

Efecto de la infección con *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, en el vigor de las semillas de Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)

GUERRA-R., Priscila, DELGADILLO-B., Claudia, HERNÁNDEZ-H., José Luis, GUERRA-R. Diana y SÁNCHEZ-C., Román

P. Guerra',', C. Delgadillo', J. Hernández', R. Guerra'' y R. Sanchez''

'Colegio de Postgraduados- Campus Montecillo
'' UACH-Departamento de Preparatoria Agrícola,
''' UACH-Departamento de Fitotecnia.
pris682000@yahoo.com.mx

F. Rérez, E. Figueroa, L. Godínez, J. Quiroz y R. García (eds.) Química, Biología y Agronomía. Handbook T-I. - ©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2016.

Abstract

The effect of infection with tomato seeds *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* bacteria was determined on quantitative parameters to assess seed vigor. No statistically significant difference between treatments for emergency speed parameters, percentage of establishment, shoot length and root length was found. Percent viability parameter is statistically different in the treatment of variety saladette with bacteria, where the infection causes a decrease in seed viability. In the dry weight of stem significant difference between treatments ball without bacteria and saladette with bacteria was found. Increased production of biomass and root dry weight on the ball variety without infection was found; the largest amount of biomass produced by this variety, compared with saladette variety, is not affected by the infection of seeds, with statistically significant difference, which indicates greater vigor ball variety.

14 Introducción

El jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) es una de las hortalizas (junto con la papa) más cultivadas a nivel mundial, representa una rica fuente de vitaminas y minerales así como proteínas, carbohidratos, fibra y ácido fólico, entre otros. Además, es rico en licopeno considerado un antioxidante muy potente (Jaramillo *et al.*, 2007).

El cancro bacteriano es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta al cultivo de tomate en el mundo. El agente causal de esta enfermedad es la bacteria gram positiva *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*). El diagnóstico oportuno de *Cmm* juega un papel fundamental en varias de las medidas que involucran el control de la enfermedad. Las semillas infectadas constituyen la fuente primaria de inóculo y son responsables de la ocurrencia de brotes severos de infección, aunque también puede diseminarse a través de suelo contaminado arrastrado por el viento, o de manera mecánica por las manos, herramientas de trabajo, poda y otras labores culturales (Sandoval, 2004). Se requieren niveles muy bajos de contaminación de la semilla para iniciar una epidemia importante. Por lo anterior, para el manejo del cultivo se recomienda la utilización de semillas certificadas y/o la selección y el trasplante de plántulas provenientes de semilla certificada y desarrollada en almacigos libre de la enfermedad.

Por otro lado, el “vigor” de las semillas ha sido por mucho tiempo tema de interés entre los productores y usuarios de las semillas agrícolas, ya que si bien la calidad de las semillas está determinada principalmente por la germinación y el establecimiento de las plántulas en el campo, éstas dependen en gran medida del vigor de la semilla. De ahí el interés por evaluar este parámetro de calidad mediante pruebas cuyos resultados estén altamente correlacionados con el comportamiento de las semillas en el campo (Moreno, 1984).

Después de diferentes intentos por definir el vigor de las semillas, en 1977, el Comité de pruebas de Vigor de la ISTA, lo definió como: “El vigor de la semilla es la suma total de aquellas propiedades de la semilla que determinan el nivel de actividad y comportamiento de la semilla o lote de semilla durante su germinación y emergencia de la plántula. Las semillas que se comportan bien se llaman semillas de alto vigor y semillas que se comportan pobremente son denominadas semillas de bajo vigor”. Esta definición engloba aquéllos procesos que directamente han sido relacionados con las diferencias en el vigor de las semillas; estos son:

a) Proceso y reacciones bioquímicas durante la germinación, tales como reacciones enzimáticas y actividad respiratoria; b) Velocidad y uniformidad de la emergencia de la plántula en el campo, y c) Capacidad de emergencia de las plántulas bajo condiciones desfavorables del medio ambiente. Moreno (1984) menciona que entre las causas de la variabilidad del vigor en las semillas están las siguientes: el genotipo, medio ambiente y nutrición de la planta, estado de madurez al momento de la cosecha, tamaño, peso y peso volumétrico, daño físico, deterioro y envejecimiento y los patógenos. El presente estudio tiene como objetivo determinar el efecto de la infección de semillas de jitomate con *Cmm*, sobre su velocidad de emergencia, porcentaje de establecimiento, viabilidad, porcentaje de plántulas normales y anormales, longitud del vástago, longitud de raíz, peso seco del vástago, y peso seco de raíz, como parámetros cuantitativos para la evaluación del vigor de las semillas.

