



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

POSTGRADO EN PROTECCIÓN VEGETAL

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Clavibacter michiganensis*
subsp. *michiganensis* EN SEMILLA DE *Solanum lycopersicum* Y
EVALUACIÓN DE ALTERNATIVAS BIORRACIONALES DE
MANEJO**

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ELI FERNÁNDEZ ALCÁNTARA



DIRECCION GENERAL ACAD
DEPTO. DE SERVICIOS ESCO
OFICINA DE EXAMENES PROFESI

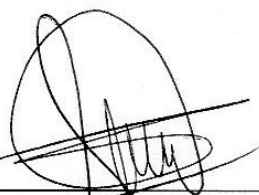


Abril del 2013

La presente tesis titulada: "Detección molecular de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semilla de *Solanum lycopersicum* y evaluación de alternativas biorracionales de manejo", realizada por el alumno **Eli Fernández Alcántara**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



ÁNGEL REBOLLAR ALVITER Ph. D.

CO-DIRECTOR:



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR:



NAHUM MARBAN MENDOZA Ph. D.

Chapingo, México, Abril del 2013.

Detección molecular de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semilla de *Solanum lycopersicum* y evaluación de alternativas biorracionales de manejo

Molecular detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in seeds of *Solanum lycopersicum* and evaluation of management alternatives biorational

Fernández-Alcántara, E., Rebollar-Alviter, A., Silva-Rojas, H. V. y Marban-Mendoza, N.

RESUMEN

Se realizó un estudio para detectar mediante la técnica de PCR, la presencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) en semilla de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), utilizando iniciadores específicos (CMM5/CMM6). Se utilizaron tres métodos para el incremento del inóculo primario a partir de sub lotes de 25 semillas, a) Extracción en tejido (pecíolo y foliolo) plántulas de 40 días b) germinación y luego BIO-PCR, y c) germinación de semillas, después se extrajo el DNA total. Se utilizaron siete variedades comerciales de las cuales cuatro fueron positivas a Cmm con el método que incluyó plántulas de 40 días y tres variedades con el método de germinación de semillas. Para el control de Cmm en plantas se probó Sulfato de cobre pentahidratado, peróxido de hidrógeno, extracto de semillas de cítricos, fermentaciones de bacterias y *Bacillus subtilis*. Los productos se asperjaron en plantas de 5 semanas de edad inoculadas artificialmente (6×10^8 CFU mL⁻¹), los tratamientos se establecieron en pre y en post inoculación a las 48 h. Ninguno de los tratamientos, tuvo un efecto en el control de la enfermedad. Los productos también se probaron por inmersión, en semillas infectadas artificialmente con Cmm (3×10^8 CFU mL⁻¹) adicionalmente se utilizó H₂SO₄ y FRACTAL® (Extracto de semillas de cítricos), posteriormente para la detección de Cmm en lotes tratados, se hizo por germinación y luego Bio-PCR. Ninguno de los tratamientos aplicados en semilla eliminó a la bacteria.

Palabras clave: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, PCR, BIO-PCR.

ABSTRACT

A study was conducted to detect by PCR, the presence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in seeds of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) using specific primers (CMM5 / CMM6). Three methods for increasing the primary inoculum from seed lots of 25, a) Extraction tissue (petiole and leaflet) 40 day seedlings b) germination and BIO-PCR, and c) seed germination, then the total DNA extracted. Seven commercial varieties of which four were positive for Cmm with the method that included seedlings 40 days and three varieties with seed germination method were used. Cmm control plants tested sulfate pentahydrate copper, hydrogen peroxide, citrus seed extract, fermentation of bacteria and *Bacillus subtilis*. Products were sprayed on plants of 5 weeks old artificially inoculated (6×10^8 CFU mL⁻¹), treatments were established in pre and post inoculation 48 h. None of the treatments had an effect in controlling the disease. The products were also tested by immersion in infected seeds artificially Cmm (3×10^8 CFU mL⁻¹) further H₂SO₄ and FRACTAL® (citrus seed extract) was used, subsequently for detecting Cmm in treated groups was made by germination and then Bio-PCR. None of the treatments applied in seed eliminated the bacteria.

Keywords: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, PCR, BIO-PCR.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a ti Ismael Fernández Alcántara, Agrónomo profesional, dedicado siempre a mejorar la vida de los demás, de la población necesitada, el bienestar de su familia, su incansable entusiasmo en innovar, mejorar cada día, siempre vio su interés por los demás, la ambición de los demás nunca te corrompió, y por eso ya no estás aquí, sin embargo aquí estaremos nosotros tu familia, tus padres, tus hermanos, tu esposa y tus hijos, que aunque ya no estés con nosotros, los que aún quedamos cuidaremos de los tuyos.

AGRADECIMIENTOS

*Al Consejo **Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de Postgrado.*

*A la **Universidad Autónoma Chapingo** y especialmente al **Departamento de Parasitología Agrícola** que mediante la **Maestría en Protección Vegetal**, me dieron la oportunidad de cursar mis estudios de Postgrado.*

A mi Director de Tesis, Dr. Ángel Rebollar Alviter, por su guía y apoyo, por darme las herramientas durante todo mi postgrado y fomentar en mí la motivación por seguir adelante.

A mi Codirectora de Tesis la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por su ayuda tanto a nivel experimental así como por apoyarme en la elaboración de los manuscritos presentados y fomentar en mí la motivación por la investigación, así como en su apoyo y plena confianza en mi trabajo; sin duda, sin ellos no habría sido posible la realización de esta Tesis.

Al Dr. Nahum Marbán Mendoza, por sus sabios consejos, que por su amplia experiencia de vida ha compartido con nosotros lo mejor con la orientación en mi formación y en el presente tema de investigación.

*A todas las personas que componen el tronco base de Profesores e investigadores **del Programa de Protección Vegetal**, por su por su instrucción, dedicación y por estar siempre dispuestos a formarnos.*

*Al **Colegio de Postgraduados** por abrirme las puertas y brindarme todo el apoyo tanto en Equipo, como en material de consulta, así como a las personas que laboran en el Laboratorio de Biotecnología y Bioquímica de Semillas.*

A mis padres: Luis Fernández y Angelina Alcántara, que siempre han cuidado de mí, y siempre han estado ahí para apoyarme, a mis hermanos, Joel, Areli, David, Lidia, Elda, Juan, a mis sobrinos, cuñados (as) la unidad nos fortalecerá para superar todas nuestras tragedias.

A mis compañeros y amigos Kenya Janet Rodríguez y Andrés Aguilar, quienes con sus oportunas consejos y orientaciones pudo realizarse este trabajo de investigación, también sin duda a quienes que compartimos juntos vivencias, aventuras, a mis inseparables amigas (os) Alejandra Marín, Martha Roblero, Edgar Huerta, Sandra Martínez y compañeros del postgrado.

DATOS BIOGRÁFICOS

ELI FERNANDEZ ALCANTARA

Nació un día 20 de agosto de 1979, en San Miguel Tenextatilóyan, Puebla, de origen rural y bajo el cobijo de una familia humilde, su interés por las ciencias naturales surge apenas cuando cursa la educación secundaria en su pueblo natal, siendo la biología, una de sus materias favoritas. Posteriormente en 1995 al ingresar al nivel medio superior en la Universidad Autónoma Chapingo, en la Preparatoria Agrícola, empieza su formación académica encaminada hacia la agronomía, esto le hace ver que la biología sigue siendo de su interés y que la Fitotecnia es una parte de la biología pero de manera aplicada. Posteriormente después de cursar los tres años de preparatoria, pasa directamente a la carrera y en 1998, ingresa a el Departamento de Fitotecnia, en la misma Universidad de Chapingo, egresando del mismo en el 2003, obteniendo el grado y título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia en el 2004.

En el 2005 inicia su experiencia laboral en la Secretaría de Desarrollo Rural del estado de Puebla, participando en programas como asesor y técnico agrícola, en cultivos de maíz, Cebada, en programas de Agricultura Protegida y Extensionismo Rural, se separa en el 2008 y se adjunta como Prestador de Servicios profesionales en la SAGARPA, hasta el 2010, en ese mismo año Ingresa a la Maestría en Protección Vegetal, del Departamento de Parasitología Agrícola, donde concluye satisfactoriamente.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	I
ÍNDICE DE CUADROS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
CAPITULO I: REVISIÓN DE LITERATURA	13
1.1. INTRODUCCIÓN	13
1.2. JUSTIFICACIÓN	14
1.3. OBJETIVO GENERAL	15
1.4. REVISIÓN DE LITERATURA	15
1.4.1. Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	16
1.4.1.1. Importancia y producción en el mundo	16
1.4.1.2. Producción en México	17
1.4.2. Cáncer bacteriano	18
1.4.2.1. Importancia y distribución	18
1.4.2.2. Características	19
1.4.2.3. Síntomas	19
1.4.2.4. Epidemiología	23
1.4.2.5. Manejo de la enfermedad	26
1.5. LITERATURA CITADA	31
CAPITULO II: Detección molecular de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en semilla de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>	37

L.).	
2.1. INTRODUCCIÓN	37
2.2. HIPÓTESIS	39
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.3.1. Semilla	40
2.3.2. Extracción de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) en semilla.	41
2.3.2.1. Siembra y obtención de tejido vegetal (peciolo y foliolo).	41
2.3.2.2. Semillas germinadas.	43
2.3.2.3. Semillas germinadas seguido por Bio-PCR.	44
2.3.3. Extracción de DNA genómico total.	45
2.3.3.1. Extracción de DNA a partir de tejido (foliolo y peciolo).	45
2.3.3.2. Extracción de DNA de semillas germinadas.	46
2.3.3.3. Extracción de DNA de semillas germinadas y luego Bio-PCR.	47
2.3.4. Cuantificación de DNA	47
2.3.5. Reacción en Cadena de La Polimerasa (PCR)	48
2.3.6. Electroforesis	48
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
2.4.1. Detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> por PCR con diferentes métodos de extracción.	50

2.4.1.1. Detección de <i>Cmm</i> por PCR en tejido foliar.	50
2.4.1.2. Detección por PCR en semillas germinadas.	51
2.4.1.3. Detección de <i>Cmm</i> en semillas germinadas y luego BIO-PCR.	51
2.4.2. Comparación de los métodos de extracción.	55
2.5. CONCLUSIONES	58
2.6. LITERATURA CITADA	60
CAPITULO III. Efecto pre y post infección de compuestos biorracionales para el manejo de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en plantas y en semilla	63
3.1. INTRODUCCIÓN	63
3.2. Hipótesis	66
3.3. MATERIALES Y METODOS	67
3.3.1. Material Vegetal	67
3.3.2. Material vegetal empleado para el aislamiento de la cepa de <i>Cmm</i> .	68
3.3.3. Aislamiento de la cepa de <i>Cmm</i> y confirmación por PCR.	69
3.3.4. Preparación de la suspensión bacteriana e inoculación	70
3.3.5. Efecto de tratamientos sobre la incidencia y severidad en pre y pos-inoculación	72
3.3.6. Análisis de las epidemias	74
3.3.6.1. Análisis de las tasas relativas de incremento de la enfermedad (TRIE).	74
3.3.6.2. Análisis de Área bajo la curva del progreso de la	75

enfermedad (ABCPE),	
3.3.7. Diseño experimental y análisis estadístico	75
3.3.8. Eficacia de tratamientos para saneamiento de semilla	76
3.3.8.1. Inoculación de la semilla	76
3.3.8.2. Tratamientos pre germinativos	77
3.3.8.3. Variables evaluadas	78
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
3.4.1. Aislamiento y confirmación de cepas de <i>Cmm</i> utilizadas en los experimentos.	79
3.4.2. Efecto de los tratamientos en la incidencia y severidad de <i>Cmm</i>	80
3.4.2.1. Análisis de las tasas relativas de incremento de la enfermedad (TRIE).	80
3.4.2.2. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE	83
3.4.3. Tratamientos a la semilla	86
3.5. CONCLUSIONES	89
3.6. LITERATURA CITADA	90
ANEXOS	94

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales países productores (ha) de tomate en el mundo (Fuente: FAOSTAT, 2012).....	16
Cuadro 2. Principales países productores por volumen (t) de cosecha en el mundo (Fuente: FAOSTAT, 2012).....	17
Cuadro 3. Síntomas causados por <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en tomate (De León et al., 2011).	20
Cuadro 4. Variedades de tomate que se utilizaron en el experimento.	40
Cuadro 5. Resultados respecto a los métodos de extracción de <i>Cmm</i> utilizados y luego la detección por PCR.....	55
Cuadro 6. Tratamientos aplicados en el control de <i>Cmm</i> en plantas inoculadas de 5 semanas de edad.	73
Cuadro 7. Tratamientos aplicados en semilla para eliminar a <i>Cmm</i>	77
Cuadro 8. Tasas relativas de incremento de la severidad determinadas con el modelo Gompertz, después de homologarlas, en los diferentes tratamientos aplicados para el control de <i>Cmm</i>	82
Cuadro 9. Modelos epidemiológicos para caracterizar el progreso temporal de severidad de <i>Cmm</i> de las epidemias (tratamientos), en plantas de tomate inoculadas artificialmente.	82
Cuadro 10. Área bajo la curva de la severidad del efecto de diferentes tratamientos aplicados para el control de <i>Cmm</i> en jitomate.	84
Cuadro 11. Efecto de los tratamientos aplicados en el porcentaje de germinación de las semillas tratadas.	88

Cuadro 12. Tasas de incremento total de las epidemias homogenizadas a un solo modelo, del primer ensayo. Parámetros epidemiológicos y estandarización de tasas de severidad de <i>Cmm</i> en diferentes tratamientos en jitomate ENSAYO 1.	94
Cuadro 13. Tasas de incremento total de las epidemias homogenizadas a un solo modelo, del primer ensayo. Parámetros epidemiológicos y estandarización de tasas de severidad de <i>Cmm</i> en diferentes tratamientos en jitomate ENSAYO 2.	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial del cáncer bacteriano (EEPO, 2010).....	19
Figura 2. Infección localizada por <i>Cmm</i> . A) Pequeñas lesiones blancas en tallo y pecíolo, B) Necrosis marginal en foliolos y C) Manchas típicas con halos blanquecinos en frutos, también llamados “ojo de pájaro” (De León <i>et al.</i> , 2011).....	21
Figura 3. . La infección sistémica en plantas de tomate por <i>Cmm</i> . A) Marchitamiento generalizado, B) Marchitamiento unilateral y necrosis en foliolos, C) Invasión del sistema vascular por el patógeno causando decoloración amarillo-marrón, D) Cancros en tallos en las etapas posteriores de desarrollo de la enfermedad, E), Exudado bacteriano que es observado cuando el tallo se abre y comienza la formación de cancro, F) Fruto infectado, el patógeno puede transmitirse a las semillas a través de los tejidos vasculares (De León <i>et al.</i> , 2011).	21
Figura 5. Frutos mostrando el síntoma “ojo de pájaro” inoculado artificialmente con <i>Cmm</i> , A. Fruto asperjado en floración con una solución bacteriana, B. Fruto inoculado con una suspensión con el uso de brocha cuando tenía un tamaño de 13 mm de diámetro (Medina <i>et al.</i> , 2001).	22
Figura 4. A) Áreas blancas disecadas de hoja dando la apariencia de quemado, B) Flacidez unilateral y marchitamiento en los foliolos, C) Marchitamiento de las plantas en invernadero. D) Infección local en la hoja pimiento dulce en vivero, E) Tejidos y haces vasculares infectados con apariencia harinosa del parénquima vascular (OEPP/EPPO, 2005).	22

Figura 6. Colonización de plantas de tomate por *Cmm* marcada con la proteína verde fluorescente (EGFP). Las plántulas de tomate se inocularon por punción, con una suspensión bacteriana en la unión de las dos primeras hojas y la localización de la cepa *Cmm* NCPPB382 marcada con la proteína EGFP fue examinada por microscopía focal de barrido láser en A, 3; B, 7, y C: 15; D, 30; E, 7, y F, 15 días posteriores. Las imágenes fueron tomadas longitudinalmente (A, D) y corte transversal (E), se derivan de tallo y hoja marchita (F). Las imágenes fueron capturadas a 3 cm por encima del sitio de inoculación (A, B, y E) y en la región apical (C, D, y F). Las flechas blancas indican vasos no colonizados. Los puntos rojos son plástidos. Las barras de escala: son de 20 micras en A, C, y E; 50 micras en B, D, y F (Chalupowicz *et al.*, 2012). 25

Figura 7. Bioluminiscencia de imágenes de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, colonización de plántulas de tomate bajo regímenes de humedad relativa baja (45%) y alta (83%) (HR) en tiempo real, las plántulas de tomate se inocularon mediante el recorte de los cotiledones cuando las plantas tenían 4 semanas de edad, se utilizó una Cepa BL-Cmm17, que es virulenta y constitutivamente bioluminiscente que contiene una inserción estable de los genes luxABCDE. Las imágenes de las mismas plántulas fueron tomadas a los 5, 10, 15, y 20 después de la inoculación día (DPI) utilizando un sistema de formación de imágenes in vivo. Imágenes de plántulas inoculadas con agua siendo el control (CK) se tomó 20 DPI. Las flechas apuntan a las señales de luminiscencia fuertes en los nodos (Fuente: Xu *et al.*, 2012). 26

Figura 8. Bioluminiscencia de imágenes con la cepa BL-Cmm17 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* la colonización de raíces de plántulas de tomate bajo regímenes de humedad relativa baja (45%) y alta (83%) (HR). Las imágenes fueron tomadas a los 5, 10, 15, y 20

días después de la inoculación (DPI) utilizando un sistema de formación de imágenes in vivo. Se muestran imágenes de raíces de plántulas inoculadas solo con agua siendo el control (CK) la imagen se tomó 20 DPI. Imágenes superiores fueron las raíces de las plántulas en condiciones de baja humedad relativa las imágenes inferiores estaban en condiciones de alta humedad relativa (Fuente: Xu <i>et al.</i> , 2012).	27
Figura 9. Presentación comercial de las variedades utilizadas en el ensayo.	40
Figura 10. Proceso de siembra y colecta de hojas de tomate (foliolos y peciolo). A) Charolas de polipropileno. B) Siembra de lotes de semilla. C) Plántulas después de 40 días después de la siembra, D) Corte de hojas. E) Colecta de muestras para laboratorio. F) Foliolos de un lote semillas sembradas. G) Hoja completa, flechas indican arriba foliolo y abajo peciolo. H) Pedazos de peciolo de 25 plantas. I) Peciolo completos.	42
Figura 11. Plántula de tomate, que se utilizaron la cuarta hoja para extracción de sub muestras de peciolo y foliolo por cada tratamiento o lote de semillas.	43
Figura 13. Colocación de semillas de tomate en cajas de Petri y papel filtro estériles.	44
Figura 12. Antes y después de la agitación con el bortex de lotes de semillas, para eliminar parte del fungicida de la cubierta.	44
Figura 14. Germinación de semillas, maceración y siembra en medio B de King. A. Plántulas obtenidas después de 120 h en cámara de germinación. B. Semillas germinadas C. Colocación de semillas germinadas en mortero estéril. D. Maceración. E. Siembra en medio. F. Recolección de macerado en tubo de 2 mL.	45

Figura 15. Nano Drop 2000c de Thermo®.	47
Figura 16. Proceso y material utilizado en el PCR a partir de cepas en medio de cultivo BK. A. Preparación y colocación de Solución maestra a los respectivos tubos. B. Termociclador BIORAD®-ADN Engine. C. Muestras previamente etiquetadas y preparadas.....	48
Figura 17 Gel de electroforesis amplificado de los productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Carril 1, marcador 1 kb, carril 2, control positivo de <i>Cmm</i> , carriles 3-9 extracción de semillas germinadas y luego PCR; 3. SUN 7705, 4. DKR 2180, 5. EL CID, 6. RESERVA, 7 RECOVA, 8. CONTROL (+), 10 (Erróneo). Carriles 11-24 extracción de tejido (peciolo y foliolo) y luego PCR; 11. SUN 7705 foliolo, 12. SUN 7705 peciolo, 13. DKR 2180 foliolo, 14. DKR peciolo, 15. EL CID foliolo, 16. EL CID peciolo, 17. RESERVA foliolo, 18. RESERVA peciolo, 19. RECOVA foliolo, 20. RECOVA peciolo, 21. Control (+) foliolo, 22. Control (+) peciolo, 23. Rio grande foliolo, 24. Rio grande peciolo.	50
Figura 18. Gel de electroforesis amplificado con los productos obtenidos en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, extracción por germinación y luego BIO-PCR, Carriles 1 y 15, marcador 1 kb, línea 2 – 11, variedades comerciales.....	52
Figura 19. Crecimiento de cepas bacterianas en medio B de King. A). Aislamiento de <i>Cmm</i> en tejido vegetal, purificada y posteriormente confirmada por PCR, colonias amarillo pálidas, B, C, D, E, F, G y H) cultivo de bacterias de las variedades evaluadas a partir del macerado de semillas germinadas.....	53
Figura 20. Invernaderos afectados por <i>Cmm</i> en Chignahuapan, Puebla. Los síntomas correspondieron a los descritos por De León <i>et al.</i> , (2011),	

Gleason <i>et al.</i> , (1993) y OEPP/EPPO (2005). A Y B) invernadero del Sr. Esteban O. C y D) Invernadero del Sr. Saúl Castilla.....	68
Figura 21. A. Colecta de tallos y frutos. B. La flechas indican el tallo de tomate, donde se observa los haces vasculares dañados de color amarillo a café, donde se encuentra la bacteria de <i>Cmm</i>	69
Figura 22. Cepas de <i>Cmm</i> purificadas y preparación de la suspensión. A y B) purificación de cepas en medio B de King, C. Escala de turbidez de MacFarland, D. el tubo de en medio corresponde a la suspensión bacteriana ajustada entre el tubo 1 y 2 de MacFarland, E) suspensión bacteriana final.	71
Figura 23. A) Preparación de palillos en suspensión bacteriana de <i>Cmm</i> , B) Inoculación a la altura de las hojas del cotiledón, C) la flecha indica la manifestación de los primeros síntomas por la infección sistémica.....	72
Figura 24. Inoculación de semillas cv. Rio grande, en suspensión bacteriana 3×10^8 de acuerdo a la escala de McFarland.	76
Figura 25. Amplificación de cepas de <i>Cmm</i> por PCR, líneas 1 y 22 marcador molecular 1 kb, línea 2 control positivo, líneas 2-5 10 amplificaciones con 100 ng en la reacción de PCR, los carriles 11-19 corresponden a las mismas muestras pero con 200 ng en la reacción de PCR, todos los aislamientos fueron de tallo.	79
Figura 26. Curvas de progreso temporal (% severidad) de las epidemias (tratamientos) en plantas tratadas.	81
Figura 27. Curvas de progreso temporal (% incidencia) de las epidemias (tratamientos) en plantas tratadas.	81
Figura 28. Área bajo la curva a través del tiempo en el testigo indicando el inicio de la enfermedad (yi), ABCPE, enfermedad final (yf).....	85

Figura 29. Amplificación de *Cmm*. Extracción por germinación y luego Bio-PCR, de los tratamientos aplicados a las semillas, líneas 1 y 18 marcador molecular 1 kb, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo, carriles 4 y 5 Phynthon 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 6 y 7 Tane citrus 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 8 y 9 Clean H₂O₂ 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 10 y 11 Romel 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 12 y 13 Protector 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 14 y 15 Fractal 5%, 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 16 y 17 Ac. sulfurico 0.5 y 1 N. 87

CAPITULO I: REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la aportación vegetal más extendida como recurso fitogenético para la alimentación a nivel mundial. La aceptación que tiene en las diversas culturas del mundo se evidencia por ser el segundo producto hortícola en el consumo en el planeta. Es un importante generador de empleo, sobre lo cual se registra un requerimiento de 140 jornales por hectárea, cuyas actividades se distribuyen en labores de cultivo y cosecha. En México el tomate está considerado como la especie hortícola más importante por la superficie sembrada que ocupa, y como la primera en su valor de producción, a esta hortaliza se encuentra en los mercados todo el año y se consume tanto fresca como procesada (Puré), es además, una fuente rica en vitaminas y antioxidantes (Pérez y Rico, 2004).

Unos de los factores de mayor importancia que afectan el rendimiento son las enfermedades bacterianas. Una de ellas es el cáncer bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) esta bacteria es una de las principales limitantes en la producción de tomate en el mundo (Borboa *et al.*, 2009).

Durante las décadas de los 30s, 60s, 80s y 90s en el estado de Michigan (USA), causó pérdidas considerables que oscilaban entre un 10 y hasta un 80% (Gleason *et al.*, 1993). A pesar de que la enfermedad se consideraba confinada en los estados del noroeste de los USA, en Sinaloa (México) se detectó e identificó el cancro bacteriano en el Valle de Culiacán, cuando de 1994 a 1996 se extendió rápidamente y se estableció en las principales áreas hortícolas de exportación de los Estados de Jalisco, San Luis Potosí, Baja California Sur y Baja California Norte (Holguín *et al.*, 2006), Tlapal (2008) menciona que también se ha presentado en los estados de Zacatecas, Querétaro, Hidalgo, Guanajuato, Michoacán y Estado de México. En Sinaloa, México Cmm ha resultado en sustanciales pérdidas económicas por 40 millones de dólares (Lara *et al.*, 2012). Tan solo en la temporada 2006-2007, en el Valle de Culiacán, se

presentó en aproximadamente 180 ha bajo invernaderos de producción, que introdujeron injertos procedentes del estado de Michoacán.

