

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas



DETECCIÓN E INCIDENCIA DE *Clavibacter michiganensis*
subespecie *michiganensis* en *Lycopersicon esculentum* Mill. EN EL
ESTADO DE SONORA, MÉXICO Y EVALUACIÓN DEL EFECTO
BACTERICIDA DE ACEITES ESENCIALES

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

JESÚS BORBOA FLORES

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Edgar Omar Rueda Puente

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2009

La presente tesis titulada “**Detección e incidencia de *clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en *Lycopersicon esculentum* Miller en el estado de Sonora, México y evaluación del efecto bactericida de aceites esenciales**”, realizada por el **M.C. Jesús Borboa Flores**; fue dirigida y asesorada por el **Dr. Edgar Omar Rueda Puente**, siendo aceptada, revisada y aprobada por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Consejo Particular

Dr. EDGAR OMAR RUEDA PUENTE
DIRECTOR DE TESIS

Dr. JUAN FRANCISCO PONCE MEDINA
CO-DIRECTOR DE TESIS

Dra. EVELIA ACEDO FÉLIX
SINODAL

Dr. MANUEL CRUZ VILLEGAS
SINODAL

Dr. JOSE LUIS GARCÍA HERNANDEZ
SINODAL

Dr. JESÚS SANTILLANO CAZÁRES
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

Escribir el agradecimiento de esta tesis doctoral, es para mí dar gracias primeramente a Dios por dejarme llegar al sitio donde estoy en este momento, y deseo expresar un profundo reconocimiento a todas aquellas personas que me han ayudado a ser posible esta tesis doctoral. En primer lugar quiero agradecer al Dr. Edgar Omar Rueda Puente, director de esta tesis por saber conducirme en el desarrollo de la investigación, por saber escucharme y ofrecerme sus consejos y su amistad en momentos decisivos. A la Dra. Evelia Acedo Félix, responsable del Laboratorio de Microbiología Molecular del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, A. C. (CIAD), por facilitarme el trabajo poniendo a mi disposición todos los medios disponibles, reconociendo su incondicional apoyo profesional, paciencia y calidad humana.

A los miembros de mi comité: Dr. Juan Francisco Ponce medina, Dr. Manuel Cruz Villegas y Dr. José Luís García Hernández, por el gran interés mostrado en el desarrollo de esta investigación, por sus consejos y amistad.

A los M.C. Armando Pulido Herrera y Adrián Mauricio García Ortega del Laboratorio de Virología y Biología Molecular Centro Regional de Estudios y Diagnóstico Fitosanitario del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California por la aportación de sus conocimientos y permitirme trabajar en su grupo de investigación.

A la Universidad de Sonora, Universidad Autónoma de Baja California, al Instituto de Ciencias Agrícola por sus apoyo y servicios brindados como institución, durante los años que he dedicado a la realización de este postgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Programa de Mejoramiento del Profesorado por el apoyo de la beca otorgada para realizar mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por el proyecto aprobado 12067: Detección de bacterias de importancia cuarentenaria en la zona Noroeste de México.

A la Q.B. Rosalva Pérez, y al personal del Laboratorio de Microbiología Molecular por su gran ayuda y aportación de conocimientos desde el primer día hasta el último momento de mi estancia en el CIAD.

A todo el personal del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) por el apoyo brindado durante mis estudios.

A la M.C Magdalena Ortega Nieblas por su apoyo incondicional y sus conocimientos brindados.

DEDICATORIA

A toda mi familia por su cariño y apoyo que siempre me han brindado. A mis padres Máximo que se nos adelantó en el camino, a mi madre Ramona por su comprensión y ayuda en los momentos mas difíciles de mi vida, que me ha enseñado a enfrentar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño. A ellos muchas gracias.

A mi esposa Lupita por su paciencia, por su comprensión, por su empeño, para que salga adelante con mis estudios.

Para mis hijos, Jesús Eduardo y Yuritt Guadalupe. Por su compañía y motivación para continuar en estate importante proyecto de mi vida que les servirá de ejemplo en su formación profesional. Es sin duda mi referencia para el presente y para el futuro.

A mis amigos Francisco y Raquel por haber creído siempre en mi.

A todos ellos muchas gracias de todo corazón.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de Figuras.....	X
Índice de Cuadros.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
CAPÍTULO I. Integración general.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
1.0. El cultivo del tomate.....	6
1.1. Aspectos generales del cultivo de tomate.....	6
1.1.1. Taxonomía de <i>Lycopersicon esculentum</i> Miller.....	7
1.1.2. Descripción botánica del tomate.....	8
1.1.3. Sistema radicular, tallo y hoja.....	8
1.1.4. Descripción de flor y fruto.....	8
1.1.5. Clasificación del cultivos de tomate.....	9
1.1.6. Importancia del cultivo de tomate.....	11
2.0. Producción.....	12
2.1.1 Producción de tomate en el mundo.....	12
2.1.2. Producción de tomate en México.....	12
2.1.3. Producción de tomate en el estado de Sonora.....	13
3.0. Enfermedades bacterianas.....	13
3.1.1. Enfermedades que disminuyen su producción.....	13
3.1.2. Morfología y estructura de bacterias fitopatógenas.....	14
4.0. Clasificación de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	19
4.1.1. Cancro bacteriano del tomate.....	19
4.1.2. Sintomatología de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en tomate.....	20

4.1.3. Ciclo de la enfermedad y epidemiología.....	22
4.1.4. Manejo de la enfermedad.....	23
4.1.5. Importancia económica de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	25
5.0. Detección de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	26
5.1.1. Descripción de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	26
5.1.2. Características bioquímicas de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i>	27
5.1.3. Detección de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> mediante pruebas serológicas.....	29
5.1.4. Diagnostico molecular de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i>	30
6.0. Métodos de control de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	31
6.1.1. Control químico de <i>Cmm</i>	31
6.1.2. Control biológico.....	32
6.1.3. Aceites esenciales.....	33
6.1.4. Mecanismos de acción de aceites esenciales contra <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	34
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS.....	37
CAPÍTULO 2. Detección de <i>Clavibacter michiganensis</i> subespecie <i>michiganensis</i> en tomate en el estado de Sonora, México.....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
Colectas de muestras.....	38
Muestreo de semilla.....	38
Aislamiento e identificación.....	40
Detección serológica.....	41
Extracción de ADN genómico total a partir de tejido vegetal.....	41

Detección de <i>C. michiganensis</i> subespecie <i>michiganensis</i> por PCR.....	41
Pruebas de patogenicidad.....	43
Preparación del inóculo bacteriano.....	43
Pruebas de patogenicidad en semilla.....	43
Pruebas de patogenicidad en plántula.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
Detección, aislamiento e identificación.....	45
Detección serológica.....	45
Aislamiento y caracterización fenotípica de <i>Cmm</i>	46
Detección e identificación por técnicas moleculares.....	46
Pruebas de patogenicidad.....	47
CONCLUSIONES.....	48
CAPÍTULO 3. Evaluación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de aceites esenciales contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subespecie <i>michiganensis</i>	52
MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
Obtención de aceites.....	53
Cultivos bacterianos.....	53
Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales...	54
Preparación del inóculo.....	54
Actividad antimicrobiana.....	54
Análisis estadístico.....	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	61

LITERATURA CITADA.....	62
Anexo 1	79

PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA INVESTIGACIÓN

Índice de de Figuras

Figura		Pág.
1	Diversidad de color, tamaño y forma del fruto de tomate.....	10
2	Estructura de una bacteria fitopatógena mostrando sus organelos.....	15
3	Tallo de tomate afectados por <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> mostrando una necrosis de haces vasculares de color marrón del los vasos; síntoma característico del de la enfermedad.....	21
4	Hojas de tomate afectadas por <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> mostrando el color pardo y la necròsis en los bordes de los foliolos; síntoma característico de la enfermedad.....	22
5	Frutos de tomate afectadas por <i>C.michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> mostrando el punto negro, necrotico rodeado del halo blanco (ojo de pájaro) síntoma característico de la enfermedad.....	22
6	Localización geográfica de los sitios de muestreo de tomate <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., evaluadas en Sonora México	40
7	Síntomas típicos del cancro bacteriano obsevados durante el muestreo. Izquierda: planta de tomate con síntoma inicial de daño por <i>Cmm</i> . Derecha: plantas de tomate con síntoma de <i>Cmm</i> con la enfermedad avanzada.....	49
8	Aislamiento bacteriológicos obtenidos de tejido foliar sintomatico en medio de cultivo NBY.....	49
9	Detección por PCR de un fragmento de ADN específico para la bacteria <i>C. michiganensis</i> subespecie <i>michiganensis</i> en muestras de diversos tejido de planta de tomate con síntomas de cancro bacteriano.....	50

10	Árbol de homología de la comparación de las secuencias del fragmento del ADNr amplificado de las cepas H y D aisladas, con tres secuencias parciales de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i> , de <i>Micobacterium</i> spp. y <i>Escherichia coli</i>	50
11	Plántulas de 20 días tratadas con inóculo bacteriano de <i>Cmm</i> . y plántulas tratadas con agua destilada estéril.....	51
12	Comparación del crecimiento de <i>Clavibacter michiganensis</i> subespecie <i>michiganensis</i> con el aceite esencial de <i>Limppia palmeri</i> (Derecha) y los antibióticos de estreptomina y el ácido nalidixico (Izquierda).....	59
13	Comportamiento de los aceites esenciales en la interacción a diferentes concentraciones frente a las cepas bacterianas <i>Cmm</i> a las 24 h del ensayo.....	60

Índice de Cuadros

Cuadro		Pág.
1	Características del hábito de crecimiento y producción del cultivo de tomate determinado, indeterminado y semi-determinados.....	11
2	Resultados del análisis de los diámetros de inhibición del crecimiento de <i>Cmm</i>	56

RESUMEN

De los productos hortícolas, sobresale el cultivo del tomate *Lycopersicon esculentum* Mill., siendo la hortaliza más importante en el mundo. El cultivo de tomate puede ser afectado por varias enfermedades, una de ellas es *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, (*Cmm*). El objetivo del presente trabajo consistió en detectar la incidencia de *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (*Cmm*) en semilla y material vegetativo de (*Lycopersicon esculentum* Mill.), y evaluar el efecto bactericida de aceites vegetales. Se muestreó semilla, hoja, tallo y fruto en nueve localidades del Estado de Sonora, en sistema de invernaderos, casa sombra y campo a cielo abierto, comprobándose la presencia de *C. michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*) en sólo una de las localidades, mediante análisis fitopatológicos, caracterizaciones bioquímicas, técnicas serológicas del test de ELISA (Enzyme Linked immunosorbent assay), y por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, se amplificó un fragmento 270 pb del espaciador intergénico ribosomal, específico para la detección de *Cmm* y un fragmento de aproximadamente 480 pb del gen 16S del operón ribosomal, se secuenció y se encontró una homología del 99% con *Cmm* de las secuencias públicas, mediante análisis de Blast. Posteriormente la investigación se orientó en evaluar el efecto bactericida de 19 aceites esenciales, de los cuales fueron seleccionados 6 por mostrar mayor efecto bactericida (orégano *Lippia palmeri*, obtenido de un hábitat natural y otro semidomesticado; *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Thymus vulgares*). La cepa bacteriana utilizada en

el presente estudio fue *C. michiganensis* subespecie *michiganensis* la cual fue aislada de campos de tomate contaminado y caracterizada según como se indicó en el estudio previo. Las diluciones de los aceites evaluadas fueron 1:1, 1:10 y 1:5 v/v, colocándose 15 μ l de cada una de las concentraciones de los aceites esenciales sobre discos de papel filtro en medio de cultivo específico (NBY). El análisis de varianza indicó diferencia significativa ($p < 0.05$), entre los aceites evaluados, entre las diferentes concentraciones y en la interacción entre ambos parámetros en la inhibición del crecimiento de *Cmm*. Los aceites esenciales que presentaron actividad antimicrobiana fueron las diferentes presentaciones de *Lippia palmeri*, *Thymus vulgaris* y *Cinnamomum zeylanicum*, los cuales representan una alternativa para el control de la bacteria *Cmm*.

ABSTRACT

Tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.), is the most important horticultural product worldwide. Tomanto cultivation can be affected by various diseases; one of them is *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* (*Cmm*). The aim of this study was to detect the occurrence of *Cmm* in seed and vegetative material (*Lycopersicon esculentum* Mill), and evaluate the bactericidal effect of vegetable oils. Seed, leaf, stem and fruit were sampled in nine localities in the State of Sonora, in system of greenhouses, shade house and open field, confirming the presence of *Cmm* in only one of the localities, using phytopathological analysis, biochemical characterization, serological test ELISA (Enzyme Linked immunosorbent assay), and the technique of chain reaction polymerase. Amplification of a 270 bp fragment of AND of the ribosomal intergenic spacer, specific for detection of *Cmm* and a fragment of approximately 480 bp of 16S gene riboosomal operon, was sequenced and found 99% homology with public sequences of *Cmm* by Blast analysis. The second part of the investigation was oriented to evaluate the bactericidal effect of 19 essential oils, of which 6 were selected due they showed greater bactericidal effect (oregano *Lippia palmeri*, obtained from a one natural habitats and other semi-cultivated; *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Thymus vulgare*).The used bacterial stock in this study was *C. michiganensis* subspecie *michiganensis* which was isolated and characterized from contaminated fields of tomato, according to the previous study. The dilutions of oils evaluated were 1:1, 1:10 y 1:5 v/v; then, 15 µl of each concentration of essential oils were placed on

paper discs filter in the specific media (NBY). The variance analysis showed significant difference ($p < 0.05$), between oils, among different concentrations and in the interaction between both parameters in the inhibition from the growth of *Cmm*. The essential oils that presented antimicrobial activity were the different presentations from *Lippia palmeri*, *Thymus vulgaris* and *Cinnamomum zeylanicum*, which are represents an alternative for the control of bacterium *Cmm*.

CAPÍTULO 1

Integración general

El trabajo de investigación que se presenta a continuación, consta de cuatro capítulos. El primero consiste en un revisión bibliográfica sobre aspectos generales del cultivo del tomate y de las bacterias fitopatógenas, así como de su de control. En el segundo capítulo, se hace referencia sobre la metodología utilizada en el muestreo de semilla, hoja, tallo y fruto en nueve localidades, en sistema de invernaderos, casa sombra y campo a cielo abierto, comprobándose la presencia de *C. michiganensis* subespecie *michiganensis* mediante análisis fitopatológicos, caracterizaciones bioquímicas, técnicas serológicas mediante la prueba de ELISA (Enzyme Linked immunosorbent assay), y por la técnica molecular basada en la detección de fragmentos de ácidos nucleicos específicos por la reacción en cadena de la polimerasa. De las muestras recolectadas, sólo se detectó y se aisló *Cmm* de una de las localidades muestreadas, con sistema de cultivo en malla sombra. De dos de las colonias aisladas, se secuenció un fragmento de aproximadamente 480 pb del ADNr 16S (cepas H y D) y se encontró una homología del 99 y 97 % respectivamente, en la comparación frente a otras cepas de *Cmm* depositadas en el Gen bank. La detección de la bacteria *Cmm* en semilla, hoja y tallo en el estado de Sonora en las diferentes etapas fenológicas del tomate, representa un riesgo para los productores de la hortaliza, por lo que es necesario que ésta y las demás regiones productoras realicen pruebas en los lotes de semillas de importación, para evitar la diseminación de la bacteria y evitar que la enfermedad se extienda en el Estado.

de Sonora. El tercer capítulo se orientó a evaluar el efecto bactericida de 19 aceites esenciales, de los cuales fueron seleccionados 6 por mostrar mayor efecto bactericida, los cuales fueron: orégano (*Lippia palmei*), encontrado en dos hábitats naturales y otro semicultivado; *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Thymus vulgares*. La cepa bacteriana utilizada en este estudio, fue *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, la cual se aisló y caracterizó previamente de campos de tomate contaminado en el estado de Sonora. La técnica utilizada para el análisis de la actividad antimicrobiana, fue de acuerdo a las recomendaciones de Prabuseenivasan y col. (2006) modificada. Los aceites se diluyeron 1:1, 1:10 y 1:5 v/v y de forma aséptica; se colocaron 15 µl de cada una de las concentraciones de los aceites esenciales sobre discos de papel filtro en medio de cultivo específico (NBY). El análisis de varianza indico diferencia significativa ($p < 0.05$), entre los aceites evaluados, entre las diferentes concentraciones y en la interacción entre ambos parámetros en la inhibición del crecimiento de *Cmm*. Los aceites esenciales que presentaron actividad antimicrobiana fueron las diferentes presentaciones de *Lippia palmeri*, *Thymus vulgaris* y *Cinnamomum zeylanicum*, los cuales representan una alternativa para el control de la bacteria *Cmm*. Son necesarios nuevos experimentos para obtener información relacionada con los aspectos fitotóxicos sobre las diferentes etapas fenológicas del cultivo.

