógeno, de los tratamientos que se aplicaron las plantas que mayor concentración de amonio (una de las formas en las que se absorbe el nitrógeno) fue el tratamiento en el que se le aplicó Acibenzolar-S-metyl (Actigar) con una concentración de 557.84 partes por millón (ppm) de amonio, seguido de la mezcla de lípidos y extractos de semillas (Biobacter), con 532.09 ppm, los tratamientos que menor concentración tuvieron de este elemento fueron el extracto de gobernadora (Bela Plus) con 438.78 ppm y por último la cepa de *Bacillus subtilis* (Biologic) con 405.88 ppm.

Cuadro 6. Efecto de los tratamientos en la concentración de amonio en plantas de jitomate.

Tratamientos	Medias* (ppm)
Azibensolar-S-metyl (Actigar)	557.84 a
Aceite de lípidos graveoles 5.00%, extracto de semillas de citrus paradisiaca 1.00%, extracto de equinacea angustifolia 5.00%, extracto de mimosa tenuiflora 30.00%, salicilato de potasio, ácidos grasos omega 3, chitosan hidrolizado, sorbato de potasio. (Biobacter).	532.09 a
Control no inoculado	517.86 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	517.47 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2	511.83 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1	507.37 a
Control inoculado	501.22 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa3	499.26 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	494.37 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 2	494.08 a
<i>Bacillus subtilis</i> (1x108 UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liqueniforme</i> (1x105 UFC/ml) 10.00%, <i>Lactobacilo</i> (1x105 UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp. (1x105UFC/ml) 10.00%, <i>Azotobacter</i> spp. (1x105 UFC/ml) 10.00% (Best Ultra F).	484.5 a
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x108 UFC/ml) 30.00%, metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. chitosan hidrolizado. (Best Ultra R).	482 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 2 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	481.8 a

<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	460.73 a
Dióxido de hidrogeno (Oxidate)	439.73 a
Extracto de gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) (Bela Plus).	438.78 a
<i>Bacillus subtilis</i> (Biologic)	405.88 a

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

## Potasio

El potasio es un elemento que también ayuda a monitorear el desarrollo de las plantas, en esta investigación los tratamientos que obtuvieron la mayor cantidad de este elemento fueron las cepas de *Bacillus subtilis* cepas 1, 2 y 3 con 23926, 23440 y 23256 ppm respectivamente, en contraste las plantas en donde se encontró la menor concentración de este elemento al final del experimento fueron las que se inocularon con Acibenzolar-S-metyl (Actigar) y el que contenía el hongo *Trichoderma harzianum* con 19879 y 18489 ppm respectivamente.

Cuadro 7. Efecto de los tratamientos en la concentración de potasio en plantas de jitomate.

Tratamientos	Medias* (ppm)
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1	23926 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2	23440 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa3	23256 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 2	23212 a
<i>Bacillus subtilis</i> (1x108 UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liqueniforme</i> (1x105 UFC/ml) 10.00%, <i>Lactobacilo</i> (1x105 UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp. (1x105UFC/ml) 10.00%, <i>Azotobacter</i> spp. (1x105 UFC/ml) 10.00% (Best Ultra F).	23049 a
Control no inoculado	22971 a
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x108 UFC/ml) 30.00%, metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. chitosan hidrolizado. (Best Ultra R).	22684 a
Extracto de gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) (Bela Plus).	22418 a
Dióxido de hidrogeno (Oxidate)	22078 a
Aceite de lípidos graveoles 5.00%, extracto de semillas de citrus paradisiaca 1.00%, extracto de <i>Equinacea angustifolia</i> 5.00%, extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> 30.00%, salicilato de potasio, ácidos grasos omega 3, chitosan hidrolizado, sorbato de potasio. (Biobacter).	21839 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 2 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	21578 a
Control no inoculado	21358 a
<i>Bacillus subtilis</i> (Biologic)	20971 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	20709 a