En invernaderos, la enfermedad es particularmente severa debido a condiciones de mayor humedad relativa y más baja intensidad luminosa (Ramírez y Sáinz, 2006). Borboa *et al.*, (2009) indica que también se ha observado en sistemas, donde se carece de protección bactericida contra el patógeno, haciéndose más común y más severa. En el estado de Morelos, en el ciclo de temporal 2008 en los principales municipios productores de jitomate a cielo abierto se afectaron una superficie de 1000 ha, las pérdidas que ocasionó esta enfermedad fueron del 70% hasta la pérdida total de 100%, donde se obtenían rendimientos en promedio de 25 ton ha⁻¹, lo que ocasionó un incremento en los costos de producción de alrededor de 10 a un 15% directamente en lo que respecta al consumo y aplicación de productos fungicidas, bactericidas que se creía que podían ayudar a corregir el problema (CESVMOR, 2010).

1.2. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país el tomate se produce en todas regiones, su importancia radica en ser la principal hortaliza de exportación y que genera divisas, además es una actividad que genera empleo. Una de las limitantes del cultivo es la incidencia de enfermedades una de ellas destaca por ser devastadora y por causar pérdidas económicas significativas, además del costo adicional para su manejo posterior y desinfestación. Se han realizado muchos trabajos para tratar de controlar el problema, hasta ahora no existen variedades resistentes y los productos utilizados de tipo biológico o químico no tienen efecto cuando ya se ha establecido el patógeno. Sin embargo, hasta ahora una de las estrategias que se pueden emplear es el uso de semilla libre de la bacteria que causa el cáncer bacteriano, la optimización de métodos para detectar la presencia de la bacteria en semilla se ha estudiado y se ha probado su eficacia en la detección, por tal razón en el presente trabajo se emplean las técnicas moleculares con el objeto de evidenciar que actualmente las variedades comerciales pueden ser portadoras de *Cmm* y que a pesar de que la legislación fitosanitaria limita su movimiento y comercialización, esta sigue siendo la principal fuente de inóculo.

También se plantean algunas alternativas para reducir o eliminar el patógeno en la semilla. Por último se plantea la evaluación de productos alternativos que comercialmente se presume pueden controlar a la enfermedad.

Ante la problemática actual de la enfermedad causada por *Cmm*, su diseminación principal por semilla contaminada, su manejo y la necesidad de buscar alternativas de control u erradicación, se planteó el presente trabajo bajo el siguiente:

1.3. OBJETIVO GENERAL

Identificar y detectar molecularmente la presencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), en lotes de semillas comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y evaluar algunas alternativas comerciales para el control en semilla y en planta.

1.4. REVISIÓN DE LITERATURA

1.4.1. Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

1.4.1.1. Importancia y producción en el mundo

El 75% de la producción mundial de tomate es para consumo en fresco, y el 25% para propósitos industriales (p. e. pastas, concentrados, salsas, jitomate pelado y rebanado). Tan solo en los países de China, India, Turquía, Estados Unidos y Egipto, se concentró el 50 % (2,238,110 ha) de la superficie total sembrada en el mundo, que en el 2010 fue de 4,412,757 ha y aportaron el 60% (79,404,974 t) de la producción total en el mundo que fue de 151,699,945 t. México ocupó el décimo lugar en superficie sembrada con el 2.23% (98,189 ha) (Cuadro 1) y también en volumen de producción, con apenas el 1.98% (2,997,640 t) (Cuadro 2), (FAOSTAT, 2012).

Cuadro 1. Principales países productores (ha) de tomate en el mundo (Fuente: FAOSTAT, 2012).

País	Superficies /ha	(%) Porcentaje que aporta cada país
Mundo + (Total)	4,412,757	100.00
China	924,735	20.96
India	634,400	14.38
Turquía	304,000	6.89
Nigeria	264,100	5.98
Egipto	216,385	4.90
Estados Unidos de América	158,590	3.59
Irán (República Islámica del)	146,985	3.33
Italia	118,822	2.69
Federación de Rusia	115,200	2.61
México	98,189	2.23

Cuadro 2. Principales países productores por volumen (t) de cosecha en el mundo
(Fuente: FAOSTAT, 2012).

País	Producción /t	Porcentaje que aporta cada país (%)
Mundo + (Total)	151,699,405	100
China	47,116,084	31.06
Estados Unidos de América	12,858,700	8.48
India	12,433,200	8.20
Turquía	10,052,000	6.63
Egipto	8,544,990	5.63
Italia	6,024,800	3.97
Irán (República Islámica del)	5,256,110	3.46
España	4,312,700	2.84
Brasil	4,114,310	2.71
México	2,997,640	1.98

1.4.1.2. Producción en México

En México se produce en los 32 estados de la república Mexicana, siendo los principales productores por superficie sembrada tan solo en el 2011 Sinaloa (15,999.18 ha), Michoacán (4,882.5 ha), Zacatecas (3,232.9 ha), Baja California (2,775.14 ha), Nayarit (2,773.0 ha), Veracruz (2,313.75 ha), Baja California Sur (2,299 ha), Morelos (2,176 ha), Jalisco (2,157.45 ha) y el resto en los demás estados, el total de superficie sembrada fue de 53,780.18 ha con una producción total de 1,872,481.69 t y un valor de la producción en miles de pesos por \$10,336,853.07 (SIAP, 2012).

Actualmente la producción de jitomate en México se realiza durante todo el año y en todas las entidades federativas, esto se ha asociado en gran medida por el avance en agricultura protegida. En el 2010 la superficie protegida cultivada creció de 750 ha en 1999 a 15,000 ha, un incremento del 95% en poco más de una década y durante los últimos tres años esta superficie ha crecido en un 40%, se espera continúe su

crecimiento a un ritmo promedio de 25% o 1200 ha por año (Alexander, 2012). Actualmente existen alrededor de 20 mil ha bajo agricultura protegida, de las cuales aproximadamente 12 mil son de invernadero y las otras 8 mil corresponden a malla sombra y macro túnel principalmente. Los principales cultivos que se producen bajo agricultura protegida son: el tomate (70%), pimiento (16%), pepino (10%). El 50% de la superficie con agricultura protegida se concentra en cuatro estados: Sinaloa (22%), Baja California (14%), Baja California Sur (12%) y Jalisco (10%) (SAGARPA, 2012).

1.4.2. Cáncer bacteriano

El cáncer bacteriano es ocasionado por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) fue reportado por primera vez en USA en 1909, y después en 1977 y 1992, en invernaderos de en Minesota (USA). Actualmente esta enfermedad se puede encontrar en todas las regiones donde se cultiva esta hortaliza (Hausbeck *et al.*, 2000).

1.4.2.1. Importancia y distribución

Es una de las enfermedades más importantes del tomate (*Solanum lycopersicum*) a nivel mundial (Fatmi y Saad, 1991). S. Miller indica que varios brotes de cancro bacteriano han causado graves pérdidas en la propagación de tomate y en los invernaderos de producción en Estados Unidos, Canadá, México y Guatemala en la década pasada (Xu, 2010).

Esta bacteria se presenta de manera esporádica pero cuando se establece puede ser muy destructiva por la capacidad que tienen para diseminarse fácilmente por semilla o de manera mecánica por las manos, herramientas de trabajo, podas y labores culturales. Cuando se presenta puede acabar con todas las plantas en las parcelas o invernaderos en semanas. De acuerdo a la European and Mediterranean Plant Protection Organization (EEPO), se encuentra distribuida en todas las zonas donde se cultiva tomate en el mundo (EEPO, 2010).

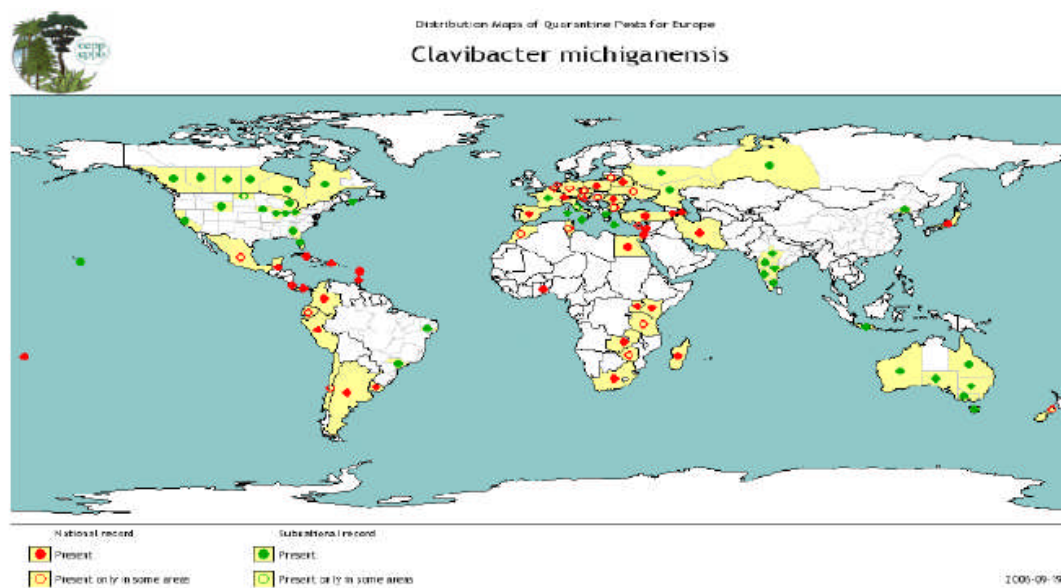


Figura 1. Distribución mundial del cáncer bacteriano (EEPO, 2010).

1.4.2.2. Características

Las células bacterianas tienen forma recta, ligeramente curvada o de varilla, miden 1.5-4 por 0.5-0.9 micrómetros. Las bacterias son inmóviles, pero algunas especies del género son móviles por medio de uno o dos flagelos polares. La bacteria es Gram positiva, sin crecimiento anaeróbico, con crecimiento aeróbico, forma colonias amarillas en medio YDC, colonias mucoides cuando es cultivada a 30°C (Agrios, 2005; Shaad *et al.*, 2001).

1.4.2.3. Síntomas

Las plantas de tomate afectadas por el cáncer bacteriano muestran una variedad de síntomas (Tabla 3; Figuras 2, 3, 4 y 5), que dependen del lugar de producción (en invernadero o de campo), de la edad de la planta, el tiempo de la infección, las prácticas culturales, los cultivares, la susceptibilidad y otros factores (De León *et al.*, 2011; OEPP/EPPO, 2005). Además, hay pruebas de cepas que producen síntomas menos severos (OEPP/EPPO, 2005). El tipo de infección puede ser sistémica o localizada (Cuadro 3) (Gleason *et al.*, 1993).

Cuadro 3. Síntomas causados por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate (De León *et al.*, 2011).

Infección	Síntomas	Modo de infección
Sistémica	Marchites; hojas y folíolos unilateralmente; común en etapas iniciales (Figuras 2A, 2B y 4B). Decoloración vascular amarillo-marrón (Figura 2C, 4E). Cancros formados en tallos y peciolo (Figura 2D).	Semillas infestadas o plántulas que fueron infectadas desde la emergencia y hasta la edad de plántulas. Invasión vascular desde las semillas infestadas o la introducción del patógeno por heridas.
Localizada	Necrosis marginal localizada de folíolos que aparecen secos y rizados de abajo hacia arriba (Figura 3B). "Ojo de pájaro" síntoma que se desarrolla en frutos (Figura 3C, 5A y 5B). Pequeñas ampollas que se desarrollan en tallos (Figura 3A).	La infección por tricomas rotos o aberturas naturales tales como estomas e hidátides.

En general, *Cmm* causa infección sistémica de plantas de tomate (OEPP/EPPO, 2005). En las infecciones sistémicas, el patógeno invade el vascular tejidos (Figuras 2C y 4E), y las plantas se marchitan (Figuras 2A y 4C) frecuentemente el marchitamiento se observa en un lado de las hojas en las primeras etapas, al menos durante los períodos de mayor evapotranspiración (Figuras 2B y 4B) (OEPP/EPPO, 2005; De León *et al.*, 2011), y con menos frecuencia, aparecen cancros en los tallos (Figura 2D) (De León *et al.*, 2011). Bajo las condiciones que favorecen el desarrollo bacteriano (25°-30°C y evapo-transpiración de estrés), las hojas se marchitan y se arrugan en unos pocos días (Figura 3C), finalmente toda la planta se seca. En condiciones menos favorables, el marchitamiento irreversible, será retrasado y la planta no puede mostrar ningún marchitamiento cuando la defoliación se hace por el manejo del cultivo (OEPP/EPPO, 2005).

En un cultivo en invernadero, la enfermedad a menudo puede ser reconocida en una etapa temprana por presentar solamente áreas verdes, entre las venas de la hoja que rápidamente se secan a blanco pálido y posteriormente se observa una necrosis

café que puede dar a la planta una apariencia quemada por el sol, o como de una sobredosis con una sustancia química. Pequeñas áreas afectadas pueden unirse y producir grandes zonas necróticas (Figura 4A) (OEPP/EEPO, 2005).

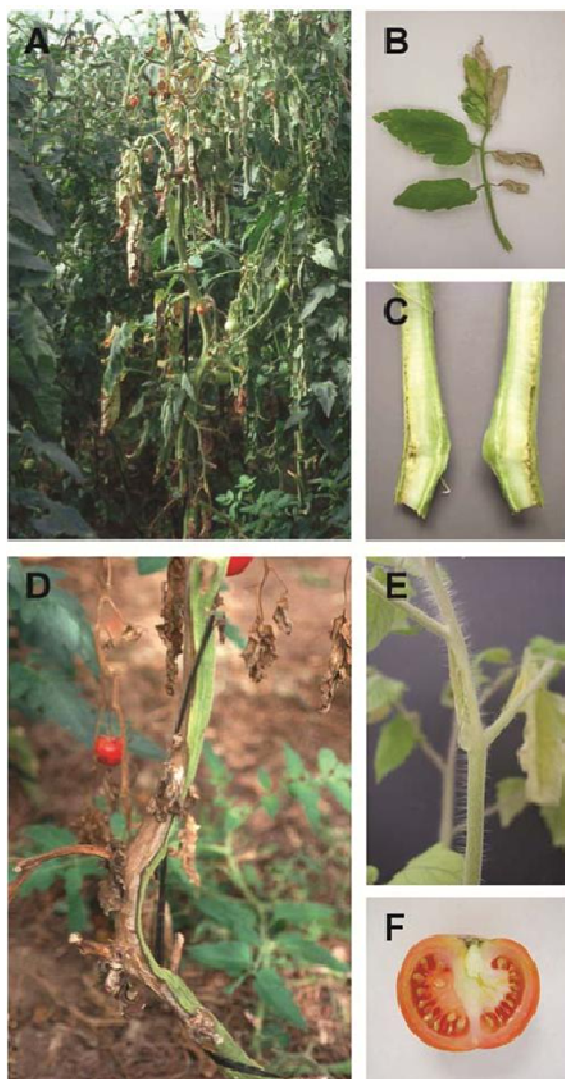


Figura 3. . La infección sistémica en plantas de tomate por *Cmm*. **A)** Marchitamiento generalizado, **B)** Marchitamiento unilateral y necrosis en folíolos, **C)** Invasión del sistema vascular por el patógeno causando decoloración amarillo-marrón, **D)** Cancros en tallos en las etapas posteriores de desarrollo de la enfermedad, **E)**, Exudado bacteriano que es observado cuando el tallo se abre y comienza la formación de cancro, **F)** Fruto infectado, el patógeno puede transmitirse a las semillas a través de los tejidos vasculares (De León *et al.*, 2011).

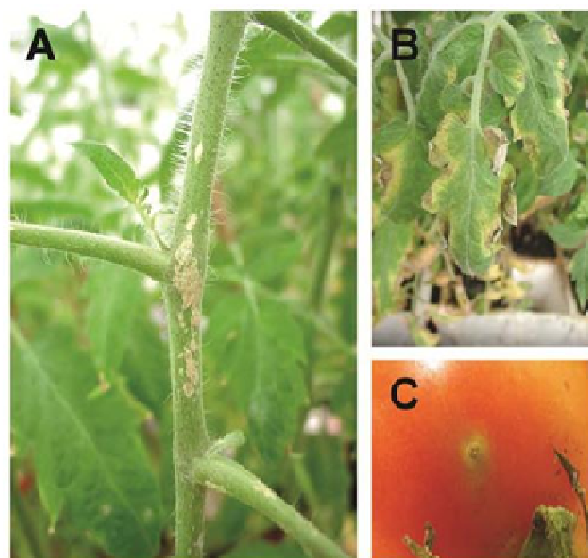


Figura 2. Infección localizada por *Cmm*. **A)** Pequeñas lesiones blancas en tallo y pecíolo, **B)** Necrosis marginal en folíolos y **C)** Manchas típicas con halos blanquecinos en frutos, también llamados "ojo de pájaro" (De León *et al.*, 2011).



Figura 4. **A)** Áreas blancas disecadas de hoja dando la apariencia de quemado, **B)** Flacidez unilateral y marchitamiento en los folíolos, **C)** Marchitamiento de las plantas en invernadero. **D)** Infección local en la hoja pimiento dulce en vivero, **E)** Tejidos y haces vasculares infectados con apariencia harinosa del parénquima vascular (OEPP/EPPO, 2005).

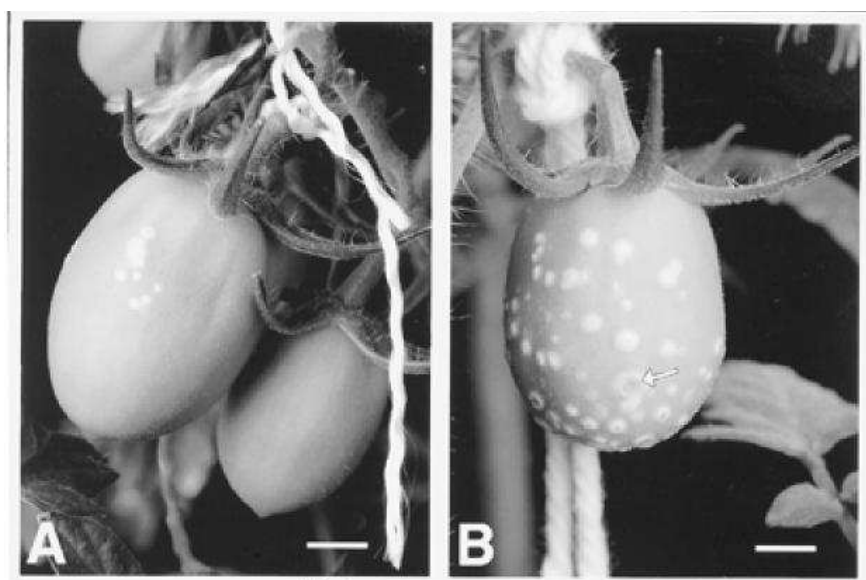


Figura 5. Frutos mostrando el síntoma “ojo de pájaro” inoculado artificialmente con *Cmm*, **A.** Fruto asperjado en floración con una solución bacteriana, **B.** Fruto inoculado con una suspensión con el uso de brocha cuando tenía un tamaño de 13 mm de diámetro (Medina *et al.*, 2001).

En plantas de tomate inoculadas en condiciones de invernadero, el vástago se abre, y un flujo de gotitas que contienen masas de bacterias se puede observar (Figura 2E) cuando la humedad relativa es alta (De León *et al.*, 2011). Generalmente, la infección por *Cmm* no se expresa en las plantas jóvenes. Sin embargo, el marchitamiento puede ocurrir temprano en plantas injertadas, posiblemente, incluso en

el vivero, y en las hojas de plantas jóvenes se pueden desarrollar manchas como resultado de infecciones locales en condiciones de humedad excesiva (Figuras 4A y 4B) (OEPP/EPPO, 2005).

Infecciones externas pueden ser cuando la bacteria entra a través de tricomas rotos o aberturas naturales en las hojas, flores y frutos que pueden mostrar infecciones localizadas. *Cmm* puede ser transmitida a las semillas en los frutos en desarrollo, a través de los tejidos vasculares de la planta madre (Figura 2F) (Carlton *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 2001). Necrosis marginal de las hojas (Figura 3B) es el síntoma más frecuente durante las epidemias de campo. Cancros en los tallos (Figura 3A) y lesiones en los frutos "ojo de pájaro" (Figuras 3C, 5A y 5B), derivadas de infecciones locales. Los frutos de plantas infectadas de forma sistémica, pueden no desarrollar síntomas y caer ó madurar de manera desigual. Las manchas típicas de las hojas o frutos, derivados de la infección local, no se encuentran en los invernaderos, a menos que se utilice el riego por aspersión (OEPP/EPPO, 2005).

1.4.2.4. Epidemiología

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) puede sobrevivir durante varios meses en diferentes estructuras de invernaderos e implementos, pero la supervivencia de *Cmm* en el suelo durante largos períodos de tiempo sólo es posible cuando las bacterias están asociadas con restos de plantas (Gleason *et al.*, 1993).

En semilla, la transmisión parece ser muy baja, pero con infección latente, las plantas jóvenes se consideran muy importantes para la propagación de *Cmm* (OEPP/EPPO, 2005; Crescenzi y Fanigliulo, 2011). También puede diseminarse mediante el agua, labores culturales, implementos, suelo, etc., una vez introducida en un cultivo, se traduce en que en poco tiempo la infección sea generalizada y el cultivo sea destruido (Chang *et al.*, 1991). La semilla enferma generalmente da origen a plantas aparentemente sanas las cuales al llegar a la madurez desarrollan síntomas (OEPP/EPPO, 2003; Chang *et al.*, 1992). Las semillas infectadas o trasplantes son considerados como la fuente de inóculo primario en campo abierto o en invernadero (Gitaitis *et al.* 1991; Tsiantos, 1987; Chang *et al.*, 1991). Estudios de producción en

campo ha demostrado que una sola semilla en 10,000, puede ocasionar una epidemia en condiciones favorables (Chang *et al.*, 1991; Gitaitis *et al.*, 1991). Otro estudio ha demostrado que en lotes de semillas infestadas con menos de 58 CFU g⁻¹, no causaron daño en condiciones de invernadero, mientras que en lotes con 1000 CFU g⁻¹ provocó síntomas en el 4% de las plantas (Hadas *et al.*, 2005).

Las plántulas asintomáticas pueden escapar de la inspección y causar las epidemias después del trasplante. Un estudio previo mostró que las plantas crecidas a partir de semillas infestadas artificialmente estaban contaminadas con 10⁴ a 10⁸ CFU g⁻¹ en plántula (Tsiantos *et al.*, 1987). También las plántulas cultivadas a partir de semillas infectadas naturalmente, pueden llevar de 10³ a 10⁴ CFU g⁻¹ del patógeno en los brotes (Shirakawa *et al.*, 1991). En la producción de plántulas en invernadero, debido a que la densidad es muy alta, *Cmm* se propaga fácilmente a través del riego y el contacto de hoja a hoja. Se sabe que *Cmm* es buena endófita y se mueve en el xilema después de su entrada a través de heridas o aberturas naturales (Carlton *et al.*, 1998; Gartemann *et al.*, 2008), fácilmente pueden colonizar el xilema en direcciones tanto acropétala y basipétala (Figura 6, 7 y 8) (Xu *et al.* 2012; Chalupowicz *et al.*, 2012).

Las heridas mecánicas, son fácilmente realizadas durante el injerto, podas, cosecha, transporte y trasplante, promueve la difusión de *Cmm* directamente en el tejido vascular (Chang *et al.*, 1991). El ingreso por hidátodos también es posible.

Las condiciones óptimas para el desarrollo de los síntomas en tomate del cancro bacteriano son temperaturas cálidas (23 a 28 °C) y alta humedad relativa (HR) (> 80%) (Basu, 1966).