14.1 Materiales y métodos

El experimento se realizó en el campo experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, bajo condiciones de invernadero utilizando cajas de plástico de 20 X 30 cm, con la mitad de su volumen con arena de río estéril. Se utilizaron dos genotipos de jitomate: jitomate tipo “Bola” variedad Floradade y jitomate “Saladette” variedad Río Grande, las semillas se obtuvieron a partir de los frutos.

Preparación del inóculo. El cultivo bacteriano de *Cmm* de 24h en caldo NBY (Caldo nutritivo 0.8%, extracto de levadura 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, KH_2PO_4 0.025%), se centrifugó por 15 min a 3900 g y el precipitado se re suspendió en una solución salina a 0.85% estéril para eliminar los fragmentos del medio de cultivo; se centrifugó nuevamente y se ajustó el inóculo a una densidad óptica (OD) de 0.67 a 480nm para obtener 10^8 unidades formadoras de colonias (CFU) por mililitro (Hadas *et al.*, 2005).

Infección de las semillas. De cada una de los tipos de jitomate se utilizaron 100 semillas por repetición previamente desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1.0% (v/v) por 5 minutos y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. A continuación fueron embebidas en 200mL de la suspensión bacteriana (preparada anteriormente) por 30 minutos (Figura 14).

Figura 14 Infección de semillas de jitomate con *Cmm*



Posteriormente se sembraron en almácigo en sustrato estéril. Se realizaron 4 repeticiones de 100 semillas cada una por tratamiento (Figura 14.1).

Figura 14.1 Siembra de semillas de jitomate infectadas y no infectadas en almácigos



Asimismo, 100 semillas se consideraron como testigo negativo al pasar por el mismo proceso pero con uso de agua destilada estéril en lugar de suspensión bacteriana (Borboa *et al.*, 2009)

El diseño experimental utilizado fue un Diseño de Bloques Completos al Azar con 4 repeticiones.

Modelo Estadístico:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + b_j + \varepsilon_{ij} \quad (14)$$

$$i = 1, 2, 3, 4. (T) \quad j = 1, 2, 3, 4. (B)$$

Donde:

y_{ij} = Observación de la variable respuesta (viabilidad(% de plantas normales y anormales), longitud de la raíz, peso seco de vástago y peso seco de raíz) obtenida del tratamiento i -ésimo dentro del bloque j -ésimo.

μ = Media general de las variables respuestas.

τ_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

b_j = Efecto del j -ésimo bloque

ε_{ij} = Error asociado al tratamiento i en el bloque j

Hipótesis a probar:

- H_0 : No hay diferencias entre las medias de los dos tipos de tomate infectados y no infectados.
- H_a : Hay diferencias en al menos una de las medias de los dos tipos de tomate infectados y no infectados.

Nivel de significancia de 0.05.

Regla de decisión:

Rechazar H_0 si el valor de $F_c > F_t$.

No rechazar H_0 si el valor de $F_c < F_t$

La unidad experimental constó de las 100 plantas por tratamiento por repetición.

Para cada tipo de jitomate (Bola y Saladette), se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento (con infección y sin infección) de 100 semillas cada una, de tal manera que se obtuvieron 4 tratamientos (Tabla 14).

Tabla 14 Determinación de la ubicación de cada una de las repeticiones utilizando una tabla de distribuciones al azar

Tratamientos		Repeticiones (R)			
		I	II	III	IV
Tipo Bola (B)	Con infección (BC)	4(BC)	7(BC)	9(BC)	13(BC)
	Sin infección (BS)	1(BS)	5(BS)	12(BS)	15(BS)
Tipo Saladette (S)	Con infección (SC)	3(SC)	6(SC)	11(SC)	14(SC)
	Sin infección (SS)	2(SS)	8(SS)	10(SS)	16(SS)

Donde:

(BC) = semillas del tipo Bola con infección

(BS) = semillas del tipo variedad Bola sin infección

(SC) = semillas del tipo Saladette con infección

(SS) = semillas del tipo Saladette sin infección

Prueba de vigor en arena. En una caja de arena previamente esterilizada, se estableció el experimento teniendo como unidades experimentales 10 hileras de 14 cm de longitud a 2 cm de separación. En cada hilera se sembraron 10 semillas por tipo de jitomate a una distancia de 1.4 y a 0.5 cm de profundidad, usando un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La cama de arena se cubrió con una capa de polietileno formando un micro túnel.