<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	20423 a
Azibensolar-S-metyl (Actigar)	19879 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	18489 a

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

La intensidad de la enfermedad solo se le dio el valor de 1 a plantas que mostraban los síntomas ya descritos en el punto 3.8.3 Intensidad de la enfermedad y 0 a las plantas que no mostraron síntomas, los cuales se muestran en el cuadro 35, en donde los tratamientos en que tuvieron la mayor incidencia de la enfermedad fue la cepa 3 de *Bacillus subtilis* en donde se presentó en el 100% (las 4 plantas con síntomas) de las repeticiones, seguido de los tratamientos, Cepa 1 de *Bacillus subtilis*, la mezcla de las cepas 1 por la 2, la cepa 1 por la 3, la mezcla de las tres cepas (1 por 2 por 3), Best Ultra R, Actigar y el control inoculado con el 75% (3 plantas con síntomas) de incidencia. La correlación de las plantas con síntomas y las plantas positivas se realizó por medio de las prueba de inmunopresión (Inmunotiras) específicas para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Cuadro 8. Plantas positivas al Cáncer Bacteriano.

Tratamiento	Incidencia (%)
<i>Bacillus</i> C1	75
<i>Bacillus</i> C2	50
<i>Bacillus</i> C3	100
<i>Bacillus</i> C1 x <i>Bacillus</i> C2	75
<i>Bacillus</i> C1 x <i>Bacillus</i> C3	75
<i>Bacillus</i> C2 x <i>Bacillus</i> C3	50
<i>Bacillus</i> C1 x <i>Bacillus</i> C2 x <i>Bacillus</i> C3	75
Biologic	50
Biobacter	25
Best Ultra R	75

<i>Trichoderma</i>	25
Best Ultra F	25
Oxidate	50
Bela Plus	50
Actigar	75
Control no inoculado	50
Control inoculado	75

---

Una de las formas en las que se trasmite *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) es por transmisión mecánica por lo que en la figura 8 se muestra como fue la distribución de la enfermedad en el invernadero donde se llevó a cabo la investigación, anteriormente se presentó cuales tratamientos fueron positivos a Cmm en este caso se muestra como fue la distribución de las plantas enfermas donde se observa que las hileras del centro son las que presentaron un mayor número de plantas con Cmm, lo cual coincide con las regiones donde había mayor humedad relativa y más follaje, provocando un ambiente favorable para el desarrollo de la enfermedad, además se observa que con las labores culturales como podas o tutores se puede diseminar la enfermedad de planta en planta por lo cual se observan dos hileras casi completas con síntomas de Cmm.