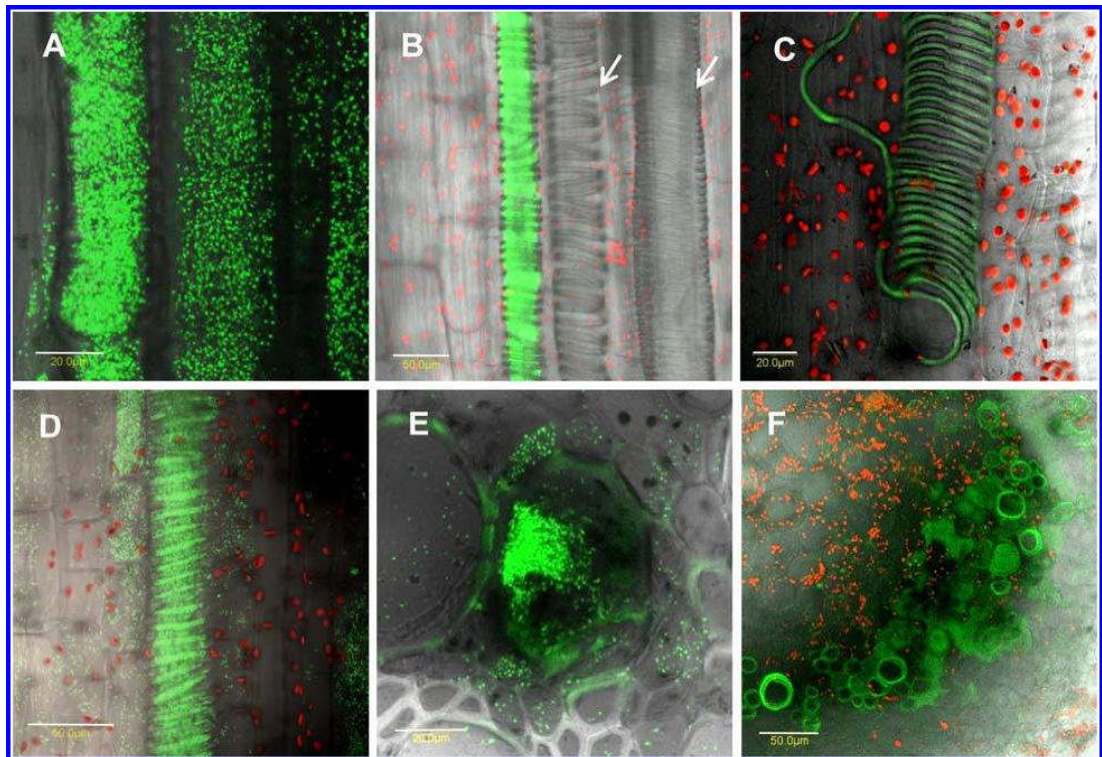


Figura 6. Colonización de plantas de tomate por *Cmm* marcada con la proteína verde fluorescente (EGFP). Las plántulas de tomate se inocularon por punción, con una suspensión bacteriana en la unión de las dos primeras hojas y la localización de la cepa *Cmm* NCPPB382 marcada con la proteína EGFP fue examinada por microscopía focal de barrido láser en A, 3; B, 7, y C: 15; D, 30; E, 7, y F, 15 días posteriores. Las imágenes fueron tomadas longitudinalmente (A, D) y corte transversal (E), se derivan de tallo y hoja marchita (F). Las imágenes fueron capturadas a 3 cm por encima del sitio de inoculación (A, B, y E) y en la región apical (C, D, y F). Las flechas blancas indican vasos no colonizados. Los puntos rojos son plástidos. Las barras de escala: son de 20 micras en A, C, y E; 50 micras en B, D, y F (Chalupowicz et al., 2012).

Las heridas que se producen durante la producción de plántulas y el mantenimiento de los cultivos, facilita la diseminación del patógeno. La dinámica de la infección bacteriana en plántulas a través de heridas se ha visualizado con el empleo de cepas bioluminiscentes que contienen una inserción estable de los genes *luxABCDE* esto ha facilitado el monitoreo de la dinámica de infección de *Cmm* en plántulas en tiempo real (Figura 7 y 8) (Xu et al., 2012).

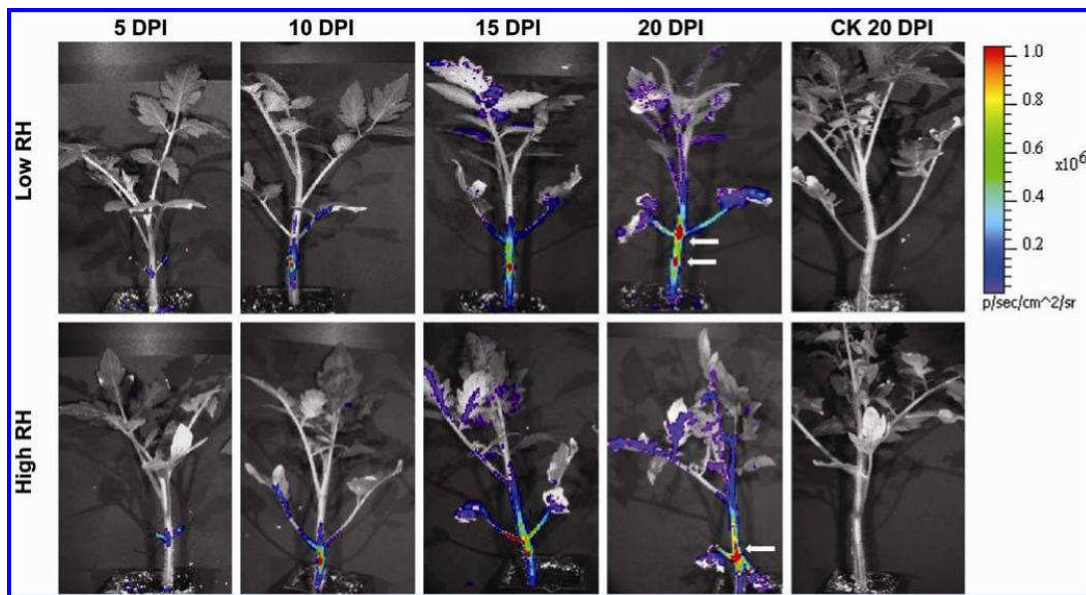


Figura 7. Bioluminiscencia de imágenes de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, colonización de plántulas de tomate bajo regímenes de humedad relativa baja (45%) y alta (83%) (HR) en tiempo real, las plántulas de tomate se inocularon mediante el recorte de los cotiledones cuando las plantas tenían 4 semanas de edad, se utilizó una Cepa BL-Cmm17, que es virulenta y constitutivamente bioluminiscente que contiene una inserción estable de los genes luxABCDE. Las imágenes de las mismas plántulas fueron tomadas a los 5, 10, 15, y 20 después de la inoculación día (DPI) utilizando un sistema de formación de imágenes in vivo. Imágenes de plántulas inoculadas con agua siendo el control (CK) se tomó 20 DPI. Las flechas apuntan a las señales de luminiscencia fuertes en los nodos (Fuente: Xu et al., 2012).

1.4.2.5. Manejo de la enfermedad

Las recomendaciones preventivas contra el cáncer bacteriano, se sugiere el uso de semilla certificada y plántulas sanas, la des infestación del invernadero, la extracción de plantas enfermas y de residuos de cosecha, se recomienda no hacer la rotación de cultivos con otras especies de plantas *Solanaceas* por lo menos durante dos años (Gleason et al., 1993).

A pesar del hecho de que numerosos cultivares moderadamente resistentes están presentes en el mercado (Poysa, 1993), actualmente no hay variedades o híbridos altamente resistentes disponibles en el mercado (De Vries y Stephens, 1997).

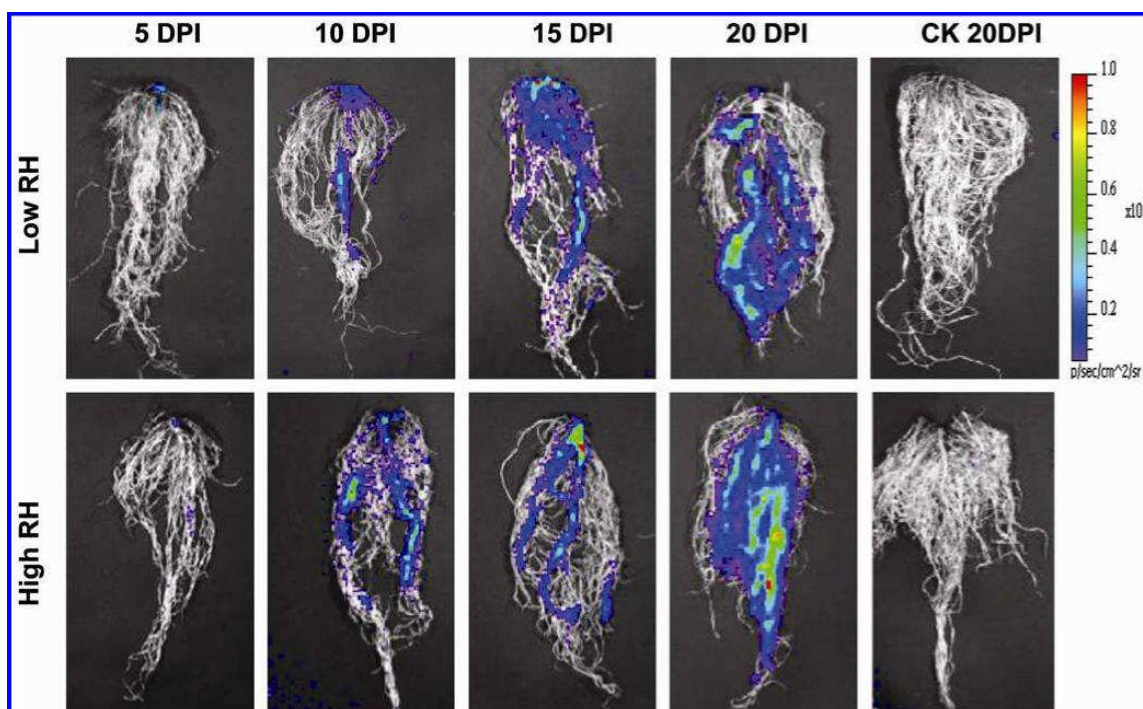


Figura 8. Bioluminiscencia de imágenes con la cepa BL-Cmm17 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* la colonización de raíces de plántulas de tomate bajo regímenes de humedad relativa baja (45%) y alta (83%) (HR). Las imágenes fueron tomadas a los 5, 10, 15, y 20 días después de la inoculación (DPI) utilizando un sistema de formación de imágenes in vivo. Se muestran imágenes de raíces de plántulas inoculadas solo con agua siendo el control (CK) la imagen se tomó 20 DPI. Imágenes superiores fueron las raíces de las plántulas en condiciones de baja humedad relativa las imágenes inferiores estaban en condiciones de alta humedad relativa (Fuente: Xu *et al.*, 2012).

En lo que se refiere al control químico, los productores tienen opciones limitadas en el control de cáncer bacteriano en el campo. Solo dos antibióticos han sido probados en el control del cáncer bacteriano (Hausbeck *et al.*, 2000; Milijasevic *et al.*, 2009), uno es Estreptomicina, este reduce la población de *Cmm* en plántulas y en invernadero (Hausbeck *et al.*, 2000), el antibiótico Kasugamicina (Kasumin: de Arista Life Sciences), ha mostrado reducir el crecimiento de *Cmm in vitro* (Theodoro y Maringoni, 2000), y un estudio en campo, mostró reducir la severidad de la enfermedad (Miller *et al.*, 2007), Estreptomicina y Kasugamicina pueden ser utilizados como tratamientos a la semilla. Algunos agricultores aplican bactericidas de forma preventiva,

mientras que otras aplicaciones después de presentar síntomas han aparecido. El control de la enfermedad es factible por aplicación de antibióticos tales como estreptomicina, aunque su uso está prohibido en la mayoría de los países (Baysal *et al.*, 2005).

El uso de bactericidas normalmente incluye múltiples aplicaciones de compuestos de cobre, ya sea solos o en mezcla con mancozeb (Gleason *et al.*, 1993; Hausbeck *et al.*, 2000), cada siete a 10 días. Sin embargo el uso a largo plazo de estos bactericidas, puede inducir la resistencia de las cepas bacterianas (Cooksey, 1990).

Uno de los métodos posibles de la reducción de la incidencia de *Cmm* es la inducción de resistencia en la planta. Varios estudios recientes han demostrado la eficacia de acibenzolar-S-metilo (ASM), el cual induce la resistencia sistémica adquirida, limitando las poblaciones y el crecimiento de *Cmm* (Baysal *et al.*, 2003) especialmente cuando se combina con variedades resistentes e hidróxido de cobre (Werner *et al.*, 2002), la reducción de la enfermedad se logra cuando las plantas son tratadas previamente de 3 a 6 días antes de la inoculación (Milijasevic *et al.*, 2009). La resistencia inducida por la aplicación del Ácido DL- β -amino butírico (BABA) contra *Cmm*, han demostrado también la supresión y el desarrollo de la enfermedad, su aplicación antes de la inoculación resulta en el incremento de la actividad de las enzimas phenylalanine ammonia-lyase, peroxidasas y la concentración de H₂O₂ en la planta (Baysal *et al.*, 2005).

Prácticas usadas en el control de *Cmm* en suelo son la solarización (Slevin *et al.*, 2004). La sobrevivencia de *Cmm* y su transmisión por las raíces en cultivos hidropónicos puede reducirse con un pH de 4.0-4.5 en la solución nutritiva (Huang y Tu, 2001).

Métodos de control biológico o biocontrol de *Cmm*, se han evaluado recientemente, algunos de los biocontroladores utilizados son, *Bacillus subtilis* (Quadra 136), *Trichoderma harzianum* (Rootshield) y lisozima para prevenir la incidencia del chancro bacteriano en invernadero (Utkhede y Koch, 2004), otros agentes de control biológico, son bacterias antagónicas y hongos endomicorrizas, como *Streptomyces*

(Zhang *et al.*, 2011), diferentes cepas nativas de *Pseudomonas fluoresces* habitantes de la rizosfera en tomate, han demostrado reducir la incidencia y aparición de síntomas (Amckras *et al.*, 2010) sin embargo depende de la cepa utilizada, pues otras pueden no tener efecto (Xu, 2010).

El empleo de variedades de tomate resistentes, representaría la medida de control más eficaz contra *Cmm*. Las fuentes de resistencia al patógeno del cáncer bacteriano, se han encontrado en varios parientes silvestres de *Solanum lycopersicum* y son: *Solanum peruvianum*, *S. habrochaites* (*Lycopersicum hirsutum*) y *S. pimpinellifolium* (*L. pimpinellifolium*) (Berry *et al.*, 1989; Francis *et al.*, 2001; Kabelka *et al.*, 2002), el análisis de la expresión de los genes que le confieren resistencia a especies silvestres y susceptibles, fue estudiado recientemente por Lara *et al.* (2012). Para identificar los genes involucrados en la respuesta de la enfermedad, diferentes genes mostraron expresiones contrastantes entre especies silvestres y resistentes, estos son altamente regulados en especies silvestres, pero poco regulados en especies susceptibles de tomate, las interacciones de incompatibilidad de estos genes entre especies silvestres de tomate y *Cmm*, debe ser estudiado todavía así como la función de cada gen involucrado.

Balaji y Smart (2012) generaron plantas transgénicas que manifiestan la sobre expresión de dos proteínas de tomate, *Snakin-2* (SN2) un péptido rico en cisteína con actividad antimicrobiana de amplio espectro in vitro y la proteína similar a las extensinas (*extensin-like-protein*, ELP), una de las principales proteínas en la pared celular relacionada con la respuesta de la planta al ataque de patógenos, la acumulación de estas en plantas modificadas, mostraron una tolerancia a *Cmm*, reflejado por un atraso en el desarrollo y progreso de la enfermedad.

Los bacteriófagos pueden ser útiles como métodos de biocontrol de *Cmm* en campo. El primer fago conocido para *Clavibacter michiganensis* fue aislado en 1947, pero sus características y propiedades no se describieron, posteriormente Echandi y Sun (1973), aislaron y caracterizaron parcialmente un bacteriófago aislado en tomate designado como CMP1, en este estudio se realizó con el propósito de utilizarlo en la

identificación de *Clavibacter michiganensis* en su hospedero. Recientemente Wittmann *et al.* (2010a) y Wittmann *et al.*, (2010b), realizaron el análisis molecular y genómico del fago CMP1 y las secuencias genómicas parciales del fago CN77 (un fago de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*), ellos demostraron que la actividad de endoliosinas de ambos bacteriófagos se limitan únicamente a especies de *Clavibacter michiganensis* y no afectan otras bacterias, la especificidad de endoliosinas de estos fagos, pueden ser herramientas útiles para el control biológico en plantas. El fago CMP1 es altamente específico a *Cmm* y actualmente estudios se encuentran en proceso, con el objeto de generar plantas transgénicas de tomate, que contengan los genes que expresen las endoliosinas del fago (Wittmann *et al.*, 2010b). Comercialmente se puede encontrar en el mercado un producto llamado Agriphage® (OmniLytics Company) que contiene un fago específico y se recomienda su aplicación en cultivos de tomate y chile. Este bacteriófago es altamente selectivo a *Xanthomonas campestris* pv. *versicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, cuenta con registro EPA y está disponible desde hace algunos años en el mercado (OmniLytics, 2006).

1.5. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5a Ed. Academic Press. USA. 922 p.
- Alexander, L. M. 2012. Potencia en agricultura protegida.
- Amkraz, N., Boudbyach, E. H., Boubaker, H., Bouizgarne, and Ben Aoumar, A. A. 2010. Screening for fluorescent pseudomonades, insolated from rhizosphere of *tomato*, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. World Journal Microbiology Biotechnology 26:1059-1065.
- Balaji, V., and Smart, C. D. 2012. Over espression of *Snakin-2* and *extensin-like protein* genes restricts pathogen invasiveness and enhances tolerance to *Clavibancter michiganensis* subsp. *michiganensis* in trasgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). Trasgenic Research 21:23-37.
- Basu, P. K. 1966. Conditions for symptomatological differentiation of bacterial canker, spot, and speck of tomato seedlings. Canadian Journal of Plant Science 46:525-530.
- Berry, S. Z., Madumadu, G. G., Uddin, M. R., and Coplin, D. L. 1989. Virulence studies and resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato germplasm. Horticultural Science 24:362-365.
- Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E. O., Acedo-Felix, E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo-Juarez, O., y García-Ortega, A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el tomate en el Estado de Sonora. Revista Fitotecnia Mexicana 32:319-326.
- Baysal, Ó., Soyly, M. E., and Soyly, S. 2003. Induction of defense related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Pathology 52:747–753.
- Baysal, O., Gursoy, Y.Z., Ornek, H., and Duru, A. 2005. Induction of oxidants in tomato leaves treated with dl- β -Amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. European Journal of Plant Pathology 112: 361-369.
- Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E. O., Acedo-Felix, E., Ponce, J. F., Cruz-Villegas, M., García-Hernández, J. L., y Ortega-Nieblas, M. M. 2010. Evaluación de la actividad antibacterial in vitro de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Tropical and Subtropical Agroecosystems 12:539-547.

- Carlton, W. M., Braun, E. J., and Gleason, M. L. 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology* 88:525-529.
- CESVMOR. 2010. Campaña manejo fitosanitario del jitomate. *Monitor Agrícola* 4:4-6.
- Chalupowicz, L., Zellermann, E. M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Savidor, A., Sessa, G., Iraki, N., Barash, I., and Manulis-Sason, S. 2012. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* 102:23-31.
- Chang, R. J., Ries, S. M., and Pataky, J. K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology* 81:1276-1281.
- Chang, R. J., Ries, S. M., and Pataky, J. K. 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker of tomato. *Phytopathology* 82:553-560.
- Crescenzi, A., and Fanigliulo, A. 2011. Serious Outbreak of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato in Southern Italy. *Acta Horticulture* 914:43-46.
- Cooksey, D. A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 28:201-219.
- Dhanvantari, B. N. 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11:400-408.
- De León, L., Silverio, F., López, M. M., and Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a seedborne tomato pathogen; healthy seeds are still the goal. *Plant Disease* 95:1328-1338.
- De Vries, R. M., and Stephens, C. T. 1997. Response of first generation tomato somaclone progeny to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Science* 126:69-77.
- Dreier, J., Bempohl, A., and Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85:462-468.
- Echandi, E., and Sun, M. 1973. Insolation and characterization of a bacteriophage for the identification of *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology* 63:1398-1401.
- EPPO. 2010. Data sheets on cuarentines pest. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO A2 List. No. 50.

- Fatmi, M., Schaad, N. W., and Bolkan, A. 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Disease* 75:383-385.
- FAOSTAT. 2012. in: FAO; Producción agrícola <http://faostat.fao.org/> [En línea] Fecha de consulta: 30 de octubre del 2012.
- Francis, D. M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B., and St. Clair, D. 2001. Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA 407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease* 85:1171-1176.
- Gartemann, K. H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., and Goesmann, A. 2008. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal Bacteriology* 190:2138-2149.
- Gleason, M. Braun, E. J., and Peterson, R. H. 1993. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 1:1519-1523.
- Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., and Voloudakis, A. E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease* 75:834-838.
- Hadas, R., Kritzman, G., Klietman, F., Gefenand, T., and Manulis, S. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology* 54:643-649.
- Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R., and Fulbright, D. W. 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology* 90:38-44.
- Holguín-Peña, R. J., Vázquez-Juárez, R. C., and Rueda-Puente, E. O. 2006. Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease* 90:1150.
- Huang, R., and Tu, J. C. 2001. Effects of nutrient solution pH on the survival and transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in hydroponically grown tomatoes. *Plant Pathology* 50:503-508.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J., and Eichenlaub, R. 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology* 1:113-118.
- Jones, J. P., Jones, J. B., Stall, R. E., and Zitter, T. A. 1993. Diseases of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). The American Phytopathological Society.

<http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Tomato.aspx> [En línea]
Fecha de consulta: 10 febrero 2013.

- Kabelka, E., Franchino, B., and Francis, D. M. 2002. Two loci from *Lycopersicum hirsutum* LA407 confer resistance to strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 92:504-510.
- Lara-Ávila, J. P., Isordia-Jasso, M. I., Castillo-Collazo, R., Simpson, J., and Alpuche-Solís, A. G. 2012. Gene expression analysis during interaction of tomato and related wild species whit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Molecular Biology Reporter* 30:498-211.
- Medina-Mora, C. M., Hausbeck, M. K., and Fulbright, D. W. 2001. Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease* 85:88-91.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., Rekanović, E., and Stepanovic, S. 2009. Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. *Pestic. Phytomed. (Belgrade) Serbia* 24:19-27.
- Miller, S. A., Mera, J. R., Xu, X., and Baysal, F. 2007. Evaluation of productos of to manege bacterial canker of processing tomatoes. *PDMR* 2:V038.
- Omnilytics. 2006. OmniLytics the phage company
<http://www.omnilytics.com/products/agriphage/agriphage3.html> [En línea] Fecha de consulta: 15 de septiembre del 2012.
- OEPP/EPPO. 2003. Quarantine pest prepared by CABI and EPPO for the E. U. under contract 90/399003 Data sheets on quarantine pests. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_ds.pdf [En línea] Fecha de consulta: agosto del 2011.
- OEPP/EPPO. 2005. Normes OEPP EPPO: Standards diagnostics *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* PM 7/42 . *Bulletin* 35:275–283.
- Poysa, V. 1993. Evaluation of tomato breeding lines resistant to bacterial canker. *Canadian Journal of Plant Pathology* 15:301-304.
- Pérez-Moreno, L., y Rico-Jaramillo, E. 2004. Virus fitopatógenos de importancia económica en el Estado de Guanajuato. Primera Edición. Universidad de Guanajuato. 143 p.
- SAGARPA. 2012. Agricultura protegida 2012.
<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Agricultura-Protegida2012.aspx>
[En línea] Fecha de consulta: 22 de junio 2012.

- Shaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3th ed. The American Phytopathological Society. St. Paul Minesota, USA. 373 p.
- Shirakawa, T., Sasaki, T., and Ozaki, K. 1991. Ecology and control of tomato bacterial canker and detection methods of its pathogen. Japan Agricultural Research Quarterly 25:27-32.
- SIAP. 2012. <http://www.siap.gob.mx> [En línea] Fecha de consulta: 1 de Noviembre del 2012.
- Slevin., E., Mahrer, Y., Kritzman, G., and Katan, J. 2004. Survival of plants pathogens under structural solarization. Phytoparasitica 32:470-478.
- Theodoro, S. A., and Maringoni, A. C. 2007. *In vitro* and *in vivo* action of chemicals on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causal agent of the bacterial canker of tomato. Scientia Agricola 57:439-444.
- Tsiantos, J. 1987. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. Journal Phytopathology 119:142-146.
- Tlapal-Bolaños, B. 2008. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo de jitomate (*Solanum sculentum*). In: Jitomate; Tecnología para su producción en invernadero. Bautista, M. N., Chavarin, P. C., y Valenzuela, E. F. (Editores). 2ª Edición, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 213 p.
- Utkhede, R., and Koch, C. 2004. Biological treatments to control bacterial canker on greenhouse tomatoes. Biocontrol 49:305-3013.
- Weihong, Z., Wenxiang, Y., Qingfang, M., Yaning L., and Daqun, L. 2011. Screening and identification of antagonistic *Streptomyces* spp. against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato rhizosphere. Frontiers of Agriculture in China 4:159–164.
- Werner, N. A., Fulbright, D. W., Podolsky, R., Bell, J., and Hausbeck, M. K. 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. Plant Disease 86:535-542.
- Wittmann, J., Eichenlaub, R., and Dreiseikelmann, B. 2010a. The endolysis of bacteriophages CPM1 and CN77 are specific for lysis of *Clavibacter michiganensis* strains. (Abstract) Microbiology 156:2366-2373.
- Wittmann, J., Gastemann, K. H., Eichenlaub, R., and Dreiseikelmann, B. 2010b. Genomic and molecular analysis of phage CPM1 from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Bacteriophage 1:6-13.

- Xu, X. 2010. Seed trasnmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and development of strategies to control the pathogen in seed. (Tesis the Degree Doctor of Philosophy). Oio The Ohio State University. The Ohio State University, E.U. 164pp. . [http:// etd.ohiolink.edu/send-pdf.cgi/Xu%20Xiulan.pdf?osu1291083855](http://etd.ohiolink.edu/send-pdf.cgi/Xu%20Xiulan.pdf?osu1291083855). [En línea] Fecha de consulta: Octubre del 2012.
- Xu, X., Rajashekara, G., Paul, P. A., and Miller, S. A. 2012. Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. *Phytopathology* 102:177-184.
- Yuce, E. K., Yigit, S., and Tosun, N. 2011. Efficacy of solarization combined with metam sodium and hydrogen peroxide in control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouse. (Abstract) *Acta Horticulturae* (ISHS) 914:385-391.
- Zanon, J. M., and Jordá, C. 2008. Eradication of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by incorporating fresh crop debris into soil: preliminary evaluations under controlled conditions. *Crop Protection* 27:1511-1518.
- Zhang, W., Wenxiang, Y., Qingfang, M., Yaning, L., and Daqun, L. 2010. Screning and identification of antagonistic *Streptomyces* spp. Against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato rhizosphere. *Frontiers of Agriculture in China* 4:159-164.