INTRODUCCIÓN

De los principales productos hortícolas, sobresale el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.); es sin duda la hortaliza más importante en el mundo logrando en menos de un siglo la preferencia de los consumidores de diversos países y por ser la más dinámica y con mayor capacidad exportadora (Carrillo, 2004). Su producción representa una actividad importante para los agricultores de muchos países como Estados Unidos, Italia, España, Grecia, México, Brasil, Turquía, y varios países asiáticos (Carrillo, 2004).

Una de las causas principales de la disminución en la producción del cultivo es la presencia de enfermedades de origen biótico causadas por bacterias, hongos, virus y nematodos fitopatógenos, desarrollando mejor la enfermedad cuando existe un huésped susceptible, un patógeno virulento y un ambiente apropiado para desarrollarse la enfermedad (Jones *et al.*, 2001).

Entre las bacterias que afectan al cultivo de tomate esta *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*), pertenecientes a la familia *Microbacteriaceae*, la cual fue descrita por primera vez en el año 1909, por Edwin F. Smith sobre tomate bajo invernadero en Grand Rapids, en Michigan Estado Unidos. El mismo Edwin F. Smith, en un principio la denominó como Grand Rapids, pero más tarde le dio el nombre de marchitez bacteriana.

No fue hasta 1926, en que a esta enfermedad se le dio importancia, debido los cuantiosos daños importantes generados en algunas zonas de Estados Unidos, y en los años siguientes se extendió por el mundo ocasionando grandes pérdidas en producción de tomate (Aguirre, 1965). En la actualidad se encuentra

distribuida por casi todo el mundo causan pérdidas económicas significativas que oscilan entre 10 y 80 % en tomate de invernadero y del campo (Gleason *et al.*, 1993; Blancard, 1996).

La transmisión es principalmente por semilla infectada o contaminada, y trasplantes de material vegetativo contaminado por el patógeno, en el cual puede vivir por varios años (EPPO, 1992; Gleason *et al.*, 1993). La bacteria penetra a los tejidos vasculares principalmente a través de heridas, estomas, tricomas e hidratos de la hoja (Gleason *et al.*, 1993). En el fruto se presentan manchas necróticas con el centro rugoso de color pardo rodeado por un halo blanco: estas manchas son conocidas como ojo de pájaro. (Gleason *et al.*, 1993; Blancard, 1996).

Las formas de control para *Cmm*, es mediante las prácticas culturales en el manejo del cultivo, utilizar semilla sana libre del patógeno (Claudio y Sandoval, 2004). En cuanto a control químico, se puede recurrir a aplicaciones preventivas de productos cúpricos como oxiclورو de cobre, óxido de cobre o hidróxido de cobre (Sandoal, 2004). Estos métodos de control previenen la multiplicación bacteriana pero no son siempre controles adecuados del inóculo llevado en la semilla. Desafortunadamente, el uso frecuente de pesticidas y los antibióticos contra la planta y bacterias patógenas ha llevado a la selección de poblaciones bacterianas resistentes contra los antibióticos. Aunado a lo anterior, existen restricciones gubernamentales en el uso de los compuestos de cobre, que son ampliamente utilizados para el control de las enfermedades bacterias en la planta, estos compuestos han sido limitados en los países de la unión europea

por la regla 473/2002 debido a su impacto en el ambiente (Sandoal, 2004). y por su toxicidad para el hombre provocan irritación en la piel, en el tracto respiratorio y los ojos. Además son de un alto costo no se consigue fácilmente y se dispone de un limitado número de productos y en su mayoría afectan a organismos benéficos. En el contexto de esta problemática de manejo de enfermedades, se requieren realizar programas de monitoreos constantes para diagnosticar la posible presencia de la bacteria *Cmm* en los campos productores de tomate en el estado de Sonora, lo cual es fundamental auxiliarse de técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares, así como evaluar otros métodos de control de la bacteria mediante el uso de aceites esenciales.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.0 El cultivo del tomate

1.1 Aspectos generales del cultivo de tomate

El tomate es la hortaliza más importante en numerosos países y su popularidad aumenta considerablemente, por lo cual este cultivo a adquirido gran importancia económica en todo el mundo (Esquinas y Nuez, 2001). Todavía hay controversia sobre su área de origen (D'Arcy *et al.*, 2001, Gleason y Cronquist, 1991), proponen que se originó en los Andes entre Colombia, Bolivia, Chile, Ecuador y Perú entre otros, donde existen mayor cantidad de tipos de géneros; otros investigadores argumentan que su origen es de México. Algunos botánicos hallaron el tomate primero en toda la América tropical, subtropical y más tarde en los trópicos de Asia y África (CEDAF, 1993).

La evidencia histórica favorece a México como el centro más importante de domesticación del tomate; hecho ampliamente aceptado en el mundo científico, ya que la utilización de las formas domésticas en nuestro país, es muy antiguo. Sus frutos eran bien conocidos y empleados por culturas indígenas que habitaban en el centro y sur de México; quienes llamaban en legua náhuatl Xitli (ombligo o centro) y tinatim (tomati o tomatera) y Francisco Hernández emplea también la voz de jitomate cuando describe xitli los más grandes por ello se llaman xitomate (Bukasov, 1963; Báez, 2001).

En 1554, fue llevado a Europa y desde ahí se comercializó a Estados Unidos a partir de 1885. Los portugueses y españoles difundieron el tomate a Oriente

Medio y África y desde ahí a otros pasajes asiáticos y de Europa a Estados Unidos y Canadá (Ramírez y Sáinz, 2006; CEDAF, 1993).

1.1.1 Taxonomía de *Lycopersicon esculentum* Mill.

El tomate *Lycopersicon esculentum*, es una planta perenne, perteneciente al reino Plantae, división Spermathophyta (reproducción por semilla), subdivisión Angiosperma (semillas cubiertas), clase Dicotyledoneae, orden Solanales, familia: Solanaceae. Género: *Lycopersicon*, especie: *esculentum* (CEDAF, 1993; Gleason, 1991; Jones *et al.*, 1997). Como planta perenne de crecimiento determinado e indeterminado (Nuez, 2001). Debido a la hibridación y su porte arbustivo, tiene la capacidad de desarrollarse de forma rastrera, semirrecta o erecta.

El género *Lycopersicon* comprende diferentes especies comúnmente divididas en dos subgéneros: *Eulycopersicon* que incluye especies de fruto rojo *Eriopersicon* que son en su mayoría frutos verdes.

Según Miller y Tanksley (1990) la mayor diversidad del tomate se encuentra en las especies silvestres, ya que éstas representan una importante fuente de variabilidad genética que puede ser utilizada en el mejoramiento del cultivo, tales como el sabor, el aroma, la coloración y la textura.

Las especies silvestres producen un mayor número de frutos por racimo que el tomate cultivado. Dentro de las formas silvestres más promisorias del género para aportar características transferibles se encuentra *L. esculentum* var. *cerasiforme*; tomate conocido como cherry y de valor comercial relativamente alto en el mundo (Moccia *et al.*, 1998).

Todas las especies que pertenecen al género *Lycopersicon* son diploides, $2N = 24$ cromosomas (Jones *et al.*, 1997).

1.1.2. Descripción botánica del tomate

Del tomate *Lycopersicon esculentum* se reconocen diversos tipos botánicos en cuanto a su forma y tamaño: *Comune*: tomate común, *Grandifolium*: tomate hoja de papa, *Validum*: tomate erecto, arbustivo, *Cerasiforme*: tomate cereza o Cherry y *Pyriforme*: tomate pera y están formados por las siguientes partes:

1.1.3. Sistema radicular, tallo y hoja.

Este se compone de una raíz principal de las que surgen raíces laterales que forman un conjunto de un radio de 1.5 m la mayor parte del sistema radicular se ubica entre los 5 y 45 cm. de profundidad (CEDAF, 1993).

El Tallo es herbáceo, en su etapa de desarrollo es erecto y cilíndrico, cubierto de pelos glandulares que expulsan una sustancia de color verde amarillo con un olor característico que desempeña el papel de repelente para algunos insectos. El tamaño es determinado por características genéticas como por otros factores (Báez, 2001; CEDAF, 1993).

Las hojas son pinntisectas con foliolos desiguales, oval lanceolados, labodentados, pilosos y aromáticos. El tamaño de esta estará determinado por las características genéticas del cultivo y las condiciones en las que se encuentre (CATIE, 1990; CEDAF, 1993).

1.1.4. Descripción de flor y fruto

La planta posee una inflorescencia en forma de racimo cimoso con flores pequeñas, medianas y grandes, con diferentes tonalidades de amarillo. El

número de flores por racimo puede ser de 7 a 9 (Rodríguez *et al.*, 2001; CEDAF, 1993).

Las flores son hermafroditas, con 5-6 sépalos que forman un cáliz persistente, 5-6 pétalos dispuestos en una corola tubulosa, con igual número de estambres unidos en la base de la corola, dentro de a cual se encuentra el pistilo. El ovario es supero y puede ser bicarpelar y pluri o policarpelar (Rodríguez *et al.*, 2001; CEDAF, 1993).

El fruto consiste en una baya de forma, dimensión y localidad variable según la variedad. La superficie puede ser lisa o rugosa. La cantidad de lóbulos puede ser de dos o más, aunque la mayoría de las variedades típicas industriales son de dos lóbulos y en las de consumo fresco, la mayoría de frutos grandes tienen lóbulos de 8-10. La pulpa del fruto será mayor mientras la cámara y el espesor que cubre el tomate sean menores (Rodríguez *et al.*, 2001; CEDAF, 1993).

La localidad de los frutos puede ser simétrica o asimétrica. Frecuentemente el número de semillas en los frutos pequeños es mayor que en los más grandes. Según su forma, tamaño y color los frutos pueden ser: anaranjados, amarillos, blanquecinos, rosados, rojos, y verdes (Figura 1). Siendo el color rojo los de mayor demanda en el mercado (Nuez, 2001; CEDAF, 1993).

1.1.5. Clasificación de cultivares de tomate

Unas de las características para clasificar los distintos cultivares de tomate es según el periodo de duración de su ciclo vegetativo, dentro de las cuales se encuentran los precoces que duran de 90-110 días las cuales producen sus frutos en los 65 y 80 días desde el transplante. Los semiprecoces con una

duración de 110-120 días, y los tardíos de 120 y 130 días con 85 a 100 días para la primera recolección, El tipo de crecimiento también es importante para definir un cultivar, por lo cual pueden ser determinados, indeterminado y semi-determinado(Cuadro1) (CATIE, 1990; CEDAF, 1993). El tomate se clasifica comúnmente como un cultivo hortícola herbicé de ambiente calido, con una temperatura óptima de crecimiento en el intervalo de 21 a 23 °C. El crecimiento y desarrollo de la planta se detiene virtualmente a temperaturas inferiores de 10 °C. (Rodríguez *et al.*, 2001).

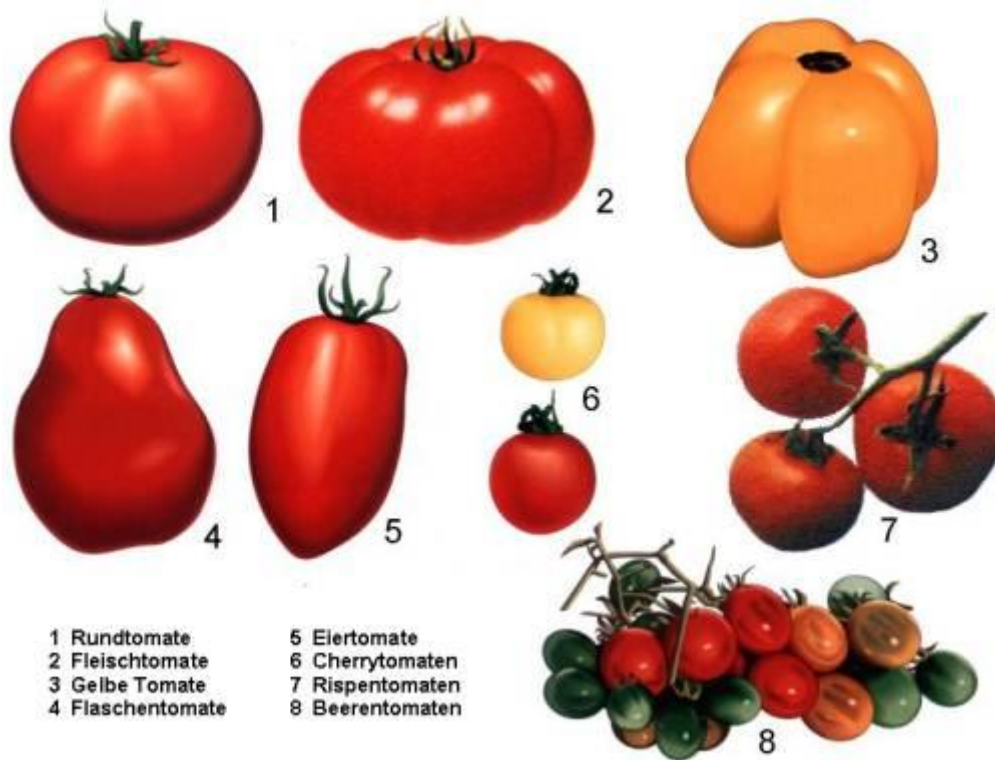


Figura 1. Diversidad de color, tamaño y forma del fruto de tomate

Cuadro 1. Morfología y modelos de crecimiento del tomate y características del hábito de crecimiento y producción del cultivo de tomate: determinado, indeterminado y semi-determinados

Determinado	Indeterminado	Semi-determinado
Fuerte tendencia a la ramificación	Ramificación débil	Ramificación débil
1 o 2 hojas por simpodio	3 o 4 hojas por simpodio	2 a 3 hojas por simpodio
Floración y maduración de frutos concentrada	Floración y maduración distribuída en un largo período	Floración y maduración distribuída en un período corto
Hábito arbustivo	Hábito rastrero	Hábito rastrero
No se realiza poda ni raleo de frutos	Siempre se podan y pueden ralearse frutos	Siempre se podan y pueden ralearse frutos
Producción a campo de estación, sin conducción y con posibilidades de cosecha mecánica	Producción a campo o invernadero. Siempre se conducen y cosechan manualmente	Producción a campo o invernadero. Siempre se conducen y cosechan manualmente
Tomate industria o doble propósito	Tomate de mesa	Tomate de mesa

1.1.6. Importancia del cultivo de tomate

El tomate *Lycopersicon esculentum* Mill., es una de las hortalizas más importantes en el mundo tanto por la superficie de cultivo y por la producción obtenida ya que ocupa el segundo lugar después de la papa (Ramírez-Sáinz, 2006). Su popularidad se debe al aceptable sabor y disponibilidad del fruto en una amplia gama de ambientes, así como a su relativa facilidad para ser cultivado (Cruz, 2007). Además su cultivo tiene las siguientes ventajas: genera

empleo, debido a que requiere mucha mano de obra desde la siembra hasta el empaque; estimula el empleo urbano proporcionando oportunidades de negocios en aspectos como manufactura, venta de agroquímicos, maquinaria y equipo; se necesita semilla de calidad; su exportación va en aumento, lo mismo que los precios pagados a los productores, generando importantes cantidades de divisas; mejora la nutrición de los consumidores; es muy versátil en su uso porque se puede consumir en fresco, cocinado, frito y procesado industrialmente en conservas, salsas, jugos y en polvo (Cruz, 2007).

2.0. Producción

2.1.1. Producción de tomate en el mundo

La superficie sembrada de tomate en se estima en más de tres millones de hectáreas en el mundo, con un producción promedio anual de 126.2 millones de toneladas; actualmente el tomate se siembra en más de 170 países siendo los principales productores China, Estados Unidos, Turquía, India, Italia, Egipto, España, Brasil, Irán y México (Cruz, 2007).

2.1.2 Producción de tomate en México

En México se cultivan alrededor de 64 mil hectáreas anuales de las cuales se obtienen un producción de alrededor de 2, 425,000 toneladas (SIAP-SAGARPA, 2008). La superficie dedicada a este cultivo creció en un 20% económico y social, ocupa el primer lugar en exportación, desde hace más de 20 años, con un promedio de más de 80,000 hectáreas cultivadas en los últimos diez años (1996-2006) y la producción en un 22%. El tomate es un cultivo que sobresale por su impacto al año, lo cual representa un 26% del total anual exportado de

vegetales frescos, con más de 2,000,000 de toneladas de fruto fresco, además se obtienen divisas por concepto de exportación de alrededor de 500 millones de dólares (Ramírez-Sáinz, 2006).

