



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CONTROL BIOLÓGICO DE**

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

**Por:**

**Ana Luz Romero García**

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de**

**Maestro en Ciencias Agropecuarias**

**Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.**

**Diciembre 2011**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CONTROL BIOLÓGICO DE**

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

**Por:**

**Ana Luz Romero García**

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de**

**Maestro en Ciencias Agropecuarias**

**Asesor Principal:**

**M.C. Clara Teresa Monreal Vargas**

**Asesores:**

**Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís**

**Dr. Ovidio Díaz Gómez**

**Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.**

**Diciembre 2011**

El trabajo titulado “CONTROL BIOLÓGICO DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*” fue realizado por: “Ana Luz Romero García” como requisito parcial para obtener el título de “Maestro en Ciencias Agropecuarias” y fue revisado y aprobado por el suscrito Comité de Tesis.

M.C. Clara Teresa Monreal Vargas

Asesor Principal



---

Dr. Ángel Alpuche Solís

Asesor



---

Dr. Ovido Díaz Gómez

Asesor



---

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a los 17 del mes de Diciembre del 2011.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología de Posgrado de la Facultad de Agronomía, U.A.S.L.P. y en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), bajo la asesoría de la M.C. Clara Teresa Monreal Vargas, la co-asesoría del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, y con el apoyo de Fundación Produce San Luis Potosí.

## **DEDICATORIA**

A mi esposo

**Miguel Angel**

Por ser cómplice en todas mis travesías y por impulsarme a hacer realidad todos mis sueños.

A mis hijos

**Miguel Alejandro**

**Luís Angel**

Por hacer que mi vida sea alegre y maravillosa.

A mi padre

**Francisco**

Por dejarme una invaluable herencia, “mi carrera”, por caminar siempre a mi lado y apoyarme en todo momento incondicionalmente.

A mi madre

**Ana Luisa**

Por el gran amor que me ha tenido.

A mis hermanos

**Nadia, Iván, Pavel, Citlali y Francisco**

Por estar siempre conmigo y por el gran cariño que nos tenemos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Agronomía y a la Universidad Autónoma de San Luís Potosí por darme la oportunidad de estudiar la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., por darme la facilidad de realizar parte del proyecto de tesis, llevada a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular.

A la Fundación PRODUCE, por los recursos otorgados para llevar a cabo la presente tesis.

Al Dr. Ángel Alpuche Solís, por su colaboración como Co-asesor de tesis, así como la confianza y consejos que me brindó.

A la M.C. Clara Teresa Monreal, por su colaboración como asesora de tesis y por su apoyo, confianza y motivación que me brindó durante mis estudios y proyecto de tesis.

Al Dr. Ovidio Díaz Gómez, por su colaboración y consejos para que este trabajo llegara a su culminación.

Al Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular, en especial a Elvira Hernández Rico, Rosalba Castillo Collazo y Mayra Janeth Esparza Araiza; Lilia Montoya, por el apoyo, las enseñanzas y el cariño que en todo momento me brindaron.

Al Dr. José Pablo Lara Ávila, por sus consejos.

## CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
INTRODUCCIÓN	1
Agente Etiológico	2
Importancia Económica de <i>Cmm</i>	5
Sintomatología	7
Infección localizada	7
Infección sistémica	8
Epidemiología	9
Manejo	10
Control químico	11
Control genético	12
Control biológico	13
Identificación de Microorganismos Habitantes de la Rizósfera	17
Objetivos	18

Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	19
Ubicación del Experimento	19
Reactivos y Medios de Cultivos	19
Cepa de <i>Cmm</i> y Residuos de Col	19
Toxicidad de Compuestos Volátiles Liberados de Residuos de Col Deshidratados	19
Aislamiento de Antagonistas	20
Detección de Microorganismos Antagonistas por Confrontación con <i>Cmm</i>	20
Purificación de Cepas	20
Identificación de Antagonistas	21
Identificación microbiológica	21
Identificación molecular	21
Extracción de ADN	21
Amplificación del ADNr-16S con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
Análisis de los productos de PCR por electroforesis	22
Identificación de bacterias por secuenciación	22
<b>RESULTADOS</b>	24
Efecto Tóxico <i>In Vitro</i> de los Compuestos Volátiles Liberados de los Residuos de Col Deshidratados sobre el Crecimiento de <i>Cmm</i>	24
Aislamiento, Selección e Identificación de Microorganismos Antagonistas	25
Aislamiento y selección	25
Identificación con pruebas bioquímicas y fisiológicas	26
Identificación con técnicas moleculares	29

DISCUSIÓN	36
Efecto Tóxico <i>In Vitro</i> de los compuestos Volátiles Liberados de los Residuos de Col Deshidratados sobre el Crecimiento de <i>Cmm</i>	36
Aislamiento, Selección e Identificación de Microorganismos Antagonistas	38
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA	47

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Morfología colonial de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en diferentes medios de cultivo semiselectivos.	4
2	Cepas de bacterias que presentaron antagonismo <i>in vitro</i> a <i>Cmm</i> .	26
3	Pruebas bioquímicas primarias con la que se identificó que nueve cepas antagónicas corresponden al género <i>Bacillus</i> .	28
4	Identificación de <i>Bacillus atrophaeus</i> con las secuencias de un fragmento del ADNr 16S, amplificado con los iniciadores 533 F y 1391 R.	31
5	Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con las secuencias de un fragmento del ADNr 16S, amplificado con los iniciadores 533 F y 1391 R.	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución mundial de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .	6
2	Algunos síntomas del cáncer bacteriano observados en plantas cultivadas en San Luis Potosí, México. (A) Hojas con necrosis marginal y manchas necróticas con halo amarillo; (B) marchitamiento en plantas adultas; (C) ojo de pájaro en frutos; (D) marchitamiento y colapso por una infección sistémica; (E) necrosis de rama y cáncer en tallo.	8
3	Efecto de los compuestos volátiles liberados de los residuos de col deshidratados sobre el crecimiento de <i>Cmm</i> a las 24 h, en comparación con el testigo no expuesto y con organismos sensibles a estos volátiles.	24
4	Antagonismo <i>in vitro</i> exhibido por las diferentes cepas aisladas de la rizósfera de mezquite y de los residuos de col deshidratados, a través de halos de inhibición del crecimiento de <i>Cmm</i> .	25
5	Bacterias del género <i>Bacillus</i> antagonistas a <i>Cmm</i> . (A) Bacilos Gram (+) con endospora central-Tinción de Gram y (B) endospora central (tinción de Schaeffer y Fulton).	27
6	Amplificación del gen ADNr 16S. 1 Marcador molecular de 1 Kb, 2-5 cepas 8.11, 5.10, 7.10 y 1.14, con un tamaño de banda esperado de 900 pb.	29
7	Liberación del inserto del vector pGEM-T Easy del tamaño de banda esperado de 900 pb. 1 Marcador molecular 1 Kb, 2-10 cepas clonadas.	30
8	Dendrograma construido por el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining) con el programa Clustal W, con el que se identifica que las clonas Sec8.11-1, Sec1.14-2 corresponden a <i>Bacillus atrophaeus</i> y la Sec1.14-3 a <i>Bacillus</i> sp.	34
9	Dendrograma construido por el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining) con el programa Clustal W, que muestra que las cepas Sec 5.1 y Sec 7.10 corresponden a <i>Pseudomonas aeuroginosa</i> pero las cepas son genéticamente divergentes.	35