CAPITULO II: Detección molecular de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semilla de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

2.1. Introducción

El control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es particularmente importante para los productores de semillas de tomate porque las semillas infectadas se considera la fuente de inóculo primario y la legislación actual prohíbe su comercialización (León *et al.*, 2006). La diseminación de estas semillas infectadas es la causa principal de nuevos brotes de cáncer bacteriano y su distribución en todo el mundo, por lo tanto se ha establecido que la estrategia más importante para controlar el cáncer bacteriano es el uso de semillas libres de patógenos (Rademaker y Janse, 1994; Janse y Wenneker, 2002). En este sentido existen varios métodos de diagnóstico fiables para detectar este agente patógeno importante.

Los métodos convencionales usados para la detección e identificación de este patógeno incluyen ensayos bioquímicos, mediante el contenido de ácidos grasos de la membrana y el perfil metabólico. Estos métodos, sin embargo, tienen varias limitaciones, incluyendo una pobre sensibilidad, falta de especificidad y el de esperar un periodo largo para obtener los resultados (León *et al.*, 2006). Otros métodos además de los anteriores utilizados para la detección de *Cmm* incluyen: el diagnóstico de la enfermedad y la identificación del patógeno, que generalmente se basa en una de las siguientes: SA (aglutinación en placa), ELISA (enzymelinked immunosorbent assay), IF (inmunofluorescencia), PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y bioensayo en tomate (OEPP / EPPO, 2005). El ensayo por PCR proporciona una rápida prueba para la detección de *Cmm* en el tejido vegetal infectado (Dreier *et al.*, 1995).

Sin embargo, la precisión de los métodos de detección de *Cmm* presentan limitaciones en la sensibilidad cuando se quiere detectar en semilla; en un nivel muy bajo de bacterias es difícil detectarse con las pruebas serológicas comunes. En estas pruebas para mejorar la detección, es conveniente incrementar la concentración de

bacterias, al menos hasta el umbral en que las pruebas de ELISA comunes la detecten (Petrina y Bedland, 2012; Milijasevic *et al.*, 2009).

Es por ello que diferentes métodos de extracción de *Cmm* en las semillas han sido evaluados simultáneamente, estos incluyen primero realizar a) molienda de semillas (con adición de un paso de centrifugación) ó b) remojo (con o sin agitación) en solución búfer fosfato, luego se realiza 1) PCR directo, 2) Bio-PCR (primero se siembra en medio selectivo y luego se realiza la PCR) 3) enriquecimiento de PCR (en este método se utiliza un medio semi selectivo líquido estéril para el incremento de *Cmm* y luego se realiza la PCR). La extracción de *Cmm* por molienda de semillas ha sido mejor que el remojo de semillas. La técnica de Bio-PCR ha mostrado ser una técnica sensible para detectar a *Cmm* en semilla (Milijasevic *et al.*, 2009; Hadas *et al.*, 2005). Con Bio-PCR se ha detectado a *Cmm* en lotes de 5000 semillas que contienen una semilla infestada con tasas infección de 156 a 3990 CFU semilla⁻¹, comparativamente con PCR directo y solo en lotes que contienen de 5 a 10 semillas infestadas solo puede ser detectada por PCR directo y también por Bio-PCR (Hadas *et al.*, 2005). Resultados similares fueron obtenidos por Milijasevic *et al.* (2009) al detectarla en lotes de 5000 semillas con una semilla infestada, sin embargo no especifican la concentración de CFU contenida en la suspensión de extracción utilizada. Por otra parte los mismos autores detectaron a *Cmm* por PCR directo, Bio-PCR, y enriquecimiento de PCR, solo en muestras que contenían cinco semillas infectadas en lotes de 5000 semillas.

Una herramienta rápida y fácil de utilizar para el diagnóstico en campo, es con el empleo de InmunoStrip® (Agdia), para detección en suelo y en tejido vegetal (hoja y tallo), su sensibilidad de detección es de 10⁷ CFU mL⁻¹, aunque también puede reaccionar en forma cruzada con *Cm* subsp. *nebraskensis*, *Cm* subsp. *insidiosus*, *Cm* subsp. *sepedonicus* y *Xanthomonas campestris transluciens*, sin embargo no se ha observado que compartan el mismo hospedante en muestras reales en campo (Agdia, 2012)

A pesar de que actualmente en México la norma oficial mexicana NOM-007-FITO-1995 impide la comercialización de semilla contaminada por *Cmm* esta sigue

siendo el principal medio de diseminación del patógeno, por lo tanto se ha planteado el siguiente experimento bajo el siguiente objetivo:

Detectar molecularmente mediante la técnica de PCR la presencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en lotes de semillas de variedades comerciales de tomate.

2.2. Hipótesis

Algunas variedades comerciales son portadoras de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Semilla

Se adquirieron siete híbridos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tipo Saladette de crecimiento determinado e indeterminado, de las principales variedades comerciales que actualmente son cultivadas en los estados del centro de México, en invernaderos, casas sombras y en campo abierto (Cuadro 4).

Cuadro 4. Variedades de tomate que se utilizaron en el experimento.

	Variedad	Lote	Empresa	Tipo de crecimiento
1	SUN7705	11076430003	Nunhems	Indeterminado
2	DRK 2180	1263184	De Ruiter Seeds	Indeterminado
3	EL CID	Q65502	Harris Moran	Indeterminado
4	RESERVA	I92652	Vilmorin	Indeterminado
5	RECOVA	0111260654	Seminis	Determinado
6	CONTROL (+) ¹	No determinado	No Determinado	Indeterminado
7	RIO GRANDE	ND	Caloro Seed	Determinado

¹ Semilla proporcionada por un laboratorio de diagnostico fitosanitario, la muestra fue positiva a *Cmm*, por derechos del laboratorio no se muestran la variedad y lote correspondiente.



Figura 9. Presentación comercial de las variedades utilizadas en el ensayo.

2.3.2. Extracción de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) en semilla.

Antes de la obtención del DNA genómico total, se procedió a colocar los lotes de semilla comercial dividiendo en sub muestras de 25 semillas de cada una de las 7 variedades evaluadas probando tres métodos para incremento, antes de PCR: A) siembra y obtención de tejido (peciolo y foliolo), B) germinación de semillas seguido de Bio-PCR y C) germinación de semillas.

2.3.2.1. Siembra y obtención de tejido vegetal (peciolo y foliolo).

Se sembraron sub lotes de 25 semillas en charolas de germinación, la semilla tal y como se encuentra sin tratamiento. Se usó como sustrato Peat Moss #3, y charolas de polipropileno (Figura 10A y B). El sustrato fue esterilizado al menos una vez en el autoclave a 120°C por 20 min y se establecieron bajo condiciones de invernadero, a 27°C en promedio desde de la emergencia y hasta la aparición de las 2 hojas del cotiledón, solo se regaron con agua tal y como proviene de pozo de extracción sin agregar nutrientes, después de la aparición de las primeras hojas verdaderas, las plántulas se regaron diariamente con una solución nutritiva de Steiner (1984) al 50% hasta que se utilizaron para la extracción.

Luego de que las plantas adquirieron una altura promedio de 15 a 20 cm y con cuatro hojas verdaderas totalmente expandidas (Figura 10C y 11), (40 días después de la siembra), se colectó el cuarto foliolo de cada planta juntando 25 foliolos de cada lote sembrado, el método de corte fue por quiebre y no se usaron tijeras ni otras herramientas que tuvieran contacto con la parte herida. Se separaron los foliolos y peciolos obteniendo dos muestras de tejidos vegetales (peciolos y foliolos) para la extracción posterior de DNA (Figura 10D, E, F, G, H, I).



Figura 10. Proceso de siembra y colecta de hojas de tomate (foliolos y peciolo). **A)** Charolas de polipropileno. **B)** Siembra de lotes de semilla. **C)** Plántulas después de 40 días después de la siembra, **D)** Corte de hojas. **E)** Colecta de muestras para laboratorio. **F)** Foliolos de un lote semillas sembradas. **G)** Hoja completa, flechas indican arriba foliolo y abajo peciolo. **H)** Pedazos de peciolo de 25 plantas. **I)** Peciolo completos.

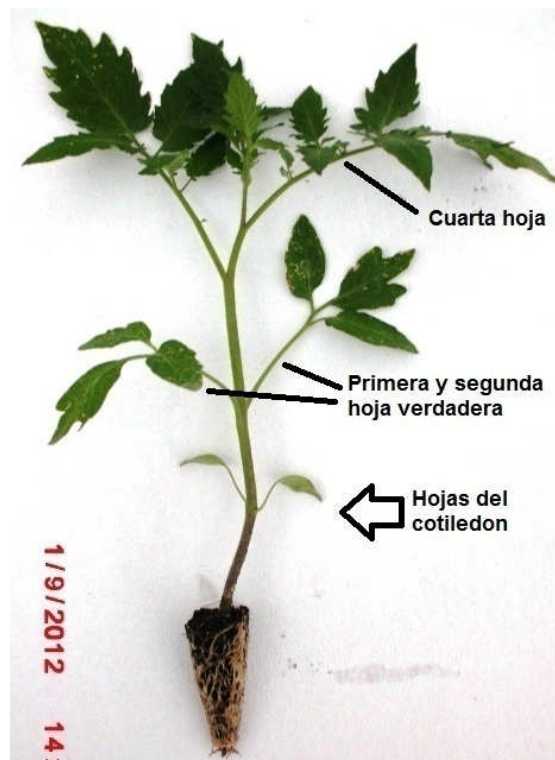


Figura 11. Plántula de tomate, que se utilizaron la cuarta hoja para extracción de sub muestras de peciolo y foliolo por cada tratamiento o lote de semillas.

2.3.2.2. Semillas germinadas.

Se utilizaron 25 semillas de cada variedad. Para eliminar el posible efecto del fungicida (generalmente Thiram) con el que viene tratadas las semillas, estas se colocaron en tubos Eppendorf, adicionando 2 mL de agua destilada, se agitaron durante 15 min en un vortex (Figura 12) y se dejaron escurrir en una malla por 5 min. Posteriormente las semillas de cada variedad se pusieron en cajas de Petri previamente esterilizadas en autoclave con papel filtro, y se les adicionó entre 5 a 10 mL de agua destilada estéril, las cajas se sellaron con parafilm y se establecieron en una cámara de germinación controlada, con luz blanca 24 hrs y 28°C por 120 h (Figura 13).

Las semillas germinadas se colocaron en un mortero (estéril) con 2 mL de agua destilada estéril y se maceraron hasta obtener una mezcla uniforme (Figura 14A, B, C y D). El macerado de las semillas germinadas se colocaron en tubos de 2 mL y se almacenaron a -20°C hasta su utilización para la extracción de DNA (Figura 14D y F).



Figura 12. Antes y después de la agitación con el vortex de lotes de semillas, para eliminar parte del fungicida de la cubierta.

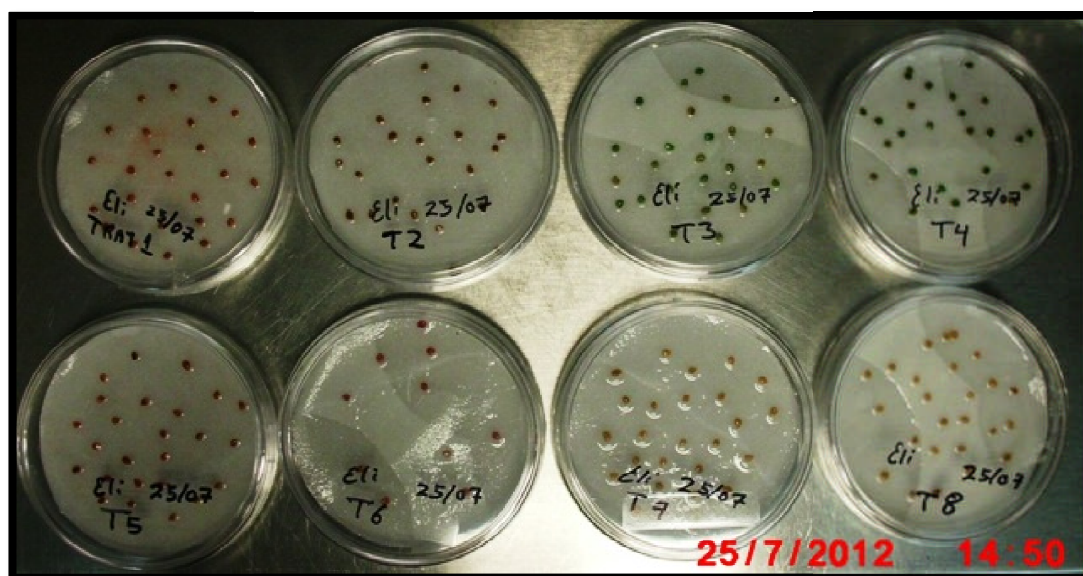


Figura 13. Colocación de semillas de tomate en cajas de Petri y papel filtro estériles.

2.3.2.3. Semillas germinadas seguido por Bio-PCR.

En este proceso se derivó del método b) de las mismas semillas germinadas de cada lote que se colocaron en un mortero (estéril) con 2 mL de agua destilada estéril y se maceraron hasta obtener una mezcla uniforme (Figura 14A, B, C y D), entonces con un asa bacteriológica flameada y enfriada se sumergió sobre el macerado y se realizó la siembra en medio de cultivo por estría continua en toda la caja de Petri (Figura 14E), las cajas se incubaron a medio ambiente por cinco días hasta su utilización.

Para la siembra de *Cmm* se utilizó como medio de cultivo B de King (Proteosa peptona #3 al 2 %, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.15 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 %, agar 1.5 %, glicerol 1 % y agua destilada 1000 mL) (Shaad *et al.*, 2001).

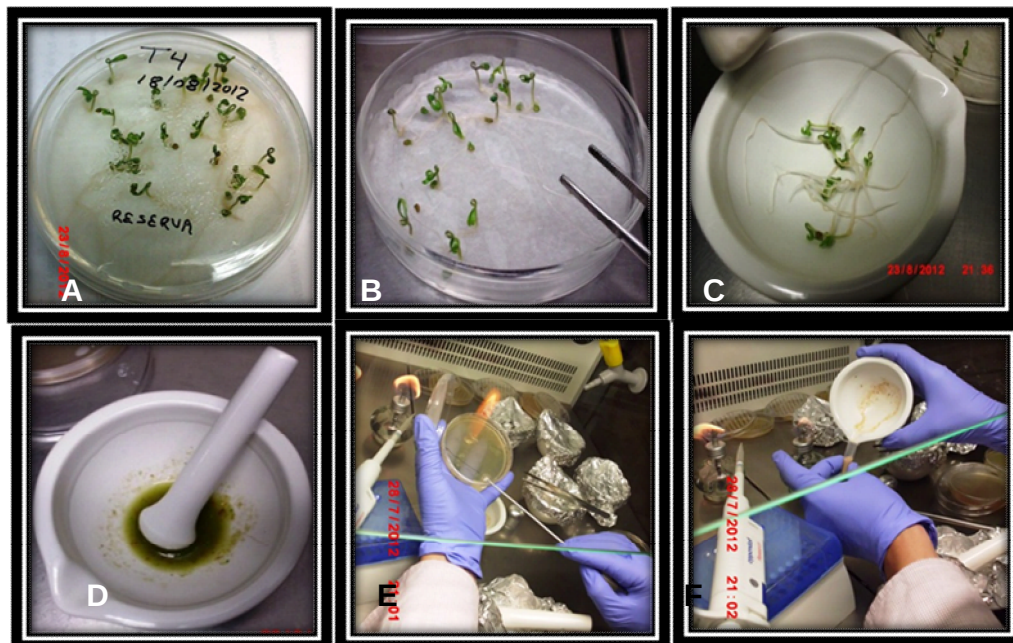


Figura 14. Germinación de semillas, maceración y siembra en medio B de King. **A.** Plántulas obtenidas después de 120 h en cámara de germinación. **B.** Semillas germinadas. **C.** Colocación de semillas germinadas en mortero estéril. **D.** Maceración. **E.** Siembra en medio. **F.** Recolección de macerado en tubo de 2 mL.

2.3.3. Extracción de DNA genómico total.

Para la obtención de DNA total se utilizó el protocolo de Doyle y Doyle (1990) el cual consiste en obtener el DNA genómico con CTAB (método de bromuro de cetil-trimetil amonio).

2.3.3.1. Extracción de DNA a partir de tejido (foliolo y peciolo).

Se realizó la siguiente modificación al protocolo, antes de realizar el paso 2), se tomó un trozo de cada foliolo y peciolo de cada una de las 25 hojas de diferentes plantas (Figura, 10F y H), formando una sub muestra, que luego se colocó en un morteros de porcelana y macerado con la adición de Nitrógeno líquido, posteriormente se realizó el paso 2 y continuando el protocolo como se describe a continuación.

Protocolo de Doyle y Doyle (1990).

1. Se calentó la solución amortiguadora (CTAB) a 65°C en baño maría,

2. Posteriormente se colocaron aproximadamente 100 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de 2 mL,
3. Se le agregó 1 mL de solución amortiguadora CTAB. Se mezcló por inversión, para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora.
4. Posteriormente se incubaron los tubos previamente etiquetados en un baño maría a 65 °C durante 90 min.
5. Se retiraron los tubos del baño maría y se dejaron enfriar durante 5 a 10 min, para después agregar 500 µL de cloroformo: alcohol isoalnilico (24:1). Se agitaron los tubos por inversión durante 10 min a temperatura ambiente.
6. Se centrifugó a 3500 rpm a temperatura ambiente durante 10 min para formar la fase acuosa y la fase orgánica (de color verde oscuro).
7. Se recuperó aproximadamente 750 µL de la fase superior acuosa y se vació en un tubo nuevo de 1.5 mL. Se repitió el tratamiento con cloroformo en la fase acuosa para obtener DNA más puro, aunque en menor cantidad.
8. Después se agregó 1/2 volumen de etanol al 100% previamente enfriado en un refrigerador a -20°C. Se mezcló por inversión para favorecer la precipitación del DNA.
9. A continuación se centrifugó a 3500 rpm a temperatura ambiente durante 30 min para precipitar y formar la pastilla de DNA en el fondo del tubo. Se desechó el etanol por decantación
10. Se agregó 1 mL isopropanol al 70 %. Se lavó suavemente la pastilla de DNA. Se desechó el alcohol por decantación y se repitió el lavado. Se dejó que el alcohol se evaporará a temperatura ambiente hasta que la pastilla se secó. Finalmente, se re suspendió la pastilla en 50 µL de Elution Buffer. Se guardaron las muestras a -20°C hasta utilizarlas.

2.3.3.2. Extracción de DNA de semillas germinadas.

Para la obtención de DNA genómico se utilizó el método CTAB (método de bromuro de cetil-trimetil amonio) y se partió a partir del macerado de semillas germinadas, esto fue colocado en un tubo de 2 mL (Figura 14F), se siguió el mismo protocolo de Doyle y Doyle (1990), pasando directamente al paso 4) usando solamente aproximadamente 1

mL de macerado y a este se le agrego directamente 1 mL la solución CTAB y se realizaron los mismo pasos hasta el 10.

2.3.3.3. Extracción de DNA de semillas germinadas y luego Bio-PCR.

De las cepas obtenidas de la siembra del macerado en medio B de King, se utilizó el método de CTAB realizando las siguientes modificaciones al protocolo en los siguientes pasos:

1) En este paso la solución amortiguadora (CTAB) se calentó a 95°C.

2) Con una azada flameada, se tomó del medio de cultivo una masa suficiente de bacterias y se mezcló por inmersión a un tubo de 2 mL, homogeneizándola con 1000 µl la solución amortiguadora CTAB.

Posteriormente se realizaron los pasos, como indica el protocolo y en los pasos 6 y 9, se centrifugó a 10,000 rpm.

2.3.4. Cuantificación de DNA

Todas las muestras obtenidas por diferentes métodos de extracción de *Cmm*, se cuantificaron en un espectrofotómetro Nano Drop 2000c de Thermo® (Figura 15) y se determinó la relación 260/280 nm el cual indica la calidad del DNA, si este se encuentra libre de proteínas y la relación 260/230 nm que indica la presencia o ausencia de fenoles.



Figura 15. Nano Drop 2000c de Thermo®.

2.3.5. Reacción en Cadena de La Polimerasa (PCR)

Para todas las muestras obtenidas, se amplificó la región *pat-1*, correspondiente los genes que le confieren patogenicidad a la bacteria de *Cmm* que se encuentran en el plásmido pCM2 que genera un producto de 614 bp usando los primers diseñados por Dreier *et al.* (1995). Los primers específicos fueron CMM5 (5'-GCG AAT AAG CCC ATA TCA -3') y CMM6 (5'-CAG GAG CGT GTC GCT AAT -3') (Reverse y Fordward), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizó de acuerdo con el protocolo de los mismos autores.

Las reacciones de PCR consistieron de 0.5 μL de cada primer, 5 μL de Buffer 1x, 13.2 μL de agua HPLC 0.3 μL de *Taq* DNA polimerasa (Promega, USA), 0.5 μL de dNTP's, 5 μL de DNA (20 ng μL^{-1}) para un volumen total de 25 μL (Figura 16A). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador (BIORAD®-DNA Engine) y consistieron de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 1 min y un periodo final de extensión a 72°C por 10 min, almacenamiento a 4°C (Figura 16B).

2.3.6. Electroforesis

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% adicionando buffer TAE a una concentración de 1X. Se incluyó un marcador de peso molecular de 1Kb (PROMEGA, USA). La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta utilizando el sistema digital de análisis (INFINITY).

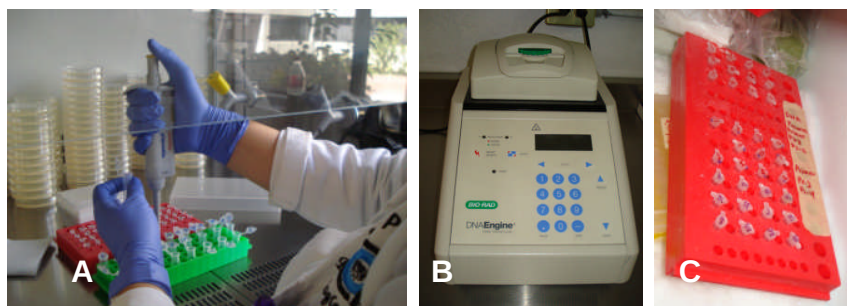


Figura 16. Proceso y material utilizado en el PCR a partir de cepas en medio de cultivo BK. **A.** Preparación y colocación de Solución maestra a los respectivos tubos. **B.** Termociclador BIORAD®-ADN Engine. **C.** Muestras previamente etiquetadas y preparadas.

identificación filogenética. Se purificaron los amplicones del DNA de aproximadamente 614 pb limpiados con el kit QIAQUICK (QIAGEN, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se secuenciaron en ambas direcciones mediante el *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, EEUU) y se revolvieron en un secuenciador 3130 *Applied Biosystems*) USA. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y editadas con el *software* BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), y comparadas con la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) utilizando el programa BLAST.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por PCR con diferentes métodos de extracción.

2.4.1.1. Detección de *Cmm* por PCR en tejido foliar.

Se detectó la presencia de *Cmm* en la amplificación mediante PCR de un fragmento de DNA específico de 614 bp. en las variedades evaluadas SUN 7705, DKR2180F1, RECOVA y el CONTROL POSITIVO, resultando positivos por la extracción de *Cmm* a partir de tejido vegetal (Cuadro 5 y Figura 17). Los resultados indican que la semilla estaba contaminada, sin embargo no se puede saber si la contenía una o varias semillas, la extracción de *Cmm* de las muestras que fueron tomadas de 25 plantas sembradas previamente y luego por la técnica de PCR con el uso de primers CMM5 y CMM6 (Dreier *et al.*, 1995), confirmaron la presencia.