2.1.3 Producción de tomate en el estado de Sonora

El estado de Sonora se caracteriza por tener gran actividad agrícola y dentro de esta actividad la horticultura tiene gran importancia, ya que año con año genera un importante rubro en la economía estatal y nacional en divisas, además genera en forma directa e indirecta miles de empleos, en la producción de tomate. Esta actividad es base económica de varios municipios. La superficie de siembra de tomate en el estado de Sonora ha ido en aumentando, durante los últimos siete años, durante el ciclo agrícola otoño-invierno del año 2000 se registró una superficie de siembra de 1,105 ha, con producción de 30,470 toneladas con valor de producción de 75,416.90 miles de pesos, y para el mismo ciclo pero del año 2007 se reporta una superficie de siembra de 1,775 ha con producción de 46,886.00 toneladas, siendo su valor comercial 249,844.60 miles de pesos (SIAP-SAGARPA, 2008).

3.0. Enfermedades bacterianas

3.1.1. Enfermedades que disminuyen su producción

Algunos hongos que causan enfermedades importantes al cultivo del tomate son: *Alternaria dauci* f. *solani* (Fritz, 2006), *Botrytis cinerea* (Ribera *et al.*, 2008), *Fulvia fulva* (Pierre *et al.*, 1985), *Leveillula taurina* (Kasselaki *et al.*, 2006) y *Phytophthora infestans* (Agrios, 1997), entre otros. Los principales virus que afectan la producción de tomate son: TMV (Virus del Mosaico del Tabaco),

ToMV (Virus del Mosaico del Tomate), TSWV (Virus de la Marchitez Manchada del Tomate), TYLCV (Virus del Rizado Amarillo del Tomate), PVX (Virus X de la Papa), CMV (Virus del Mosaico del Pepino), AMV (Virus del Mosaico de la Alfalfa) y PVY (Virus Y de la Papa) (Blancard, 1997; Productores de hortalizas, 2006) y entre las bacterias que afectan al cultivo de tomate, se tiene a *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis* que causa cáncer bacteriano (Hadas *et al.*, 2005), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que causa la enfermedad peca bacteriana (Boch *et al.*, 2002), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* que causa la mancha bacteriana (Marcó-Stall, 1983; Blancard, 1997), y *Pseudomonas corrugata* que causa la necrosis medular (Nico *et al.*, 2006)

3.1.2. Morfología y estructura de bacterias fitopatógenas

Las bacterias son organismos microscópicos que pueden medir de 0.2 a 1.2 μm de diámetro de 0.4 a 14 μm de longitud se conocen alrededor de 1,600 especies donde la mayoría son organismos saprófitos y como tales benefician al hombre, ya que participan descomponiendo la materia orgánica producida por el hombre y sus fabricas, así como producidas por la muerte de plantas y animales. Se estiman unas 100 especies de bacterias patógenas que producen enfermedades en plantas, las cuales pueden viven como saprofitos facultativos esto les permite ser cultivadas en medios nutritivos (Agrios, 2005). Las bacterias son microorganismos simples que normalmente están formados por células procariotas (Figura 2); es decir, células que contienen un solo cromosoma pero que carecen de membrana nuclear o de organelos internos equivalentes a las mitocondrias y los cloroplastos. En realidad, las bacterias y los organelos de la

células vegetales tienen muchas características en común, de ahí que los antibióticos que afectan a las bacterias a menudo inhiben a las mitocondrias o a los cloroplastos sin que impidan las demás funciones de la célula vegetal eucariótica (Agrios, 2005).

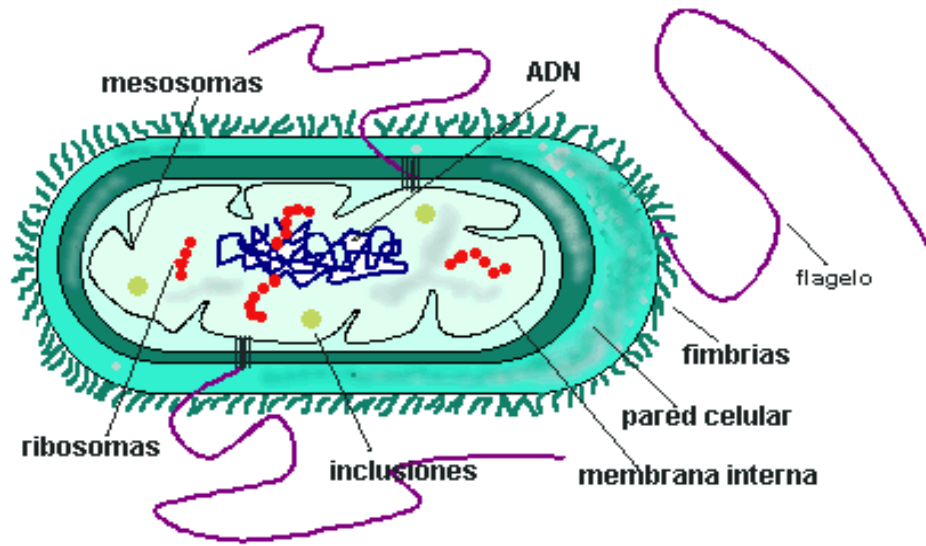


Figura 2. Estructura de una bacteria fitopatógena mostrando sus organelos.

La mayoría de bacterias fitopatógenas tienen forma de bastón de forma cortos, cilíndricos y en los cultivos jóvenes tiene un longitud que va de 0.6 a 3.5 μm y un diámetro de 0.5 a 1.0 μm . En cultivos viejos o en altas temperaturas, los bastones de algunas especies son largos y algunos pueden tener forma filamentosa. En ocasiones presentan variaciones de forma de bastón, ya sea en la forma de Y o una V y otras formas ramificadas (Agrios, 2005). La pared celular de las mayoría bacterias fitopatógenas están cubiertas por una capa o cápsula de un material de consistencia viscosa gomosa denominada capa

mucilaginosa, compuesta de diferentes sustancias predominando los polisacáridos (Madigan *et al.*, 2006).

Se conoce que estos exopolisacáridos protegen a las bacterias de la desecación, contribuyen en la adherencia a la superficie de las plantas y modifican el ambiente alrededor de la bacteria para favorecer la multiplicación y sobrevivencia en condiciones adversas (Beattie & Lindow, 1999).

La pared celular es una estructura rígida que le da forma a la bacteria. Se encuentra por debajo de la capa mucilaginosa y por encima de la membrana citoplasmática. La diferente composición de la pared celular de las bacterias es una característica taxonómica. Algunos grupos de bacterias poseen una pared compuesta por un alto contenido de lípidos, proteínas y polisacáridos (Gram negativas) y otro grupo posee una pared más simple, compuesta principalmente de peptidoglicanos (Gram positivas) (Madigan *et al.*, 2006).

La membrana citoplasmática es una fina capa que se encuentra por debajo de la pared celular es la responsable de controlar la entrada y salida de nutrientes y sustancias de excreción. Los daños en esta membrana producen la muerte celular debido a que la célula bacteriana pierde la capacidad de seleccionar la cantidad y cuales sustancias entran y salen de la célula (Madigan *et al.*, 2006).

El material de reserva de las bacterias fitopatogenas consiste en acumulaciones de compuestos como polifosfatos, poli- β -hidroxibutirato, y glycogen en vacuolas especiales de reserva (Madigan *et al.*, 2006).

Otras estructuras que poseen algunas bacterias son los flagelos estos son importantes para el movimiento de las bacterias en el agua. El número y ubicación es una característica taxonómica (Madigan *et al.*, 2006).

Los fimbrias y pilis son apéndices no flagelares filamentosos. Una de las funciones mencionadas de los fimbrias es participar en la adhesión de las bacterias a superficies de células de las plantas u otras bacterias o a superficies inanimadas (Romantschuk, 1992). Los ribosomas son las estructuras responsables de la síntesis de proteínas. Las bacterias en general, presentan un alto número de ribosomas de pequeño tamaño (70S), que a la vez consiste en dos subunidades (30S y 50S). La subunidad 30S contiene las moléculas 16S rRNA y el 50S las moléculas 5S rRNA y 23S rRNA cuya secuencia es utilizada en la clasificación de bacterias. (*S= Unidad de sedimentación de Svedberg*).

El material genético (ADN) se encuentra disperso en el citoplasma. Está constituido por un cromosoma principal y uno o más plásmidos. El cromosoma principal carga toda la información genética indispensable para la viabilidad de la bacteria. En cambio los plásmidos, poseen toda la información para codificar funciones como resistencia a antibióticos, metales pesados y virulencia. Por otro lado, participan en el proceso de transferencia genética entre bacterias en el proceso llamado transmisión (Romantschuk, 1992).

El metabolismo de las bacterias fitopatógenas son quimio heterótrofas, obtienen la energía y fuente de carbono de la degradación de la materia orgánica. De acuerdo a su relación con el oxígeno se clasifican en aerobias por que utilizan oxígeno como aceptor final de electrones en su cadena respiratoria o en

anaerobias facultativas, que son aquellas que en ausencia de oxígeno, recurren a otra vía metabólica utilizando como aceptor de electrones a compuestos orgánicos endógenos producidos en la misma ruta de fermentación. Pocas bacterias fitopatógenas tienen esta capacidad. El ejemplo típico, son las representantes del género *Erwinia* (Vurro y Ellis, 1997).

Otra característica importante que merece ser mencionada dentro del metabolismo de las bacterias fitopatógenas, es la producción de toxinas que tienen un rol importante en la virulencia. Las toxinas pueden alterar directa o indirectamente el movimiento de agua, iones y otros compuestos a través de las membranas celulares y tejidos vasculares, inhibir algunas enzimas, alterar las funciones de reguladores de crecimiento o inhibir procesos vitales para la planta como la fotosíntesis, la generación de moléculas altamente energéticas (síntesis de adenosín trifosfato, ATP), el metabolismo de ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas, entre otras. Las toxinas en general afectan la fisiología de las plantas, ejerciendo una acción subletal a concentraciones relativamente bajas (Vurro y Ellis, 1997).

Debido a que las toxinas comprenden un grupo muy diverso de metabolitos, muchas de ellas difieren entre sí en cuanto a sus características estructurales; de ahí que se pueden encontrar péptidos, glicopéptidos, compuestos fenólicos, terpenoides, glucósidos y polisacáridos (Vurro y Ellis, 1997).

En las bacterias no existe reproducción sexual. La población aumenta por la división del microorganismo por el proceso de fisión binaria. A partir de la membrana citoplasmática se forma un tabique que divide el protoplasma en dos

partes. La pared celular crece de ambos lados del tabique, separando a las dos células "madre e hija". El crecimiento de la población es exponencial. Como el número de células se duplica en cada generación, la población aumenta en potencia de 2: 2⁰, 2¹, 2², 2³.... 2ⁿ (Vurro y Ellis, 1997).

Los principales géneros de bacterias fitopatógenas son los siguientes: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium* y el anteriormente llamado *Corynebacterium* que se dividió en 4 géneros *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Clavibacter* y *Curtobacterium*. Existen otros géneros que también causan enfermedades, entre ellos *Xilella*, *Clostridium* y *Bacillus* (A. P. S. 2001).

4.0. Clasificación de *Clavibacter*

4.1.1. Cancro bacteriano del tomate

Clavibacter provoca la enfermedad conocida como Cancro bacteriano y es considerada actualmente la enfermedad más importante del tomate (Chang et al., 1992; De León et al., 2007).

Esta enfermedad fue estudiada por primera vez por Smith (1910) y debe su nombre al lugar donde fue encontrada por primera vez. El agente causal fue clasificada como *Corynebacterium michiganensis* de 1930 a 1980. En los ochentas, el género *Corynebacterium* fue reclasificado como pertenecientes al género nuevos conocimientos acerca de la composición de la pared celular, en función de su contenido de ácido 2,4-diaminobutílico de guanina + citosina, contenido de perfil electroforético de. Por lo cual se le conoce hasta nuestros tiempos como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) (Davis et al.,; Dreier et al., 2000).

Clavibacter se ubica en el Dominio de las Bacterias Procariota (Woese *et al.*, 1990), Phylum *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997), Clase Actinobacteridae (Stackebrandt *et al.*, 1997; Zhi *et al.*, 2009), Subclase, Orden Actinomycetales (Kroppenstedt, 1977), Suborden Micrococccineae (Stackebrandt *et al.* 1997), Familia Microbacteriaceae, Género *Clavibacter* (Davis *et al.*, 1984), Especie *michiganensis*, Subespecie *michiganensis*. (Davis *et. al.* Dreier *et al.*, 2000).

El género *Clavibacter* se divide en diferentes especies y subespecies: *rathayi*, *toxicus*, *tritici*, *xyli*, *xyli* subsp. *Cynodontis*, *xyli* subsp. *Xyli*, *iranicus*, *michiganensis* subsp. *Insidiosus*, *michiganensis* subsp. *michiganensis*, *michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *michiganensis* subsp. *tessellarius* (<http://www.bacterio.cict.fr/c/clavibacter.html>).

4.1.2. Sintomatología de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate

El cancro bacteriano se caracteriza por presentar una serie de síntomas que pueden estar influenciados por las condiciones ambientales, edad de la planta y susceptibilidad de cultivo. La bacteria penetra a los tejidos vasculares principalmente a través de heridas, estomas, tricomas e hidátodos de la hoja (Gleason *et al.*, 1993). El marchitamiento es el síntoma más común ya que la bacteria infesta a las plantas sistémicamente y puede desarrollarse en etapas tempranas. Recibe el nombre de cancro bacteriano por la forma en que son dañados el tallo (Figura 3.) y los pecíolos (Figura 4.) durante la etapa avanzada de la enfermedad (Jones, 2001). Los síntomas de la enfermedad incluyen necrosis marginal de la hojas, reducción del crecimiento, marchitez, decoloración vascular y muerte de la planta (De León *et al.*, 2007). En los folíolos ésta

bacteria pueda causar pequeñas manchas cancrosas primeramente blancas, posteriormente beige a marrón oscuro; este síntoma es muy raro y se produce siempre acompañado de un marchitamiento de folíolos y de un pardeado de los vasos del tallo.

En la hojas se observan inicialmente pequeñas manchas blancas que posteriormente se necrosan. El marchitamiento brusco, casi siempre es unilateral, afecta a los folíolos situados baja, media y superior de la planta. La bacteria al colonizar los tejidos corticales y los de la medula próxima a los vasos provoca líneas cremosas, blancas, amarilla, marrón oscuras a lo largo del tallo (Blancard, 2000). En el fruto se presentan manchas necróticas con el centro rugoso de color pardo rodeado por un halo blanco: estas manchas son conocidas como ojo de pájaro o de pavo. (Gleason *et al.*, 1993; Blancard, 1996). El tiempo entre la infección y la aparición de síntomas varía entre 10 y 34 días (Gleason *et al.*, 1993; EPPO, 1992).



Figura 3. Tallo de tomate afectados por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* mostrando una necrosis de haces vasculares de color marrón; síntoma característico de la enfermedad.



Figura 4. Hojas de tomate afectadas por *C.michiganensis* subsp. *michiganensis* mostrando el color pardo y la necrosis en los bordes de los folíolos; síntoma característico de la enfermedad.



Figura 5. Frutos de tomate afectadas por *C.michiganensis* subsp. *michiganensis* mostrando el punto negro, necrótico rodeado del halo blanco (ojo de pájaro); síntoma característico de la enfermedad.

4.1.3. Ciclo de la enfermedad y epidemiología

La bacteria sobrevive en estaciones de cultivo en los restos del huésped, en las malas hierbas huésped, las plantas espontáneas, los tutores de madera contaminados, la semilla y en el suelo por dos o tres años. Todos los substratos contaminados constituyen una fuente de inóculo de la enfermedad, pero la forma más importante o fuente de inóculo primario en la diseminación del patógeno es a través de la semilla la cual se considera como principal vector pasivo a larga

distancia y el comercio facilita la distribución de la enfermedad en todo el mundo (EPPO, 1992; Gleason *et al.*, 1993; Gitta, 2003; Ramírez y Sainz, 2006; Lou *et al.*, 2007).