## RESUMEN

A nivel mundial, nacional y en San Luis Potosí, las plantaciones de jitomate y chile son afectadas por la enfermedad devastadora del cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). Ésta, es una de las enfermedades más difíciles de controlar y hasta hoy en día, las prácticas de manejo se han enfocado en medidas principalmente preventivas y en la utilización de bactericidas cúpricos y antibióticos, sin embargo, estos manejos no han sido eficientes. El objetivo general de este trabajo, fue desarrollar un método de control biológico para el manejo del cáncer bacteriano. Para ello se analizó el efecto que tienen los compuestos volátiles liberados por la hidrólisis de los residuos de col deshidratados y conservados por dos y cinco años, los tiempos de incubación fueron 24, 48 y 72 h. Se encontró que los compuestos liberados por la hidrólisis de los residuos de col no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento de *Cmm*. Adicionalmente, se aislaron microorganismos antagónicos a *Cmm*. Para esto, se pesó 1 g de rizósfera de mezquite y se tomó una asada de residuos de col los cuales se sembraron por la técnica de dilución y extensión. Se tomaron microorganismos que presentaron morfología tipo actinomiceto, para confrontarse con *Cmm* y medir el halo de inhibición. Se seleccionaron 11 cepas con características morfológicas macroscópicas diferentes, que desarrollaron halos de inhibición con diámetros de 2 a 6.2 cm. Las cepas se purificaron y se identificaron a través de pruebas bioquímicas y fisiológicas (Cowan y Stell, 1974), 9 cepas se identificaron como *Bacillus* sp. Los mejores antagonistas (2 *Bacillus* y 2 Gram negativos) se identificaron comparando la secuencia del ADNr 16S con secuencias previamente reportadas en la base de datos del GenBank utilizando programa BLAST. El porcentaje de identidad se estableció con el método Clustalw y se elaboró un dendrograma con el programa Neighbour-joining. Los *Bacillus* correspondieron a *Bacillus* sp. y *B. atrophaeus* y las Gram (-) a *Pseudomonas aeruginosa* pero el dendrograma refiere que las 2 cepas de ambas especies son subespecies o variantes genéticas divergentes, concordando con las diferencias morfológicas y fisiológicas previamente observadas. La rizósfera del mezquite y los residuos de col poseen gran biodiversidad en microorganismos antagónicos a *Cmm* que pudieran utilizarse como un método de control biológico para el manejo del cáncer bacteriano.

## SUMMARY

Worldwide, nationally and at San Luis Potosí State, tomato and pepper crops are affected by the devastating disease bacterial canker of tomato caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). Bacterial canker is one of the most difficult tomato diseases to control, and currently, disease management practices are based mainly in prevention measurements and in the use of copper-based bactericides and antibiotics, however, these methods have been ineffective. The main purpose of this study was to develop a biological control method for bacterial canker management. We analyzed the effect of volatile compounds released by the hydrolysis of dried cabbage wastes preserved for two and five years. Cultured *Cmm* was incubated for 24, 48 and 72 h. It was found that the compounds released by the hydrolysis of cabbage wastes had not effect on *Cmm* growth. Additionally, antagonistic microorganisms on *Cmm* were isolated. For this, 1g of mesquite rhizosphere and a small portion of cabbage were collected, and inoculated by the dilution and extension method. Microorganisms presenting actinomycete morphology were isolated and confronted with *Cmm* to measure the inhibition halo. We selected eleven strains with different macroscopic morphological features that developed an inhibition halo of 2 to 6.2 cm in diameter. The strains were purified and identified through biochemical and physiological tests (Cowan y Stell, 1974). Of these, nine strains were identified as *Bacillus* sp. The best antagonistic microorganisms (2 *Bacillus* y 2 Gram-negative ones) were later identified comparing the 16S rDNA sequences with those previously reported in the GenBank databases using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The percentage identity at nucleotide level was established with the Clustalw method and a Neighbour-joining dendrogram was elaborated. The *Bacillus* strains were identified as *Bacillus* sp. and *B. atropaeus* and the Gram-negative strains were identified as *Pseudomonas aeruginosa*, but the dendrogram indicates that the two strains of both species are subspecies or divergent genetic variants, consistent with the morphological and physiological features previously observed. In conclusion, mesquite rhizosphere and cabbage wastes have a great biodiversity of antagonistic microorganisms on *Cmm* that could be used as a biological control method for bacterial canker management.

## INTRODUCCIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* Mill) es considerado el principal producto hortícola en el mundo, con una superficie cultivada de más de 3 millones de hectáreas, y una producción promedio de 118, 240,518 t (FAO, 2011). El jitomate se cultiva en más de 160 países (Ramírez y Sáinz, 2006), siendo los principales productores China, Estados Unidos, India, Turquía, Egipto e Italia. México ocupa el décimo lugar en producción, con una aportación del 2.48% (FAO, 2011), y con una superficie sembrada de 53, 572.62 ha, destacando Sinaloa como el principal productor con más del 32.6% de la producción nacional, le sigue Baja California, Michoacán, Veracruz, Zacatecas, Nayarit y San Luis Potosí (SIAP, 2011).

En México, el jitomate es un cultivo que sobresale por su importancia económica y social (SENASICA, 2009). Debido a que, se generan divisas por concepto de exportación de alrededor de los 500 millones de dólares y ocupa mano de obra de más de 500,000 empleos en actividades que van desde labores de cultivo y cosecha, hasta la selección, empaque y venta del producto (Ramírez y Sáinz, 2006).

En San Luis Potosí la superficie sembrada es de 2,643.50 ha y se obtiene una producción de 112,150 t. Los principales municipios productores son Villa de Guadalupe, Vanegas, Ciudad Fernández y Matehuala (SIAP, 2011).

Por otro lado, el cultivo de chile es una hortaliza también de importancia mundial y nacional. En México, en los últimos diez años se ha incrementado su producción y por ello ocupa el segundo lugar a nivel mundial con una producción de 2, 054,970 t de chile verde (FAO, 2011). Las principales variedades sembradas son jalapeño, serrano, poblano y morrón. Al igual que el jitomate tiene un impacto socioeconómico por la enorme cantidad de mano de obra que demanda durante todo el ciclo agrícola, que es aproximadamente de 120 a 160 jornales por hectárea (Monreal, 2008). San Luis Potosí tiene una superficie sembrada de 14,178.50 ha con una producción de 158,287.00 t; y las principales regiones productoras se ubican en los municipios Ciudad Fernández, Ébano, Matehuala y Rio Verde (SIAP, 2011).

Entre los factores limitantes para la producción de estas hortalizas se encuentran los problemas fitosanitarios ocasionados por distintos patógenos. Algunas enfermedades provocan pérdidas económicas que en algunos casos alcanzan el 100%. El cáncer bacteriano ocasionado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) es una enfermedad que afecta a plantas de jitomate y chile, y ha provocado epifitias en todo el mundo, resultando en una disminución en la producción y pérdidas económicas hasta un 100%. El cáncer bacteriano es difícil de controlar y para ello se han utilizado bactericidas a base de cobre (Oyoque, 2008), sin embargo, los resultados no han sido satisfactorios, al contrario, incrementan los costos de producción y causan daños al hombre, animales y al ambiente. El control biológico es actualmente una alternativa para los problemas fitosanitarios. Se sustenta en el incremento de microorganismos benéficos que establecen interacciones directas de tipo antagonista con el patógeno, o bien indirectas como la estimulación de los mecanismos de defensa en el huésped (Tapia, 2001; Montesinos *et al.*, 2007). La incorporación de mejoradores orgánicos al suelo como los residuos de crucíferas generan condiciones de supresividad para patógenos de este hábitat, debido al incremento de microorganismos antagónicos y cambios en las características fisicoquímicas que son desfavorables a éstos, por lo que actúan como estrategia de control biológico y son una alternativa no contaminante para el productor y el ambiente (Escandón, 2007).

### **Agente Etiológico**

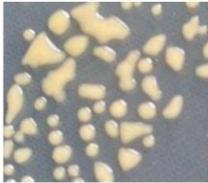
La enfermedad cáncer bacteriano fue registrada por primera vez en 1909 en Gran Rapids, Michigan. El agente etiológico fue identificado como una bacteria por E. F. Smith en 1910, quién la denominó *Aplanobacter michiganense*. En 1934, con base a su morfología y reacción a la tinción de Gram se le cambio el nombre a *Corynebacterium michiganense*, nombre que fue aceptado durante décadas, hasta que fue reubicada por Davis *et al.* (1984), en el nuevo género *Clavibacter*, considerando la composición de la pared celular. El desarrollo de la genética molecular en las últimas décadas ha influido considerablemente en la taxonomía bacteriana. *Clavibacter* se clasifica como un miembro de la familia Microbacteriaceae de acuerdo con el análisis de secuencias del 5S RNAr (Park *et al.*, 1993). *Clavibacter michiganensis* es la única especie del género *Clavibacter* y se

divide en cinco subespecies de acuerdo al hospedero que infecta. Estas cinco subespecies son *michiganensis*, que infecta a plantas de jitomate y chile, *sepedonicus*, que provoca la podredumbre anular de la papa, *nebraskensis* responsable de la marchitez y el tizón del maíz; *tessellarius*, que induce en las hojas de trigo pecas y manchas, y por último *insidiosus*, patógeno que causa marchitamiento y retraso en el crecimiento de la alfalfa (Jahr *et al.*, 1999; Eichenlaub *et al.*, 2006). El agente etiológico del cáncer bacteriano actualmente se conoce como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* (1984).