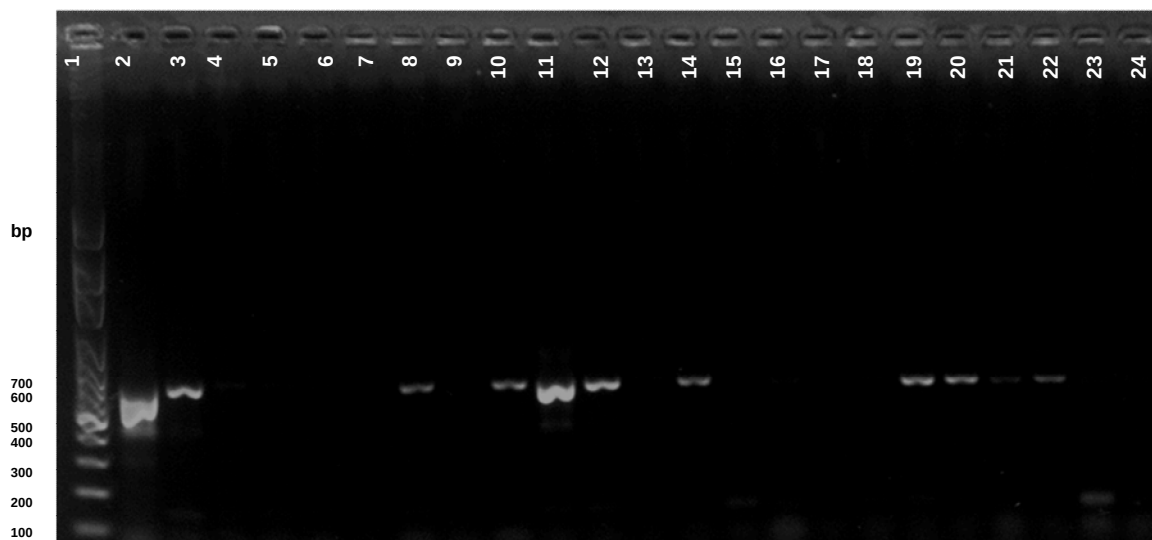


Figura 17 Gel de electroforesis amplificado de los productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Carril 1, marcador 1 kb, carril 2, control positivo de *Cmm*, carriles 3-9 extracción de semillas germinadas y luego PCR; 3. SUN 7705, 4. DKR 2180, 5. EL CID, 6. RESERVA, 7 RECOVA, 8. CONTROL (+), 10 (Erróneo). Carriles 11-24 extracción de tejido (peciolo y foliolo) y luego PCR; 11. SUN 7705 foliolo, 12. SUN 7705 peciolo, 13. DKR 2180 foliolo, 14. DKR peciolo, 15. EL CID foliolo, 16. EL CID peciolo, 17. RESERVA foliolo, 18. RESERVA peciolo, 19. RECOVA foliolo, 20. RECOVA peciolo, 21. Control (+) foliolo, 22. Control (+) peciolo, 23. Rio grande foliolo, 24. Rio grande peciolo.

Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por otros autores (Dreier *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1997; Kokosková *et al.*, 2010) que corroboran que con el ensayo de PCR proporciona una prueba rápida para la detección de *Cmm* con los primers CMM5 y CCM6, en tejido vegetal infectado.

2.4.1.2. Detección por PCR en semillas germinadas.

Tres de las variedades SUN 7705, DKR2180, y CONTROL POSITIVO, resultaron positivas para *Cmm* por PCR (Figura 17), solo con el procedimiento que incluyó primero la germinación de las semillas y después la extracción de *Cmm*, esto confirma que la bacteria estaba presente en las muestras (25 semillas/muestra), pero no se sabe si provenía de una o de varias semillas, pero puede suponerse como lo indica Xu *et al.*, (2010) que durante las etapas tempranas de la germinación se incrementó la bacteria y luego halla invadido el hipocotilo, cotiledón y la radícula.

2.4.1.3. Detección de *Cmm* en semillas germinadas y luego BIO-PCR.

En este trabajo el método propuesto por germinación seguido por Bio-PCR, no se obtuvieron resultados positivos en ninguna de las muestras al momento de realizar la prueba con PCR (Figura 18), esto se atribuye a la falta de sensibilidad del medio de cultivo utilizado. Es posible que el crecimiento de *Cmm* no se favoreciera y es probable que sí lo fue para el crecimiento de otros saprofitos y dio lugar a un falso negativo. Si *Cmm* creció, la concentración no fue suficiente para su detección como lo indica Kokosvova *et al.*, (2010) que el umbral mínimo de detección por PCR cuando se usan los primers CMM5/CMM6 es de 10^4 CFU mL⁻¹.

Sin embargo, el objeto de haber realizado Bio-PCR, fue el buscar la multiplicación del patógeno objetivo en medios sólidos y posteriormente la amplificación por PCR esto también ha sido utilizado por otros autores (Gitaitis y Walcott, 2007; Munkvold, 2009; Milijasevic *et al.*, 2009; Hadas *et al.*, 2005) en la detección de *Cmm*. Esto se justifica mas cuando los bajos niveles de población de la bacteria en / sobre de semillas también hacen muy difícil su detección (Hadas *et al.*, 2005).

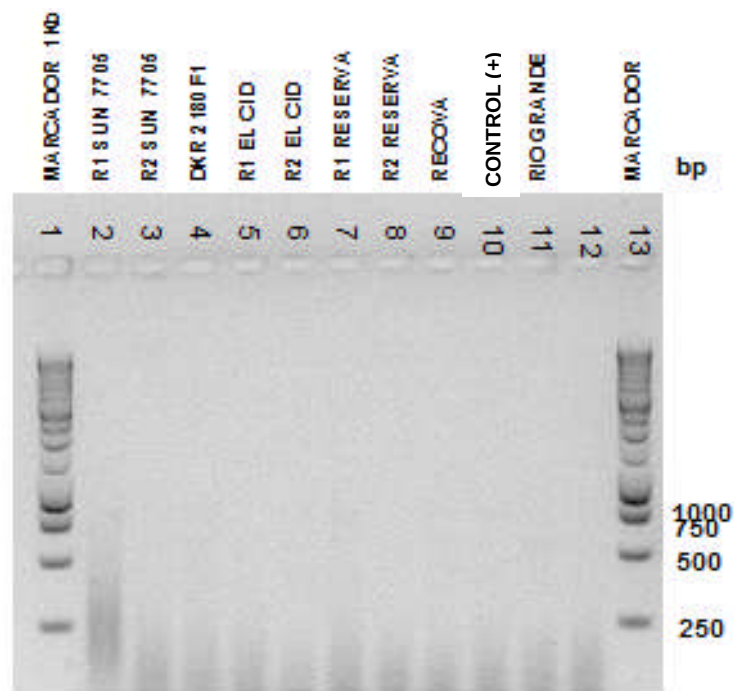


Figura 18. Gel de electroforesis amplificado con los productos obtenidos en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, extracción por germinación y luego BIO-PCR, Carriles 1 y 15, marcador 1 kb, línea 2 – 11, variedades comerciales.

La recuperación de diferentes colonias bacterianas que se obtuvieron a partir de la siembra del macerado de las semillas germinadas en medio de cultivo B de King, no se pudieron distinguir adecuadamente, entre otras saprófitas o pudieron corresponder a cepas antagónicas (Figura 19). Esto puede atribuirse a la falta de selectividad del medio utilizado para aislar a *Cmm*, pues la identificación del patógeno a menudo se complica por la presencia de crecimiento rápido de saprófitos u antagónicas que se asemejan a la morfología de colonias de *Cmm* y estas coexisten con ellas, también es posible que si la morfología de las colonias sean similares visualmente a *Cmm*, las bacterias encontradas sean cepas virulentas o no virulentas (Álvarez *et al.*, 2005; Ftayeh *et al.*, 2011; Milijasevic *et al.*, 2009).

El empleo de medios selectivos debe considerarse para este tipo de ensayos. Al respecto varios medios selectivos para aislar a *Cmm* se han desarrollado (Schaad *et al.*, 2001), sin embargo dado que diferentes cepas de *Cmm* pueden exhibir diferentes

morfología de las colonias incluso en el mismo medio, es recomendable utilizar varios medios de cultivo al mismo tiempo (Hadas *et al.*, 2005; Milijasevic *et al.*, 2009; Ftayeh *et al.*, 2011), en un estudio realizado por Hadas *et al.*, (2005), en la recuperación de cepas de *Cmm* en tres medios selectivos diferentes SCM (Fatmi y Schaad, 1988); mSCM (Bolkan *et al.*, 1996.); D₂ANX (Chun, 1982) encontró que el crecimiento era altamente variable, por ejemplo, una de las cepas utilizadas creció muy bien en D₂ANX pero no creció en SNC y mSCM, mientras otra no crecía en D₂ANX pero sí creció en SNC y mSCM.

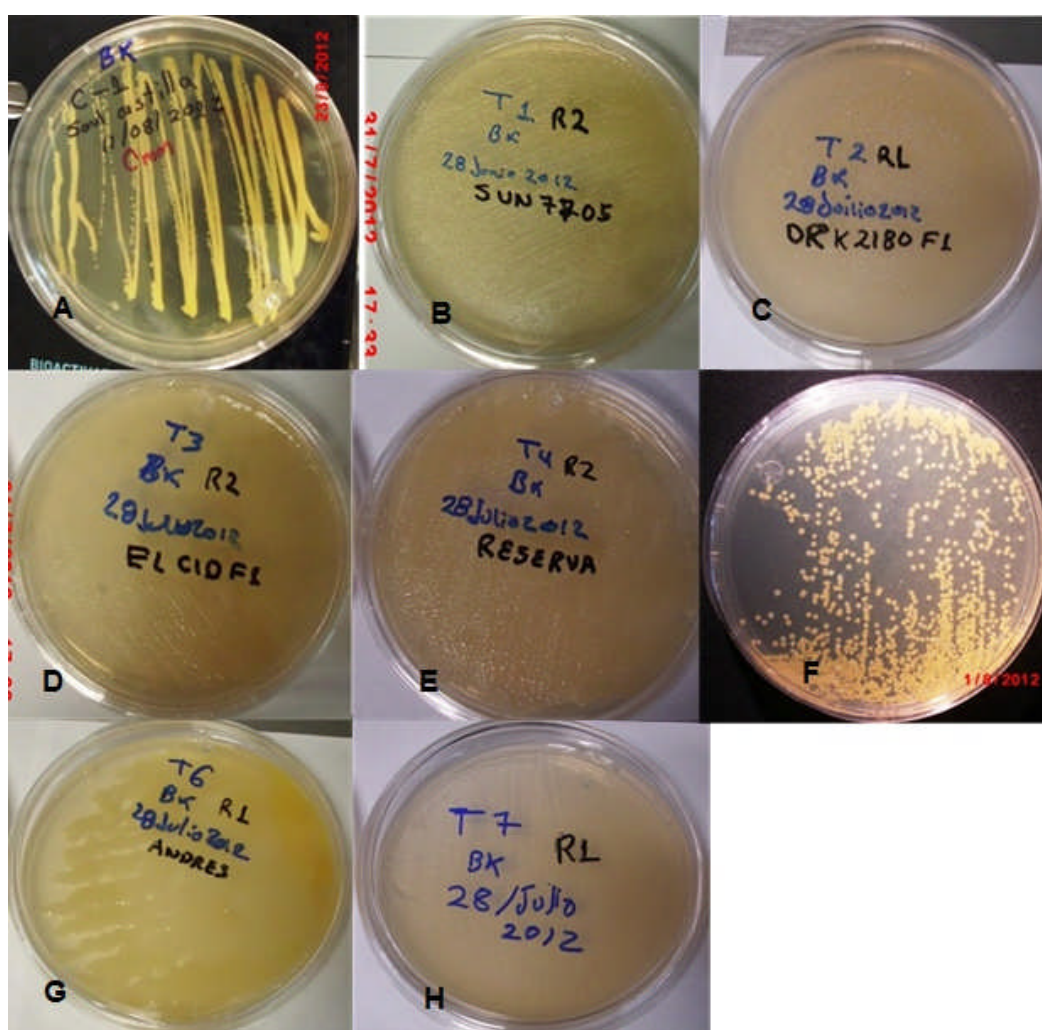


Figura 19. Crecimiento de cepas bacterianas en medio B de King. **A).** Aislamiento de *Cmm* en tejido vegetal, purificada y posteriormente confirmada por PCR, colonias amarillo pálidas, **B, C, D, E, F, G y H)** cultivo de bacterias de las variedades evaluadas a partir del macerado de semillas germinadas.

Resultados similares fueron obtenidos por Milijasevic *et al.* (2009), al evaluar 19 cepas en los mismos medios y diferentes cepas tuvieron comportamientos similares a los encontrados por Hadas *et al.*, (2005).

La falta de fidelidad de los medios selectivos desarrollados para aislar a *Cmm*, se refuerza con el estudio reciente realizado por Ftayeh *et. al.*, (2011) quien en un intento por desarrollar un medio altamente sensible propuso un nuevo medio selectivo para *Cmm* llamado BTC por sus siglas en ingles (bacterial canker of tomato), la selectividad de este, fue probada con 30 cepas de *Cmm*, y se compararon con el crecimiento en otros medios selectivos previamente publicados (D2, KBT, D2ANX, SCM, MSCM, CMM1, MCN, y EPPO), el crecimiento de colonias en diferentes medios fue variable, en niveles bajos de hasta 8 UFC solo el medio propuesto favoreció el crecimiento de *Cmm* y reprimió el crecimiento de bacterias no objetivo, por el contrario el crecimiento de *Cmm* en los otros medios no podía distinguirse de saprofitos y otros dieron lugar a falsos negativos.

Sin embargo no se debe descartar la técnica de Bio-PCR, pues Hadas *et al.* (2005) demostró que solo con Bio-PCR pudo detectar una semilla contaminada en 10,000, con una concentración de 10^2 a 10^3 CFU semilla⁻¹, mostrando mayor sensibilidad con la siembra en medios selectivos que con PCR directo. Otro método no probado en el este experimento puede ser enriquecimiento de PCR esto se ha sido incluido en el protocolo de la EPPO (OEPP/EPPO, 2005.) con el empleo de medios semi selectivos líquidos donde se usan tubos de ensaye son inoculadas con una suspensión de células de *Cmm*, a niveles de contaminación de 10^2 - 10^3 CFU seguido por PCR y se ha detectado consistentemente una semilla contaminada (4×10^2 CFU), a una muestra de 10,000 semillas.

La identificación de las muestras se hizo mediante la secuenciación del fragmento. Se encontró que los fragmentos obtenidos pertenecen a *Cmm* ya que al compararlas con la base de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando el programa BLAST mostraron una máxima identidad del 100%.

2.4.2. Comparación de los métodos de extracción.

Los resultados obtenidos en la detección por PCR con respecto a los métodos de extracción, las variedades SUN 7705, DKR2180F1 y CONTROL POSITIVO, resultaron positivos en tejido y en semillas germinadas, por otra parte la variedad RECOVA, solo fue positiva para tejido, sin embargo con el método propuesto de germinación y luego BIO-PCR, no se obtuvieron amplificaciones para ninguna de las variedades evaluadas, que se atribuyen a la falta de selectividad del medio utilizado en este estudio, pues era de esperarse que al menos en las variedades SUN7705, DKR2180F1 y CONTROL POSITIVO el resultado fuera positivo por Bio-PCR, porque las muestras utilizadas corresponden a las mismas usadas en las de germinación en los que si se obtuvieron muestras positivas para las mismas variedades, sin embargo este supuesto tampoco lo podemos confirmar pues no sabemos la tasa de infección de las semillas o si es una o varias semillas infestadas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados respecto a los métodos de extracción de *Cmm* utilizados y luego la detección por PCR

Variedad	Método y parte utilizada para la detección.			
	Tejido		Germinación	Germinación y luego BIO-PCR
	Foliolo	Peciolo		
SUN 7705	+	+	+	-
DKR 2180F1	-	+	+	-
EL CID	-	-	-	-
RESERVA	-	-	-	-
RECOVA	+	+	-	-
CONTROL (+)	+	+	+	-
RIO GRANDE	-	-	-	-

Numerosos intentos se han hecho para desarrollar y estandarizar los protocolos para la detección del patógeno en las semillas (Fatmi y Schaad, 1988; Hadas *et al.*, 2005). Sin embargo, los niveles variables de infección de las semillas y la amplia variación morfológica entre las cepas *Cmm* aumentan la dificultad en la estandarización

de un método adecuado de detección con sensibilidad uniforme y reproducible (Hadas *et al.*, 2005).

Debe considerarse que la sensibilidad de los diferentes métodos de detección en las semillas depende del método de extracción (Roth, 1989; Milijasevic *et al.*, 2009), es por ello que se justifica en este experimento el haber empleado tres métodos de extracción y reducir la posibilidad de un falso negativo, que aún puede estar presente.

Una alternativa para conocer la cantidad de inóculo presente en las muestras, independientemente del método de extracción, sería usar PCR en tiempo real (Salm y Geider, 2004). La principal ventaja de la PCR en tiempo real con respecto al de PCR clásico es que se puede cuantificar la cantidad del ADN del organismo objetivo y aumentar la especificidad cuando se utilizan sondas internas fluorescentes (Schaad y Frederick, 2002).

En este trabajo no podemos comparar la sensibilidad de los métodos de extracción porque no se determinó la concentración inicial de *Cmm* (CFU g⁻¹) en las semillas utilizadas o si estaba presente en una o varias semillas, por ello los mismos resultados pudieron ser variables al ser subdivididas las mismas muestras en sub lotes pequeños. Puede suponerse que la bacteria se incrementó hasta el umbral mínimo de detección, en las muestras que resultaron positivas para tejido vegetal y en las semillas germinadas, esto de acuerdo a lo que mencionan Kokosvova *et al.*, (2010) que el umbral mínimo de detección por PCR cuando se usan los primers CMM5/CMM6 es de 10⁴ CFU mL⁻¹, esto fue demostrado por los mismos autores comparándolo con unos primers propios Cmm1F y Cmm1R, estos primers que se derivan del gen *Cmm* tomatinasa y genera una amplificación de 500 bp y son capaces de detectarlo a 10³ CFU mL⁻¹.

Así, en la práctica, el límite de detección de *Cmm* por PCR es de aproximadamente 10³ CFU mL⁻¹ (León *et al.* 2006; Kokosvova *et al.*, 2010); pero lo más preocupante es la frecuencia de falsos negativos debido a la presencia de inhibidores de la PCR y su capacidad para detectar el DNA de las células no viables (Gitaitis y Walcott, 2007; Munkvold, 2007). Esto es de considerarse en este trabajo, al haber

usado solamente primers específicos para la detección de *Cmm* descritos por Dreier *et al.* (1995) porque los resultados falsos positivos y/o falsos negativos son todavía posible cuando se utiliza los ensayos de PCR, así como pruebas de inmunodiagnóstico (Kaneshiro y Alvarez, 2001). Los falsos negativos han sido reportados por Louws *et al.*, (1999) con los primers CMM5 y CMM6, sólo el 75% de las cepas de *Cmm* probadas reaccionaron con ambos primers. Del mismo modo, Hadas *et al.* (2005) encontraron que cuatro de 23 cepas de *Cmm* probadas no reaccionaron con los primers CM3/CM4 y que dos no reaccionaron con los primers CMM5/CMM6. Por tanto, es recomendable utilizar más de un conjunto de primers para realizar la prueba de PCR para obtener resultados más fiables. Es por ello que aunque la técnica de PCR se considera generalmente más sensible que otros métodos de detección (Meraz *et al.*, 2011; kokoscova *et al.*, 2010), el uso de más de una de las pruebas de selección basadas en distintos principios biológicos se recomienda para el diagnóstico de la mayoría de los patógenos, especialmente las bacterias de plantas cuarentenadas (OEPP / EPPO 2005; KokosKova *et al.*, 2007). Varias estrategias se han desarrollado para superar estas desventajas. Los inhibidores de la PCR presentes en los extractos de semillas pueden ser removidos por diferentes protocolos de extracción de DNA, lo que facilita la detección de *Cmm* por PCR convencional (León *et al.*, 2008; Dreier *et al.*, 1995; Milijasevic *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en el experimento confirman que las semillas de tomate infectadas por *Cmm* actúan como fuentes de inóculo primario para las epidemias del cáncer bacteriano (Gleason *et al.*, 1993; Gitaitis *et al.*, 1991), así como la introducción del patógeno y nuevos brotes de la enfermedad en otras regiones, por otra parte, los estudios de campo en los Estados Unidos han demostrado que una sola semilla infectada en 10,000 pueden iniciar una epidemia en condiciones favorables (Gitaitis *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1991). También debe hacerse hincapié en que la recomendación general por ISTA para un tamaño de muestra estándar es de 10,000 semillas con el fin de detectar el 0,03% de nivel de contaminación en un lote de semillas (OEPP / EPPO, 2005). La muestra por lo tanto se divide en sub muestras, cada uno con no más de 2,000 semillas. Milijasevic *et al.*, (2009), sugieren que las

pequeñas muestras (1,000 o 2,000 semillas) sería apropiado teniendo en cuenta los procedimientos de extracción y métodos de detección disponibles. Ellos obtuvieron los mejores resultados con el cultivo en medio selectivo y una combinación de muestra de pre-incubación en medios selectivos común y luego realizaron el PCR, es decir, Bio-PCR. El PCR directo demostró ser un método sensible pero menos eficiente, y que dependía de la extracción de DNA a partir del material de semilla, probablemente debido a la presencia de sustancias en el material vegetal que inhibe la enzima Taq polimerasa, por lo tanto, observando este aspecto de los métodos de detección disponibles de *Cmm* en semillas, sugieren el uso de muestras no mayores de 2,000 semillas y una combinación de dos métodos de detección diferentes, crecimiento de bacterias simultánea en al menos dos medios de cultivo semi selectivos y Bio-PCR o PCR directa.

En este trabajo se usó una sub muestra de 25 semillas, por el costo que implica el uso de semilla híbrida, el proceso de molienda de 2,000 mil semillas como lo indica la ISTA, en la práctica es poco factible, sobre todo para detectar *Cmm* en semillas híbridas por el alto costo que implicaría la semilla. El uso de ensayos no destructivos para detectar *Cmm* en semilla todavía no es satisfactoria (Biggerstaff *et al.*, 2000).

2.5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman los trabajos previos realizados por otros autores y pone en evidencia que en al menos cuatro de las variedades comerciales evaluadas en el presente trabajo están contaminadas por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

A la luz de los resultados obtenidos e independientemente de la sensibilidad de los métodos de extracción empleados en este experimento, debe poner en alerta a los productores, propagadores, ranchos y empresas productoras de verificar la sanidad de las semillas. Pues aun cuando las muestras de semillas puede considerarse bajo nivel de contaminación, este trabajo indica que *Cmm* está siendo dispersada por semillas comerciales por lo que es conveniente como lo indican otros autores utilizar al menos

dos métodos de extracción considerando que la cantidad e inóculo primario superficial o dentro de la semilla.

En el presente estudio con los métodos usados no fue posible estimar la cantidad de inóculo que pueden contener los lotes evaluados, sin embargo considerando el tamaño del lote de 1,000 semillas y de considerando el umbral óptimo de detección que se utilizó indica de manera indirecta el riesgo potencial que puede tener en el desarrollo de una epidemia si esta semilla es utilizada. El nivel de contaminación si consideramos que solo se utilizaron 25 semillas por muestra, en lotes adquiridos que contenían 1,000 semillas, esto representaría el 2.5%, de semillas contaminadas.

2.6. LITERATURA CITADA

- Agdia. 2012. Productos Agdia Inmuno Strip ISK 44001.
https://orders.agdia.com/InventoryD.asp?loc=IN&collection=ISK%2044001&attribute_Size=25, [En línea] Fecha de consulta: 22 de diciembre del 2012.
- Alvarez, A. M., Kaneshiro, W. S., and Vine, B. G. 2005. Diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in tomato seed: What is the significance?. *Acta Horticulturae* 695:205-214.
- Biggerstaff, C. M., Gleason, M. L., and Braun, E. J., 2000. Refinement of a nondestructive tomato seed assay for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using seed fiber. *Seed Science and Technology* 28:261–269.
- Bolkan, H. A., Waters, C. M., and Fatmi, M. 1996. ISTA Handbook On Seed Health Testing, Working Sheet no. 67. Zurich, Switzerland: ISTA.
- Chang, R. J., Ries, S. M., and Pataky, J. K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology* 81:1276-1281.
- Chun WCC, 1982. Identification and detection of *Corynebacterium michiganense* in tomato seed using the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. MSc Thesis. Honolulu, HI, USA: University of Hawaii.
- CIMMYT. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT. 92 p.
- De León, L., Rodríguez, A., López, M. M., and Siverio, F. 2008. Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Journal Applied Microbiology* 104:776-786.
- Dreier, J., Bempohl, A., and Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85:462–468.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. A rapid total ADN preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Fatmi, M., and Schaad, N. W., 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. *Phytopathology* 78:121–126.
- Ftayeh, R. M., Von Tiedemann, A., and Rudolph, K. W. E. 2011. A new selective medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seed. *Phytopathology* 101:1355- 1364.

- Gitaitis, R., Beaver, R. W., and Voloudakis, A. E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease* 75:834-838.
- Gitaitis, R., and Walcott, R. 2007. The epidemiology and management of seed borne bacterial disease. *Annual Review Phytopathology* 45:371-397.
- Gleason, M. Braun, E. J., and Peterson, R. H. 1993. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 1:1519-1523.
- Hadas, R., Kritzman, G., Klietman, F., Gefenand, T., and Manulis, S. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection thres hold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology* 54:643–649.
- Janse, J. D., and Wenneker, M. 2002. Possibilities of avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen-tested (certified) or treated planting material. *Plant Pathology* 51:523–536.
- Kaneshiro, W.S., and Alvarez, A. M. 2001. Specificity of PCR and ELISA assays for hypovirulent and avirulent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 91:46 (Abstract).
- Kokosková, B., Mráz, I., and Fousek, J. 2010. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiologica* 55:239-244.
- Leon, L. D., Siverio, F., and Rodríguez, A. 2006. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *Journal Microbiology Methods* 67:141–149.
- Louws, F. J., Rademaker, J. L. W., and de Bruijn, F. J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review Phytopathology* 37:81-125.
- Mraz, I., Beran, P., and Kokoskovaa, B. 2011. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from Tomato Plants and Seeds Using ELISA, IF and PCR with Commercial and Own Primers. *Acta Horticulture*. 914:57-60.
- Milijasevic, S., Todorovic, B., Potocnik, I., and Stepanovic, M. 2009. Comparison of Different Methods in Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomato Seeds. *Acta Horticulture* 808:103-110.
- Munkvold, G. P. 2009. Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology* 47:285-311.