La diseminación secundaria en almácigos o en el cultivo ocurre por lluvia y riego por aspersión, ayudado por el viento, la maquinaria y las labores de manejo del cultivo como poda generalizada del almácigo, debido a que los instrumentos de trabajo se contaminan con el patógeno. Todas las condiciones óptimas para las plantas hospederas, lo son también para el desarrollo de la enfermedad: temperatura de 28°C y humedad relativa de 80 a 90%. Las plantas fertilizadas con un exceso de nitrógeno son más susceptibles (León, 1988; López *et al.*, 1995).

4.1.4. Manejo de la enfermedad

Respecto a *C. m* subsp. *michiganensis*, al presentarse en alguna etapa fenológica del cultivo, no existe ningún método de control exitoso, por lo cual se aconseja el uso de métodos preventivos y prácticas culturales, que son consideradas como los aspectos más apropiados para el disminuir el avance de enfermedades. A continuación se describen la más importante:

-Utilizar semilla sana, certificada y evitar el uso de plántula contaminada por patógenos, así como variedades resistentes (Thyr *et al.*, 1973; Vasinauskienė, 2002.).

-Se recomienda probar la semilla por un método apropiado en una muestra representativa y encontrarla libre de la bacteria (EPPO/ OEPP, 1992).

-Eliminación de plantas con síntomas que constituyen fuente de inóculo, lavándose las manos inmediatamente luego de eliminarlas, antes de volver a trabajar al cultivo.

-Eliminar aquellas inmediatamente adyacentes, ya que éstas también pueden contener el patógeno sin mostrar aún síntomas.

-Eliminar de malezas que pueden constituir huéspedes alternativos. Es importante tener presente que algunas enfermedades presentan rangos de huéspedes bastante amplios, que incluyen también otras especies cultivadas.

-Control temprano de insectos vectores: pulgones, mosca blanca y trips y utilizar variedades resistentes.

-Monitoreo permanente para ubicar plantas sintomáticas, especialmente exhaustivo antes de cualquier labor que implique manipuleo de éstas como poda, amarre, desbrote.

-Evitar las siembras demasiado densas en condiciones de baja luminosidad.

-Manejar la aireación, calefacción y el riego en invernadero con el fin de reducir la duración de los periodos diarios que combinan humedad a saturación y condensaciones y temperaturas de 15 a 17° C.

-Controlar los niveles de nitrógeno en el suelo y agua, ya que niveles elevados favorecen el desarrollo de la enfermedad.

-Aplicación de cubiertas plásticas de invernadero con absorción de luz ultravioleta ya que reducen la tasa de colonización (Garijo, 1991; EPPO/OEEP, 1992; Sandoval, 2004).

4.1.5. Importancia económica de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Los daños que *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis*, desde su aparición de la enfermedad en los invernaderos de Michigan en los EE.U.U., en el siglo pasado, ha provocado hasta el presente epidemias con pérdidas económicas considerables a las cosechas de tomate de invernadero y del campo, ocasionando la muerte de las plantas jóvenes o reduciendo su producción comercial, reportándose dispersa en casi todo el mundo (Ramírez y Sáinz, 2006). El cancro bacteriano ha sido considerada una de las enfermedades bacteriana más importante del tomate (De León *et al.*, 2007).

Las pérdidas reportadas oscilan entre 10 y 80% (Gleason *et al.*, 1993; Blancard, 1996). La reducción en la producción se puede asociar a la pérdida directa de la planta, números reducido y de menor tamaño del fruto. En Ontario, Canadá, se registran pérdidas de producción del 20% o mayores (Dhanvantari, 1989; Dhanvantari, 1993); en Francia se reportan pérdidas 20-30% (Rat *et al.*, 1991; OEP/EPPO, 2005); en Illinois EE.UU el 46 %. (Chang *et al.*, 1992); y una reducción del 10% después de la pérdida de la planta en Queensland, Australia (Dullahide *et al.*, 1983).

En el año 2002 la bacteria *Cmm* se aisló de lotes de semilla de tomate producidos comercialmente en Java, Indonesia (Anwar *et al.*, 2004). Durante el 2003 en sistemas de producción de tomate en invernadero, se detectó por primera vez a *Cmm* en la región Mediterránea de Turquía causando pérdidas de hasta el 65 % (Basim *et al.*, 2004). Como consecuencia de la importación de semillas americanas la enfermedad aparece en Dinamarca en 1922 y

actualmente ha sido detectada en las principales áreas tomateras de todo el mundo (Weber, 1992). La incidencia de la enfermedad en Lituania se acercó al 10% y es la enfermedad más frecuente en la producción de tomates en invernadero (Vasinauskienė, 2002). El patógeno está presente ahora en todas las áreas principales de la producción del tomate (EPPO/CABI, 1998; Ramírez y Sáinz, 2006).

En un estudio sobre desarrollo de métodos de diagnósticos moleculares de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas, se reporta una incidencia de 100 % de la bacteria *Cmm* los cuales ocasionó pérdidas de 65 % en 450 ha sembradas de tomate en la primera etapa del ciclo de producción. Siendo esta enfermedad una de las más importantes en cuanto a pérdidas producidas en San Luis Potosí, México durante el ciclo agrícola 2004 (Monreal, 2005). En el estado de Sinaloa, México se ha presentado con diversos grados de incidencia y severidad. En el ciclo agrícola 2006-2007, en el valle de Culiacán, Sinaloa, México se presentó en aproximadamente 180 hectáreas bajo producción en invernadero, que introdujeron injertos procedentes del estado de Michoacán. En invernaderos la enfermedad es más severa debido a las condiciones de humedad relativa y a la baja intensidad luminosa (Ramírez y Sáinz, 2006; García *et al.*, 2007).

5.0. Detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

5.1.1. Descripción de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Son pequeños bacilos en forma de bastones ligeramente curvados que llegan a formar agregados en forma de “V”, miden en general entre 0.4 a 0.6 μm y 0.8

a 1.2 μm , no forman endosporas y no son móviles. Cuando se desarrollan en agar nutritivo YDC o NBY, forman colonias circulares o convexas de color amarillo, crema o naranja no móvil, no esporulada, estrictamente aeróbica y forma colonias amarillas en medios nutritivos (Davis *et al.*, 1996; Rodríguez, 2001). La estructura de la pared celular es lisa y tiene como principal componente el peptidoglicano. Se divide por fisión binaria transversal (Davis *et al.*, 1996). La técnica de tinción Gram es la más ampliamente utilizada por que no solo permite determinar las formas (Cocos, Bacilos y Espirilos), sino también la agrupación de las bacterias. Además es de considerable valor en la identificación y clasificación, al separar las bacterias gram positivas y gram negativas. Otra técnica para la detección de *Cmm* es la de Inmunofluorescencia indirecta, la cual se basa en la detección de antígenos (Ag) presentes en la membrana de las células en suspensión. Para ello se aprovecha la existencia de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer Ag de membrana que permiten: a) Reconocer una población celular; b) Identificar las células efectoras de una determinada función y c) Estudiar el grado de activación de una población celular (Rodríguez, 2001).

5.1.2. Características bioquímicas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

El género *Clavibacter* es una bacteria estrictamente aeróbica, rodeada de una capa gruesa (pared celular) compuesta por membrana citoplasmática, peptidoglicanos, fosfolípidos, proteínas y ácido lipoteico. La membrana plasmática o citoplasmática está compuesta por una lámina que sirve de "contenedor" para el citrol o hialoplasma, y formada principalmente por

fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina), colesterol, glúcidos y proteínas (integrales y periféricas). La principal característica de esta barrera es su permeabilidad selectiva. La pared externa de la envoltura celular tiene como base química fundamental el compuesto peptidoglicano, que es un polímero de N-acetil-2-D-glucosamina, unido en orientación β -1,4 con N-acetil murámico. Esta molécula se polimeriza una gran cantidad de veces, de modo que se forma una red especial, llamada sáculo de mureína. Dicho compuesto es de vital importancia para conservar la forma y darle rigidez a la célula bacteriana (Schaad *et al.*, 2001).

Prácticamente todos los procesos biológicos dependen de la presencia y/o actividad de las proteínas o enzimas catalizadoras de reacciones químicas en organismos vivos. Las enzimas que participan en la patogenicidad de *Cmm* son las endoglucanasas, metilesterasas de pectina, poligalacturonasa xilanasas y exopolisacáridos (Jahr *et al.*, .

La reproducción de la bacteria *Cmm* en laboratorio se puede obtener en medios de cultivo de dos tipos dependiendo la finalidad del medio: medio líquido y medio para aislamientos. Los líquidos son caldos nutritivos que se emplean cuando se requiere un crecimiento abundante de bacterias y como "NBY" (Caldo nutritivo 8.0g, Extracto de levadura 2.0g, K_2HPO_4 2.0g, KH_2PO_4 0.5g, glucosa 2.5g y agua 1000 ml). Medio para aislamiento "NBY" contiene el mismo material anterior solo se le agrega 15.0 g de agar para 1000 ml. Otro medio recomendado que ha dado buenos resultados lo es extracto de levadura-dextrosa (YDC), compuesto por (extracto de levadura 10.0 g, dextrosa 20.0g,

carbonato de calcio (polvo fino) 20.0 g, Agar 15.0g y agua 1000 ml. López y Cambria (1995), recomiendan el medio LPGA (Levadura- Peptona- Glucosa y Agar) (Schaad *et al.*, 2001; Rodríguez, 2001). Las condiciones favorables para el desarrollo de *Cmm* son baja intensidad luminosa, temperaturas entre 24 y 28 °C, pH ligeramente alcalino y humedad de 60 a 80%. (Fatmi–Schaad, 1988; Waters–Bolkan, 1992).

Las reacciones bioquímicas descritas para identificar a *Cmm* son: reacción de KOH al 3% es una prueba rápida y sencilla, en la que no influye la edad del cultivo y se utiliza para conocer si la bacteria se considera Gram-positiva o Gram-negativa si la preparación no es viscosa es gram-positiva (Schaad *et al.*, 2001). Otras pruebas incluye la de catalasa (+), la cual ayuda a diferenciar bacterias aeróbicas o anaeróbicas, oxidasa (-) diferencia a las bacterias en entéricas o no entéricas, ureasa (-), hidrólisis de esculina (+), caseína (-), pigmento amarillo (-), producción de ácido de manosa (+), melesitosa (-), manitol (-), ribosa (-), sorbitol (-), inulina (-), utilización de acetato (-), propionato (-), succinato (+), producción de H₂S a partir de peptona (+) (Schaad *et al.*, 2001).

5.1.3. Detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* mediante pruebas serológicas

Para conocer las propiedades antigénicas de *Cmm* se utiliza la prueba de inmuno-adsorción con Enzimas Ligadas (ELISA), es un método rápido para la detección de organismos fitopatógenos. Esta técnica esta basada en la capacidad que tienen los agentes fitopatógenos (antígeno) para desencadenar la producción de inmuno-globulinas (anticuerpos). El ensayo denominado sandwich de doble anticuerpo (Das), es el más utilizado para la detección de

Cmm, y consiste en: a) sensibilizar la placa (anticuerpo adherido a la placa gammaglobulina son específicos para cada patógeno, b) Adición de la muestra (extracto a probar conteniendo el antígeno *Cmm*), c) adición de la enzima conjugada, (fosfatasa alcalina). El sustrato es hidrolizado por la enzima dando lugar a un cambio de color de la solución, y esto permite determinar los resultados visualmente y cuantificarlos espectrofotométricamente por medio de un lector de placas (Cruz, 2007).

5.1.4. Diagnóstico molecular de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

El diagnóstico basado en el estudio del ADN ha experimentado un avance considerable en el último decenio fruto de la identificación, caracterización de un elevado número de genes implicados en patologías de plantas. En la actualidad, el análisis de numerosas enfermedades puede ser abordado en los laboratorios de genética molecular.

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original, o molde (Patrik, 1999).

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que a través de la amplificación, resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una enfermedad o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado. Estos usos derivados de la

amplificación han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo (Patrik, 1999).

Diversas estrategias se han llevado a cabo para el diseño de oligos específicos en la detección de bacterias fitopatógenas por la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, una de ellas implica la secuenciación del ADN implícita en los genes del patógeno (Patrik, 1999). En particular para *C. michiganensis* subsp *michiganensis* la alta homóloga entre sus subespecies había complicado el desarrollo de sondas específicas de ADN.

No obstante así como Meletzus *et al.* (1993) encontraron una cepa de esta bacteria con genes de patogenicidad Pat-1 en un plásmido pCM1 y un gen que codifica la producción de una endocelulasa (Cel A) codificada en el plásmido pCM2 (Dreier *et al.*, 1995; Karl *et al.*, 2008; Kleitman *et al.*, 2008). Se diseñaron un juego de oligos (CMM-5 y CMM-6), derivados de la secuencia parcial del gen Pat-1, los cuales resultaron ser específicos solamente para cepas virulentas de *Cmm* y establecieron un método de diagnóstico por PCR para este patógeno, en tejido vegetal y semillas de tomate (Sousa-Santos *et al.*, 1997)

6.0. Métodos de control de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

6.1.1. Control químico de *Cmm*

El método de control de patógenos mas generalizado en la agricultura, especialmente en la lucha contra enfermedades fungosas y bacterianas, es el químico. El primer fungicida, descubierto en 1882, se conoció como la pasta

bordelesa (Alexopoulos *et al.*, 1996), y marcó el comienzo del control químico de las enfermedades en plantas.

El control químico de la enfermedad en tomate provocadas por *Cmm* se basa en el uso de tratamientos con productos cúpricos de oxiclورو de cobre, sulfato cúprico, óxido cuproso, o Kasugamicina. Así como rociar plantas con estreptomycin antes del trasplante y aplicar mezclas de mancozeb y cobre tras el trasplante y antes de la incidencia de la enfermedad (Blancard *et al.*, 1996). Tales métodos de control previenen la multiplicación bacteriana pero no son siempre controles adecuados del inóculo llevado en la semilla. Desafortunadamente, el uso frecuente de pesticidas y los antibióticos contra la planta y bacterias patógenas ha llevado a la selección de poblaciones bacterianas resistentes contra los antibióticos. Aunado a lo anterior existen restricciones gubernamentales en el uso de los compuestos de cobre, que son ampliamente utilizados para el control de las enfermedades bacterias en la planta, estos compuestos han sido limitados en los países de la unión europea por la regla 473/2002 debido a su impacto en el ambiente, y por su toxicidad para el hombre, provocan irritación en la piel, en el tracto respiratorio y los ojos. Además son de un alto costo no se consigue fácilmente y se dispone de un limitado número de productos y en su mayoría afectan a organismos benéficos (Blancard *et al.*, 1996).

6.1.2. Control biológico

El control biológico es una de las tantas herramientas disponibles para utilizar en el programa de manejo integrado de enfermedades de las plantas. En años

recientes, se han incrementado los casos exitosos de control biológico el cual se basa en emplear un agente de control con propiedades similares al patógeno y aprovechar una serie de interacciones ecológicas: competencia, antagonismo o antibiosis (Ducrot, 2005).

El desarrollo de agentes de control biológico es más complicado que el control químico, ya que introduce un tercer ser vivo en la interacción. Los mecanismos de control biológico para bacterias son básicamente los mismos que para el control biológico de hongos. Uno de los más frecuentes es la producción de metabolitos, capaces de actuar específicamente sobre las bacterias o de amplio espectro o de bacteriocinas activas frente a microorganismos de un cierto genero o especie (Fravel, 1989).

6.1.3. Aceites esenciales

Las plantas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, siendo la mayoría fenoles o sus derivados oxígeno-sustituidos. En general son metabolitos secundarios (es decir, que no tienen un papel esencial en el metabolismo de la plantas) de acuerdo a Walton y Brown (1999).

Estos productos nombrados comúnmente esencias son sustancias olorosas volátiles contenidas normalmente en los vegetales. Su volatilidad los diferencia de los aceites fijos que producen los lípidos, los cuales son particularmente abundantes en las Retaceas, Umbelíferas, Mirtáceas y Labiadas (Torres, 2004). Son compuestos del agradable olor de determinadas plantas y algunos con poder antimicrobiano como el mentol obtenido de la menta (*Menta piperita*) y la

capsaicina de la planta conocida como pimiento rojo o chile (*Capsicum annuum*) (Domingo, 2003).

6.1.4. Mecanismos de acción de aceites esenciales contra *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*

Los aceites esenciales han demostrado poseer características insecticidas, antioxidantes, anti-bacteriano, antifúngicos, antiviral (Burt, 2004; Kordali *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los géneros *Origanum* (orégano) y *Thymus* (Tomillo), Cinnamom (Canela), tienen propiedades antioxidantes, relacionadas con los compuestos fenólicos, carvacrol y el timol que pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas, para inducir la lisis rápida de la célula bacteriana (Basim *et al.*, 2000).