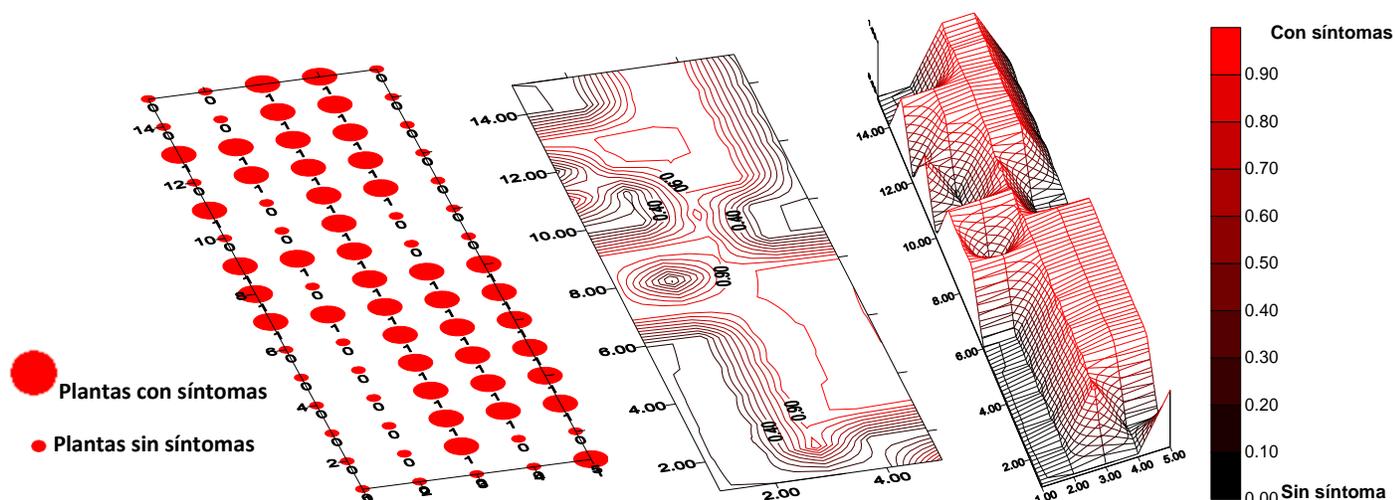


Figura 8. Distribución de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el invernadero en tres dimensiones, de izquierda a derecha, la forma planta, la segunda en curvas y la tercera en tercera dimensión, donde 0 = planta sin síntomas y 1 = planta con síntomas .

El rendimiento es un parámetro que sirvió para comparar el efecto de las dos estrategias de manejo, los tratamientos que tuvieron el mayor rendimiento fueron las que se inocularon con *Bacillus subtilis* la cepa 1, la mezcla de la cepa 1 con la cepa 3 y la cepa 2 sola, con valores de 1130.0, 1045.0 y 947.3 gramos respectivamente. Los tratamientos con menor rendimiento fueron el Control no inoculado, la mezcla de *Bacillus subtilis* cepa 2 por 3 y el extracto de gobernadora (Bela Plus), con 570.3, 535.0 y 521.3 gramos respectivamente.

Cuadro 9. Rendimiento de los distintos tratamientos.

Tratamientos	Media* (g)
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1	1130.0 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	1045.0 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2	974.3 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	960.0 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 2 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	926.3 a
<i>Bacillus subtilis</i> (Biologic)	925.0 a
Dióxido de hidrogeno (Oxidate)	910.8 a
Esporas de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 30.00%, metabolitos de fermentación de hongos benéficos múltiples, flora microbiana benéfica de lixiviación de materia orgánica animal y vegetal, <i>Azotobacter</i> spp. chitosan hidrolizado. (Best Ultra R).	903.8 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa3	882.5 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 1 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 2	834.0 a

Control inoculado	766.3 a
Azibensolar-S-metyl (Actigar)	682.0 a
<i>Bacillus subtilis</i> (1x10 <sup>8</sup> UFC/ml) 40.00%, <i>Bacillus liqueniforme</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, <i>Lactobacilo</i> (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 5.00%, <i>Pseudomonas</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00%, <i>Azotobacter</i> spp. (1x10 <sup>5</sup> UFC/ml) 10.00% (Best Ultra F).	645.0 a
Aceite de lípidos graveoles 5.00%, extracto de semillas de citrus paradisiaca 1.00%, extracto de <i>Equinacea angustifolia</i> 5.00%, extracto de <i>Mimosa tenuiflora</i> 30.00%, salicilato de potasio, ácidos grasos omega 3, chitosan hidrolizado, sorbato de potasio. (Biobacter).	621.7 a
Control no inoculado	570.3 a
<i>Bacillus subtilis</i> cepa 2 x <i>Bacillus subtilis</i> cepa 3	535.0 a
Extracto de gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ) (Bela Plus).	521.3 a

\* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales.

### 3.1.7. Discusión

El uso de varias estrategias de manejo hace que el efecto de estas se potencialice haciéndola más eficiente contra la enfermedad o plaga deseada, generalmente se ha hecho del control químico la herramienta más usada en todos los sistemas de producción, actualmente se han estado buscando estrategia que sean menos contaminantes al medio ambiente y que sean saludables, por lo que las estrategias de manejo con productos inductores de resistencia es una buena herramienta que se puede utilizar dentro de los programas de manejo integrado de plagas y enfermedades, dentro de este manejo, existe una herramienta que ha sido poco explotada y que es el manejo correcto de la nutrición una herramienta que va de la mano con la capacidad de las plantas para defenderse de los patógenos, debido a que si las plantas presentan deficiencias de algún elemento esencial, sufren desbalances lo que las hace más susceptibles al ataque de enfermedades e incluso plagas.