*Cmm* se caracteriza porque en el peptidoglicano de la pared celular, el aminoácido dibásico es el 2,4-diaminobutírico. Es un bacilo Gram positivo con un contenido de 73% de Guanina+Citocina en su genoma (Eichenlaub *et al.*, 2006). Es una bacteria mesófila con una temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de 25-28 °C (Gaterman *et al.*, 2008). La máxima temperatura de crecimiento es cerca de los 35 °C, la temperatura letal es de 50 °C. El pH óptimo varía de 7 a 8, pero el crecimiento puede empezar con valores menores de 5. Es una bacteria aerobia obligada, no produce endospora, no es móvil, da reacción positiva al KOH, metabolismo negativo en medio Hugh y Leifson, catalasa positiva, oxidasa negativa, hidrólisis de la esculina positiva (Boone *et al.*, 2001). El tiempo de generación es alto, aproximadamente de tres a cuatro días se desarrollan colonias en medios de cultivo. La pigmentación de las colonias varía de acuerdo al medio de cultivo, van desde amarillas mucoides hasta negras (Cuadro 1). Sin embargo pueden ocurrir mutantes que varían el color de blancas, rojas, anaranjadas a rosas (EPPO, 2011).

Su genoma está constituido por un cromosoma circular de 3,298 Mb y dos plásmidos circulares denominados pCM1 (27.4 Kb) y pCM2 (70.0 Kb), que tienen un menor contenido de G+C (66.5 y 67.5, respectivamente) que el genoma (Gaterman *et al.*, 2008) y en los que se ubican factores determinantes de patogenicidad. En el plásmido pCM1 se localiza el gen endoglucanasa *celA* que codifica la proteína CelA de 78 kDa (746 aminoácidos) con similitud a  $\beta$ -1,4-endoglucanasas de la familia de las celulasas A1. Esta proteína tiene tres dominios estructurales, un dominio catalítico tipo IIa, un dominio puente-celulosa y un dominio terminal C (Jahr *et al.*, 2000).

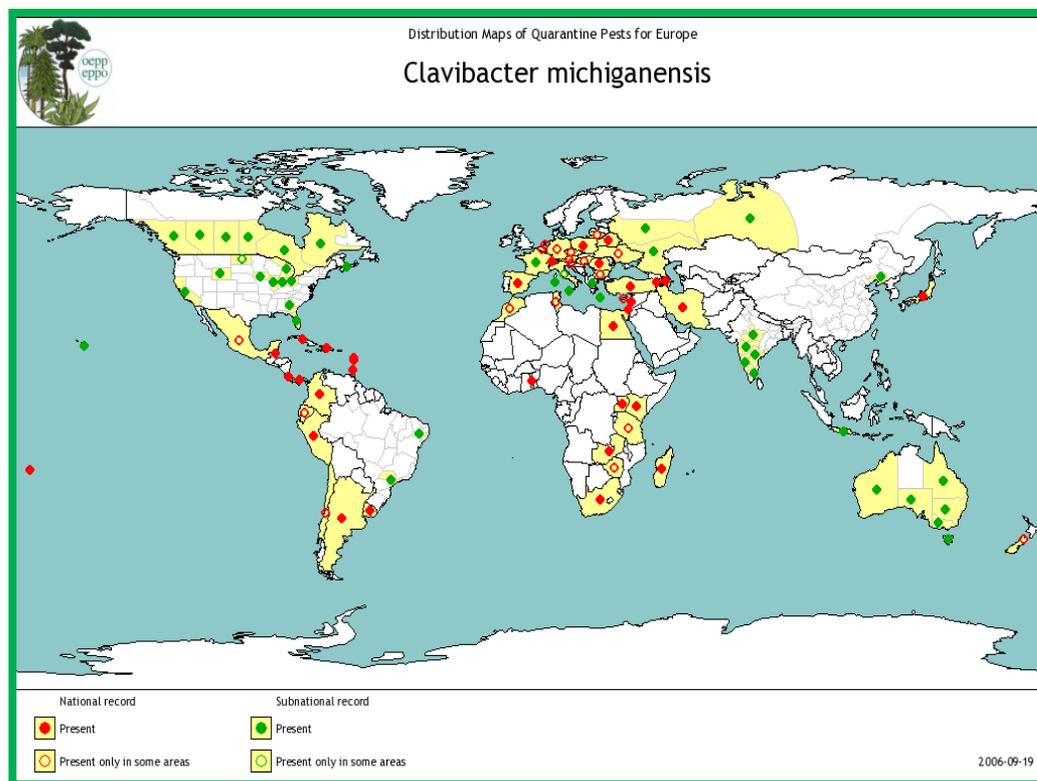
**Cuadro 1.** Morfología colonial de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en diferentes medios de cultivo semiselectivos.

Medio de cultivo	Características	Período de incubación (días)	Parte de la planta utilizada	Referencia
<b>YPGA</b>	Colonias 3-4 mm amarillas con márgenes enteros mucoide 	3-4	Planta y fruto	EPPO, 2011
<b>SCM</b>	Colonias gris transparente mucoide forma irregular con manchas interiores negras 	9-12	Semilla	Fatmi y Schaad, 1988
<b>CMM1</b>	Colonias de color negro	3-5	Semilla	Alvarez y Kaneshiro, 1999
<b>D2</b>	Colonia de 1-2 mm amarillo claro 	3-4	Planta	Kado y Heskett, 1970

El plásmido pCM2 tiene una región conocida como *pat-1* que codifica el factor de patogenicidad que corresponde a una proteína de 29.7 kDa de la familia de las serina proteasas (Dreier *et al.*, 1997). Ambos plásmidos juegan un papel importante para la inducción de sintomatología en la planta, así como para la virulencia. En el cromosoma se localizan aproximadamente 20 regiones con bajo contenido de G+C, la región más grande se conoce como región *chp/tomA*; se ubica cerca del origen de replicación y es necesaria también para la patogenicidad de la bacteria. Esta región contiene muchos genes que codifican proteínas implicadas en la incorporación a las rutas metabólicas de azúcares, varias serinas proteasas que son necesarias para una eficiente colonización del huésped y la tomatinasa que inhibe al alcaloide  $\alpha$  tomatina involucrado en el mecanismo de defensa de la planta (Gaterman *et al.*, 2008).

### **Importancia Económica de *Cmm***

El cáncer bacteriano es una enfermedad ampliamente distribuida en todas las zonas productoras de jitomate de los cinco continentes (Figura 1) (EPPO, 2011). Afecta tanto a plantas en campo abierto así como las que se encuentran bajo sistemas protegidos, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas. Estas se deben principalmente al marchitamiento y colapso de las plantas, además los frutos manchados con el síntoma conocido como ojo de pájaro, son de baja calidad y de valor reducido en el mercado. Desde su aparición en los invernaderos de Michigan en el siglo pasado, ha causado epidemias con pérdidas económicas considerables en las décadas de 1930, 1960, 1980, y 1990; las pérdidas oscilaron entre un 10 y 80 % (Gleason *et al.*, 1993). Las epifitias continuaron en la década de 2000 a 2010, y continúa distribuyéndose. Como muestra de esto, la National Plant Protection Organization reportó en 2010, la presencia de *Cmm* en una nueva región de Italia (municipio de Murggia); es un patógeno sujeto a cuarentena y está registrado en la lista A2 (EPPO, 2011).