Los mecanismos de acción de los diversos compuestos orgánicos de las plantas son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles se atribuye a la oxidación de compuestos en la célula (Cowan, 1999), del carvacrol se ha reportado que se encuentra presente en aceite esencial de orégano en un 60 a 70% y en tomillo 45%, la inhibición de crecimiento de muchos patógenos por carvacrol ha sido reportada en varios artículos sin embargo no se ha definido el mecanismo de acción de este (Ultee, 2002).

El aceite de tomillo se menciona que puede ser un rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos (Oussalah, 2006). Los triterpenos pueden actuar siguiendo diversos mecanismos en dependencia de su naturaleza química. Los triterpenos de naturaleza alcohólica pueden alterar la naturaleza coloidal del protoplasma celular provocando su muerte (Pelczar, 1992).

De los alcaloides se ha postulado que se intercala con el ADN, el de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Cowan, 1999). Otro estudio reporta que los componentes del aceite esencial interfieren con las funciones de permeabilidad de membrana celular (Lambert *et al.*, 2004).

Se ha reportado que el aceite esencial de fragarin puede alterar la permeabilidad e interrumpir la función de la membrana, celular de *Cmm* dando por resultado la disipación del potencial de la membrana. Además, la capacidad del fragarin disipa el potencial de la membrana. De igual forma, fue confirmado que con el uso de los liposomas, la inhibición inmediata del consumo de oxígeno y la disipación inmediata del potencial de la membrana,, el efecto sobre la membrana precede o es simultáneo con la muerte celular (Filippone *et al.*, 2001).

Otros compuestos como los esteroides pueden interferir en determinados procesos de síntesis vitales de la célula bacteriana (Pelczar, 1992).

En la búsqueda de sustancias naturales que permitan desarrollar nuevas estrategias para controlar y eliminar de plagas se han realizado numerosas investigaciones con aceites esenciales, y se ha observado que actúan como bio-controladores debido a la presencia de metabolitos secundarios los cuales están implicados en el control biológico contra organismos fitopatógenos, y en ciertos casos, activando procesos de defensa en la planta, brindando una protección preventiva (Castillo 2004; Kagale *et al.* 2004; Ducrot, 2005), los cuales son las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del

aroma de las plantas, son mezclas complejas de hasta 100 componentes, entre ellos: terpenoides, fenoles aromáticos, éteres, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma característico de la planta donante (Batish *et al.*, 2008; Shiva, 2007). Estos metabolitos secundarios, se encuentran en estructuras histológicas especializadas, localizadas sobre o cerca de la superficie de la planta. Su función en la planta sigue en estudio pero se asocia a la inhibición de la germinación de malas hierbas y como protección contra bacterias, hongos e insectos y para favorecer la polinización (Shiva, 2007). Los aceites esenciales son biodegradables, amigables con el ambiente y poseen bajos o inexistentes niveles de toxicidad, lo que permite que sean utilizados en cualquier ambiente (Cheng *et al.*, 2009). Lo anterior se ha reflejado en el interés que han mostrado los investigadores para obtener nuevos conocimientos sobre el potencial de las plantas aromáticas, sobre las bacterias fitopatógenas, como se describe en la siguiente investigación donde se evaluó la actividades antibacterianas de los aceites esenciales de las plantas medicinales contra el crecimiento del *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizando los aceites esenciales obtenidos de las plantas de orégano (*Origanum syriacum*), tomillo (*Thymbra spicata*), menta (*Mentha spicata*) y lavanda (*Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*). El resultado indicó que el aceite esencial del tomillo fue el más eficaz de inhibir el crecimiento de *Cmm*, seguido por los aceites de orégano, menta y lavanda (Soylu *et al.*, 2003).

HIPÓTESIS

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* está presente en los cultivos de tomate en el estado de Sonora y su control puede llevarse a cabo con el uso de aceites orgánicos esenciales de origen vegetal.

OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar la incidencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) en semilla y material vegetativo de (*Lycopersicon esculentum* Mill.), y evaluar el efecto bactericida de aceites vegetales.

Objetivos particulares

- 1.- Localizar la presencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), en semilla y material vegetativo de tomate en el estado de Sonora, México.
- 2.- Conocer la incidencia de *Cmm* en los cultivos de tomate en el estado de Sonora.
- 3.- Evaluar el efecto bactericida *in vitro* de aceites esenciales de para el control de *Cmm*.

CAPÍTULO 2

DETECCIÓN DE *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* EN TOMATE EN EL ESTADO DE SONORA, MÉXICO

DETECTION OF *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* IN TOMATO IN THE STATE OF SONORA, MEXICO

Jesús Borboa Flores^{1*}, Edgar O. Rueda Puente¹, Evelia Acedo Félix², Juan F. Ponce³, Manuel Cruz³, Onécimo Grimaldo Juárez³ y Adrián M. García Ortega⁴.

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Blvd. Luís Encinas y Rosales s/n, Col. Centro. 8300, Hermosillo, Sonora, México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carr. a La Victoria Km. 06, 83000, Hermosillo, Sonora, México.

³ Instituto de Ciencias Agrícolas. Carr. a Delta s/n. 21705, Ejido Nuevo León, Baja California, México.

⁴Laboratorio de Biología Molecular, Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California. Km 1.5 Carr. a San Felipe s/n, Col. Xochimilco. 21380, Mexicali, Baja California, México.

Autor para correspondencia (jborboa@guayacan.uson.mx)

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

La investigación se realizó en el ciclo agrícola 2006 en terrenos de siembra de tomate en modalidad invernadero, casa sombra y campo a cielo abierto en el Estado de Sonora, México. Este estado su ubica en el noroeste de México, entre 32° 29' y 26° 18' y entre 108° 25' y 115° 03' LO (INEGI, 2000).

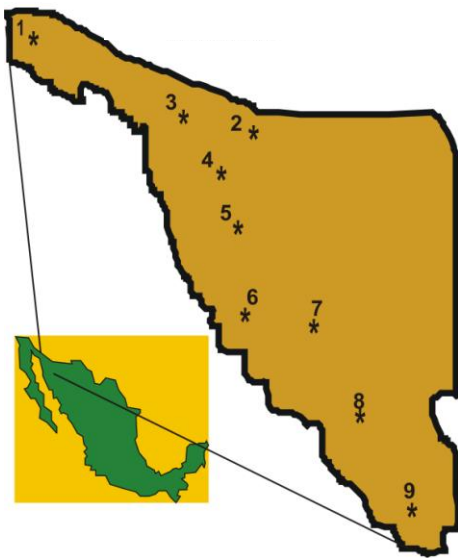
Muestreo de semilla

La semilla utilizada en este trabajo fue donada por la Confederación Nacional de Productores Hortícolas del Estado de Sonora, o fue adquirida de diversas

casas comerciales de agro-insumos de la región. Las semillas recolectadas fueron depositadas en bolsas de papel previamente identificadas y se trasladaron al laboratorio de fitopatología del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Mexicali, Baja California.

Muestreo en plantas (plántula, hoja desarrollada y fruto)

El muestreo se hizo en nueve localidades en sistema de invernaderos, casa sombra y campo a cielo abierto, previa inspección de surcos a pasos equidistantes, de acuerdo con las dimensiones de los sitios de cultivo. En la Figura 6 se muestran los sitios de muestreo (CONAGUA, 2006). Este sistema permite obtener un intervalo de confianza mínimo de 95 % en la detección, en niveles de infección de 0.1 % y con 5 % de confiabilidad en el muestreo (IPFSAPH, 2001). Los síntomas a los que se dirigió el muestreo, fueron los atribuibles a la bacteria Cmm, descritos anteriormente (Chang et al., 1992; Gleason et al., 1993; Blancar 1996). Cada muestra colectada se identificó, y se envolvió con papel húmedo, luego se colocó en una hielera para ser trasladada al laboratorio para los análisis fitopatológicos correspondientes.



Localidad Sistema de Siembra	
1. San Luis Rio Colorado	Cielo abierto
2. Imuris	Invernadero
3. Sáric	Casa sombra
4. San Ignacio	Casa sombra
5. Benjamin Hill	Invernadero
6. Costa de Hermosillo	Casa sombra
7. Valle de Empalme	Casa sombra
8. Valle del Yaqui	Casa sombra
9. Valle del Mayo	Casa sombra

. Figura 6. Localización geográfica de los sitios de muestreo de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill., evaluadas en Sonora México

Aislamiento e identificación

Se obtuvo savia de las plantas colectadas mediante un macerado en mortero de porcelana y una porción se sembró en tres cajas de petri con diferentes medios de cultivo: YDC (extracto de levadura 1 %, D-glucosa 2 %, CaCO_3 2 %, agar 1.2 %); agar B de King (peptona 2 %, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.15 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 %, agar 1.5 %, glicerol 1.5 %) y NBY (Caldo nutritivo 0.8 %, extracto de levadura 0.2 %, K_2HPO_4 0.2 %, KH_2PO_4 0.025 %, agar 1.5 %). Las cajas se incubaron a 29 °C por 48 h, y a las colonias resultantes se les hicieron pruebas morfológicas y bioquímicas de acuerdo con las recomendaciones de OEPP/PEPO (2005) y Schaad *et al.* (2000).

Detección serológica

Una porción de savia se empleó para la detección serológica de *Cmm*, con un juego comercial (DAS-ELISA, Agdia[®], Inc.), que consiste en un ensayo “sándwich” de doble anticuerpo, conforme a las instrucciones del fabricante. Una vez terminada la reacción, se observó el desarrollo de color cada 15 min a 405 nm en un lector (Bio-Rad[®]) durante 1 h.

Extracción de ADN genómico total a partir de tejido vegetal

Las partes de la planta que se utilizaron para la extracción de ADN genómico fueron: semilla, tallo, follaje y fruto. El ADN genómico total se obtuvo mediante la metodología descrita por Chomczynski *et al.* (1997), que utiliza el reactivo DNAzol-ES[®] (MRC, Inc.). Para la obtención del ADN genómico a partir de cepas aisladas de *Cmm*, se utilizó la misma técnica de Ausubel *et al.* (2002) y Sambrook y Russel (2001).

Detección de *C. michiganensis* subespecie *michiganensis* por PCR

Se amplificó el espaciador intergénico situado entre los genes ribosomales 16S y 23S, mediante los iniciadores PSA-4: 5´-TCA-TTG-GTC-AAT-TCT-GTC-TCC-C-3´ y PSA-R: 5´-TAC-TGA-GAT-GTT-TCA-CTT-CCC-C-3´, de acuerdo con las especificaciones de Pastrik y Rainey (1999), y se amplificó un fragmento de 270 pb.

También se amplificó por PCR un fragmento de ADNr 16S, de 480 pb, con las condiciones de PCR e iniciadores fD1 y rP2, desarrolladas por Weisburg *et al.* (1991). Los fragmentos de PCR se enviaron a secuenciar a la Universidad de San Diego, Cal. EE.UU., y los resultados se compararon con las bases de datos

públicas disponibles, mediante BLAST en las bases de datos del GenBank (Benson *et al.*, 2008).

El volumen total de la reacción fue de 25 μ L y como testigo positivo se utilizó ADN genómico extraído de una cepa de referencia. Como testigo negativo se utilizó agua grado biología molecular. Los componentes de la mezcla de reacción fueron: amortiguador para la reacción al 1X, iniciadores PSA-4 y PSA-R (2 ng- μ L), MgCl₂ (1.5 mM), dATP, dCTP, dGTP (200 μ M), 1 unidad de *Taq* polimerasa y 50 ng de ADN genómico. La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research[®]) y las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C/2.5 min, seguido de 40 ciclos con 3 segmentos de: 94 °C/30 s, hibridación a 63 °C/20 s, y extensión a 72 °C/45 s y la polimerización final se hizo a 72 °C por 5 min.

La electroforesis se hizo en gel de agarosa 2 %. Se utilizó amortiguador TBE (0.5 M, pH 8.3) y al preparar el gel se adicionó bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g-mL (Sambrook y Russell, 2001). Se mezclaron 10 μ l del producto de PCR con 2 μ l de buffer de carga 5X (xilencianol 0.125 % azul de bromofenol, 0.125 % glicerol 50 %, en TBE 1X) y se cargaron en el gel. Se utilizó el marcador de peso molecular de 0.1 a 2.0 Kpb (Invitrogen). Se aplicó una carga de 100 V por 40 min al terminar el gel se colocó sobre un transiluminador UV y los resultados se registraron con el sistema digital BioDoc-it (UVP, Inc.). El árbol de homología se obtuvo de la comparación de las secuencias en el programa DNAMAN versión 6.0 (Lynnon Corp.).

Pruebas de patogenicidad

Preparación del inóculo. Un cultivo bacteriano de 24 h en caldo NBY, se centrifugó por 15 min a 3900 g y el precipitado se resuspendió en solución salina al 0.85 % estéril, para eliminar los fragmentos del medio de cultivo; se centrifugó nuevamente y se estandarizó el inóculo a una turbidez del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. Se tomó una alícuota de 1 mL para hacer diluciones seriadas hasta 10^{-4} y conocer el número aproximado de células viables. Las diluciones se sembraron en placas con medio NBY por difusión, en volumen de 0.1 mL sobre el agar, la solución bacteriana se diseminó con una varilla de arrastre, y se incubaron a 30 °C por 48 h (Madigan *et al.*, 2006). Este inóculo de 1×10^6 UFC/mL se utilizó para las pruebas de patogenicidad en semilla, plántula, y fruto del tomate (Pony Express F1).

Pruebas de patogenicidad en semilla. Se utilizaron 20 semillas previamente desinfectadas en solución de hipoclorito de sodio 1.0 % (v/v) y fueron embebidas en 200 mL de la suspensión bacteriana por 30 min; posteriormente se sembraron en vasos térmicos por separado, que contenían sustrato estéril tipo peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.). Asimismo, otras 20 semillas se consideraron como testigo negativo al pasar por el mismo proceso, pero con uso de agua destilada estéril.

Pruebas de patogenicidad en plántula. Se tomaron 200 semillas previamente desinfectadas como se mencionó anteriormente, las cuales se germinaron en placas con sustrato estéril (mismas características anteriores); las condiciones en que se produjeron las plántulas fueron a 25 °C; el riego se realizó con agua

estéril. Después de 30 d de la emergencia, se inocularon 10 plántulas con la suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC/mL de *Cmm*, de las siguientes maneras: a) En aspersión directa sobre la planta; b) Punción en tallo; c) Punción en el pecíolo; D) Lijado de hoja e inoculadas con un cotonete de algodón. En cada tratamiento se utilizaron 10 plántulas como testigo negativo, que pasaron por los mismos procesos mencionados anteriormente pero con agua destilada estéril. Todo el material utilizado durante el muestreo y las pruebas de patogenicidad, así como el material biológico y peat-moss empleado en las pruebas de patogenicidad, fueron esterilizados para su desecho y posteriormente se enviaron a un incinerador, para asegurar que no hubiese diseminación al ambiente y la contaminación de otros sistemas de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 237 muestras analizadas, de las cuales, 8 fueron de raíz, 11 de tallo, 189 de hojas, 15 de frutos y 14 de semilla, pertenecientes a 9 localidades. De las muestras analizadas se obtuvieron resultados diferentes, en función de la técnica utilizada. Se detectó el crecimiento de colonias sospechosas de *Cmm* en dos localidades (4 y 5 del muestreo), una con sistema de siembra en casa sombra y otra en invernadero, lo que correspondería a una incidencia de 0.27 y 0.11 %, respectivamente. En ambos casos, las plantas presentaron un grado de severidad leve en etapa inicial, y algunas con un grado de severidad avanzado (Figura 7).

La presencia de la enfermedad en cualquier sistema de cultivo del tomate, representa un foco de alerta roja, debido a que la bacteria se transmite por

semilla y plántulas y sobrevive en el suelo por dos o tres años, lo que puede llevar a que se disemine y provoque fuertes pérdidas en la cosecha, como ha ocurrido en otras regiones (Gleason *et al.*, 1993). La presencia de la enfermedad se ha reportado más comúnmente en siembra en invernaderos, y se atribuye a la alta humedad relativa en estos sistemas de siembra, situación similar a la observada en el presente trabajo. También se ha observado que en los sistemas donde se carece de protección bactericida contra el patógeno, la enfermedad es más común y más severa. En la región Mediterránea de Turquía, Basim *et al.* (2004), reportaron la aparición de la enfermedad en sistema de producción de tomate en invernadero con una incidencia que varió de 26 a 65 %, que provocó grandes pérdidas económicas, y una gran variedad de síntomas como marchitamiento, coloración marrón oscuro a negro en las lesiones de los márgenes de las hojas y en las fases avanzadas de la enfermedad, con tejido vascular de color marrón claro, síntomas que concuerdan con los observados en este trabajo.