- Nava-Díaz, C. 2009. Manejo fitosanitario del jitomate; tratamiento térmico. *Monitor Agrícola* 4:21-23.
- OEPP/EPPO. 2005. EPPO Standards PM 7/42 (1) Diagnostic. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Bull. OEPP-EPPO Bull. 35:275-283. <http://archives.eppo.org/EPPOStandards/diagnostics.htm>
- OEPP/EPPO. 2008. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* found in the Netherlands. EPPO Reporting Service No. 1. Rep. No. 2008/005. <http://archives.eppo.org/EPPOReporting/2008/Rse-0801.pdf>
- Petrina, L., and Bedlan, G. 2012. Investigations for improving the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* in tomato seedlings. *Journal für Kulturpflanzen* 64: 91-94.
- Rademaker, J. L. W., and Janse, J. D. 1994. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by nonradio active hybridization, polymerase chain reaction, and restriction enzyme analysis. *Canadian Journal Microbiology* 40:1007–1018.
- Roth, D. A., 1989. Review of extraction and isolation methods. in: Saettler AW, Schaad, N. W., Roth, A. D., eds. *Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material*. St Paul, MN, USA: APS Press, 3–8.
- Shaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for identification of Plant pathogenic bacteria*. 3th ed. The American Phytopathological Society. St. Paul Minesota, USA. 373 p.
- Santos, M. S., Cruz, L., Norskov, P., and Rasmussen, O. F. 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Science and Technology* 25:581–584.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. Pp. 633-650. in: *Proceedings 6th International Congress on Soilles Culture*. Wageningen, The Netherlands.
- Xu, X., Miller, S. A., Baysal, G. F., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R., and Rajashekara, G. 2010. Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76:3978–3988.

CAPITULO III. Efecto pre y post infección de compuestos biorracionales para el manejo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas y en semilla

3.1. INTRODUCCIÓN

La presencia del cáncer bacteriano en unidades de producción tanto en sistemas protegidos (invernaderos, casas sombra) o en campo abierto puede ser económicamente devastadora si llega a presentarse, debido a la dificultad para su erradicación, además del costo adicional para el saneamiento y por las pérdidas que causa en la reducción del rendimiento. El manejo del cáncer bacteriano depende principalmente de mantener libre del patógeno desde las semillas y plántulas (Jahr *et al.*, 1999). Actualmente no hay variedades comerciales resistentes al cancro ó bactericidas eficaces que aplicados vía foliar o a la raíz, sean efectivos una vez que el patógeno ha entrado en la planta (Jahr *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2012).

Los métodos de control de *Cmm* hasta ahora evaluados, son desde métodos químicos, físicos y biocontrol, sin embargo ninguno han sido eficaz en el control total, la mayoría presenta una eficacia media a baja, solos o en combinación (Yuce *et al.*, 2011). Estudios recientes han confirmado que con la aplicación de bactericidas a base de cobre en plántulas de tomate en invernadero, puede reducir el tamaño de la población, la propagación y el desarrollo de *Cmm* en las plantas, reduciendo su impacto en el rendimiento en campo (Hausbeck *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2002). Sin embargo, el uso a largo plazo de estos bactericidas puede conducir a la inducción de cepas resistentes al cobre (Cooksey, 1990). Solo dos antibióticos han sido probados en el control del cáncer bacteriano (Hausbeck *et al.*, 2000; Milijasevic *et al.*, 2009), el primero es la Estreptomicina, compuesto que reduce la población de *Cmm* en plántulas y en invernadero (Hausbeck *et al.*, 2000), y la Kasugamicina (Kasumin: de Arista Life Sciences), el cual ha mostrado reducir el crecimiento de *Cmm in vitro* (Theodoro y Maringoni, 2000). Algunos agricultores aplican bactericidas de forma preventiva, mientras que otras aplicaciones después de que las plantas muestran síntomas. El

control de la enfermedad es factible con la aplicación de antibióticos tales como estreptomicina, sin embargo su uso está prohibido en la mayoría de los países (Baysal *et al.*, 2005b) además de los riesgos de resistencia que presenta.

Uno de los métodos posibles de la reducción de la incidencia y severidad de *Cmm* es la inducción de resistencia sistémica en la planta. Estudios recientes han demostrado la eficacia de acibenzolar-S-metilo (ASM) el cual induce a la resistencia sistémica adquirida, limitando las poblaciones y el crecimiento de *Cmm* (Baysal *et al.*, 2003) especialmente cuando se combina con variedades resistentes e hidróxido de cobre (Werner *et al.*, 2002), la reducción de la enfermedad se logra cuando las plantas son tratadas previamente de 3 a 6 días antes de la inoculación (Milijasevic *et al.*, 2009), pudiendo reducirla la severidad de la enfermedad hasta 76.3% (Baysal *et al.*, 2003). La resistencia inducida por la aplicación del Ácido DL- β -amino butírico (BABA) contra *Cmm*, ha demostrado también la supresión y el desarrollo de la enfermedad de hasta un 54% cuando su aplicación se realiza antes de la inoculación, que resulta en el incremento de la actividad de las enzimas phenylalanine ammonia-lyase, peroxidasas e incrementa la concentración de H₂O₂ en la planta (Baysal *et al.*, 2005b).

Recientemente se han evaluado algunos biocontroladores tales como bacterias antagónicas como cepas nativas de *Pseudomonas fluoresces* habitantes de la rizosfera en tomate las cuales en un estudio de Amckras *et al.*, (2010), de 42 aislamientos identificados solo 8 cepas aplicadas como tratamientos a las semillas y a la raíz, demostraron reducir la incidencia de un 61 a 83% y la aparición de síntomas, esto indica que depende de la cepa utilizada, pues otras pueden no tener efecto como también lo indica Xu (2010). Así mismo hongos endomicorrizas, como *Streptomyces* aislados de la rizosfera en tomate, han mostrado actividad de antibiosis contra *Cmm* en medio de cultivo (Zhang *et al.*, 2011).

La diseminación de *Cmm* por semillas infectadas, es la causa principal de nuevos brotes y su distribución en todo el mundo, la estrategia más importante para controlarla, ha sido el uso de semillas libres de patógenos (Rademaker y Janse, 1994; Janse y Wenneker, 2002). El patógeno puede estar presente tanto externa como

internamente en las semillas de tomate. La deposición directa de *Cmm* en la cubierta de la semilla puede ocurrir durante la cosecha de semillas (OOEP/EPPO, 2005; Dhanvantari, 1989), mientras que la invasión interna de *Cmm* en la semilla podría ser a través del haz vascular del fruto (Bryan, 1930).

Las semillas infectadas o trasplantes son considerados como la fuente de inoculo primario en campo abierto o en invernadero (Gleason *et al.*, 1993; Gitaitis *et al.*, 1991; Tsiantos, 1987; Chang *et al.*, 1991). La semilla enferma generalmente da origen a plantas aparentemente sanas las cuales al llegar a la madurez desarrollan síntomas (OEPP/EPPO, 2003; Chang *et al.*, 1992).

El tratamiento a las semillas, es el método más eficaz y económico, para prevenir la transmisión de *Cmm* de las semillas a las plántulas (Xu, 2010), por lo tanto, la semilla debe ser el punto inicial de un programa de manejo integrado. Los tratamientos de semillas para reducir o eliminar las poblaciones de bacterias patógenas en las semillas, se han desarrollado a lo largo de muchos años. Estos incluyen tratamientos químicos y térmicos. El tratamiento realizado con agua caliente, utilizando protocolos estándar, resulta eficaz en la eliminación de las bacterias patógenas a partir de semillas de tomate, pero en algunos lotes de semillas se puede retrasar la germinación (Ivey y Miller, 2005), tiene la ventaja de actuar interna y externamente en la semilla (Ivey y Miller, 2005; Fatmi *et al.*, 1991; Shoemaker y Echandi, 1976; Xu *et al.*, 2009).

Los tratamientos actuales de las semillas de tomate con productos químicos o agua caliente tradicionales han mostrado fallas ya sea por la disminución de vigor de las semillas o en su defecto a erradicar el patógeno (Xu, 2010).

Ante la necesidad de encontrar alternativas de manejo de *Cmm*, en plantas y para el saneamiento de semilla contaminada y evaluar si compuestos comerciales tienen un efecto en la reducción de la enfermedad, se planteó el siguiente experimento con el siguiente objetivo:

Evaluar algunos productos biorracionales comerciales, que se presume tienen un efecto en el control de *Cmm*, en plantas de tomate infectadas y determinar si alguno puede tener un efecto en la erradicación del patógeno en semilla contaminada artificialmente.

3.2. Hipótesis

Al menos un producto aplicado en plantas inoculada por *Cmm*, tiene un efecto positivo en la reducción de la incidencia o severidad de la enfermedad.

Al menos un producto puede reducir o eliminar a *Cmm* en semillas inoculadas artificialmente.

3.3. MATERIALES Y METODOS

3.3.1. Material Vegetal

Se utilizaron semillas de la variedad Rio-Grande, para garantizar que las semillas estuvieran libres de *Cmm*, se trataron previamente mediante el método de Pradhanang y Collier (2009) que consistió en sumergir el lote de semillas en una solución de HCL al 1% por 30 minutos, luego se lavo con agua destilada y se dejaron secar sobre una malla, a temperatura ambiente. La siembra se realizó en charolas nuevas de polipropileno de 200 cavidades, colocando una semilla por cavidad, se usando como sustrato Peat Moss #3 (SUNSHINE), el cual fue esterilizado previamente en autoclave a 120°C por 20 minutos. Desde de la emergencia y hasta la aparición de las dos hojas del cotiledón, las plántulas germinadas se regaron diariamente con agua sin la adición de nutrientes, posteriormente después de la aparición de las primeras hojas verdaderas, las plántulas se regaron diariamente con una solución nutritiva de Steiner (1984), que tenía 10.4, 7.5, 3.3, 3.9, 1.29 y 3.3 mmol L⁻¹ de N⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, H₂PO₄⁻, SO₄⁻², preparada a partir de Ca (NO₃).4H₂O, KNO₃, MgSO₄.7H₂O, y KH₂PO₂, más micronutrientes MicroMix® (complejo quelatado de micronutrientes) que aportó 3.0, 0.7, 0.6., 0.1, 0.1 y 0.03 mg L⁻¹, de Fe, Mn, B, Cu, Zn y Mo. Inicialmente desde los 12 días después del trasplante (DDT) se aplicaron entre 30 a 50 mL día⁻¹ por maceta y fue incrementándose progresivamente hasta aplicar entre 150 a 200 mL día⁻¹ de la solución nutritiva, cuando plántulas tenían de 30 a 60 días después del trasplante (DDT).

Sé utilizaron como macetas, bolsas de polietileno negro de cuatro litros (v) y se llenaron con un sustrato tezontle rojo (Chalupowicz *et al.*, 2010) que no había sido utilizado previamente. El trasplante se realizó, cuando las plántulas en charolas de germinación mostraron cuatro hojas verdaderas y totalmente expandidas (30 días después de la siembra), colocando dos plantas por maceta, estas fueron crecidas en condiciones de invernadero, a 28° ± 5°C en promedio durante el día y con humedad relativa entre 50%-80%, el experimento se llevo de hasta 60 días después de trasplante.

3.3.2. Material vegetal empleado para el aislamiento de la cepa de *Cmm*.

Se realizó una colecta de material vegetal (tallos, hojas y frutos) en junio del 2012, en invernaderos en producción, en el Estado de Puebla, en donde la enfermedad desarrollada se sospechaba era *Cmm* (Figura 20), se realizaron colectas en 6 invernaderos diferentes. La elección de las plantas muestreadas, se realizó de manera dirigida, buscando que los síntomas fueran característicos y atribuibles a los causados por *Cmm*, como los describe De León *et al.*, (2011), Gleason *et al.*, (1993) y OEPP/EPPO (2005) (Figuras 2, 3, 4, y 5). De cada sitio de colecta se tomaron trozos de tallo, hojas y frutos (Figura 21), se etiquetaron y se colocaron en bolsas tipo Ziploc, para su transporte al laboratorio, las muestras se mantuvieron a 4°C en refrigeración, hasta su utilización para posteriormente realizar los aislamientos de *Cmm* en medios de cultivos.



Figura 20. Invernaderos afectados por *Cmm* en Chignahuapan, Puebla. Los síntomas correspondieron a los descritos por De León *et al.*, (2011), Gleason *et al.*, (1993) y OEPP/EPPO (2005). **A Y B)** invernadero del Sr. Esteban O. **C y D)** Invernadero del Sr. Saúl Castilla.

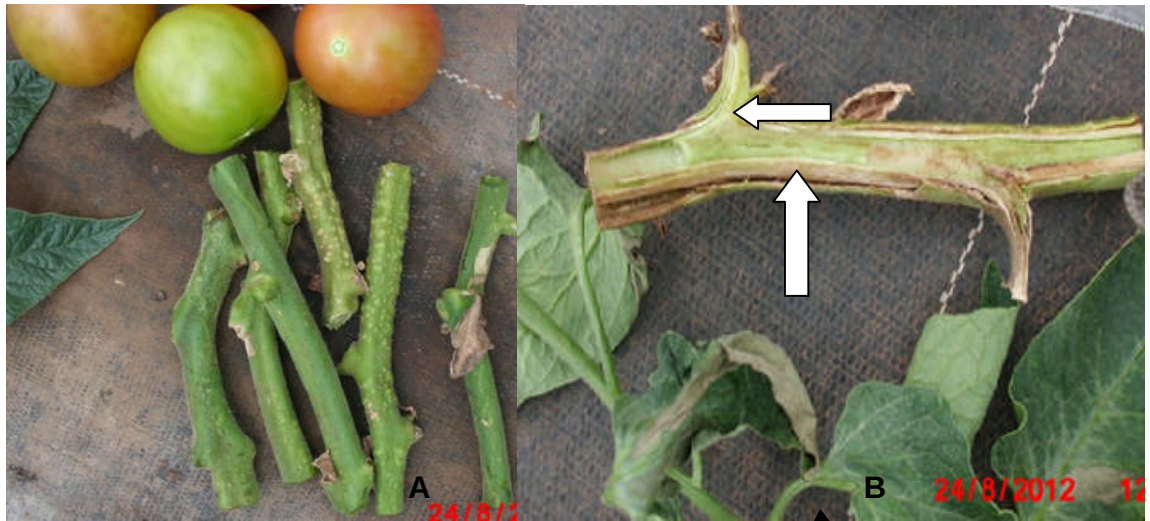


Figura 21. A. Colecta de tallos y frutos. **B.** Las flechas indican el tallo de tomate, donde se observa los haces vasculares dañados de color amarillo a café, donde se encuentra la bacteria de *Cmm*.

3.3.3. Aislamiento de la cepa de *Cmm* y confirmación por PCR.

Para el aislamiento de la bacteria del tejido infectado se utilizó como medio de cultivo B de King (Proteosa peptona# 3, 2 %, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.15 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 %, agar 1.5 %, glicerol 1.5 %) (Shaad *et al.*, 2001). La siembra se realizó sumergiendo el tejido infectado en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 5 minutos, después se desprendió la corteza del tallo para descubrir los vasculares y se rayó directamente en el medio de cultivo, otra variante fue el cortar un trozo de tejido sintomático y sembrado directamente en el medio de cultivo. Las cajas, se incubaron al medio ambiente entre 18 a 25°C durante 5 a 10 días ó hasta el crecimiento colonias bacterianas. Posteriormente se seleccionaron colonias características de *Cmm* de color amarillo naranja, y se les realizó la prueba rápida del KHO al 3%, esto permitió distinguir entre colonias de bacterias gram positivas y gram negativas, las colonias que presentaron el color y que fueron positivas al gram, se aislaron nuevamente consecutivamente hasta su purificación y su confirmación posterior por PCR (Figura 22A y B).

Las colonias purificas y que se presumía correspondían a *Cmm* se confirmaron mediante la técnica de PCR. Para la obtención de DNA genómico se utilizó el método de CTAB (método de bromuro de cetil-trimetil amonio), realizando las siguientes modificaciones al protocolo de Doyle y Doyle (1990), en los siguientes pasos: 1) En este paso la solución amortiguadora (CTAB) se calentó a 95°C, en el 2) Con una azada previamente flameada, se tomó del medio de cultivo una masa suficiente de bacterias y se mezcló por inmersión en un tubo de 2 mL, homogeneizándola con 1000 µl la solución amortiguadora CTAB. Se centrifugo a 10,000 rpm en los pasos 6 y 9.

Se utilizaron los primers específicos que le confieren genes de patogenicidad localizados en la región *pat-1* en el plásmido pCM1 de la bacteria de *Cmm*, los primers son; CMM5 (5'-GCG AAT AAG CCC ATA TCA -3') y CMM6 (5'-CAG GAG CGT GTC GCT AAT -3') (Reverse y Fordward) diseñados por Dreier *et al.* (1995). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizó de acuerdo con el protocolo para aislamientos en medio de cultivo descrito en el capítulo 2 y para la confirmación de la presencia de *Cmm* se utilizó el producto de PCR obtenido y se secuenció. Posteriormente las secuencias se editaron y se compararon con la base de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) utilizando el programa BLAST, para determinar si en efecto se trataba del patógeno *Cmm*.

3.3.4. Preparación de la suspensión bacteriana e inoculación

El inóculo se preparó a partir de la cepa bacteriana cultivadas en medio B de King, a temperatura ambiente (18°C a 26 ° C) durante 120 horas y se suspendió en agua destilada estéril (Chalupowicz *et al.*, 2010; Milijasevic *et al.*, 2009). La concentración del inóculo se ajustó a la aproximación desde 3×10^8 a 6×10^8 UFC mL⁻¹ utilizando la escala de McFarland (Figura 22) (Milijasevic *et al.*, 2009).

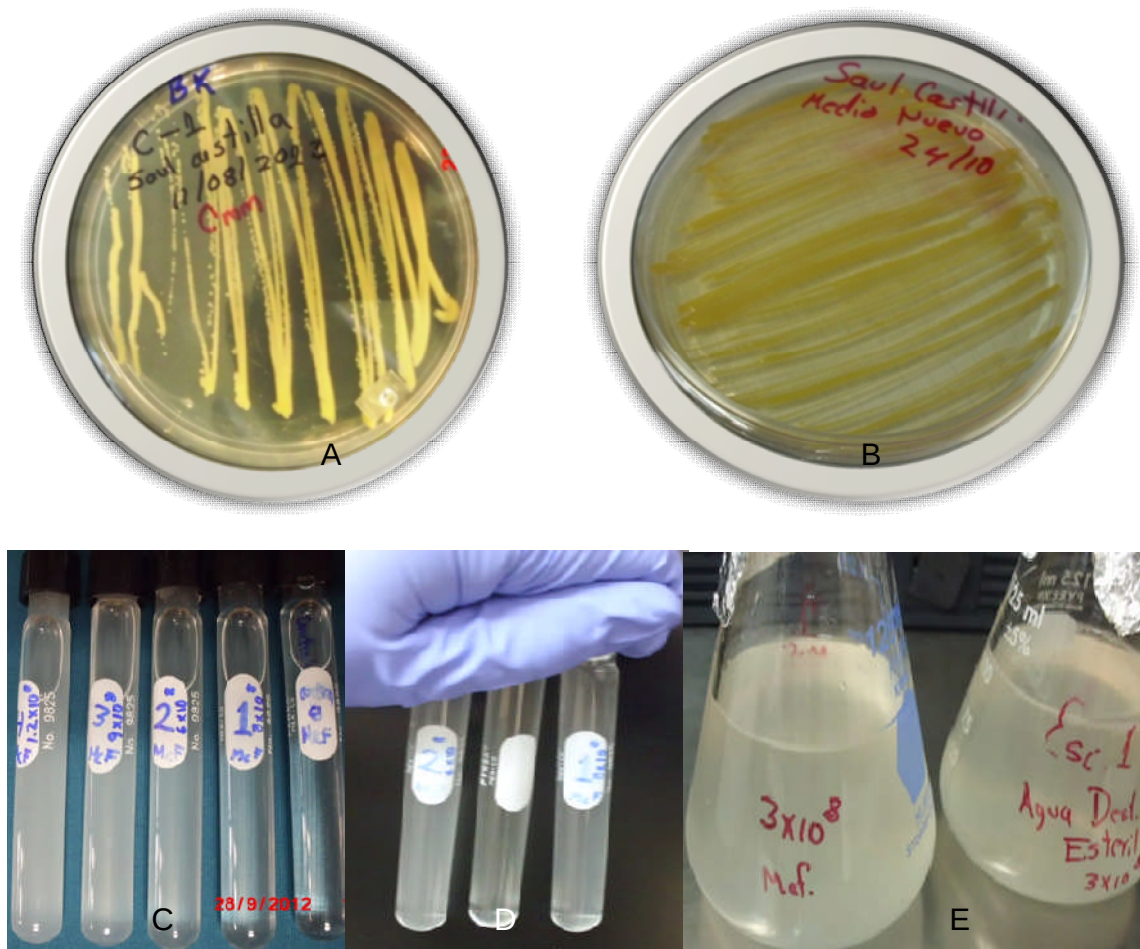


Figura 22. Cepas de *Cmm* purificadas y preparación de la suspensión. **A y B)** purificación de cepas en medio B de King, **C.** Escala de turbidez de MacFarland, **D.** el tubo de en medio corresponde a la suspensión bacteriana ajustada entre el tubo 1 y 2 de MacFarland, **E)** suspensión bacteriana final.

Las plántulas fueron inoculadas por punción a los cinco días después del trasplante (DDT), siguiendo la metodología de Baysal *et al.* (2005a) y Chalupowicz *et al.*, (2010) con la siguiente modificación, se utilizaron palillos de madera que fueron sumergidos en la suspensión bacteriana por 30 minutos luego se pichó a la altura de los cotiledones (Figura 23).



Figura 23. A) Preparación de palillos en suspensión bacteriana de *Cmm*, **B)** Inoculación a la altura de las hojas del cotiledón, **C)** la flecha indica la manifestación de los primeros síntomas por la infección sistémica.

3.3.5. Efecto de tratamientos sobre la incidencia y severidad en pre y pos-inoculación

Las plantas se asperjaron a las 48 hrs en pre y post inoculación, uniformemente sobre el follaje y el tallo, con aplicaciones de Sulfato de cobre Pentahidratado 1 mL L^{-1} (v/v) (Phynton 27®), Peróxido de hidrogeno 10 mL L^{-1} (v/v) (Clean H_2O_2 ®), Extracto de semillas de cítricos 1 mL L^{-1} (v/v) (TANE CITRUS®), fermentaciones de bacterias (PROTECTOR®) 1 mL L^{-1} (v/v), *Bacillus subtilis* 6 mL L^{-1} (v/v) (ROMEL®) y agua (control) (Cuadro 6). El experimento se estableció bajo un diseño en bloques aleatorizados completos con tres repeticiones (bloques). La unidad experimental se constituyó por 10 plantas. El experimento completo se repitió una vez.

Las evaluaciones se iniciaron a los 10 días después de la inoculación (DDI), en virtud de que estos empezaron a observar a los 10 y 15 DDI los primeros síntomas se observaron entre los 10 y 15 DDI en todos los tratamientos. El efecto de los tratamientos se evaluó usando una escala arbitraria que consiste de 5 clases (Baysal et al., 2003; Baysal et al., 2005a; Baysal et al., 2005b) donde: 0=hojas sanas y sin marchitez; 1=leve marchitez marginal, con un 1% -10% de las hojas con marchitez; 2=indica un 11% -25% de hojas con marchites; 3=marchitamiento sectorizado, con un

26% - 49% de las hojas con marchitamiento asociado con clorosis, 4=hojas con caída pronunciada, con un 50% -74% de hojas con marchitamiento, 5=hojas enteras se ablandan (planta completamente marchita). Las evaluaciones se realizaron a intervalos irregulares de 3 y 4 días. La última evaluación se realizó a los 46 DDI cuando el testigo alcanzó la escala superior de severidad.

Cuadro 6. Tratamientos aplicados en el control de *Cmm* en plantas inoculadas de 5 semanas de edad.