Variables evaluadas:

a) Velocidad de emergencia (VE): Una vez emergido el primer cotiledón se realizó el conteo inicial (X_i), y a partir de este momento se efectuó un conteo diario, lo cual concluyó hasta el momento en que no se observó emergencia (N_i). La VE se calculó con base a la expresión propuesta por Maguire (Copeland y McDonald, 1995):

$$VE = \sum_{i=1}^n [X_i/N_i] \quad (14.1)$$

Dónde:

VE= Velocidad de emergencia

X_i = Número de semillas emergidas por día

N_i = Número de días después de la siembra

b) Porcentaje de establecimiento (PE): Se evaluó a los 20 días de establecido del experimento, que fué el momento en que la emergencia permaneció constante (Figura 3). Para ello, se aplicó la expresión siguiente:

$$PE = \frac{NPN}{50} \times 100 \quad (14.2)$$

Dónde: NPN= Numero de plántulas normales al final de la prueba

c) Viabilidad: número de plantas normales más número de plantas anormales a los 20 días después de la siembra.

Porcentaje de plántulas normales (PPN): Se contabilizó el total de aquellas plántulas que presentaron todas sus estructuras esenciales como un hipocótilo, epicótilo, sistema radical bien definido, pecíolo, yema terminal y dos cotiledones.

Porcentaje de plántulas anormales (PPA): Se contabilizó el total de aquellas plántulas que presentaron alguna deficiencia en el desarrollo de sus estructuras esenciales, como son sin cotiledones, con fisuras o lesiones que dañen al tejido conductor del hipocótilo, epicótilo o raíz. Además, plántulas deformes con estructuras primordiales retorcidos en espiral y plántulas sin desarrollo después de haber salido de los cotiledones (Moreno, 1996).

d) Longitud del vástago (LV): Se midió la longitud promedio alcanzada por el vástago de la plántula a los 20 días desde el inicio de la germinación (Madueño-Molina *et al.*, 2006), en 10 plántulas por repetición.

Figura 14.2 Algunos aspectos del proceso de evaluación de plántulas de jitomate para medición de los parámetros de estudio: a) plántulas a los 20 días desde inicio de germinación, b) eliminación de sustrato, c) medición de longitud de vástago y raíz, d) separación de vástago y raíz para medición de peso seco



e) Longitud de raíz (LR): En diez plántulas normales por repetición tomadas al azar, se midió la longitud de raíz en cm desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la misma, este parámetro se cuantificó a los 20 días después de la siembra.

f) Peso seco del vástago (PSV): Se tomaron los vástagos de las plantas que hayan sobrevivido, solo plántulas normales cosechadas a los 20 días después de la siembra. Se secaron dichos vástagos en estufa sometidos a 70°C durante 72 horas y se tomó el peso seco (Méndez- Natera *et al.*, 2007).

g) Peso seco de raíz (PSR): Se tomaron las raíces de las plántulas normales que se usaron para evaluar PSV, a los 20 días después de la siembra. Se secaron dichas raíces en estufa, sometidas a 70 °C durante 72 horas y se tomó el peso seco (Méndez- Natera *et al.*, 2007).

El análisis de los datos obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados se realizó con el paquete estadístico InfoStat Software Estadístico, versión 2008.

14.2 Resultados y discusión

Los resultados de la prueba de Tukey realizada para los diferentes parámetros evaluados se muestran en la Tabla 2. En cuanto al PSV existe diferencia significativa entre los tratamientos BS y SC, aunque esto no tiene relación con las semillas infectadas, indica una mayor producción de biomasa en la variedad bola sin infección, tendencia que se repite para el parámetro PSR donde ésta variedad produce mas biomasa tanto sin bacterias como con bacterias en comparación con la variedad saladette, con diferencia estadísticamente significativa, lo cual nos da idea de un mayor vigor de la variedad bola en comparación con la variedad saladette, pero no hay diferencia estadísticamente significativa en relación a los tratamientos con y sin bacterias para ambas variedades en este parámetro. La infección de las semillas de jitomate con la bacteria *Cmm* influye claramente en el % de viabilidad lo cual se reflejaría en la producción de este cultivo.