Detección, aislamiento e identificación

Detección serológica. Por medio de la técnica de ELISA se detectaron cinco muestras positivas de *Cmm* (3 de tallo, 1 de hoja y 1 de semilla), mediante el juego comercial recomendado por las normas OEPP/EPPO (2005) para la detección presuntiva de la enfermedad en tomate. Esta técnica es la recomendada cuando se va a analizar un número grande de muestras, ya sea de material vegetal o bien de colonias aisladas. En el presente trabajo únicamente se utilizó para la detección directa en el material vegetal, por lo que

sólo se puede concluir que esta técnica fue útil en la detección primaria de la bacteria; es decir, dio idea de la presencia del patógeno en las plantas, pero no se analizaron colonias aisladas.

Aislamiento y caracterización fenotípica de *Cmm*. Se seleccionaron colonias que presentaron las características morfológicas y bioquímicas de la bacteria en estudio, colonias de color amarillo a naranja, con crecimiento aeróbico a 30 °C, de consistencia mucoide en medios de cultivo YDC y NBY (Figura 8). La tinción mostró la presencia de bacilos Gram negativos. Mediante la caracterización bioquímica se seleccionaron las colonias que presentaron crecimiento en NaCl 6 %, fermentaron glucosa, sacarosa y maltosa, pero no fermentaron arabinosa ni xilosa; además utilizaron glicerol y manitol como fuentes de carbono y no expresaron actividad de citocromo oxidasa (Schaad *et al.*, 2001).

Detección e identificación por técnicas moleculares. Se detectó la presencia de *Cmm* por la amplificación de un fragmento de ADN específico de 270 pb mediante PCR. Las siete muestras positivas fueron dos de tallo, dos de hoja y tres de semilla (Figura 9). La presencia de *Cmm* se corroboró una vez que fueron aisladas las colonias mediante PCR, con los mismos resultados de amplificación del fragmento de 270 pb (datos no mostrados). La identificación de las colonias se hizo mediante la secuenciación del fragmento de 480 pb, amplificado por PCR del ADNr. Se encontró que los fragmentos obtenidos pertenecen a cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, ya que al compararlas con las secuencias de las bases de datos públicas mostraron una homología de 99 %. La Figura 10 muestra el árbol de similitud de las secuencias

de dos de las cepas aisladas (D y H); La cepa D pertenece a los aislamientos de la región 4 San Ignacio del muestreo, con sistema de siembra en casa sombra, mientras que la cepa H a la región 5 Benjamín Hill proveniente de invernadero. La homología de las secuencias de las bases de datos con las cepas D y H aisladas es alto, conl 99 % entre ellas, así como a las secuencias de cepas obtenidas de las bases de datos con las que fueron comparadas (AB29958, EU686335 y DSM 46364), mientras que con *Micobacterium* spp., la cual pertenece al mismo grupo taxonómico, la homología es de 87 % y sólo comparte un 36 % de homología con *Escherichia coli*. Li y De Boe (1995) compararon la secuenciación casi completa de los genes 16S rRNA de las cepas tipo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. m* subsp. *insidiosus*, *C. m* subsp. *sepedonicus* y *C. m* subsp. *nebraskensis*, y las cuatro especies mostraron una disimilitud de apenas 1 % en sus genes ribosómicos, lo cual es mayor para otras especies y subespecies del mismo género.

Pruebas de patogenicidad

Las semillas de ambas variedades susceptibles y tolerantes que fueron tratadas con la solución bacteriana germinaron a las 48 h, y a los 7 d alcanzaron un altura de 5 cm; la plántulas fueron marchitándose progresivamente hasta morir totalmente por efecto de la solución bacteriana, mientras que la semilla tratada con agua destilada no manifestó síntoma alguno y continuó su crecimiento (Figura 11). Las plantas que fueron tratadas con el inóculo bacteriano en las formas de aspersión directa sobre la planta, mostraron síntomas a los 3 d de incubación, mientras que las inoculadas por punción en tallo y peciolo, lijado de

hoja e inoculadas con la ayuda de un cotonete de algodón, mostraron síntomas a los 5 d después de la inoculación, y a los 17 d, las plantas estaban completamente secas, en contraste con las plantas testigo inoculadas con agua estéril, en las que no se observaron síntomas de marchitez. Esto confirma que los aislamientos obtenidos corresponden al agente causal de la enfermedad y que se trata de una cepa fuertemente virulenta, por lo que es necesario que se busque la forma de controlarla dentro de los sistemas agrícolas aislados, y de evitar su diseminación.

CONCLUSIONES

En el Estado de Sonora, México, la enfermedad conocida como marchitez bacteriana en tomate, inducida por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, está presente en sistemas de producción bajo invernadero y casa sombra, así como en semilla, tanto por las técnicas de aislamiento en medios de cultivo y ELISA, como por la reacción en cadena de la polimerasa. Sin embargo, no se encontraron síntomas de la enfermedad en plantaciones de tomate en campos a cielo abierto.

No fue posible determinar la procedencia de la infección, ya que no se encontró ningún otro caso en plantaciones de tomate ni tampoco en semilla muestreadas.



Figura 7. Síntomas típicos del cancro bacteriano observados durante el muestreo Izquierda: planta de tomate con síntoma inicial de daño por *Cmm*. Derecha: plantas de tomate con síntoma de *Cmm* con la enfermedad avanzada.

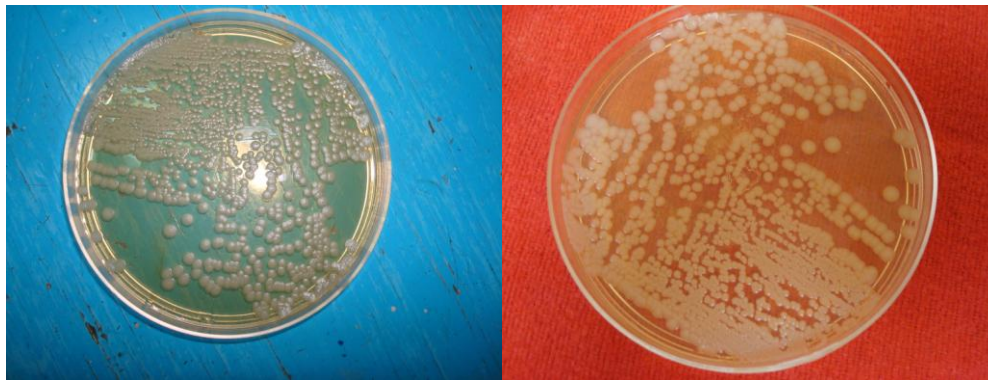


Figura 8. Aislamiento bacteriológicos obtenidos de tejido foliar sintomático en medio de cultivo NBY



Figura 9. Detección por PCR de un fragmento de ADN específico para la bacteria *C. michiganensis* subespecie *michiganensis* en muestras de diversos tejido de planta de tomate con síntomas de cancro bacteriano. 1 y 17 100 bp ADN ladder; 2 y 3 testigos positivos; 4 testigo negativo; 5 y 6 tallo (+); 7 tallo (-); 8 y 9 Hoja (+); 10, 11 y 12 hoja (-); 13 semilla (-); 14, 15 y 16 semilla (+).

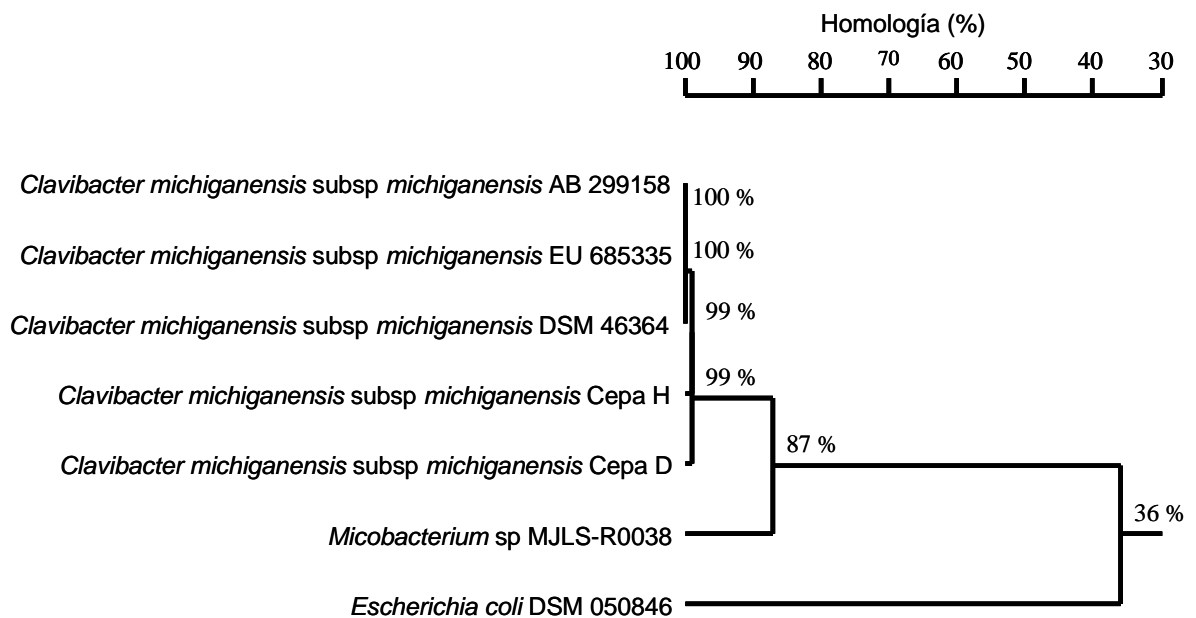


Figura 10. Árbol de homología de la comparación de las secuencias del fragmento del ADNr amplificado de las cepas H y D aisladas en este trabajo, con tres secuencias parciales de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, de *Micobacterium* spp. y *Escherichia coli*.



Figura 11. Izquierda: Plántulas de 20 días tratadas con inóculo bacteriano de *Cmm*. Derecha: Plántulas tratadas con agua destilada estéril.

CAPÍTULO 3

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE ACEITES ESENCIALES CONTRA *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY *IN VITRO* OF ESSENTIAL OILS vs *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*

J. Borboa Flores¹; E. O. Rueda Puente¹; E. Acedo Félix²; J. F. Ponce³; M. Cruz Villegas³ y
J. L. García Hernández⁴.

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos Universidad de Sonora. Blvd. Luís Encinas y Rosales s/n, Col. Centro CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.

jborboa@guayacan.uson.mx, erueda04@santana.uson.mx

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria Km. 06, 83000 Hermosillo, Sonora. evelia@ciad.mx

Instituto de Ciencias Agrícolas Carretera a Delta s/n 21705 Ejido Nuevo León, Baja California, México. jfponce8@hotmail.com; mcruz1410@hotmail.com

⁴Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, CP 23090, La Paz, B.C.S., México. jlgarcia04@cibnor.mx

*Autor de correspondencia: erueda04@santana.uson.mx Teléfono y fax (641) 324-12-42.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó la actividad antimicrobiana de 19 aceites esenciales de diferentes plantas: Árbol del té (*Melaleuca alternifolia*), Azahar (*Citrus aurantifolia* L.var. amara), Chile (*Capsicum Annum*), Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Brine), Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), Fenogreco (*Trigonella foenum graecum* L), Higuera (*Ricinus communis*), Jojoba (*Buxus chinensis*), Lavanda (*Lavandula officinalis*), Menta (*Chaix Mentha piperita* L.), Mostaza (*Brassica nigra*), Niaoli (*Melaleuca viridiflora* Gaerin), Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), Orégano (*Lippia palmeri* Watson), Orégano (*Origanum vulgare* L) Perejil (*Petroselinum sativum*), Romero (*Rosmarinus officinalis* L.), Salvia (*Salvia officinalis* L), y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

Obtención de aceites.

El aceite de orégano *Lippia palmeri* de la familia Verbenáceas fue obtenido de plantas encontradas en dos hábitats naturales y una cultivada en el estado de Sonora México, en la región conocida como Puerto orégano, localizado en las coordenadas geográficas a 29° 02 ' 52" N y 110° 50' 40 16" Oeste; otro sitio de recolección de *Lippia palmeri*, fue en Álamos, Sonora, a 380 msnm y a una latitud de 27° 01' latitud Norte y 108° 56 ' longitud Oeste. El tercer orégano fue cultivado en el área agrícola del Departamento de Agricultura y Ganadería (DAG) de la Universidad de Sonora a 29° 00' 44" LN y 111° 08' 02" LE. El aceite esencial se obtuvo por arrastre de vapor, siguiendo el Método Oficial de la A.O.A.C. 6.006 (1975), separando los compuestos volátiles del aceite esencial, utilizando un destilador tipo Clavender de capacidad de 2 litros. La calidad de los aceites esenciales seleccionados para este estudio oscilaron entre 98 y 99% de pureza acorde a Ortega *et al.* (2005). Los aceites esenciales restantes, se adquirieron del comercio local, de la marca Soria natural distribuidos por la casa Herbofarm Madrid, España.

Cultivos bacterianos

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio fue *C. michiganensis* subespecie *michiganensis* la cual fue aislada de campos de tomate con presencia de la enfermedad en estudio y posteriormente caracterizada (Borboa *et al.*, 2009).

Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales

Preparación del inóculo

La cepa bacteriana se desarrolló en un cultivo de 24 h a 30° C, en caldo NBY y se ajustó a una concentración de 10⁵ UFC/ml con solución salina estéril y se sembró de forma masiva en placas de agar NBY, utilizando un hisopo de algodón estéril, para conseguir un crecimiento microbiano uniforme. A las placas inoculadas se les colocaron discos de papel filtro, de aproximadamente 5 mm de diámetro, donde se colocaron los aceites esenciales preparado como se detalla a continuación.

Actividad antimicrobiana

La técnica utilizada para el análisis de la actividad antimicrobiana fue de acuerdo a las recomendaciones de Prabuseenivasan *et al.* (2006) modificada. Los aceites esenciales fueron disueltos en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %, adicionado con Tween 80 (0.5 % v/v), esterilizada por filtración (filtro de membrana de 0.45 µm Whatman). Las diluciones de los aceites fueron 1:1, 1:5 y 1:10 y de forma aséptica se colocaron 15 µl de cada una de las concentraciones de los aceites esenciales sobre el papel. Se utilizó DMSO en uno de los discos de papel filtro como control negativo y para descartar la actividad antimicrobiana del mismo. Además, se utilizó un disco de estreptomicina (10 µg/disco) y otro de ácido nalidíxico (30 µg/disco), como control de referencia. Se dejaron las placas por 30 min a temperatura ambiente para permitir la difusión del aceite esencial y luego fueron incubadas a 30° C por 18-24 h. Posterior al período de incubación,

se midieron los halos de inhibición del crecimiento. Los análisis se llevaron a cabo por duplicado.

Análisis estadístico

Se desarrollo un diseño factorial de 3 X 6 donde el factor A fueron tres diluciones con tres niveles (1:1, 1:5 y 1:10), el factor B son aceites con 6 niveles (Puerto Oregano, Orégano Álamos, Orégano Cultivado, Orégano comercial, Tomillo y Canela). Los datos se analizaron por medio de un ANOVA GLM, estimándose significativamente a una ($p < 0.05$). La comparación de medias se realizo por la prueba de rango múltiple de Tukey. Todos los datos fueron procesados en el paquete estadístico NCSS (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 19 aceites esenciales, sólo seis presentaron actividad bactericida: canela (*Cinnamomum zeylanicum* Brine), los 3 aceites de orégano (*Lippia palmeri* W.), recolectados de plantas procedentes de las áreas de Puerto orégano, Alamos, Sonora y Cultivado en el DAG, una muestra comercial de orégano (*Origanum vulgare* L), y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.). Los aceites descartados fue debido a que presentaron una mínima actividad en la inhibición de crecimiento de la bacteria en estudio, en las tres diferentes diluciones, por lo que se optó por descartarlos; esto último acorde a la sensibilidad de los aceites de acuerdo a las especificaciones utilizadas por Celikel y Kavas (2008), considerando el diámetro de inhibición del crecimiento (No sensible, si el diámetro total es menor de 8.0 mm; sensible para diámetros entre 9 y 14 mm; muy sensible para diámetros de 15-19 mm y extremadamente sensible para diámetros de inhibición mayores de

20 mm). En la Cuadro 2, se muestran los resultados del análisis de los diámetros de inhibición del crecimiento de *Cmm*.