**Figura 1.** Distribución mundial de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. (Fuente: EPPO, 2011).

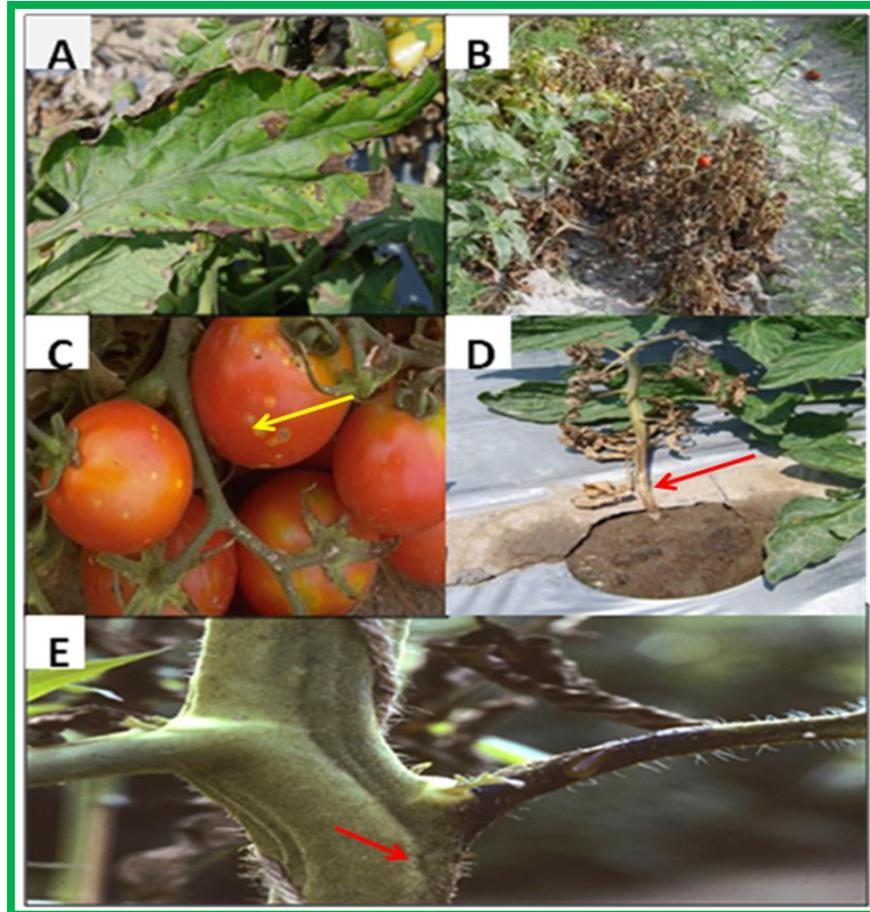
En México se ha detectado en Sinaloa, Jalisco, San Luis Potosí, Baja California, Guanajuato y Sonora. En 2009, en Sinaloa, esta enfermedad afectó 200 ha de jitomate cultivado bajo invernadero, causando pérdidas aproximadamente de 40 millones de dólares (Cárdenas-Sierra *et al.*, 2011). En San Luis Potosí se reportan pérdidas económicas que varían de 60 a 100 % en los municipios de Villa de Arista y Moctezuma (Alpuche *et al.*, 2007). Desde 1986, los suelos de la región de Villa de Arista en San Luis Potosí, están infestados por esta bacteria y cuando las condiciones son favorables se desarrollan epifitias que merman la producción, por lo que ha disminuido la superficie cultivada con jitomate (Monreal, 2005), también se encuentra presente en el municipio de Rio Verde y la Delegación Bocas. La enfermedad ocurre principalmente en jitomate, sin embargo en el 2008 fue detectada en plantas de chile en el altiplano potosino (Morales, 2009).

## Sintomatología

La amplia variedad de síntomas causados por *Cmm* diferencian si la infección es sistémica o localizada. También los síntomas varían si la infección se produce a partir de un inóculo presente en semillas o si ingresa por medio de heridas directamente en el tejido vascular. El marchitamiento es el síntoma característico de una infección sistémica y puede ser el síntoma inicial, pero cuando la infección se produce después de la dispersión epífita, a través de tricomas o aberturas naturales tales como hidatodos, los síntomas son localizados y suelen ser necrosis marginal y manchas en las hojas. Las infecciones localizadas pueden avanzar y llegar a los haces vasculares, con lo que se originan síntomas sistémicos bajo ciertas circunstancias. La complejidad de la sintomatología que aparece en un determinado lugar y el tiempo es muy variable y se dictan por las circunstancias tales como la edad de la planta, sitio de infección, susceptibilidad del cultivo y las condiciones ambientales. Como resultado de ello, la identificación de los cánceres o chancros con base en la sintomatología puede ser inexacta (Gleason *et al.*, 1993).

### Infección localizada

La necrosis marginal y manchas necróticas con halo amarillo en la hoja, son con frecuencia síntomas precoces de la infección localizada, a veces conocida como la fase de inicio; ésta aparece primero con márgenes secos de color café en la parte inferior del follaje (Figura 2A), en ocasiones separadas del área verde por una zona estrecha de tejido amarillo. El margen de necrosis aumenta y puede ocasionar marchitamiento de todo el follaje, tallos y toda la planta (Figura 2B). La inoculación de plantas muy jóvenes en invernadero puede producir pequeñas ampollas blancas en los cotiledones y follaje pero este síntoma se observa raramente en campo. En ocasiones manchas blancas a color canela aparecen en tallos de plantas cultivadas en el campo. En frutos se presentan pequeñas lesiones (menos de 0.3 cm de diámetro) de color marrón con halos blancos denominados ojo de pájaro (Figura 2C). Infección en los frutos a través del sistema vascular a veces aparecen como color amarillento o dorado, de los haces vasculares del fruto (Figura 2E) (Gleason *et al.*, 1993).



**Figura 2.** Algunos síntomas del cáncer bacteriano observados en plantas cultivadas en San Luis Potosí, México. (A) Hojas con necrosis marginal y manchas necróticas con halo amarillo; (B) marchitamiento en plantas adultas; (C) ojo de pájaro en frutos; (D) marchitamiento y colapso por una infección sistémica; (E) necrosis de rama y cáncer en tallo.

### Infección sistémica

El marchitamiento puede ser el primer síntoma de alerta. Las plántulas con infección sistémica pueden marchitarse y colapsarse rápidamente (Figura 2D), mientras las plantas viejas desarrollan lentamente los síntomas. Algunas veces se presenta marchitamiento unilateral pero la hoja eventualmente sucumbe. El tejido vascular de los tallos infectados muestra un amarillamiento que más tarde se torna café, el cual se nota en los nodos de forma vertical a los tallos. La enfermedad recibe su nombre por el desarrollo de los

chancros en el tallo, bajo ciertas circunstancias, usualmente después del marchitamiento (Figura 2D). A medida que el patógeno se extiende del xilema al floema y células del parénquima, áreas de color amarillo claro a marrón se desarrollan a lo largo de los tallos enfermos y en la parte inferior de los pecíolos. Estas áreas gradualmente se oscurecen (Figura 2E) y algunas veces se abren, resultando un chancro de color café oscuro que revela la necrosis de la médula y corteza (Gleason *et al.*, 1993).

## **Epidemiología**

La producción de jitomate se realiza a partir del trasplante de plántula al campo o invernadero. Es posible que la semilla se encuentre infectada con *Cmm*, actuando como fuente primaria de inóculo, provocando así el desarrollo de epidemias debido a que se pueden producir plántulas asintomáticas (Gitaitis *et al.*, 1991; Frank, 1999). La diseminación de la enfermedad puede ser rápida debido a la manipulación de la planta, poda y riego (Chang *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992a). La infección sistémica se presenta de 2-3 semanas después del trasplante (Gitaitis *et al.*, 1992). La bacteria vive de forma epifita en semilla, residuos de cosecha, instrumentos de labor y suelo; puede sobrevivir en éste entre 1-3 años (Fatmi y Shaad, 2002). Alternativamente, sobrevive en plantas voluntarias, plantas hospederas que incluyen 13 géneros y 35 especies de solanáceas (*Solanum lycopersicum*, *S. peruvianum*, *S. pimpinellifolium*, *S. habrochaites*, *S. melongena*, *S. nigrum*, *S. tuberosum*, *Capsicum annuum*, *Datura stramonium* y *Nicotiana tabacum*) y no hospederas (*Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* y *Xanthium saccharatum*) (Chang *et al.*, 1992b; Eichenlaub *et al.*, 2006).

La bacteria puede penetrar en la planta a través de hidatodos, estomas o heridas (Chang *et al.*, 1992c; Carlton *et al.*, 1998). *Cmm* entra al tejido degradando la pared celular de la planta, por la producción de enzimas como celulasas, poligalacturonasas y xilanasas (Benhamou, 1991), también hay producción de hormonas (IAA) (Eichenlaub *et al.*, 2006). Después de la degradación enzimática de los tejidos de la planta, la bacteria llega a los vasos del xilema se extiende en forma lateral en ella, junto con la liberación de nutrientes necesarios para la proliferación y colonización.