Las Rhizobacterias han sido utilizadas como productos para la prevención de enfermedades del suelo, pero en algunas cepas se ha demostrado que tienen la capacidad de inducir resistencia a las plantas, principalmente las especies del genero *Pseudomonas* son las que mayormente han mostrado esta característica, pero también cepas del genero *Bacillus* se ha visto este efecto. En el presente trabajo se inocularon varias cepas *Bacillus subtilis* y algunos otros productos con bacterias del mismo género que ya se emplean de forma comercial, algunos se aplicaron en mezcla y otras de forma individual, estas aplicaciones tuvieron un buen efecto en el desarrollo de las

plantas, debido a que los tratamientos que tenían rizobacterias fueron las que presentaron la mayor altura en los tratamientos, esto debido a que este tipo de organismos tiene la capacidad de liberar reguladores de crecimiento, además de que ayudan a las plantas a asimilar mejor los nutrientes del suelo.

Las solución nutritiva Steiner, está basada en una relación equilibrada entre aniones y cationes la cual proporciona a las plantas los nutrientes necesarios para un óptimo desarrollo, sin que las plantas absorban cantidades en exceso o se lleguen a tener deficiencias de algún elemento, por esta razón se utilizó en la presente investigación como una herramienta de manejo del Cáncer bacteriano, al utilizar una solución nutritiva que proporcione a la planta los elementos necesarios para el crecimiento adecuado y que no sufra desbalances nutrimentales, haciendo que la planta sea más tolerante a las enfermedades realizando sus funciones metabólicas de forma correcta, lo cual al combinarlas con otras estrategias de manejo como los inductores de resistencia proporcionan a las plantas más estrategias de defensa de las plantas. Las concentraciones de amonio que tuvo la planta en durante todo su desarrollo se mantuvieron en los rangos óptimos que reporta Sánchez (2008), los cuales oscilaron entre los 405 y los 517 partes por millón (ppm) siendo que la concentración optima reportada es de 400 a 800 ppm (véase Cuadro 26 del capítulo II). En cuanto a las concentraciones de potasio, se encontraron niveles muy por encima de las concentraciones optimas (3000 a 5000, véase Cuadro 26 del capítulo II) porque se reportaron valores desde las 19000 a las 23900 partes por millón, lo cual pudo haber sido afectada por la interacción antagónica con otros elementos o por el exceso de este nutrimento. Walker, en 1969 en el libro *Plant pathology* reportó que el potasio incrementa el efecto de *Clavibacter michiganeis* en las plantas, por lo que al presentarse niveles tan altos de este elemento se podría explicar porque la incidencia de Cáncer bacteriano en este experimento fueron altas, presentándose en la mayoría de las plantas.

### 3.1.8. Conclusiones

- ❖ El uso de distintas herramientas para el manejo de enfermedades bacterianas es la mejor estrategia que se puede seguir para evitarlas y no depender de un solo método de control lo cual provoca que las enfermedades se vuelvan resistentes a los productos químicos rápidamente y se puede hacer un mejor manejo de las enfermedades.
- ❖ La nutrición de los cultivos, en el manejo de las enfermedades es una herramienta que relaciona adecuadamente los distintos nutrientes no hay desbalances en las plantas evitando que sean más susceptibles al ataque de las enfermedades y que cuando se combinan con otras herramientas como el uso de inductores de resistencia puedan dar mejores resultados y lograr manejar los problemas causados por fitopatógenos.
- ❖ Los inductores de resistencia y la nutrición no tienen efecto directo sobre los patógenos, más bien afectan las funciones metabólicas de las plantas haciéndolas más tolerantes a las enfermedades.