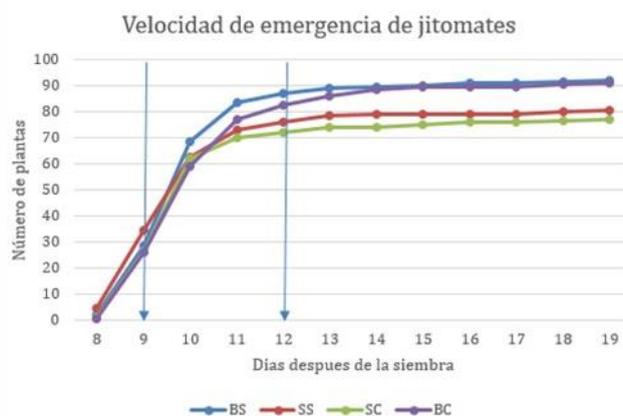
En relación al PSR, una menor producción de raíz podía afectar el buen desarrollo de las plantas al modificarse la absorción efectiva de nutrientes debido a un menor desarrollo radicular pero, de acuerdo a los resultados obtenidos esto no es atribuible a la infección de la plántula por *Cmm*, sino que es consecuencia de la diferencia en el % de viabilidad entre las variedades evaluadas.

Tabla 14.1. Resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey para los diferentes parámetros evaluados

	VE	%PE	%V	LV (cm)	LR (cm)	PSV (g)	PSR (g)
BS	9.21 A	92.50 A	93.00 A	4.36 A	9.09 A	0.35 A	0.86 A
BC	8.87 A	90.00 A	91.25 A	4.41 A	9.01 A	0.29 AB	0.86 A
SS	8.20 A	81.75 A	82.50 AB	4.52 A	9.29 A	0.27 AB	0.71 B
SC	7.72 A	61.25 A	62.75 B	4.59 A	10.31 A	0.26 B	0.63 B

BS= variedad Bola sin bacteria; BC=variedad Bola con bacteria; SS= variedad Saladette sin bacteria; SC= variedad Saladette con bacteria; VE= velocidad de emergencia; PE=porcentaje de establecimiento; V= porcentaje de viabilidad (%de plantas sanas + % de plantas anormales); LV= longitud del vástago; LR= longitud de raíz; PSV= peso seco del vástago; PSR= peso seco de raíz.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para el parámetro VE (Tabla 2), se observa que los jitomates tipo bola obtuvieron las medias más altas al igual que los de la variedad bola sin bacteria. En segundo lugar se agrupan los jitomates de la variedad saladette y muestran la misma tendencia de una mayor VE en los jitomates sin bacteria con respecto a los jitomates inoculados con bacteria (Gráfico14).

Gráfico 14 Curva de crecimiento de dos tipos de jitomates inoculados con bacteria y sin bacteria

En el Gráfico 14 se observa la velocidad de crecimiento de jitomates, donde se muestra que la mayor cantidad de plantas emergidas se obtuvieron de los 9 a los 12 días después de la siembra, es decir en 4 días emergieron la mayoría de plántulas.

Es importante mencionar, que de manera frecuente, las plantas infectadas con *Cmm* pueden pasar por plantas sanas pues presentan una infección latente que no muestra síntomas o éstos son muy leves y los síntomas de la enfermedad solo son observables cuando la infección ya está avanzada y es muy difícil erradicar. Las plantas con infecciones de este tipo, constituyen una fuente de semillas contaminadas, y son la mayor causa de nuevos brotes de infección (Gartemann *et al.*, 2008), por lo que sería interesante realizar evaluaciones del efecto de la infección de las semillas de jitomate con *Cmm* en plantas con mayor edad o incluso, de ser posible evaluar los frutos.