La semilla juega un papel importante como fuente de inóculo y de transmisión debido a que *Clavibacter* persiste dentro de la semilla entre la chalaza y el endospermo cerca al embrión. La transmisión de la enfermedad por medio de la semilla es poco eficiente si no hay una gran cantidad de bacteria, sin embargo puede originar un alto porcentaje de infecciones secundarias (Biddle *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1992b). Las técnicas de diagnóstico certero exigen que el nivel de detección sea de 1 en 10,000 semillas para garantizar que un lote esté libre de la bacteria (de León *et al.*, 2011).

Las condiciones específicas que favorecen el desarrollo de la enfermedad incluyen: temperatura del aire 24-32 °C; un período de predisposición, cuando el suelo o en el aire la temperatura es alrededor de 24 °C, condiciones de humedad óptima de 80-90% para el desarrollo de la bacteria; intensidad luminosa relativamente baja; alta concentración de nutrientes y un pH de 8 (Ramírez y Sáinz, 2006). El desarrollo de chancros puede aparecer con temperaturas frescas de 15 °C (Chang *et al.*, 1992c). El período de incubación y severidad del cáncer bacteriano es influenciado por la temperatura, edad de la planta, concentración de inóculo y cultivar (Chang *et al.*, 1992c).

Actualmente se ha determinado que *Cmm* expresa variabilidad genética principalmente en la secuencia y tamaño de los plásmidos pCM1 y pCM2, lo cual se traduce en variantes avirulentas, hipovirulentas, virulentas y altamente virulentas poco estables, es decir, las avirulentas se transforman en virulentas y viceversa (Kleitman *et al.*, 2008); lo cual es importante en la producción de plántulas debido a que en invernadero pueden no expresar síntomas y en campo los daños pueden no ser severos pero el inóculo para el siguiente ciclo se puede incrementar y ya puede ser virulento.

## **Manejo**

Para llevar a cabo un manejo adecuado del cáncer bacteriano, es importante el conocimiento del agente causal, su hábitat, ecología, sintomatología y mecanismos de dispersión. En la actualidad, no se ha encontrado un manejo que sea eficiente para controlar a *Cmm*, el uso de productos químicos a base de cobres, antibióticos, de cepas de *Cmm* avirulentas, bacteriófagos y de variedades de jitomates resistentes, solo limitan las

poblaciones de la bacteria (Werner *et al.*, 2002). Una alternativa es el control biológico, que se ha empleado para el manejo de diversas enfermedades en diferentes cultivos, además el control biológico aporta beneficios a la planta como incremento en el aporte de nutrientes, mejora el crecimiento y desarrollo, y puede inducir resistencia.

### Control químico

Jahr *et al.* (1999) indicaron que el control químico de la enfermedad causada por *Cmm*, usando antibióticos o compuestos de cobre no resulta muy eficiente y, además, su empleo supondría importantes problemas medioambientales. Esto se ha confirmado en diversos trabajos de investigación, los cuales refieren que la aplicación de compuestos a base de cobre, solos o en combinación con antibióticos han sido ineficientes, debido a que se disminuye las poblaciones de *Cmm* por efecto inhibitorio pero no tienen efecto biocida, y varios de los compuestos actúan en la superficie de la planta pero no en la parte interna por lo que el control no es eficiente (Oyoque, 2008).

La aplicación de hidróxido de cobre/mancozeb [Etilenbis (ditiocarbamato) de manganeso con sal de zinc], hidróxido de cobre/mancozeb (premezclado 12 h antes de la aplicación), estreptomycinina y estreptomycinina/hidróxido de cobre en plántulas de tomate cultivadas en invernadero, disminuyó la población y dispersión de *Cmm*, con excepción del tratamiento con mancozeb solo. Los tratamientos tuvieron impacto posterior en el desarrollo de la planta y el rendimiento en el campo pero ninguno redujo significativamente la incidencia de las manchas en el fruto en comparación con el testigo (Hausbeck *et al.*, 2000).

De León *et al.* (2009), evaluaron caldo bordelés (sulfato de cobre), quinosol, kasugamicina, estreptomycinina, oleato potásico, Antibak RZ (complejo nutricional comercializado como antimicrobiano) y Param (producto comercializado como inductor de resistencia); además de las combinaciones a mitad de dosis de quinosol+caldo bordelés, quinosol+Antibak RZ, estreptomycinina+Antibak RZ y estreptomycinina+oleato potásico. La inoculación de las plantas de jitomate fue por punción y pulverización para inducir la sintomatología. Las plantas inoculadas por punción desarrollaron rápidamente los síntomas característicos de una infección sistémica y ninguno de los tratamientos controló la enfermedad de forma efectiva. Los datos obtenidos indican que los tratamientos con sulfato

de cobre, y quinosol + sulfato de cobre pueden ayudar a prevenir la dispersión de la bacteria en el cultivo, pero no son aconsejables cuando ya se han producido los síntomas debidos a una infección sistémica.

En el trabajo de Milijašević *et al.* (2009), se evaluaron tres compuestos a base de cobre (hidróxido de cobre, oxiclورو de cobre y sulfato de cobre), dos antibióticos (estreptomina y kasugamicina) y un activador de los mecanismos de defensa de la planta (ASM benzothiadiazole - acibenzolar-S-metilo). Los compuestos de cobre fueron en general los menos efectivos en limitar las poblaciones de la bacteria y la estreptomina fue el mejor en este aspecto. El mejor tratamiento fue la aplicación de ASM tres días antes de la inoculación.

### Control genético

En la actualidad no se tiene conocimiento de una variedad que sea resistente a *Cmm*, y son pocos los estudios referentes a este tipo de control. Diferentes fuentes de resistencia parcial a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se encuentran en los genotipos de *Lycopersicon esculentum* Cordeok, IRAT L3, Okitsu Sozai no. 1, y en las accesiones de *L. peruvianum*, LA 385, LA 2334 y LA 2338 (Crinò *et al.*, 1995; Francis *et al.*, 2001). Entre los genotipos analizados por Crinò *et al.* (1995), Cordeok mostró el más alto nivel de resistencia, sin embargo, no fue estadísticamente diferente a la observada en las accesiones silvestres cuando se probó con un aislamiento italiano de *Cmm*. En nuestros días se realizan experimentos para la construcción de una planta transgénica de tomate que exprese actividad endolisina y proteja contra la infección de *Cmm* (Eichenlaub y Gartemann, 2011). También se han identificado dos loci de caracteres cuantitativos en genes de *Lycopersicon hirsutum*, al parecer los loci Rcm 2.0 y 5.1 Rcm intervienen en el control de la resistencia a *Cmm*. Al comparar líneas que contienen Rcm 2.0 y Rcm 5.1 con una línea de control susceptible, se encontró mediante análisis de electroforesis en gel de dos dimensiones espectros que fueron interpretados para deducir secuencias de péptidos. Tres enzimas superóxido dismutasa (SOD), fueron diferencialmente regulados entre los genotipos con Rcm 2.0 y Rcm 5.1 y la acumulación de peróxido de hidrógeno en tejidos específicos, indican un papel de estos loci para la respuesta a *Cmm* a través de la ruta del estrés oxidativo. En estado estacionario del mRNA y los niveles de proteína para la SOD,

tiorredoxina tipo M, S-adenosil proteínas hidrolasa, que están relacionadas con la patogénesis demostraron un patrón similar de regulación diferencial. Las líneas que contengan Rcm 2.0 y 5.1 Rcm acumulan diferentes proteínas en el estado de equilibrio de mRNAs en respuesta a la inoculación, lo que sugiere que los dos loci pueden conferir resistencia a través de distintos mecanismos (Coaker *et al.*, 2004). Por su parte Balaji *et al.* (2008), mediante un microarreglo identificaron 122 genes expresados diferencialmente en plantas de jitomate como respuesta a la inoculación de *Cmm*, los cuales están relacionados con los mecanismos de defensa, también encontraron que se induce la respuesta de genes involucrados en la síntesis de etileno y con mutantes obtenidas para esta ruta biosintética establecieron que las que sobrepresan etileno no presentaron marchitez, y concluyeron que el etileno juega un papel en la respuesta de sensibilidad o resistencia de la planta a *Cmm*.