Cuadro 2. Análisis de los diámetros de inhibición del crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, por efecto de aceites esenciales.

Aceites esenciales	Concentraciones		
	1:1	1:5	1:10
Puerto Oregano	59.6e	45.6d	37.6c
Orégano Álamos	58.3e	36.3c	28.3b
Orégano Cultivado	34.6c	29.6bc	26.3ab
Orégano comercial	37.6c	31.0bc	31.0bc
Tomillo	50.3de	33.0c	21.0a
Canela	34.3c	30.0bc	22.6ab

Valores con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

La comparación de medias mostró diferencia significativa ($p < 0.05$), entre los tipos de aceites, entre las diferentes concentraciones y en la interacción entre ambos parámetros. *Cinnamomum zeylanicum* (Brine), los tres aceites de orégano (*Lippia palmeri* W.), la muestra comercial de orégano (*Origanum vulgare* L), y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) mostraron una fuerte actividad contra *Cmm* (extremadamente sensibles, diámetro de inhibición > 20 mm), con importantes variaciones en la escala de inhibición, misma que fue disminuyendo de acuerdo a la dilución del aceite. Al hacer la comparación entre los 6 aceites, se observó que el extracto de Orégano *Lippia palmeri* recolectado en Puerto orégano (PO) en concertaciones de 1:1, 1:5 y 1:10 inhibió significativamente el crecimiento de *Cmm* que el resto de los aceites, seguida del orégano de Álamos

y del tomillo, lo cual nos permite subrayar la presencia de un potencial antibacteriano contra *Cmm*.

Estudios *in vitro* por Dagmar *et al.* (2008), observaron el efecto de treinta y cuatro aceites esenciales para inhibir el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subespecie *sepedonicus* (*Cms*) y *Clavibacter michiganensis* subespecie *insidiosus* (*Cmi*), detectando que los aceites de *Origanum vulgare*, *O. compactum*, *Eugenia caryophyllata* y *Artemisia absintio* fueron los más eficientes en controlar a las bacterias *Cms* y *Cmi*. Los resultados del presente estudio, concuerdan con Dagmar *et al.* (2008) donde el género *Origanum* es el que predomina en la inhibición de las bacterias *Cmm*. Sin embargo, es importante indicar que la inhibición de *Cmm* por los cuatro tipos de *Lippia palemeri*, vario el efecto inhibitorio (diferencia significativa en los diámetros de los halos de inhibición) adjudicándosele posiblemente a la composición de los aceites vegetales por efecto de las condiciones ambientales de su hábitat donde se desarrollan y la especie de planta; esto último acorde a los resultados obtenidos por Sivropoulou *et al.* (1996).

Otros trabajos han demostrado la capacidad de diversas especies de aceites del orégano y del tomillo de retardar y de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de plantas tales como: *Agrobacteria tumefaciens*, *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *E. caratovora*, *E. Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Axonopodis picovoltio*, *Xanthomonas vesicatoria* (Smith *et al.*, 1997; Vokou *et al.*, 1993; Sivropoulou *et al.*, 1996; Yegen, *et al.*, 1998; Türküsay, *et al.* 1998; Yıldız *et al.*, 2001; Soylu *et al.*, 2003).

Resultados similares fueron los obtenidos en el presente estudio donde se detectó una inhibición de crecimiento de *Cmm* con aceites de orégano y tomillo. Asimismo, la aplicación de aceites esenciales provenientes de orégano y tomillos, entre otros, se ha estudiado para controlar las enfermedades producidas por hongos incidentes en poscosecha del tomate, *R. stolonifer*, *B. cinerea*, *Alternaria arboressens* y *Geotrichum candidum*. Los resultados han sido variables en función del hongo y del aceite evaluado. Respecto a las diferentes diluciones de los extractos de aceite esencial que mostraron mayor inhibición de crecimiento de la bacteria *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, en concentración de 1:1, se muestran en el siguiente orden de inhibición: orégano *Lippia palmei* recolectado en puerto orégano (PO) con 59.6 mm, de halo de inhibición, seguido del orégano *Lippia palmei* recolectado en Álamos (OA), con 58.3 mm de inhibición, tomillo *Thymus vulgaris* (Tom.) con 50.3 mm. Mientras que los tratamientos más eficientes en concentración 1:5 fueron: (PO) con 45.3 mm, (OA) con 36.3 mm y (TOM) con 33.0 mm. y los más eficientes en la concentración 1:10 fueron: (PO) con 37.3 mm. (OV) con 31.0 mm. y (OA) con 28.3 mm. La efectividad de los aceites esenciales fueron comparados con dos antibióticos: estreptomicina (10 µg), y el ácido nalidíxico (30 µg), encontrándose que todos los aceites esenciales en las diferentes concentraciones dieron mejores resultados que lo esperado por los antibióticos (Figura 12).

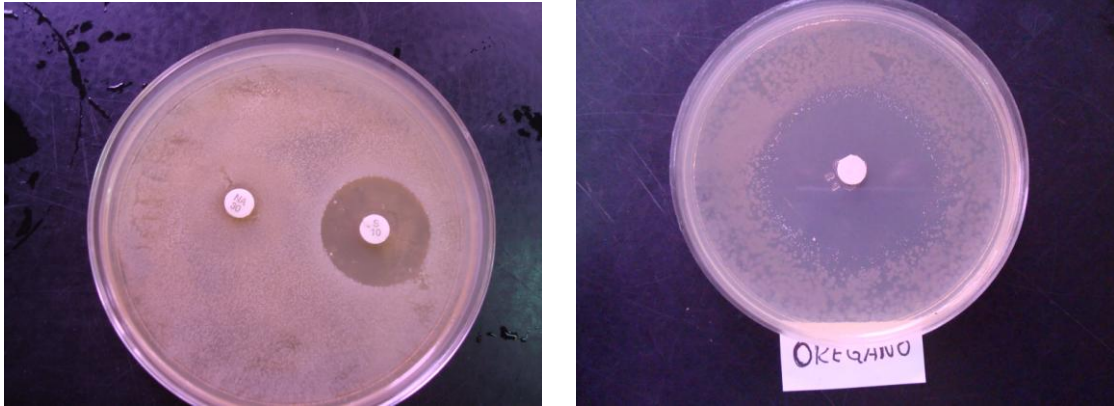


Figura 12. Comparación del crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con el aceite esencial de *Limppia palmeri* (Derecha) y los antibióticos de estreptomicina y el ácido nalidixico (Izquierda).

En este sentido, aceites esenciales de orégano, tomillo, lavanda, romero y *Dictamnus* fueron probados por (Daferera *et al.*, 2003) para conocer su eficiencia de control contra *Botritis cinerea*, *Fusarium* sp. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, en medios artificiales del crecimiento. La composición química de los aceites fue determinada por la cromatografía de gases-masa (GC-MS). El crecimiento de *Botritis cinerea*, *Fusarium* sp y de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fue inhibido totalmente por los aceites esenciales del orégano, tomillo y *Dictamnus* spp en bajas concentraciones (85-300 µg/ml). El Timol fue el componente principal del aceite del orégano, mientras que los aceites de tomillo y *Dictamnus* spp, eran ricos en carvacrol. Estos resultados se pueden comparar con el actual estudio, ya que los aceites esenciales que mejor controlaron a *Cmm* fueron los de orégano y tomillo. En relación a las fracciones, de aceites esenciales se observó un efecto diferencial, en las dosis más altas de PO y OA, predominando la concentración 1:1 (v/v), la cual resulto ser significativa ($p < 0.05$) en todos los aceites evaluados (Figura 13). La

concentración de metabolitos en el aceite esencial puede ser variable como lo es el caso de la concentración de cinamaldehído del aceite esencial procedente de canela que puede variar entre 60 y el 75% (Duke, 1986), mientras que el timol y carbacol procedentes del tomillo pueden variar entre 3 y el 60% del total (Lawrence, 1984). En el actual estudio, al utilizar dosis bajas del aceite, pudo originar una disminución del potencial de inhibición de la bacteria. Se encontró una interacción entre los aceites esenciales y las dosis, observándose una tendencia inicial de mayor a menor en el control de la bacteria *Cmm*, lo cual indica que a medida en que se va diluyendo el principio activo del aceite al disminuir la concentración. Los resultados antedichos indican que la actividad antibacteriana de los aceites esenciales puede depender de la concentración relativa de los componentes activos. Sin embargo, la interacción química posible entre los componentes no se excluye con efectos sinérgicos y/o antagónicos.

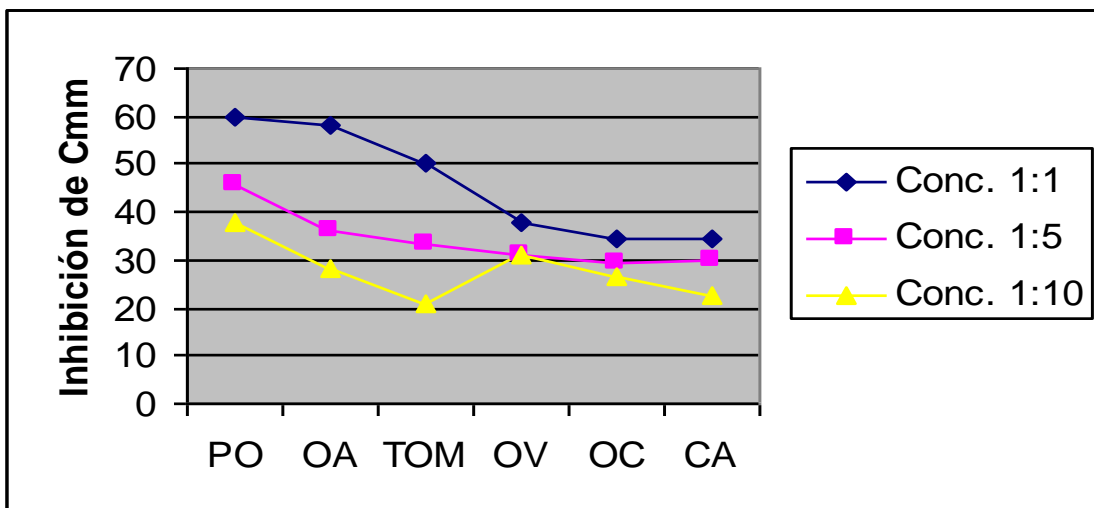


Figura 13. Comportamiento de los aceites esenciales en la interacción a diferentes concentraciones frente a las cepas bacterianas *Cmm* a las 24 h del ensayo. PO: Puerto orégano; OA: orégano álamos; TOM: tomillo; OV: *Oregano vulgare*; OC: orégano cultivado; CA: canela.

CONCLUSIONES

En la segunda parte de la investigación se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de 19 aceites esenciales, de los cuales fueron seleccionados seis por su actividad bactericida, quedando en el siguiente orden: Orégano de Puerto Orégano>Orégano de Alamos>Tomillo>Orégano cultivado>Orégano comercial>Canela; mismos que representan una buena alternativa para evitar el uso de antibióticos en el control de la bacteria *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*.

El aceite esencial de orégano *Lippia palmei* obtenido de plantas recolectadas en su hábitat natural en Puerto Orégano Sonora, mostró significativo efecto inhibitorio ($p<0.05$), *in vitro* sobre la bacteria *C. michiganensis* subespecie *michiganensis*, en concentración de 1:1, que el resto de los aceites evaluados en estas pruebas.

Son necesarios otros estudios para evaluar la actividad fito-tóxica sobre la germinación de la semilla y el posible uso para el saneamiento de la misma, para evitar el uso de semilla contaminada por patógenos que se diseminan por este medio, como lo es el caso de bacteria en este estudio. Asimismo, el aislamiento e identificación de los compuestos activos que presentan los aceites evaluados y, considerar los campos moleculares, morfológicos y bioquímicas que estos compuestos causan al patógeno y el hospedero.

Finalmente, el presente trabajo, permite proponer la reducción del uso de antibióticos y de otros bactericidas cúpricos prohibidos actualmente en algunos países europeos y en la producción orgánica de hortalizas.

LITERATURA CITADA

- Agrios G. N. 2005. Plant pathology. 5^{ta} Ed. Elsevier Academic Press, Estados
- Agrios G. N. 1997. Plant Pathology. 4th ed. Academic press, New York. P. 460
- Aguirre, A. 1965. Patología Vegetal. Editorial Limusa, México. P. 756
- Alexopoulos C., Mims C., Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. 4^{ta} Ed. Wiley. Nueva York, EEUU. P. 869.
- Anwar A. van der Zowen P. S., Ilyas S. and Van Der Wolf. 2004. Bacterial Canker (*Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*) of tomato in commercial seed produced in Indonesia. Plant Disease 88:680.
- A. P. S. 2001. Plagas y enfermedades del tomate/ Plagues and Diseases of Tomatoes. Libro de texto. Mundi-Presna Libros. ISBN: 9788471149435 8471149435. pp. 2-33.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1975. William Horwintz, Alam Sen Zel and Helen Reynoldsd. Res. Vet. Sci. 6.006. Ed. (25). Pag. 77.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., and Struhl K. 1992. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Báez, F. M. 2001. Calidad poscosecha de frutos hídricos de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill. y su relación con la calidad de la poligalacturonasa. Tesis de maestría Centro de Investigaciones en Alimentos y Dwsarrollo. Culiacán Sinalos.

- Batish D., Singh H., Kohli R. y Kaur S. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecol. Manage.* In Press. Doi:10. p. 1016.
- Basim E., Basic H., Dikcstein, E. R. y Jones J. B. 2004. Bacterial Canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* on greenhouse-grow tomato in the Western Mediterranean region of Turkey. *Plant Disease* 88:1048.
- Benson D. A, I Karsch-M. D. J. Lipman J. Ostell D. L. Wheeler, 2008. GenBank. *Nucleic Acids Research* 36, Database issue D25–D30.
- Beattie G. A. and Lindow S. E. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology* 89:353-359.
- Blancard D. 1996. Enfermedades del tomate. INRA Estación de Patología. Ed. Mundi-Prensa. España.
- Blancard D. 2000. Enfermedades del Tomate Observar, Identificar Luchar. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España. P. 212 .
- Blancard D. 1997. A colour atlas of tomato diseases: observation, identification and control. Ed. Manson Publishing, INRA, WILEY.
- Boch J., Joardar V., Gao L., Robertson T., Lim M., and N. Kunkel B. 2002. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* genes induced during infection of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Microbiology* 44:73-88.
- Borboa, F. J., Rueda, P. E. O., Acedo, F. E., Ponce, M. J. F. Cruz, V. M. Y Garcia, O. A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en tomate en el estado de Sonora, México. *Revista*

Fitotecnia Mexicana.Bravo, M., Aldunate, P. 1993. Monografías Hortícolas. CORFO. PUCCH. Santiago. P.136.

Bukasov S. M. 1963. Las plantas cultivadas de México, Colombia y Lima. IICA. Publicación. Misc. N° 20. Citado por Esquinas A. J., Nuez, F. V. 2001. El Cultivo Del Tomate/ Cultivation of Tomato. Mundi-Presna ISBN: 9788471145499 8471145499. P. 15.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.

Carrillo, R. A. 2004. Tendencias históricas de la producción de jitomate en México y Sinaloa. Empresa y agricultura de exportación en el Noroeste de México. Historia Económica y tendencias actuales. CONACYT. U42007H. P. 1.

CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate. Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales. ISBN: 9977570612 9789977570617 Turrialba, Costa Rica. Pp. 13-16.

Castillo J. 2004. Determinación de Metabolitos Secundarios en Plantas Silvestres del Parque Nacional Terepaima, Municipio Palavecino, estado Lara. Tesis. Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado, Venezuela. P. 103.

Chang R J, S M Ries J K Pataky. 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. Phytopathology 82:553-560.

- Cheng S., Liu J., Huang C., Hsui y., Chen W. y Chang S. 2009. Bioresource Technology. 100. 457-464.
- Chomczynski P, K Mackey, R Drews, W Wilfinger. 1997. DNAzol: A reagent for the rapid isolation of genomic DNA. BioTechniques 22:550-553.
- CEDAF/ Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal. 1993. Tomate de mesa. Disponible en [http //cedaf.org/tomatedemesa](http://cedaf.org/tomatedemesa). Consultada el 17/09/2006.
- Celikel N., Kavas G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Food Sci., 26: 174-181.
- Claudio, R. Sandoval, B. C. R. 2004. Manual técnico Manejo integrado de Enfermedades en cultivos hidropónicos. FAO, Universidad de Talca, Chile. Pp. 45-52.
- CONAGUA. 2006. Comisión Nacional del Agua CONAGUA - Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Red de estaciones climatológicas de la región Norte. www.conagua.gob.mx
- Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 10: 564.
- Cruz B. L. 2007. Calidad de semilla de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) por efectos de potenciales osmóticos, calcio y podas bajo condiciones de invernadero. Colegio de Posgraduados Montecillo, Texcoco, Edo. México. p.177.