En general, se considera que las semillas son la fuente primaria de inóculo, con un 0.25-100% de porcentaje de transmisión, por lo que es recomendable evitar que el patógeno llegue al área de cultivo para reducir las pérdidas por esta enfermedad. El patógeno también puede diseminarse a través de suelo contaminado arrastrado por el viento, o de manera mecánica por las manos, herramientas de trabajo, poda y otras labores culturales (Sandoval, 2004). La mayoría de las infecciones secundarias ocurren en condiciones de cultivo, generalmente por la penetración de la bacteria a través de heridas en las raíces, tallos, hojas, y frutos durante el trasplante. Una vez dentro de la planta, la bacteria invade el sistema vascular, se traslada y multiplica en los vasos del xilema, y sale de ellos por el floema, médula y corteza.

Se recomienda la selección y limpieza de la semilla y el trasplante de plántulas provenientes de semilla certificada y desarrollada en almácigos libres de la enfermedad. También la desinfección de la semilla con una solución de ácido acético al 0.6% durante 24h, o tratamiento con agua caliente a 55°C durante 25 minutos, luego tratar con formalina y secar rápidamente. La desinfección con ácido clorhídrico diluido o hipoclorito de calcio también disminuye la bacteria en forma eficiente (Gleason *et al.*, 1993).

14.3 Conclusión

Se determinó el efecto de la infección de semillas de Jitomate con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, sobre su velocidad de emergencia (VE), porcentaje de establecimiento (PE), viabilidad, porcentaje de plántulas normales (PPN), porcentaje de plántulas anormales (PPA), longitud del vástago (LV), longitud de raíz (LR), peso seco del vástago (PSV), y peso seco de raíz (PSR), como parámetros cuantitativos para la evaluación del vigor de las semillas, obteniendo diferencia estadísticamente significativa en el % de viabilidad para la variedad saladette con bacterias. Las medias de los tratamientos de los jitomates de la variedad bola obtuvieron el mayor PSR con respecto a los jitomates de la variedad saladette, lo cual indica un mayor vigor de la variedad bola.

14.4 Referencias

- Borboa, F.J., Rueda, P. E. O., Acedo, F.E., Ponce, J.F., J. F., Cruz, M., Grimaldo, J. O., y García, O.A.M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. Revista Fitotecnia Mexicana, Vol. 32. Núm. 4, octubre-diciembre, pp. 319-326.
- Copeland y M. B. McDonald (1995). Principles of seed science and technology. Third edition.
- Gartemann K. H., Abt B., Bekel T., Burger A., Engemann J., Flügel M., Gaigalat L., Goesmann A., Gräfen I., Kalinowski J., Kaup O., Kirchner O., Krause L., Linke B., McHardy A., Meyer F., Pohle S., Rückert C., Schneiker S., Zellermann E. M., 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, Vol 190. No. 6, pp 2138-2149.
- Gleason M., Gitaitis R. D., Ricker M. (1993). Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America Plant Disease, Vol. 77, 1069-1076.
- Hadas, R.,Kritzman, G., Klietman, F., Gefen, T., and Manulis, S. (2005). Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. Plant Pathology 54, 643-649.
- Jaramillo, J.; Rodríguez, V.P.; Guzmán, M.; Zapata.M.; Rengifo, T. (2007). Manual Técnico: Buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. FAO, Gobernación de Antioquía, Mana, Corpoica, Centro de Investigación “La Selva”.
- Madueño- Molina A., Garcia- Paredes D., Martinez- Hernandez J. y Rubio- Torres C. (2006). Germinación y desarrollo de plántulas de frijolillo (*Rhynchosia minima* L.) DC en condiciones de salinidad. TERRA Latinoamericana Vol. 24 Num 1. pp 47- 54.
- Mendez- Natarena J. R., Ysavit-Marcano L., Merazo- Pinto J. F. (2007). Efecto de inmersión de semillas de maíz (*zea mays* l.) en agua 100 °C sobre la germinación y crecimiento de plántulas bajo condiciones de laboratorio. Revista especializada en ciencias Químico-Biológicas Vol. 10, Núm. 2. pp. 56-64.
- Moreno, M. E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas, Instituto de Biología, UNAM, México, 383p.

Moreno, M. E. (1996). Análisis, Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Ed. UNAM. México. 193p.

Sandoval, C. (2004). Manual Técnico. Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Facultad de ciencias agrarias. Universidad de Talca, Chile.