### Control biológico

En la actualidad el control de cualquier enfermedad implica buscar formas alternativas que disminuyan el uso de agroquímicos debido a que éstos son perjudiciales para el hombre y el medio ambiente. Un método alternativo para el manejo de enfermedades es el uso del control biológico, el cual se define como la reducción de la densidad de inóculo o actividades de un patógeno o parásito que producen la enfermedad en su estado activo o de latencia, por uno o más organismos que se encuentren de forma natural o a través de una manipulación del ambiente, hospedero, o por introducción de uno o más antagonistas (Baker y Cook, 1974). Algunas actividades como el uso de variedades resistentes, fecha de siembra, solarización, rotación y asociación de cultivos, incorporación de residuos de plantas que durante su descomposición liberan compuestos nocivos a fitopatógenos con origen en el suelo, incorporación al suelo de enmiendas orgánicas que favorecen la actividad antagónica de la biota habitante del suelo y la aplicación de microorganismos antagonistas; son alternativas ecológicas que han sido eficientes en el manejo de enfermedades (Zavaleta, 1999).

Las enmiendas orgánicas como abonos verdes, restos de cultivos y residuos orgánicos, se incorporan al suelo para prevenir el incremento de enfermedades en el sitio donde se va a establecer un nuevo cultivo, o son aplicadas para generar condiciones desfavorables a agentes patógenos en suelos ya cultivados (Camacho *et al.*, 2010).

El nivel o grado de descomposición de restos orgánicos en el suelo afecta directamente a los agentes biocontroladores y a la severidad de la enfermedad causada por patógenos de plantas, habitantes del suelo. Los restos vegetales frescos incrementan la agresividad de algunos patógenos de plantas, por ejemplo, la turba de musgo, disminuye las poblaciones microbianas benéficas así como su actividad para controlar a *Rhizoctonia solani* agente causal del damping-off (Hoitikin y Boehm, 1999). La alta proporción de celulosa existente en tejidos vegetales frescos, suprime el hiperparasitismo por *Trichoderma hamatum* de los esclerocios del hongo patógeno *R. solani*; pero cuando la materia orgánica está altamente estabilizada, tiene una limitada capacidad para soportar la actividad de la biomasa microbial en el suelo, situación que se expresa en la composta madura colonizado por un determinado agente biocontrolador, se presenta el hiperparasitismo y el patógeno es erradicado, además de que el control biológico prevalece (Camacho *et al.*, 2010). Otro factor a considerar es el efecto adverso de tóxicos volátiles como metanol, etanol, amoníaco; surgidos desde la descomposición de los tejidos. Las leguminosas, y en especial la paja de alfalfa, son excelente fuente de sustancias volátiles (Baker y Cook, 1974).

Otra excelente fuente de sustancias volátiles son los residuos de plantas pertenecientes a la familia Brassicaceae que producen glucosinolatos que son  $\beta$ -D-tioglucósidos los cuales se distinguen entre sí por diferencias en sus cadenas orgánicas laterales (grupos R). Los glucosinolatos, clasificados como formas alifáticas, aromáticas o indol, se producen en todas las partes de la planta y se degradan a través de hidrólisis enzimática. Como resultado del daño a los tejidos, los glucosinolatos reaccionan con la enzima mirosinasa (glucohidrolasa tioglucosida), que se almacena por separado en la célula en los idioblastos, para producir nitrilos, epitionitrilos, tiocianatos e isotiocianatos (Brown y Morra, 1997; Fahey *et al.*, 2001). Los isotiocianatos son compuestos altamente tóxicos de diferente volatilidad. Ellos en general son biocidas y su disponibilidad en el suelo depende de la naturaleza del mismo, ya que los grupos amino y sulfhídrico de estos compuestos reaccionan de manera irreversible con las partículas de arcilla y de materia orgánica (Brown y Morra, 1997).

La producción de los glucosinolatos está determinada genéticamente y el tipo y concentración varía entre las variedades y especies de Brassicas. Se han identificado creca

de 120 diferentes glucosinolatos (Fahey *et al.*, 2001). Los residuos que se han utilizado para el manejo de fitopatógenos son: *Brassica nigra* (mostaza), *Sinapsis alba* (mostaza blanca), *Brassica juncea* (mostaza de la China), *Brassica oleracea* (repollo), *Brassica napus* (nabo), *Brassica oleracea* var. *italica* (brócoli), *Brassica oleracea* var. *botrytis* subvar. *cauliflora* (coliflor) y *Rafhanus sativus* (rábano), *Eruca sativa* (roqueta), pero también se han obtenido buenos resultados con *Ipomoea batatas* (camote) y *Sorghum* spp. (sorgo) (Mitidieri, 2005).

El efecto de los residuos de brócoli se determinó en raíces colonizadas de *Verticillium dahliae* en los cultivos de brócoli y coliflor, a través del crecimiento y la incidencia de la enfermedad en dichos cultivos, usando suelos con diferentes niveles de inóculo de *V. dahliae* y con o sin residuos de brócoli. En el cultivo de coliflor se obtuvo una disminución significativa en la incidencia y severidad con el tratamiento de residuos de brócoli en comparación con suelo no tratado. En el caso de las plantas de brócoli, se observó que en los suelos tratados con residuos, el hongo colonizó las raíces, sin embargo las plantas no manifestaron síntomas (Shetty *et al.*, 2000).

La práctica de incorporación de crucíferas en suelos, reduce la incidencia de nemátodos y hongos fitopatógenos debido a los procesos de biofumigación, pero no suprime a microflora y microfauna benéfica del suelo; por el contrario, tiene un efecto positivo sobre éstos, contribuyendo al restablecimiento de las cadenas tróficas y al aumento de la biodiversidad funcional, en otras palabras, aportando a la restitución de la vida del suelo (Bongornio *et al.*, 2009). En otro trabajo, el nemátodo del quiste de la papa (*Globodera rostochiensis* cv. Woll), fue controlado por glucosinolatos (Buskov *et al.*, 2002). La aplicación de residuos de col en plantas de *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln disminuyó la infección de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* observando un mejor desarrollo de las plantas (Escandón, 2007).

En Australia y Filipinas se han realizado experimentos para el control de la bacteria *Ralstonia solanacearum*, causante del marchitamiento bacteriano en solanáceas con diferentes especies de *Brassicac*s y residuos de sorgo. Las experiencias de laboratorio mostraron mayor control por parte de las *Brassicac*s comparadas con el sorgo. En los ensayos de campo se encontró la misma tendencia, con un efecto más rápido en los materiales más ricos en el glucosinolato 2-propenil (*B. nigra*, *B. carinata* y *B. juncea*), que

en *B. napus* (3-butenil) y *R. sativus* (4-methsulbut). En brócoli se han detectado una gran variedad de glucosinolatos (Kirkegaard, 2004).

La aplicación de las enmiendas de plantas crucíferas al suelo desencadena procesos biológicos y químicos, complejos y dinámicos (Zassada y Ferris, 2004) que generan cambios en las características de los mismos, como la modificación del pH, incremento en el contenido de nitrógeno, potasio y materia orgánica (Rodríguez, 2009). Además pueden crear un ambiente favorable para el desarrollo de microorganismos benéficos así como de aportar al suelo antagonistas a patógenos (Tapia, 2001; Escandón, 2007).

Por otra parte, en el suelo los microorganismos viven en una estrecha relación y los diferentes grupos microbianos interactúan de tal forma que el resultado de dichas interacciones puede ser benéfico o perjudicial, originando que las poblaciones de la microflora estén en un estado continuo de cambio. Las interacciones perjudiciales se denominan antagonismo y comprenden, antibiosis, competencia por espacio o nutrientes, interacciones directas como micoparasitismo y lisis enzimática e inducción de resistencia (Fernández-Larrea, 2001).

Las poblaciones de antagonistas son a menudo buscadas en las zonas donde el patógeno y la enfermedad se producen, sin embargo, también se encuentran en las zonas donde no hay presencia de fitopatógenos, o en lugares que han sido sometidos a monocultivos y la enfermedad ha disminuido a un nivel bajo; así como en rizósferas de especies vegetales no hospederas del patógeno. Estos hábitats proporcionan un gran número de antagonistas que reducen la severidad de la enfermedad (Baker y Cook, 1974).

Diversos mecanismos de control biológico se han descrito, incluido antibiosis, la producción de enzimas líticas, parasitismo, resistencia inducida, y competencia para limitar los nutrientes y el espacio. A menudo, más de un mecanismo está implicado, pero en ningún caso se ha encontrado un mecanismo único responsable de control biológico (Janisiewicz y Korsten 2002).