### 3.1.9. Literatura citada

- Duffy, B. K., and Défago, G. 1999. Macro and microelements fertilizers influence the severity of Fusarium crown and root rot tomato in a soilless production system. *HortScience* 34:287-291.
- Huber, D. M., and Arny, D. C. 1995. Interaction of potassium with plant diseases. *In: Potassium in agriculture*. R. D. Munson, (ed). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. pp.: 467-488.
- Huber, D. M., and Graham, R. D. 1999. The role of nutrition in crop resistance and tolerance to diseases. *In: Mineral Nutrition of Crops: Fundamental Mechanisms and Implications*. Z. Rengel, (ed). Food produces press, New York pp.: 169-204.
- Huber, D. M. and Thomson I., A. 2007. Nitrogen and plant disease. *In: Mineral Nutrition and plant disease*. Datnoff L. E., Elmer W. H., Huber D. M. (eds). APS press. Minnesota U.S.A. pp.: 31 – 44.
- Fucikovsky, Z. L. 1998. Manejo fitosanitario de las hortalizas en México. *In: Enfermedades de las hortalizas*, Nuñez, C. R. D. (ed). pp. 221.
- OEPP/EPPO (2003) EPPO Standards PM 7/42(1): EPPO A1 and A2 lists of quarantine pests. PM 7/42 (1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 35, 271 – 273. OEPP/EPPO, Paris (FR).
- Oteifa, B. A., 1953. Development of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, as affected by potassium nutrition of the host. *Phytopathology* 43:171-174.
- Rat, B.; Poissonnier, J.; Goisque, M.J.; Burgaud, A. (1991) Le point sur le chancre bactérien. *Fruit et Légumes* 86, 38-40.
- Rickard, D. A. 2000. Review of phosphorous acid and its salt as fertilizer materials. *Journal of plant nutrition*. 23: 161-180.

- Ramirez R., S. Osuna C., F. J de. Vázquez A., J.M.P. Bustamanete O. J. D. de. Canul K., J. Ocampo O., T. 2009. Plagas y enfermedades del jitomate cultivado en invernaderos y bioespacios del estado de Morelos. INIFAP. 79 p.
- Sanchez, G. P. 2008. Diagnostico nutrimental en tomate. *In: Jitomate tecnología para su producción en invernadero*. Bautista, M. N., Chavarin, P. C., Valenzuela, E. F. (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Estado de México. pp.: 113 – 140.
- Sandoval, V. M. 2008. Cultivo de jitomate en invernadero en México, con énfasis en nutrición. *In: Jitomate tecnología para su producción en invernadero*. Bautista, M. N., Chavarin, P. C., Valenzuela E. F. (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco Estado de México. pp: 11-34.
- Shohara, K., Williams, L. V., Duchase, D.A. y Lopez L. P. 1999. RIPA (Rapid Inmunofilter Paper Assay). *In: Métodos para detector patógenos sistémicos*. Docampo, D. M. y Lenardón S. L. (eds.) Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) INTA-JICA, Córdoba, Argentina. pp: 107-110.
- Tlapal B., B. 2008. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de tomate (*Solanum esculentum*). *In: Jitomate Tecnología para su producción en invernadero 2008*. Bautista M., N. Chavarin P., C. Valenzuela E., F. (Eds.). Colegio de Postgraduados. Chapingo, México pp: 65-94.
- Tsuda, S., Kameya-Iwaki, M., Hanada, Kouda, Y., Hikata, M. and Tomaru, K. 1992. A novel detection and identification technique for plant viruses: Rapid Inmunofilter Paper Assay (RIPA). *Plant Disease* 76: 466-469.
- Waltz, S. S., and Jones, J. P. 1973. Interaction in sources of nitrogen fertilizer and liming procedure in the control of Fusarium wilt of tomato. *HortScience* 8:137-138.