Tratamiento	Producto	Ingrediente Activo	Dosis	Tiempo de aplicación
T1	Phynton 27®	Sulfato de cobre pentahidratado	1 mL L ⁻¹	48 hrs en pre inoculación
T2	Tane Citrus®	Extracto de semillas de cítricos (<i>Citrus nobilis</i>)	2 mL L ⁻¹	48 hrs en pre inoculación
T3	Clean H ₂ O ₂ ®	Peróxido de hidrogeno H ₂ O ₂	10 mL L ⁻¹	48 hrs en pre inoculación
T4	Romel®	<i>Bacillus subtilis</i>	6 mL L ⁻¹	48 hrs en pre inoculación
T5	Protector®	Fermentaciones orgánicas	10 mL L ⁻¹	48 hrs en pre inoculación
T6	Phynton 27®	Sulfato de cobre pentahidratado	1 mL L ⁻¹	48 hrs en post inoculación
T7	Tane Citrus®	Extracto de semillas de cítricos (<i>Citrus nobilis</i>)	2 mL L ⁻¹	48 hrs en post inoculación
T8	Clean H ₂ O ₂ ®	Peróxido de hidrogeno H ₂ O ₂	10 mL L ⁻¹	48 hrs en post inoculación
T9	Romel®	<i>Bacillus subtilis</i>	6 mL L ⁻¹	48 hrs en post inoculación
T10	Protector®	Fermentaciones orgánicas	10 mL L ⁻¹	48 hrs en post inoculación
T11	Control 1	H ₂ O		48 hrs en pre inoculación
T12	Control 2	H ₂ O		48 hrs en post inoculación

Las variables tomadas en cada fecha correspondieron a la incidencia y severidad (8 evaluaciones durante todo el experimento) y tres fechas para la altura de plantas. Para el análisis de los datos obtenidos de severidad mediante la escala arbitraria, se transformaron en términos de porcentaje de la enfermedad con la fórmula de Anfoka *et al.*, (2000), empleada previamente por otros autores en experimentos similares para evaluar el efecto de productos aplicados en plantas para el control de *Cmm* (Baysal *et al.*, 2003; Baysal *et al.* 2005A; Baysal *et al.* 2005B) el cual consiste en un índice medio de severidad de la enfermedad (IMS) que se calculó a partir de cada tratamiento, mediante la adición de las puntuaciones de 10 plantas (unidad experimental), con tres repeticiones por tratamiento y expresando el valor en porcentaje utilizando la siguiente fórmula.

$$IMS = \frac{\sum[(\text{Número de plantas con el mismo valor de la escala} \times \text{valor correspondiente en la escala}) \times 100]}{(\text{Número total de plantas} \times \text{el valor más alto de la escala})}$$

El porcentaje de incidencia se calculó a partir de la suma del número de total de plantas con síntoma por 100 entre el número total 10 plantas (tres repeticiones por tratamiento).

3.3.6. Análisis de las epidemias

Con los datos obtenidos de incidencia y severidad, se realizó el análisis del progreso de las epidemias por cada tratamiento utilizando tasas relativas de incremento de la enfermedad y área bajo la curva.

3.3.6.1. Análisis de las tasas relativas de incremento de la enfermedad (TRIE).

Para analizar los datos, primero se ajustaron las epidemias a alguno de los modelos epidemiológicos de acuerdo a la técnica de Richards (1959), todas las epidemias se homologaron individualmente por repetición y tratamiento al modelo de mayor frecuencia de ajuste previo el análisis de regresión con los diferentes modelos epidemiológicos (Exponencial, Logístico, Monomolecular y Gompertz). Se definieron 33

epidemias (11 tratamientos con tres repeticiones) identificando para cada una el modelo al que mejor se ajustan, en base al coeficiente de determinación (R^2) y el patrón de residuales, anotando adicionalmente la tasa de incremento de la enfermedad según modelo de mejor ajuste. Posteriormente, a través del modelo de Richards, las tasas se transformaron al modelo de mayor frecuencia de ajuste. Primeramente a través del cálculo de Rho y posteriormente la tasa ajustada al modelo de mayor frecuencia para homogenizar las tasas de incremento de las 33 epidemias a un sólo modelo, (el de mayor frecuencia de ajuste) se usó la ecuación:

$$(a) \quad Rho = r/(m^2) + 2$$

$$(b) \quad rt = (mx^2 + 2) (Rho) \text{ en donde}$$

rt = tasa de incremento de la enfermedad transformada al modelo de mayor frecuencia de ajuste.

$m = 0$, para el Monomolecular

$m = 1$, para el Gompertz

$m = 2$, para el Logístico

3.3.6.2. Análisis de Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), fue calculada usando la formula Campbell y Madden (1990); $[(d_{i+1} + d_i)/2] (t_{i+1} - t_i)$, donde d_i y d_{i+1} son la índice de severidad, i y $i + 1$ DPI y t_i y t_{i+1} son los días posteriores a la inoculación. Adicionalmente se usó la incidencia y severidad final para comparar el efecto de los tratamientos.

3.3.7. Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos se establecieron en invernadero y se organizaron en un diseño completamente al azar con un arreglo en bloques completos al azar (10 plantas/unidad experimental) con tres repeticiones, el experimento completo se repitió una vez. Previo análisis se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas de Levene. Posteriormente los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza

(ANOVA) con el programa estadístico SAS (Software ver 9.0) y posteriormente se realizó a una prueba de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) para detectar los mejores tratamientos y su agrupamiento para tasas de incremento, y el ABCPEC así como la severidad e incidencia final (yf).

3.3.8. Eficacia de tratamientos para saneamiento de semilla

3.3.8.1. Inoculación de la semilla

Se usaron semillas (cv. Rio-Grande) que fueron inoculadas artificialmente por inmersión en una suspensión bacteriana ajustada a la aproximación desde 3×10^8 a CFU mL^{-1} utilizando la escala de McFarland (Figura 24) (Milijasevic *et al.*, 2009), posteriormente las semillas se dejaron secar a temperatura ambiente hasta su utilización en los tratamientos pre germinativos (15-20 días). La cepa se identificó molecularmente con el método de PCR descrito en el capítulo 2, la cepa denominada Esteban O. que fue utilizada y confirmada como *Cmm*, a partir de esta se volvió a cultivar la cepa en medio B de King, a temperatura ambiente (18°C a 26°C) durante 120 horas (Chalupowicz *et al.*, 2010; Milijašević *et al.*, 2009).

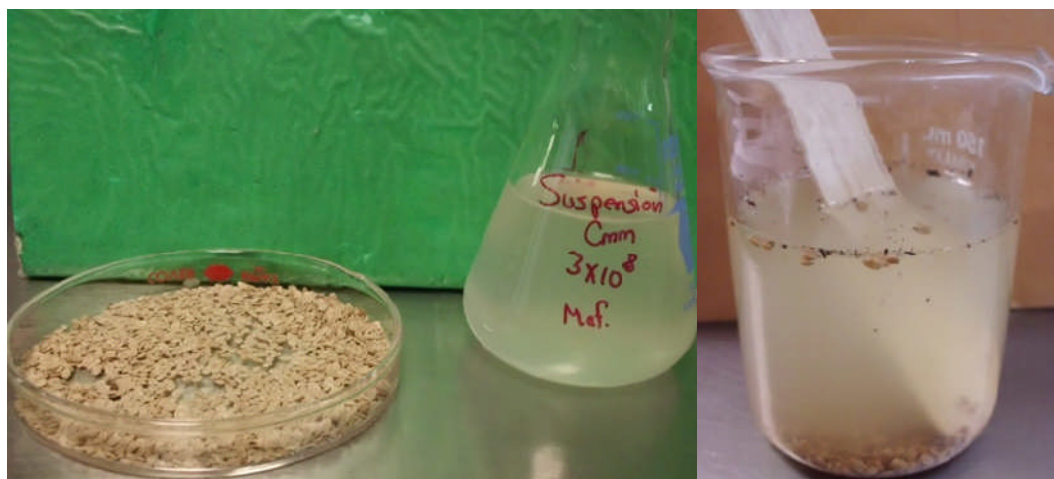


Figura 24. Inoculación de semillas cv. Rio grande, en suspensión bacteriana 3×10^8 de acuerdo a la escala de McFarland.

3.3.8.2. Tratamientos pre germinativos

Se probaron catorce tratamientos pre germinativos y un testigo (Cuadro 7) para eliminar *Cmm* de semilla inoculada artificialmente. Se usaron lotes de 100 semillas y fueron tratadas con los tratamientos por inmersión por 30 minutos, posteriormente se dejaron escurrir con papel filtro y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las semillas tratadas se dividieron en cuatro sub lotes de 20 semillas cada uno, tres lotes se usaron para siembra en charolas de germinación con sustrato estéril (Peat Moss #3), y un lote se pusieron en cajas de petri de vidrio con papel filtro esterilizadas en autoclave a 120°C por 20 minutos, las semillas se distribuyeron en la caja y se agregó entre 5 y 10 mL de agua destilada estéril.

Cuadro 7. Tratamientos aplicados en semilla para eliminar a *Cmm*.

No	Tratamiento	Ingrediente activo	Dosis
1	Phynton 27®	Sulfato de cobre pentahidratado	1 mL L ⁻¹
2	Phynton 27®	Sulfato de cobre pentahidratado	5 mL L ⁻¹
3	Tane citrus®	Extracto de semillas de cítricos (<i>Citrus nobilis</i>)	1 mL L ⁻¹
4	Tane citrus®	Extracto de semillas de cítricos (<i>Citrus nobilis</i>)	5 mL L ⁻¹
5	Clean H ₂ O ₂ ®	Peróxido de hidrogeno H ₂ O ₂	1 mL L ⁻¹
6	Clean H ₂ O ₂ ®	Peróxido de hidrogeno H ₂ O ₂	5 mL L ⁻¹
7	Romel®	<i>Bacillus subtilis</i>	1 mL L ⁻¹
8	Romel®	<i>Bacillus subtilis</i>	5 mL L ⁻¹
9	Protector®	Fermentaciones orgánicas	1 mL L ⁻¹
10	Protector®	Fermentaciones orgánicas	5 mL L ⁻¹
11	Fractal 5%®	Extracto de semilla de cítricos	1 mL L ⁻¹
12	Fractal 5%®	Extracto de semilla de cítricos	5 mL L ⁻¹
13	Acido sulfúrico	H ₂ SO ₄	0.5 N
14	Acido sulfúrico	H ₂ SO ₄	1 N
15	Control positivo (agua destilada estéril)	Agua destilada estéril	1 mL L ⁻¹

Las semillas en caja de petri se germinaron a temperatura ambiente por 7 días, de acuerdo al protocolo descrito en el capítulo 2, para la extracción de DNA de semillas germinadas, realizando en resumen lo siguiente: Macerado, siembra en medio B de King, cultivo de cepas a temperatura ambiente por 5 días luego se realizó la extracción de DNA.

3.3.8.3. Variables evaluadas

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones, se evaluó el porcentaje de germinación (20 semillas/unidad experimental) y luego se aplicó la técnica de germinación seguido por Bio-PCR (primero siembra del macerado de plántulas en medio de cultivo y luego PCR), para todos los tratamientos aplicados en las semillas para detectar la presencia de la bacteria. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el software SAS (versión 9.0), realizando el análisis de varianza y una comparación de medias de los tratamientos de Tukey ($\alpha = 0.05$).

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Aislamiento y confirmación de cepas de *Cmm* utilizadas en los experimentos.

De los muestreos realizados en los invernaderos en Puebla se aislaron cuatro cepas de *Cmm* que fueron confirmadas mediante PCR, las cepas correspondieron a sitios distintos, y el nombre asignado a cada una de ellas correspondió al sitio o productor cooperante.

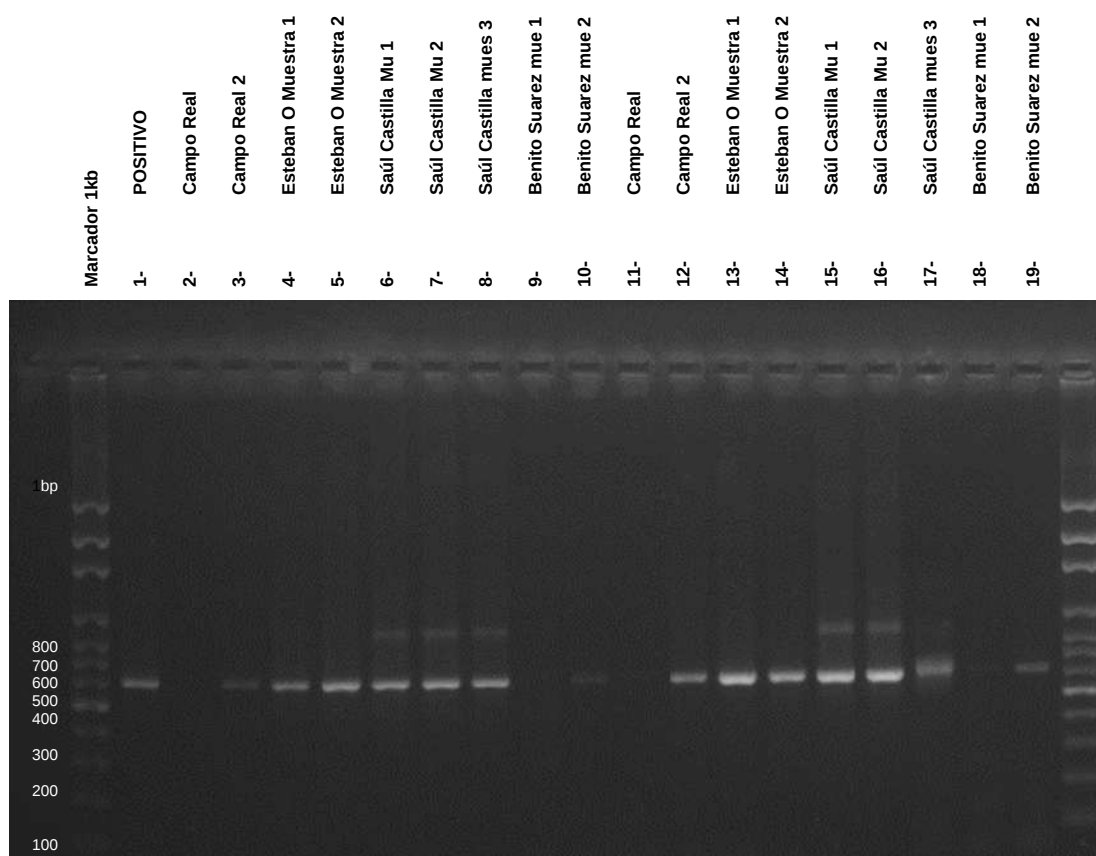


Figura 25. Amplificación de cepas de *Cmm* por PCR, líneas 1 y 22 marcador molecular 1 kb, línea 2 control positivo, líneas 2-5 10 amplificaciones con 100 ng en la reacción de PCR, los carriles 11-19 corresponden a las mismas muestras pero con 200 ng en la reacción de PCR, todos los aislamientos fueron de tallo.

La confirmación se realizó de las secuencias obtenidas comparándolas con la base de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) utilizando el programa BLAST.

La técnica de PCR con el uso de primers CMM5 y CMM6 (Dreier *et al.*, 1995) confirma ser una prueba rápida para la detección de *Cmm* a partir de cultivos puros. Para la inoculación de plantas y semillas se utilizó la cepa denominada “Saúl Castilla” porque en las amplificaciones presento una sola banda bien definida y en pruebas previas, desarrolló síntomas atribuibles a la bacteria en plantas de tomate.

3.4.2. Efecto de los tratamientos en la incidencia y severidad de *Cmm*

3.4.2.1. Análisis de las tasas relativas de incremento de la enfermedad (TRIE).

El análisis comparativo de las epidemias producto de diferentes tratamientos aplicados para el control de *Cmm*, usando las tasas de incremento de la severidad de la enfermedad para identificar los mejores tratamientos con respecto al testigo positivo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos aplicados (Cuadro 8), lo que significa que no hubo control con respecto al testigo. El modelo que mejor ajusto las epidemias con mayor frecuencia para el % de severidad fue el modelo Gompertz (Cuadro 9), tanto entre repeticiones por tratamiento como entre tratamientos (Figura 26).

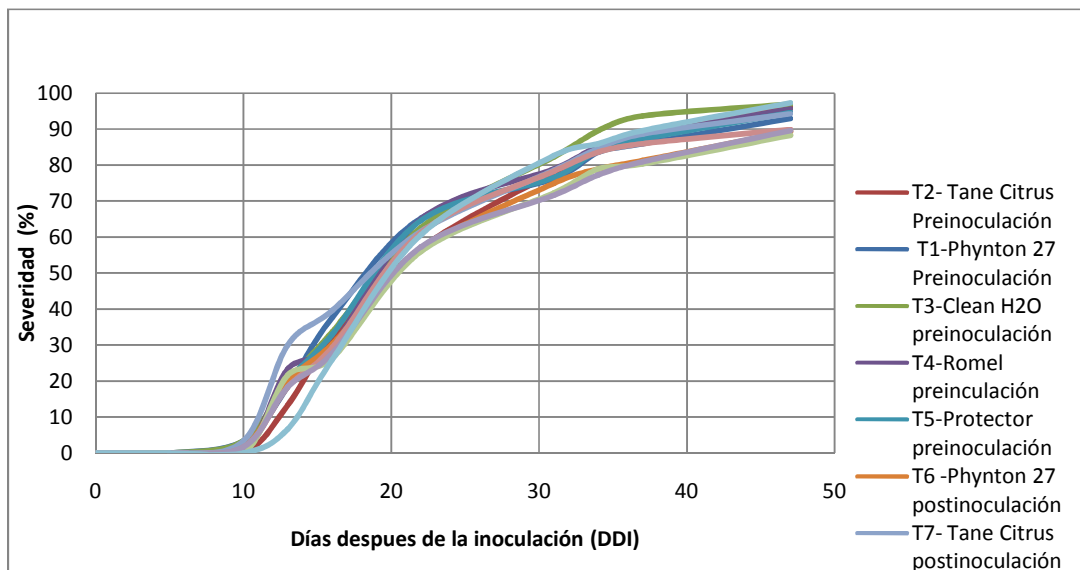


Figura 26. Curvas de progreso temporal (% severidad) de las epidemias (tratamientos) en plantas tratadas.

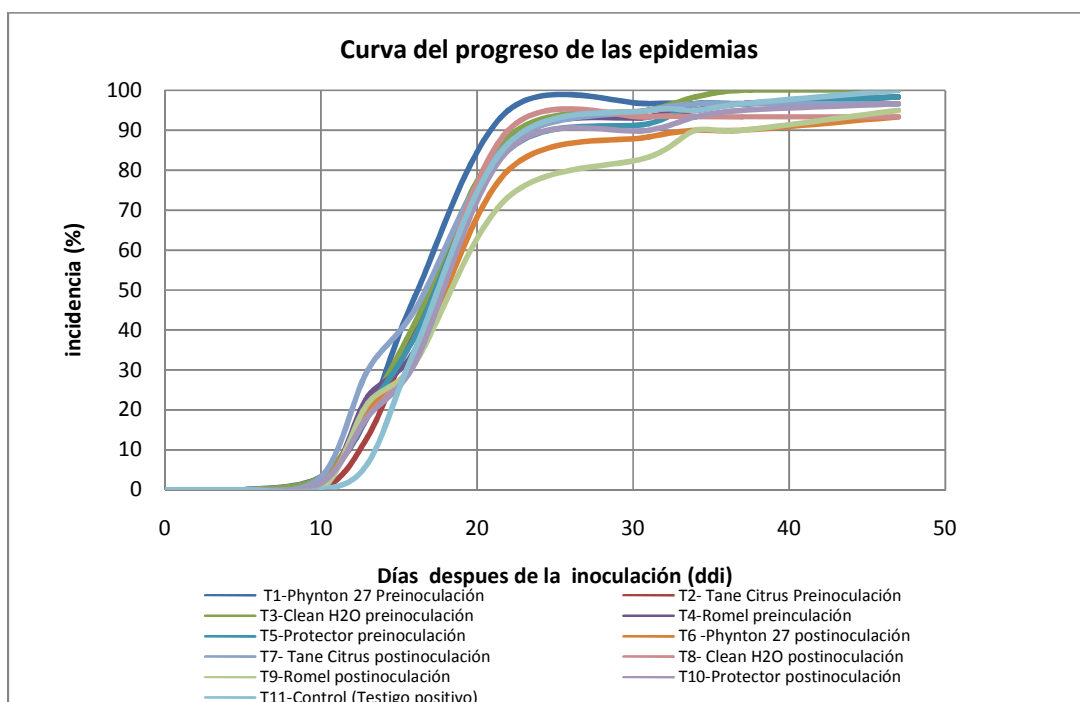


Figura 27. Curvas de progreso temporal (% incidencia) de las epidemias (tratamientos) en plantas tratadas.

Cuadro 8. Tasas relativas de incremento de la severidad determinadas con el modelo Gompertz, después de homologarlas, en los diferentes tratamientos aplicados para el control de *Cmm*.

TRATAMIENTO	Ensayo 1	Ensayo 2
	r	r
T1-Phynton 27 pre inoculación	0.127a	0.111a
T2- Tane Citrus pre inoculación	0.161a	0.110a
T3-Clean H ₂ O ₂ pre inoculación	0.153a	0.108a
T4-Romel pre inoculación	0.143a	0.109a
T5-Protector pre inoculación	0.139a	0.119a
T6 -Phynton 27 post inoculación	0.116a	0.124a
T7- Tane Citrus post inoculación	0.131a	0.130a
T8- Clean H ₂ O ₂ post inoculación	0.126a	0.100a
T9-Romel post inoculación	0.119a	0.128a
T10-Protector post inoculación	0.104a	0.126a
T11-Control (Testigo positivo)	0.148a	0.131a

Valores dentro de la misma columna seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$)

Cuadro 9. Modelos epidemiológicos para caracterizar el progreso temporal de severidad de *Cmm* de las epidemias (tratamientos), en plantas de tomate inoculadas artificialmente.

ENSAYO 1				ENSAYO2			
TRAT	MODELO	R2	r	TRAT	MODELO	R2	r
T1	Logístico	0.868	0.282	T1	Logístico	0.751	0.179
	Monomolecular	0.846	0.068		Monomolecular	0.907	0.056
	Gompertz	0.941	0.160		Gompertz	0.902	0.096
T2	Logístico	0.922	0.294	T2	Logístico	0.812	0.210
	Monomolecular	0.797	0.085		Monomolecular	0.811	0.063
	Gompertz	0.948	0.146		Gompertz	0.907	0.109
T3	Logístico	0.903	0.296	T3	Logístico	0.795	0.190
	Monomolecular	0.896	0.086		Monomolecular	0.923	0.068
	Gompertz	0.962	0.146		Gompertz	0.942	0.108

	Logístico	0.917	0.294		Logístico	0.762	0.203
T4	Monomolecular	0.826	0.082	T4	Monomolecular	0.679	0.064
	Gompertz	0.953	0.143		Gompertz	0.828	0.107
	Logístico	0.898	0.282		Logístico	0.763	0.218
T5	Monomolecular	0.877	0.071	T5	Monomolecular	0.805	0.059
	Gompertz	0.954	0.132		Gompertz	0.867	0.106
	Logístico	0.896	0.281		Logístico	0.796	0.190
T6	Monomolecular	0.705	0.054	T6	Monomolecular	0.923	0.062
	Gompertz	0.899	0.116		Gompertz	0.931	0.104
	Logístico	0.891	0.294		Logístico	0.774	0.187
T7	Monomolecular	0.904	0.064	T7	Monomolecular	0.778	0.084
	Gompertz	0.957	0.128		Gompertz	0.838	0.120
	Logístico	0.880	0.298		Logístico	0.777	0.189
T8	Monomolecular	0.767	0.070	T8	Monomolecular	0.693	0.063
	Gompertz	0.904	0.133		Gompertz	0.832	0.104
	Logístico	0.891	0.275		Logístico	0.715	0.204
T9	Monomolecular	0.858	0.058	T9	Monomolecular	0.548	0.066
	Gompertz	0.956	0.119		Gompertz	0.708	0.109
	Logístico	0.873	0.258		Logístico	0.846	0.213
T10	Monomolecular	0.866	0.045	T10	Monomolecular	0.895	0.083
	Gompertz	0.946	0.104		Gompertz	0.950	0.126
	Logístico	0.888	0.299		Logístico	0.807	0.206
T11	Monomolecular	0.897	0.079	T11	Monomolecular	0.848	0.087
	Gompertz	0.952	0.143		Gompertz	0.918	0.126

3.4.2.2. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE

El área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), para los diferentes tratamientos se muestra en el Cuadro 10, se observa que no hubo variación significativa en la cantidad de enfermedad acumulada durante el periodo evaluado.

En un estudio de compuestos de cobre que incluyó también sulfato de cobre, hidróxido de cobre y oxiclورو de cobre, realizado por Milijasevic *et al.*, (2009), este

mostró que en general los compuestos de cobre (hidróxido de cobre y oxicloruro de cobre) aplicados a plántulas en etapa de dos hojas verdaderas, dos horas en pre inoculación y posteriormente cada 7 días post inoculación y hasta los 35 días después de la inoculación, resultaron ser menos eficaces comparados con dos antibióticos estreptomicina y kasugamicina, en particular entre los compuestos de cobre, el hidróxido de cobre mostro mayor eficacia en la reducción de poblaciones bacterianas.

Cuadro 10. Área bajo la curva de la severidad del efecto de diferentes tratamientos aplicados para el control de *Cmm* en jitomate.