Dentro de los microorganismos más estudiados con efecto antagonista se encuentran los hongos *Fusarium*, *Gliocadium*, *Clonostachys*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* (Molina *et al.*, 2006; Chávez, 2007; Quiroz-Sarmiento *et al.*, 2008); y las bacterias

*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Streptomyces* y *Bacillus* (Bautista *et al.*, 2007; Mojica-Marín *et al.*, 2009). Estos microorganismos se han evaluados en diferentes especies vegetales y contra diversos fitopatógenos. Una de las bacterias más empleadas es *Bacillus*, Guillén-Cruz *et al.* (2006), evaluaron el potencial de biocontrol en campo de cuatro aislados de *Bacillus* y la mezcla de éstos (B1, B3, B9 y B13), sobre patógenos causantes de pudriciones de raíz en el cultivo de chile, así como su efecto en el desarrollo y rendimiento. Se identificó a B1 como *Bacillus amyloliquefaciens*, B3 como *B. licheniformis*, y B9 y B13 como *B. subtilis*. La aplicación de las bacterias incrementó la altura de la planta en 20% y el rendimiento final en 270%, también se redujo la incidencia en 80% y severidad de pudrición de raíz en 39% respecto al testigo. En investigaciones dirigidas al control de fitopatógenos del la raíz del trigo, se identificó la cepa de *Bacillus* sp L324-92, la cual presentó una actividad biológica mostrando inhibición en el crecimiento de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani* AG8, *Pythium irregulare* y *P. ultimum* (Kim *et al.*, 1997).

### **Identificación de Microorganismos Habitantes de la Rizósfera**

Actualmente, las técnicas moleculares juegan un papel importante en el estudio de los microorganismos de la rizósfera, se pueden usar en el monitoreo e influencia que tiene la introducción de microorganismo antagonistas en poblaciones de microorganismos cultivables y no cultivables de este hábitat. Muchas de estas técnicas están basadas en el gen (rDNA) 16S del RNA ribosomal (rRNA) que contiene regiones conservadas con regiones que varían muy poco. La secuenciación del 16S rDNA proporciona una información completa en la identificación de géneros y especies. Otros métodos basados en las secuencias como el DGGE, también proporcionan información útil, ya que la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizantes, separa especies con base en su contenido de G y C, y es un método que se utiliza para obtener perfiles basados en interespecies diferentes en 16S rDNA. El análisis de bandas polimórficas con enzimas de restricción del rDNA amplificado es un método rápido para identificar cepas diferentes por perfiles generados de fragmentos de restricción del DNAr. La técnica de FISH (hibridación fluorescente *in situ*) es usada para identificar microorganismos vivos (que están

transcribiendo), mediante microscopía o por citometría de flujo, usando como el rRNA que proveen un gran rango para especies específicas o reinos específicos. La genómica está jugando un papel importante una vez más en el entendimiento y monitoreo de biocontrol, ya que secuencias de patógenos y agentes de biocontrol están rápidamente disponibles. Un método de gran rendimiento tal como la tecnología de los microarreglos será cada vez más importante para apreciar la identidad y actividad de un gran número de microorganismos que habiten la rizósfera y para la evaluación del efecto de los agentes de biocontrol en la actividad contra los organismos patógenos (Lugtenberg y Leveau, 2007).

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Desarrollar un método de control biológico para el manejo del cáncer bacteriano.

### **Objetivos específicos**

Determinar el efecto tóxico *in vitro* de los compuestos volátiles de los residuos deshidratados de col preservados por 2 y 5 años, sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Identificar microorganismos antagonistas a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en fuentes microbianas como los residuos de col deshidratados y fermentados, así como en la rizósfera del mezquite, y seleccionar los más eficientes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Ubicación del Experimento**

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitopatología de Posgrado de la Facultad de Agronomía, U.A.S.L.P. y en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT).

### **Reactivos y Medios de Cultivos**

Los reactivos que se utilizaron en la preparación de las soluciones fueron de alta pureza y provenían de compañías como Sigma, Aldrich, J.T. Baker, Ciochemics y Shelton Scientific-IN. Los medios de cultivos fueron de Bioxon, Beckton Dickinson y Merck. Las enzimas de restricción y la T4 DNA ligasa fueron de New England BioLabs, Invitrogen, Inc. y Promega. La Taq DNA-polimerasa de Roche Diagnostic.

### **Cepa de *Cmm* y Residuos de Col**

La cepa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Villa de Arista y los residuos de col (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) deshidratados y conservados por 2 y 5 años fueron proporcionados por el Laboratorio de Fitopatología de Posgrado de la Facultad de Agronomía, U.A.S.L.P.

### **Toxicidad de Compuestos Volátiles Liberados de Residuos de Col Deshidratados**

El ensayo se realizó con dos tipos de residuos considerando su tiempo de conservación (2 y 5 años), y consistió para ambos en colocar en morteros grandes de porcelana estériles, 5g de residuo deshidratado a los que se les adicionaron 18 mL de agua destilada estéril. Por la forma del mortero, se pudo depositar encima de los residuos una cajas Petri con el medio extracto de levadura peptona glucosa agar (YPGA) recién sembrada con *Cmm* y destapada. La caja deja espacio y permite que los compuestos volátiles que se liberan por hidrólisis enzimática o por degradación microbiana circulen, y entren en contacto con la bacteria. Finalmente el sistema se selló cubriendo el mortero en su totalidad con parafilm y papel aluminio, para evitar la salida de volátiles. Se incubaron por 24, 48 y 72 h. Se hicieron 3

repeticiones para cada tipo de residuo y tiempo de incubación, además del testigo respectivo que consistió en morteros con agua estéril sin residuos y con cajas de YPGA también recién sembradas con *Cmm* y destapadas, cubriéndolas como se describió anteriormente.

### **Aislamiento de Antagonistas**

Se exploraron como fuente de microorganismos rizósfera de mezquite (*Prosopis* spp.) y residuos de col deshidratados y fermentados. Se realizaron diluciones seriadas base 10, a partir de un gramo de rizósfera de mezquite y se sembraron las diluciones  $10^3$  a  $10^7$  por extensión en los medios de YPGA, CZAPECK y papa dextrosa agar (PDA). Estas cajas destapadas se colocaron en morteros estériles con residuos de col deshidratados (5 años) y humedecidos con agua estéril; se taparon con papel aluminio y parafilm, y se incubaron a 28 °C por 48 h. Después de este tiempo, los residuos de col deshidratados y fermentados también se utilizaron como fuente de microorganismos, sembrándolos en los mismos medios de cultivo e incubándose a la misma temperatura y período de tiempo.

### **Detección de Microorganismos Antagonistas por Confrontación con *Cmm***

Los microorganismos candidatos, se seleccionaron por su morfología tipo actinomiceto. Se obtuvo una suspensión a partir de las colonias elegidas, tomando una asada y disolviéndola en 4.5 mL de agua destilada estéril. Con la suspensión de cada una de las cepas aisladas, se humedecieron discos de papel filtro de 0.5 cm de diámetro, los cuales fueron depositados en cajas de YPGA recién sembradas con *Cmm* por extensión. Aquéllos que generaron un halo de inhibición se consideraron antagonistas, se midió el halo de inhibición y el tamaño se consideró como criterio de eficiencia.

### **Purificación de Cepas**

Para asegurarse que las cepas de los microorganismos seleccionados fueran puras, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio YPGA por extensión hasta obtener una colonia con un solo tipo de microorganismo.

## Identificación de Antagonistas

### Identificación microbiológica

Las cepas seleccionadas fueron caracterizadas microscópicamente con la tinción de Gram y posteriormente con las pruebas bioquímicas y fisiológicas primarias establecidas por Cowan y Steel (1974). Se observó a las endosporas con la tinción de Schaeffer y Fulton.

### Identificación molecular

Extracción de ADN. Se realizó a partir de un crecimiento bacteriano obtenido en 500  $\mu\text{L}$  de medio líquido 802 (10g polipeptona, 2 g extracto de levadura, 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 L agua destilada). Se cosecharon las células por centrifugación a 8,000 rpm/2 min. Se resuspendió el paquete bacteriano en 500  $\mu\text{L}$  de agua milli Q estéril, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de Buffer de extracción (2% Triton X 100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8, 1mM  $\text{Na}_2$  EDTA solución) y 1 mL de fenol cloroformo isoamílico y se mezcló. Se separaron las fases por centrifugación a 10,000 rpm/10 min. Se obtuvo la fase acuosa, se adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de RNAasa (2.6 mg/ml) y se incubó a 37 °C por 20 min. Posteriormente se adicionó 1 mL de isopropanol, se incubó por 3 min a -80 °C y se centrifugó a 13,000 rpm/2 min. El ADN obtenido se resuspendió en 300  $\mu\text{L}$  de etanol y se volvió a centrifugar a 13,000 rpm/2 min. Finalmente se resuspendió en 40  $\mu\text{L}$  de agua milli Q estéril. Se verificó la calidad observándolo en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio 10 mg/ml, y revelado en un fotodocumentador de geles UVP EpiChemi Darkroom con cámara digital CCD.