- Dagmar P., Blanka k., Roman P., Rysanek P. 2008. Effectivity of plant Essential Oils Against *Clavibacter Michiganensis*, *in vitro*. Zemdirbyste-Agriculture, vol. 95, No. pp. 440–446.
- Davis M. J., Gillaspie A.G., Vidaver A. K. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *Xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. International Journal Systematic Bacteriology, V. 34, p. 107-117.
- Davis M. J. 1996. Taxonomy of plant-pathogenic coryneform bacteria. Annual Review of Phytopathology, v. 24, p. 115-140.
- D´Arcy W., Stevens W. D., Ulloa C. U., Pool A. y O., Montiel O. M.. 2001. Flora de Nicaragua. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 85, tomo III. St. Louis, Missouri.
- Daferera D. J., Ziogas B. N., Polissiou M. G. 2003. The effectiveness of plant essential oils in the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection. ISSN. 0261-2194. Vol. 22, pp. 39–44.
- De León L., Rodríguez A, López M. M. and Siveiro F. 2007. Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation of detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed. Journal of applied Microbiology 104: 776-786.
- 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; 28.

Dhanvantari B. N. 1993. Seed-borne infection in tomato bacterial canker. Proceedings of the 9th Annual Tomato Disease Workshop Pp. 33-36.

Dullahide S.R. Moffett M.L. Heaton J.B. Giles J.,1983. Effect of time of inoculation of *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* on yield of trellised tomatoes. Australasian Plant Pathology. 12(2):15-16.

Domingo D., Lopez B. M. 3003. Plantas con actividad antimicrobiana. Rev. Esp Qimoterap. España 16(4): 385-393.

Dreier J. D. Meletzus R. Bahro and R. Eichenlaub. 2000. The endo- α -1,4-glucanase of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for the induction of bacterial wilt of tomato. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:703–714.

Dreier J. D., Bermphol A., and R. Eichenlaub R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection for Phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. pathogenicity 85: 462-468.

Ducrot P. H. 2005. Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticida activity of natural products from higher plants. pp. 47–58.

Duke J.A. 1986. Handbook of Medicinal Herbs. Editorial. CRC Press, Florida.USA. ISBN. 0-8493-2946-9. p. 33.

EPPO/CABI. 1998. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Quarantine Pests for Europe, 2nd edn, pp. 980–985.

EPPO/OEPP. 1992. Quarantine procedure *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Tesd Methods for tomato seeds. BII EPPO, 22 : 219- 224.

Edwin, D. C. (1990). Bacterial wilt. In: Stutevulle, D. L.; Edwin, D. C. (Eds) Compendium of alfalfa diseases. 2nd ed. St. Paul. ASP. P. 5-6.

Esquinas, A. J., Nuez, F. V. 2001. El Cultivo Del Tomate/ Cultivation of Tomato. Mundi-Presna ISBN: 9788471145499 8471145499. PP. 15-41. FAO (Organización para la agricultura y la alimentación). 2007.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

Fatmi W. and N.W. Schaad. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology* 78: 121-126.

Fravel D. R., 1989. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*. 26:75-91.

Filippone M. P., Días M. P., Diaz J. C., Castagnaro R. A. Ricardo P. and Farías R. N. 2001. Effect of Fragarin on the Cytoplasmic Membrane of the Phytopathogen *Clavibacter michiganensis* Editor-in-Chief: Jonathan Walton Published by APS PRESS in cooperation with the International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions.

Fritz M., Jakobsen I., Lyngkaer M. F. Thordal-Christensen H., and Pons-Kühnemann J. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Micorrhiza* 16: 413-419

García E R, A F Carrillo, J Siller (2007) Presencia de cáncer bacteriano en tomate injertado. Confederación de Asociaciones Agrícolas del Estado de Sinaloa. CAADES.18^a Ed. Pp.82.

- Garijo C. 1991. Técnicas y criterios de intervención para el control de las plagas y enfermedades polífagas más importantes de los cultivos hortícolas en invernaderos. *Phytoma España* nº 34. 39-44.
- Gitta L. C. 2003. Genetic and biochemical characterization of resistance to bacterial canker of tomato caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. The Ohio State University. E. U. A. P. 180.
- Gleason M, E J Braun, R H Peterson (1993). Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*. 81:1519-1523.
- Gleason M. L, Gitaitis, R.D, Ricker, M.D. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, v.77, n.11, p. 1069-1076.
- Gleason H. A. and Cronquist A. 1991. Manual of the vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada. 2a ed. Bronx, New York.
- Hadas R., Krizman G., Kliezman F. Gefen T. and Manulis S. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed. *Plant Pathology* 54: 643-649.
- IPFSAPH. 2001. National Seed Health System: Reference Manual B (Seed Health Testing and Phytosanitary Field Inspection Methods Manual). Pp 44-52. <http://www.ipfsaph.org/servlet/CDS>.

INEGI. 2000. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Sistemas Nacionales Estadístico y de Información Geográfica. <http://imágenes.google.com..mx>

Jahr H., Dreier J., Meletzus D., Bahro R., Eichenlaub R. 2000. The endo β -1,4 glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. Mol Plant-Microbe Interact.

Jones B. J., Jiménez G. M. M. 2001. Plagas y enfermedades del tomate. The American Phytopathological Society. Pp.1-2.

Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. and Zitter. T. A. 1997. Compendium of tomato diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. USA. P.73.

Kagale S., Marimuthu T., Thayumanavan B., Nandakuman R. and Samiyappan R. 2004. Physiological and Molecular Plant Pathology. 65: pp. 91-100.

Karl H. G., Birte A., Thomas B., Burger, A. Jutta E., Monika Flügel, M., Gaigalat, L. Goesmann, A., Graffen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., r Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer F., Pohle, S., Rückert, Ch., Susanne Schneiker, Zellermann, E., Pühler, A., Eichenlaub, R., Kaiser, O. and Bartels, D. 2008. The Genome Sequence of the Tomato-Pathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 Reveals a Large Island Involved in Pathogenicity_† journal of bacteriology, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Vol. 190, No. 6. PP. 2138-2149.

Kasselaki A. M., Shaw M. W., Malathrakis N.E. and Haralambous J. 2006. Control of *Leveillula taurica* in Tomato by *Acremonium alternatum* is

by Induction of Resistance, not Hyperparasitism. *European Journal of Plant Pathology* 115:263-267.

Kleitman F., Barash I., Burger A., Iraki N., Yunis Falah Y., Sessa G., Weinthal D., Chalupowicz Gartemann K. H. , Eichenlaub R. and Manulis-S. S. (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 121 No.4. pp. 463-475.

Kordali S. Fakir,A. Mavi A. Yildirim A. 2005. Screening of Chemical Composition and Antifungal and Antioxidant Activites of the Essential Oils from three Turkish Artemisa Species. *J. Agric. Food. Chem.*, 53:1408-1416.

Kroppenstedt R. M. 1977. Untersuchungen zur Chemotaxonomie der Ordnung Actinomycetales. Buchanan, 1917. PhD Thesis, Universitat Darmstadt. Darmstadt. Gernay.

Lambert R. J. Hanlon G. W. Denyer S. P. 2004. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*, *J Appl Microbiol*: 96(2):244-253. (CN00437)

Lawrence B. M. 1984. The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfum. Flavorist*. 1984. 9 (5).pp. 41-44, 49-51. Citado por Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* (2004) 94: 223-253.

Li X, S. H. De Boer. 1995. Comparison of 16S ribosomal RNA genes in *Clavibacter michiganensis* subspecies with other coryneform bacteria. *Can J Microbiol*. 41:925-929.

- León G. H. M. 1988. Enfermedades de los cultivos en el estado de Sinaloa. INIA.SARH. Sinloa, México. p. 20.
- López M. y Cambra M. 1995. Diagnóstico y detección de bacterias fitopatógenas. In: Llorer, G.; Lopez, M.; Trapero, A y Bello, A. (eds).
- Lou L. X., Walters C. Bolkan H., Liu X. L. and Li J. Q. 2007. Quantification of variable cells of *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathology* 135: 1365-3059.
- Madigan T. M. Martinko M. J., Parker J. 2006. Biología de los microorganismos. Impreso en España, Editorial Hall. ISBN: 10:84-205-3679-2. PP. 336-348.
- Marcó G. M., Stall R. E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* 67: 779-781.
- Meletzus D., Berrmpohl A., Dreier J. and Eichenlaub R. 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the Phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis*. NCPPB382. *Journal of Bacteriology* 175: 2131-2136.
- Miller J.C. and Tanksley S. D. 1990. Analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics* 80:437-448.
- Moccia S., Frezza D., Chaera Y. and Mónaco E. 1998. Tomate cherry”: evaluación de componentes de calidad en tres híbridos durante el almacenamiento. *Horticultura Argentina* 17:5-10.

- Monrreal V. C. T. 2005. Desarrollo de métodos de diagnósticos moleculares de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas. Tesis en ciencias de biología molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Pp.61-95.
- Nico A. I., Aliooi A. M., Dal B. E. and Ronco L. B. 2006. Interacción de *Pseudomonas corrugata* y *Pseudomonas viridiflava* y diferentes genotipos de tomate. Revista de la Facultad de Agronomía 106:37-45.
- Nuez F. 2001. El cultivo del tomate. Libro de texto, Ed. Mundi-Presna, España: ISBN: 9788471145499 8471145499. pp. 13- 43.
- OEPP/EPPO. 2005. Diagnostic *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. European and Mediterranean Plant Protection Organization PM 7/42(1) Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 35:271–273.
- Ortega N. M. M., McCaughey E. D., Bargeño M. R., Serna F. 2005. Estimación de materia vegetal del Orégano (*Lippia palmeri* Watson) y su contenido de aceite esencial por planta en dos sitios nativos del estado de Sonora. Memorias del 5to Simposio Internacional de la Flora Silvestre de Zonas áridas. pp. 234-249.
- OEPP/EPPO. 2005. Diagnostic *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. European and Mediterranean Plant Protection Organization PM 7/42(1) Bulletin OEPP/EPPO. Bulletin 35:271–273.
- Oussalah, M. J. 2006. Food Prot, 69:046-1055.

- Pastrik K H, F A Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* by Polymerase Chain Reaction-based techniques. J. Phytopathology 147:687-693.
- Pierre J. G., Ans E. H., Grardy C. M. and Joseph A. K. 1985. Isolation and characterization of an elicitor of necrosis isolated from intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*) and tomato'. Plant Physiology 77: 642-647.
- Productores de hortalizas. 2006. Plagas enfermedades guía de identificación y manejo del tomate, Meister Media.
- Pelczar M. J, Reid R. D. 1992. Microbiología. Ed. Pueblo y Educación. La Habana Cuba. P. 664.
- Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S. 2006. In vitro antibacterial activity.
- Ramires V. J. Sáinz R. R. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. 1er. Ed. Once Ríos. México. pp. 19-160.
- Rat B., Poissonnier J., Goisque M. J., Burgaud A. 1991. Le point sur le chancre bactérien. *Fruit et Légumes* 86, 38-40.
- Ribera A., Cotoras M. and Zuñiga G. 2008. Effect of extracts from in vitro grown shoots of *Quillaja saponaria* Mol. on *Botrytis cinerea* Pers. World. Journal of Microbiology and Biotechnology..
- Rodríguez R. R., Tavares R. J. M., y Medina J. J. A. 2001. Cultivo Moderno del Tomate. ISBN: 8471146401 9788471146403. Mundi-Prensa. Madrid Esp. Pp. 15-19.

- Rodríguez M. M. L. 2001. Manual para la Identificación de Bacterias Fitopatogenas. 2^{da} Ed. Universidad Autónoma de Capingo. Pp. 80-96.
- Romantschuk M. 1992. Attachment of plant pathogenic bacteria to the surface of plants. *Annu. Rev. Phytopatol.* 30:225-243.
- Sambrook J, Russell D W, Sambrook J (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. p. 999.
- Sandoal, V. C. 2004. Manual Técnico Manejo Integrado de Enfermedades en el Cultivo de Hortalizas. Universidad de Talca. FAO. Pp. 45-46.
- Schaad N W, J B Jones, W Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria.* Ed. APS Press. U.S.A. Pp: 1-15.
- Shiva R. C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. Departamento de Sanidad y Anatomía de Animales. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. P. 173.
- SIAP-SAGARPA. 2008. Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Anuario agropecuario 1980 al 2006. <http://www.siap.gob.mx>. Consultado en Febrero del 2008.
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* vol. 44, pp. 1202–1205.
- Smith, M.D. and Navilliat, P.L. 1997. A new protocol for antimicrobial testing of oils. *Journal of Microbiological Methods* 28, 21–24.

- Sousa Santos M., Cruz L., Norskov P. and Ramussen O. F., 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* I tomato seeds. *Seed Science and technology* 25:581-584.
- Soylu S., Soylu E.M., Bozkurt İ.A., Kaya A.D. 2003. Antibacterial activities of essential oils from oregano, thyme, rosemary and lavender plants against *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, the causal agent of halo blight of bean. *Ovidius Univ. Ann. Med. Sci. Pharm.* 1: 40-44.
- Stackebrandt E., Riney A. and Wrd R.N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-49.
- Thyr B. D., Webb R. E., Jaworski, C. A., Ratcliffe, T. J. 1973 Tomate cancro bacteriano: el control de tratamiento de semillas. *Plant Disease Reporter.* 57: 974-977.
- Torres C. M. 2004. Investigación en la transformación secundaria de fruto, tubérculos, flores y hoja o tallo de especies pertenecientes al ecosistema andino. Informe técnico Jardín botánico. Subdirección de ciencias botánicas. Bogota D. C. pp. 2-14.
- Türküsay H., Onoğur E. 1998. Bazı bitki ekstraktlarının *in vitro* antifungal etkileri üzerine araştırmalar. *Turkish J. Agricult.Forestry* 22: 267-271.
- ULTEE A. 2002. Acción bactericida del carvacrol hacia el patógeno del alimento, el bacilo de cirio, (on line). www.agralin.nl/wda/&
- Weber A., 1992: Tomatsygdomme (Tomato diseases). Copenhagen. *Rev. Appl. Mycol.*, 2: 246.

- Vasinauskienė M. 2002. Bacterial diseases of the greenhouse grown tomatoes. *Biologija*. 1:29-31.
- Vokou D., Varelzidou S., Katinakis, P. 1993 Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. *Agricult. Ecosyst. Environ.* 47: 223.
- Vurro M. and Ellis B. E. 1997. Effect of fungal toxins on induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in elicited cultures of hybrid poplar. *Plant Science* 126:29-38.
- Walton N. J. and Brown D. E. 1999. Chemical from plants. perspectives on plants secondary products. Imperial College Press.
- Waters C.M. and H.A. Bolkan. 1992. An improved semi-selective medium for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. (Abstr.) *Phytopathology* **82**: 1072.
- Woese C. R., Kandler O. and Wheelis M. L. 1990. Hacia un sistema natural de los organismos: propuesta para los dominios *Archaea Bacteriay Eucarya*. Department of Microbiology, University of Illinois, Urbana 6180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4576-4579.
- Weisburg W G, S M Barns D A Pelletier D J Lane D. J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Yıldız N., Aysan Y., Çınar Ö. 2001. Domates gövde nekrozu etmenleri *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia chrysanthemi*, ve *E.caratovora* subsp. *caratovora* üzerine bazı bitki ekstrakt ve eterik yağları ile compost ekstraktlarının etkileri. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, Bildirileri, Tekirdağ. pp. 63-72 (in Turkish).

Yegen O., Ünlü, A., Berger, B.M. 1998. Use and side effects on the sil microbial activity of the essential oil from *Thymbra spicata* to control pepper blight *Phytophthora capsici*.

J. Plant Dis. Protect. 105: 602-610.

Zhi X. Y., LI W. J. and Stackebrandt E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59: 589-608.

<http://www.bacterio.cict.fr/c/clavibacter.html>

ANEXO 1

PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA INVESTIGACIÓN

- 1.-Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en tomate en el estado de Sonora, México.
Revista Fitotecnia Mexicana (artículo aceptado).

- 2.-Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*.
Tropical and Subtropical Agroecosystems (artículo enviado).

- 3.- Effect of essential oils in the control of the *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* bacterium in tomato plants developed.
(Antibacterial activity of essential oils on *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*)
International Journal of Experimental Botany Phytan (artículo enviado)