ENSAYO 1	% Días	ENSAYO 2	% Días
T1-Phynton 27 Preinoculación	1618.00a	T1-Phynton 27 Preinoculación	2427.70a
T2- Tane Citrus Preinoculación	1635.70a	T2- Tane Citrus Preinoculación	1937.30a
T3-Clean H ₂ O ₂ preinoculación	1773.00a	T3-Clean H ₂ O ₂ preinoculación	2130.70a
T4-Romel preinculación	1678.70a	T4-Romel preinculación	1989.00a
T5-Protector pre inoculación	1667.00a	T5-Protector preinoculación	1973.70a
T6 -Phynton 27 pos inoculación	1290.30a	T6 -Phynton 27 postinoculación	2082.30a
T7- Tane Citrus postinoculación	1589.30a	T7- Tane Citrus postinoculación	2422.00a
T8- Clean H ₂ O ₂ postinoculación	1549.00a	T8- Clean H ₂ O ₂ postinoculación	1942.70a
T9-Romel postinoculación	1434.00a	T9-Romel postinoculación	1930.00a
T10-Protector postinoculación	1303.30a	T10-Protector postinoculación	2218.00a
T11-Control (Testigo positivo)	1788.70a	T11-Control (Testigo positivo)	2304.30a
Coeficiente de variación	11.22538	Coeficiente de variación	15.27005

Valores dentro de la misma columna seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

Los resultados obtenidos contrasta con lo que mencionan Hausbeck *et al.*, (2000) y Werner *et al.*, (2002), que con la aplicación de bactericidas a base de cobre en plántulas de tomate en invernadero se puede reducir el tamaño de la población, desarrollo y propagación de *Cmm* disminuyendo su impacto en la planta y rendimiento en el campo. Sin embargo el efecto nulo en el control con sulfato de cobre aplicado vía foliar, sea el resultado del tiempo de inoculación de la bacteria pues una vez que esta está en el interior del sistema vascular a través de la inoculación por punción, esta se estableció y fácilmente colonizó el xilema como ha sido comprobado por Xu *et al.*

(2012) y Chalupowicz *et al.* (2012), y el producto no es capaz de introducirse en la planta. Otra posibilidad como se puede suponer es la resistencia de la cepa utilizada a los compuestos de cobre como resultado de su uso continuo como lo indica Cooksey (1990). Un estudio previo por Milijasevic *et al.*, (2009) confirma la resistencia de cepas de *Cmm* a compuestos de cobre. Por lo tanto, compuestos de cobre con efecto preventivo o curativo no tienen efecto sobre la incidencia y severidad de la enfermedad en plantas previamente no infectadas ni en plantas posteriormente infectadas.

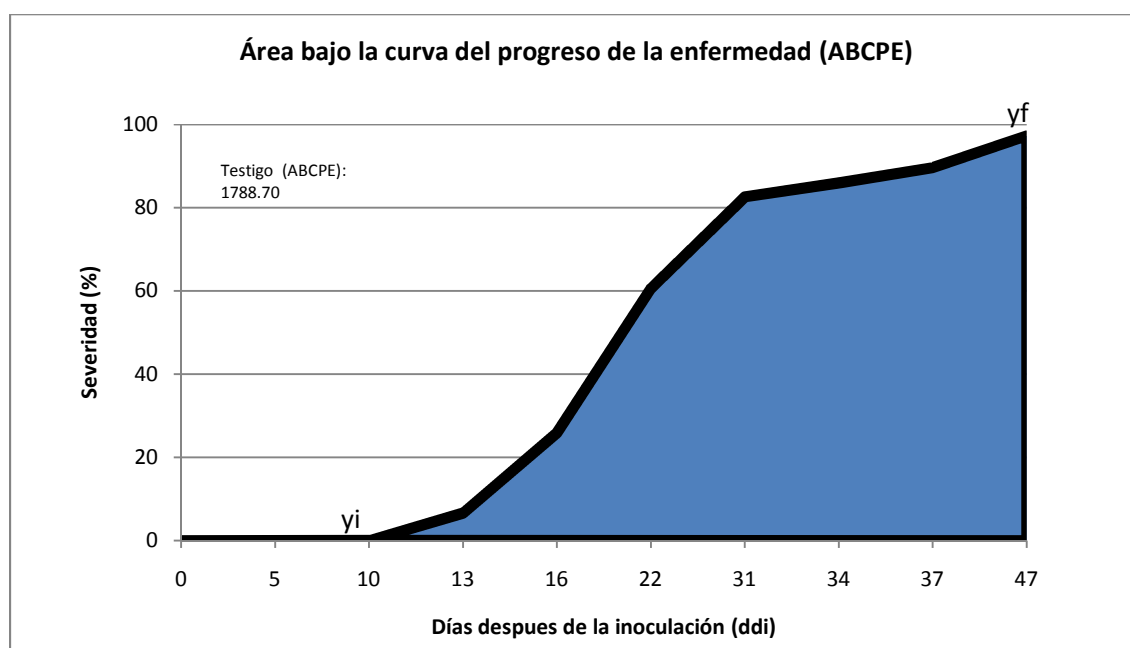


Figura 28. Área bajo la curva a través del tiempo en el testigo indicando el inicio de la enfermedad (yi), ABCPE, enfermedad final (yf).

El empleo de extractos de cítricos y en específico de Tane Citrus®, tampoco tuvo un efecto positivo en el control del cáncer bacteriano. En un estudio previo con un extracto de cítricos aplicado en sistemas hidropónicos abierto en lana de roca, mostro resultados positivos en la reducción de la enfermedad en años posteriores, el ácido peracético + peróxido de hidrogeno también probado, fue menor en el control de *Cmm* (Slusarski, 2005). Resultados similares se obtuvieron en los tratamientos biológicos con el empleo de cepas antagónicas o fermentaciones de bacterias. En el caso del producto Protector® (el producto solo describe como ingrediente activo “fermentaciones de bacterias”, sin especificar el tipo de cepas del que se obtienen) y Romel® (*Bacillus*

subtilis, el producto no especifica la cepa) confirma que son ineficaces en el manejo de la enfermedad, en plantas cuando se desean utilizar de manera preventiva ó curativa. Slusarski (2008), evaluó el producto Aqua Bac Plus (*Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*.) como agente de biocontrol, aplicado al sustrato semanalmente posterior a la inoculación por *Cmm*, revelando su ineficacia al obtener un 100% de plantas muertas de tomate. Sin embargo *Bacillus subtilis* (Quadra 137) ha sido útil en el control del cancro bacteriano en plántulas de tomate de invernadero mediante pulverización foliar en dosis de 0.3 y 0.6 g L⁻¹ antes de la inoculación con *Cmm* (Utkhede y Koch, 2004).

3.4.3. Tratamientos a la semilla

El efecto los tratamientos probados en semillas de jitomate infestadas artificialmente por *Cmm*, mostraron un efecto positivo en la reducción del inóculo primario, pues el crecimiento de colonias típicas en medio B de King, no eran distinguibles visualmente, sin embargo al momento de aplicar la técnica empleada primero por germinación de las semillas y luego por Bio-PCR (siembra en medio de cultivo y luego PCR) con los primers CMM5 y CMM6 (Dreier *et al.*, 1995), fue posible detectar al patógeno (Figura 29), en todos los tratamientos probados. Visualmente es menos notoria la banda en los tratamientos probados con Fractal 5%, porque apenas es posible distinguir una banda tenue, comparándola con el control, por lo que nos indica que la cantidad se redujo pero no fue eliminado completamente, es necesario para confirmar este supuesto aplicar otras técnicas como el PCR en Tiempo Real, para cuantificar la cantidad de inóculo en la reacción de PCR.

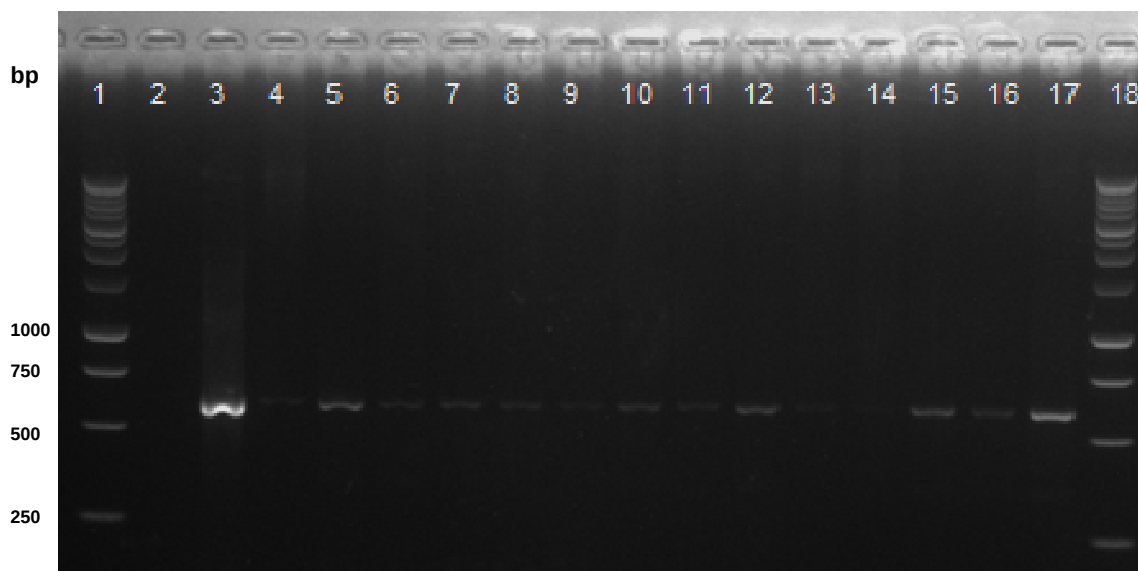


Figura 29. Amplificación de *Cmm*. Extracción por germinación y luego Bio-PCR, de los tratamientos aplicados a las semillas, líneas 1 y 18 marcador molecular 1 kb, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo, carriles 4 y 5 Phyn-ton 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 6 y 7 Tane citrus 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 8 y 9 Clean H₂O₂ 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 10 y 11 Romel 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 12 y 13 Protector 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 14 y 15 Fractal 5%, 1 y 5 mL L⁻¹, carriles 16 y 17 Ac. sulfúrico 0.5 y 1 N.

El efecto de los tratamientos aplicados a la semilla afectó el porcentaje de germinación (Cuadro 11). Fractal en dosis 1 y 5 mL L⁻¹ y Ácido sulfúrico 0.5 N, afectaron mas el porcentaje de germinación de las semillas. Las plántulas se crecieron solo hasta los 25 días después de las siembra y no se trasplantaron, hasta esa etapa no mostraron síntomas atribuidos a *Cmm*, y las condiciones del invernadero no fueron apropiadas (asepsia) por tal razón las plántulas ya no se llevaron hasta planta adulta, o hasta que manifestara los síntomas de *Cmm* por lo que no podemos saber si la bacteria sobrevivió y pudiera haber presentado síntomas en planta adulta.

Un estudio realizado por Kasseñaki *et al.*, (2011) con hidróxido de cobre y *Bacillus spp.* utilizados como tratamientos en semillas para el cáncer bacteriano, en inmersión reportaron resultados que indicaron el 100% libre de patógenos, entre ellos a *Cmm*, sin embargo no precisan la metodología usada para verificarlo, o como realizaron la confirmación de la ausencia del patógeno en las semillas. El saneamiento

de semillas con *B. subtilis* tampoco redujo la incidencia de la enfermedad por *Cmm* (Schmidt, *et al.*, 2004).

Cuadro 11. Efecto de los tratamientos aplicados en el porcentaje de germinación de las semillas tratadas.

No.	Tratamiento	Dosis	Germinación (%)
1	Phynton 27®	1 mL L ⁻¹	100a
14	Acido sulfúrico H ₂ SO ₄	1 N	100a
15	Control (agua destilada)	1 mL L ⁻¹	100a
9	Protector®	1 mL L ⁻¹	100a
2	Phynton 27®	5 mL L ⁻¹	95ab
10	Protector®	5 mL L ⁻¹	95ab
7	Romel®	1 mL L ⁻¹	95ab
5	Clean H ₂ O ₂ ®	1 mL L ⁻¹	95ab
8	Romel®	5 mL L ⁻¹	90abc
3	Tane citrus®	1 mL L ⁻¹	90abc
6	Clean H ₂ O ₂ ®	5 mL L ⁻¹	85abc
4	Tane citrus®	5 mL L ⁻¹	85abc
11	Fractal 5%®	1 mL L ⁻¹	85abc
12	Fractal 5%®	5 mL L ⁻¹	80bc
13	Acido sulfúrico H ₂ SO ₄	0.5 N	75bc

Valores dentro de la misma columna seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $\alpha=0.05$).

El efecto del peróxido de hidrogeno H₂O₂ tampoco tuvo un efecto total en la erradicación de *Cmm* en lotes de semillas tratados en este experimento, sin embargo Ken *et al.* (2000), han utilizado también este compuesto como tratamiento para la desinfestación de semillas de lechuga, que habían sido inoculadas con *Xhantomonas campestris* pv. *vitians*. Las bacterias no se detectaron cuando las semillas se trataron con 3-5% con peróxido de hidrogeno durante 5 o 15 minutos, el hidróxido de cobre también fue probado en este experimento y redujo solo los niveles de infestación de las semillas.

3.5. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio, indicaron que los productos comerciales evaluados para el control de *Cmm*, no son una alternativa en el manejo de la enfermedad, en plantas en pre y post inoculación en plantas infectadas. No se recomienda su uso posterior en un programa de manejo, sobre todo cuando la enfermedad ya se ha establecido.

Los productos evaluados como alternativas para el saneamiento de las semillas infectadas, tampoco ofrece un resultado favorable en la erradicación del patógeno, se sugiere realizar otras pruebas, incrementando la concentración de los productos y el tiempo de exposición, así como cuantificar la cantidad de inóculo primario que pueda estar presente en las semillas tratadas, de esta forma se tendrá mejor conocimiento del efecto de los tratamientos propuestos, que no puede confirmarse en el presente experimento, adicionalmente se sugiere sembrar las semillas tratadas, llevarlas hasta plantas adultas y observar la aparición de síntomas, confirmando la presencia o ausencia con la metodología utilizada en este trabajo para la detección de *Cmm* en tejido vegetal.

3.6. LITERATURA CITADA

- Anfoka, G. H. 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. Faculty of Agricultural Technology 19:401-405.
- Amkraz, N., Boudyach, E. H., Boubaker, H., Bouizgarne, B., and Ben Aoumar, A. A. 2010. Screening for *fluorescent pseudomonades*, isolated from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. World Journal of Microbiology Biotechnology 26:1059–1065.
- Baysal, Ó., Soylu, M. E., and Soylu, S. 2003. Induction of defense related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Pathology 52:747–753.
- Baysal, O., Gursoy, Y.Z., Ornek, H., and Duru, A. 2005a. Enhanced tomato resistance to bacterial canker by application of turtle oil. Plant Pathology 71:204–210.
- Baysal, O., Gursoy, Y. Z., Ornek, H., and Duru, A. 2005b. Induction of oxidants in tomato leaves treated with dl-β-Amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. European Journal of Plant Pathology 112:361-369.
- Bryan, M. K. 1930. Studies on bacterial canker of tomato. Journal of Agricultural Research 41:825-850.
- Campell, L. C., and Mandden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology, John Wiley and Sons, Inc. New York, USA 532 p.
- Chang, R. J., Ries, S. M., and Pataky, J. K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. Phytopathology 81:1276-1281.
- Chang, R. J., Ries, S. M., and Pataky, J. K. 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker of tomato. Phytopathology 82:553-560.
- Chalupowicz, L., Cohen-Kandli, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Sessa, G., Barash, I., and Manulis-Sasson, S. 2010. Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 100:252-261.
- Chalupowicz, L., Zellermann, E. M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Savidor, A., Sessa, G., Iraki, N., Barash, I., and Manulis-Sasson, S. 2012. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. Phytopathology 102:23-31.

- Cooksey, D. A. 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 28:201-219.
- Dhanvantari, B. N. 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 400-408.
- Dhanvantari, B. N., and R. J. Brown. 1993. Improved seed treatment for control of bacterial canker. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 15:201-205.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. A rapid total ADN preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Dreier, J., Bermpohl, A., and Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85:462–468.
- Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., and Voloudakis, A. E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease* 75:834-838.
- Gleason, M. Braun, E. J., and Peterson, R. H. 1993. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 1:1519-1523.
- Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R., and Fulbright, D. W. 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology* 90:38-44.
- Ivey, M. L., and Miller, S. A. 2005. Evaluation of hot water seed treatment for the control of bacterial leaf spot and bacterial canker on fresh market and processing tomatoes. *Acta Horticulturae* 695:197-204.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J., and Eichenlaub, R. 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology* 1:113-118.
- Janse, J. D.,| and Wenneker, M. 2002. Possibilities of avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen-tested (certified) or -treated planting material. *Plant Pathology* 51:523–536.
- Kasseñaki, A. M., Goumas, D., Tamm, L., Fuchs, J., Copper, J., and Leifert, C. 2011. Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected whit bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). (Abstract) *Njas Wageningen Journal of Life Sciences* 58:145-147.

- Ken, P., Nagata, R., Richard, N. R., Collins, J., and Amanda Carroll. 2002. Investigation of Seed Treatments for Management of Bacterial Leaf Spot of Lettuce. (Abstrac) The American Phytopathological Society 86:151-155.
- Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., Rekanović, E., and Stepanović, S. 2009. Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. Pestic. Phytomed. (Belgrade) Serbia 24:19-27.
- Miller, S. A., Mera, J. R., Xu, X., and F. Baysal. 2007. Evaluation of productos of to manege bacterial canker of processing tomatoes. PDMR 2:V038.
- OEPP/EPPO. 2003. Quarantine pest Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003 Data Sheets on Quarantine Pests. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Consultado agosto 2011 Disponible en: http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_ds.pdf.
- OEPP/EPPO. 2005. Normes OEPP EPPO: Standards Diagnostics *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* PM 7/42 . Bulletin 35:275–283.
- Pedroza-Sandoval, A. 1995. Epidemiología Agrícola: Principios y Aplicaciones. Universidad Autónoma Chapingo-Unidad Regional Universitaria de Zonas Aridas. Bermejillo- Durango. 76-83pp
- Pradhanang, P. M., and Collier, G. 2009. How effective hydrochloridric acid treatment to control *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Acta Horticulturae 808:81-86.
- Rademaker, J. L. W., and Janse, J. D. 1994. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by nonradioactive hybridization, polymerase chain reaction, and restriction enzyme analysis. Canadian Journal Microbiology 40:1007–1018.
- Richards, F. J. 1959. A flexible growth function for empirical use. Journal of Experimental Botany 10:290-301.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. Pp. 633-650. In: Proceedings 6th International Congress on Soilles Culture. Wageningen, The Netherlands.
- Slusarski, C. 2005. Evaluation of Chemical and Biological Control Methods for Their Potential to Reduce Bacterial Canker of Tomato in a Greenhouse Stonewool Cultivation System. Acta Horticulture 698:299-304.
- Slusarski, C. 2008. Attempts at biological control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on rockwool grown greenhouse tomatoes. Vegetable Crops Research Bulletin 69:125-134.

- Tsiantos, J. 1987. Transmission of bacterium *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *Journal Phytopathology* 119:142-146.
- Theodoro, S. A., and Maringoni, A. C. 2007. *In vitro* and in vivo action of chemicals on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causal agent o the bacterial canker of tomato. *Scientia Agricola* 57:439-444.
- Utkhede, R., and Koch, C. 2004. Biological treatments to control bacterial canker on greenhouse tomatoes. *Biocontrol* 49:305-3013.
- Werner, N. A., Fulbright, D. W., Podolsky, R., Bell, J., and Hausbeck, M. K. 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Disease* 86:535-542.
- Xu, X. 2010. Seed trasnmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and development of strategies to control the pathogen in seed. (Tesis the Degree Doctor of Philosophy). The Ohio State University, E.U. 164pp. . <http://etd.ohiolink.edu/send-pdf.cgi/Xu%20Xiulan.pdf?osu1291083855>. [En línea] Fecha de consulta: Octubre del 2012.
- Xu, X., Rajashekara, G., Paul, P. A., and Miller, S. A. 2012. Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. *Phytopathology* 102:177-184.
- Yuce, E.k., Yigit, S., and Tosun, N. 2011. Efifcacy of solarization conbinet whit Metam Sodium and hidrogen peroxid in control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersisic* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouse. *Acta Horticulturae* 914:385-392.
- Zhang, W., Wenxiang, Y., Qingfang, M., Yaning, L., and Daqun, L. 2010. Screning and identification of antagonistic *Streptomyces spp.* Against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato rhizosphere. *Frontiers of Agriculture in China* 4:159-164.

ANEXOS

Cuadro 12. Tasas de incremento total de las epidemias homogenizadas a un solo modelo, del primer ensayo. Parámetros epidemiológicos y estandarización de tasas de severidad de *Cmm* en diferentes tratamientos en jitomate ENSAYO 1.

TRAT	REP	MODELO	R ²	CME	r (ddi)	rho	r _t
T1	1	Gompertz	0.983	0.069	0.146		
T1	2	Gompertz	0.974	0.090	0.135		
T1	3	Monomolecular	0.974	0.012	0.049	0.025	0.099
T2	1	Logístico	0.929	1.234	0.293	0.049	0.195
T2	2	Gompertz	0.976	0.117	0.159		
T2	3	Gompertz	0.979	0.067	0.130		
T3	1	Monomolecular	0.970	0.036	0.079	0.039	0.157
T3	2	Gompertz	0.990	0.034	0.136		
T3	3	Gompertz	0.971	0.151	0.165		
T4	1	Gompertz	0.960	0.108	0.117		
T4	2	Gompertz	0.977	0.115	0.162		
T4	3	Gompertz	0.990	0.043	0.149		
T5	1	Monomolecular	0.973	0.035	0.082	0.041	0.164
T5	2	Gompertz	0.990	0.027	0.121		
T5	3	Gompertz	0.985	0.048	0.131		
T6	1	Gompertz	0.983	0.070	0.145		
T6	2	Gompertz	0.967	0.066	0.101		
T6	3	Gompertz	0.966	0.069	0.102		
T7	1	Gompertz	0.986	0.043	0.141		
T7	2	Gompertz	0.986	0.036	0.115		
T7	3	Gompertz	0.962	0.140	0.137		
T8	1	Gompertz	0.987	0.043	0.132		
T8	2	Monomolecular	0.941	0.020	0.041	0.020	0.082
T8	3	Gompertz	0.969	0.164	0.165		
T9	1	Gompertz	0.979	0.043	0.102		
T9	2	Gompertz	0.975	0.096	0.140		
T9	3	Gompertz	0.972	0.073	0.115		
T10	1	Gompertz	0.980	0.048	0.113		
T10	2	Gompertz	0.972	0.060	0.105		
T10	3	Gompertz	0.958	0.074	0.094		
T11	1	Gompertz	0.982	0.086	0.178		
T11	2	Gompertz	0.984	0.058	0.138		
T11	3	Gompertz	0.983	0.053	0.129		

r= Tasa relativa de incremento de la severidad de *Cmm* según el mejor modelo de ajuste.

rt=Tasa relativa de incremento transformada al modelo Gompertz modelo de mayor frecuencia.

rho=Parámetro de cambio ponderado común.

Cuadro 13. Tasas de incremento total de las epidemias homogenizadas a un solo modelo, del primer ensayo. Parámetros epidemiológicos y estandarización de tasas de severidad de *Cmm* en diferentes tratamientos en jitomate ENSAYO 2.

TRAT	REP	MODELO	R2	CME	r (ddi)	Rho	rt
T1	1	Monomolecular	0.992	0.006	0.062	0.031	0.125
T1	2	Monomolecular	0.978	0.015	0.057	0.029	0.114
T1	3	Gompertz	0.970	0.052	0.094		
T2	1	Gompertz	0.986	0.048	0.134		
T2	2	Monomolecular	0.986	0.006	0.049	0.024	0.098
T2	3	Gompertz	0.987	0.026	0.099		
T3	1	Gompertz	0.956	0.077	0.093		
T3	2	Gompertz	0.964	0.076	0.103		
T3	3	Gompertz	0.991	0.029	0.128		
T4	1	Gompertz	0.958	0.184	0.148		
T4	2	Monomolecular	0.977	0.011	0.050	0.025	0.101
T4	3	Monomolecular	0.979	0.006	0.039	0.020	0.078
T5	1	Monomolecular	0.977	0.016	0.060	0.030	0.120
T5	2	Monomolecular	0.983	0.021	0.079	0.039	0.157
T5	3	Gompertz	0.956	0.056	0.080		
T6	1	Monomolecular	0.972	0.031	0.074	0.037	0.149
T6	2	Monomolecular	0.948	0.030	0.053	0.026	0.106
T6	3	Monomolecular	0.941	0.041	0.058	0.029	0.116
T7	1	Gompertz	0.983	0.030	0.095		
T7	2	Gompertz	0.977	0.111	0.157		
T7	3	Monomolecular	0.934	0.065	0.069	0.034	0.138
T8	1	Gompertz	0.942	0.219	0.136		
T8	2	Gompertz	0.984	0.030	0.100		
T8	3	Monomolecular	0.941	0.013	0.032	0.016	0.065
T9	1	Gompertz	0.961	0.088	0.106		
T9	2	Monomolecular	0.982	0.047	0.115	0.057	0.230
T9	3	Monomolecular	0.899	0.013	0.024	0.012	0.049
T10	1	Gompertz	0.963	0.153	0.143		
T10	2	Gompertz	0.984	0.051	0.128		
T10	3	Gompertz	0.938	0.145	0.107		
T11	1	Logístico	0.938	0.408	0.179	0.030	0.119
T11	2	Gompertz	0.966	0.136	0.140		
T11	3	Monomolecular	0.954	0.053	0.075	0.038	0.151

r= Tasa relativa de incremento de la severidad de *Cmm* según el mejor modelo de ajuste.

rt=Tasa relativa de incremento transformada al modelo Gompertz modelo de mayor frecuencia.

rho=Parámetro de cambio ponderado común.