Amplificación del ADNr-16S con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la identificación de las cepas bacterianas se amplificó el segmento 16S del ADNr con la técnica de PCR y los iniciadores universales 533 F/1391 R (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3' y 5'-GAC GGG CGG TGT GTR CA-3', respectivamente), que amplifican un fragmento de 900 pb, que permiten establecer una relación filogenético entre las bacterias (Lane, 1991 citado por Barns *et al.*, 1994; Hugenholtz *et al.*, 1998). La reacción se efectuó en un volumen de 25  $\mu\text{L}$  con una mezcla maestra constituida por 18.85  $\mu\text{L}$  de agua milli Q, 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 5X, 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25mM, 0.5  $\mu\text{L}$  dNTPs 10 $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{L}$  de cada

iniciador (533 F, 1391 R) 1  $\mu$ M, 0.15  $\mu$ L Taq polimerasa (5U/  $\mu$ L) y 1.0  $\mu$ L de ADN. La amplificación se efectuó en un termociclador DNA Bio Rad, y las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial 94°C/1 min, 30 ciclos conformados por las etapas de desnaturalización 94 °C/30 s, alineamiento 65 °C/ 30 s, extensión 72 °C/1 min; y extensión final 72 °C/5 min.

Análisis de los productos de PCR por electroforesis. Los productos de PCR (alícuotas de 6  $\mu$ L) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1% en TAE 1X. Ésta se efectuó en una cámara horizontal aplicando una corriente de 80 V. Se reveló, tiñendo con bromuro de etidio (10 mg/mL) por 20 min y exponiendo a la luz ultravioleta en un fotodocumentador de geles UVP EpiChemi Darkroom con cámara digital CCD. Las imágenes se capturaron con el software LabWorks 4.0.0.8.

Identificación de bacterias por secuenciación. La identificación de las bacterias por esta técnica implica los procesos de ligación del fragmento del ADN<sub>r</sub> amplificado en un plásmido, transformación de células competentes de *E. coli* Top 10F, con este plásmido, clonación del plásmido con el fragmento de ADN, extracción del ADN plasmídico y secuenciación. Los productos de PCR amplificados (2  $\mu$ L) se ligaron en el vector pGEM T-Easy (3,015 pb) utilizando como mezcla de ligación: 1  $\mu$ L del vector, 5  $\mu$ L de Buffer 2X, 1  $\mu$ L de ADN ligasa T4 y 1  $\mu$ L de agua Milli Q. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se almacenó a 4 °C toda la noche. Se hizo la transformación por choque térmico, utilizando células competentes *Escherichia coli* Top 10F. Estas se descongelaron en hielo y se les adicionó 2  $\mu$ L de la mezcla de ligación, mezclando rápidamente e incubando en hielo por 5 min. Posteriormente se les dio un choque térmico a 42 °C/1.5 min, seguido de incubación en hielo por 10 min. Se les añadió 500  $\mu$ L de medio LB y se incubaron a 37 °C por 45 min. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min y se resuspendió en 100  $\mu$ L de LB con ampicilina 100 mg/L. Para la clonación, una alícuota de 100  $\mu$ L de células transformantes se sembró por extensión en medio LB/ampicilina/IPTG/X-gal. Las clonas seleccionadas fueron las colonias que no presentaron actividad de  $\beta$ -galactosidasa indicado por su color blanco, debido a que presumiblemente contienen el inserto y las azules no. Para verificar la presencia del inserto se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico de acuerdo al procedimiento modificado de Birnboim-técnica de Miniprep (Sambrook y

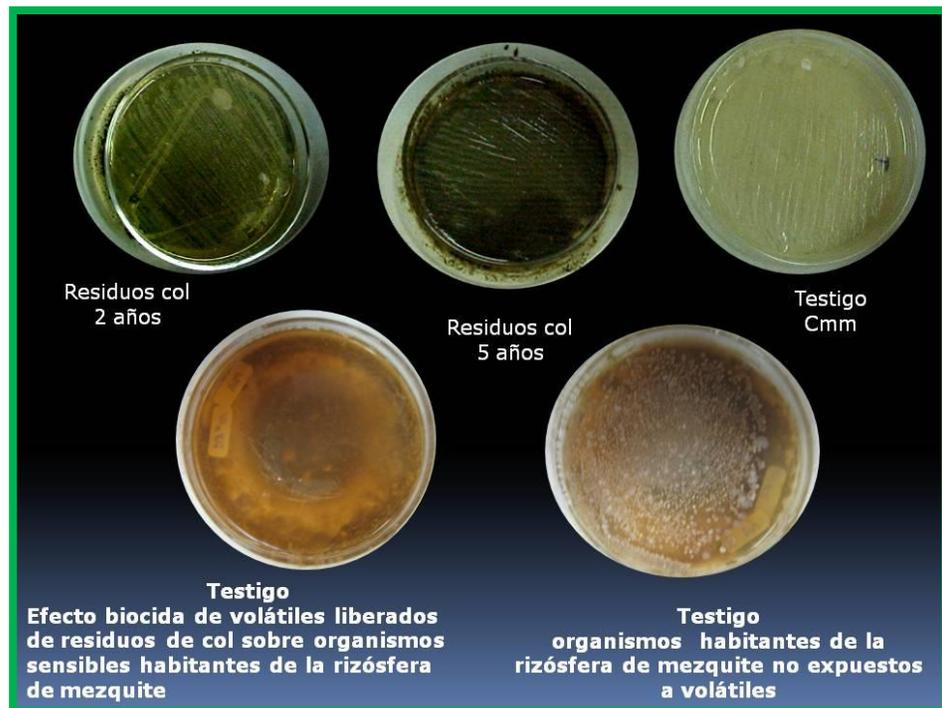
Russell, 2001). Finalmente se confirmó la clonación del inserto por liberación de éste del plásmido, mediante la digestión con la enzima *EcoRI* y se observó la banda del tamaño esperado por electroforesis en gel de agarosa 1%, en el fotodocumentador de geles.

El ADN plasmídico se cuantificó y se envió al CINVESTAV, Irapuato para su secuenciación. La identificación se realizó por comparación de la secuencia obtenida para cada cepa con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando el programa BLASTN. El análisis filogenético se realizó con el programa CLUSTAL W y se hizo un dendrograma con el método Neighbour Joining.

## RESULTADOS

### Efecto Tóxico *In Vitro* de los Compuestos Volátiles Liberados de los Residuos de Col Deshidratados sobre el Crecimiento de *Cmm*

En este bioensayo, se encontró que los compuestos volátiles procedentes de la hidrólisis de los residuos de col no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento de *Cmm*, esto se determinó por el desarrollo colonial de *Cmm* a las 24, 48 y 72 h. Se observó que hubo formación de colonias desde las 24 horas, y a las 72 h se presentó el mayor desarrollo, el cual fue similar al crecimiento de *Cmm* testigo (Figura 3). Tanto los residuos deshidratados de col de 2 y 5 años tuvieron resultados similares. Además se constató que los residuos liberaron compuestos volátiles fungicidas debido a que no crecieron hongos en las muestras de la rizósfera de mezquita expuestas a éstos volátiles.



**Figura 3.** Efecto de los compuestos volátiles liberados de los residuos de col deshidratados sobre el crecimiento de *Cmm* a las 24 h, en comparación con el testigo no expuesto y con organismos sensibles a estos volátiles.

## Aislamiento, Selección e Identificación de Microorganismos Antagonistas

### Aislamiento y selección

Con el análisis microbiológico de la rizósfera de mezquite y de los residuos deshidratados y fermentados de col, se encontraron bacterias antagonistas en ambas fuentes microbianas. De 40 bacterias aisladas y confrontadas con *Cmm*, inicialmente se seleccionaron 11 cepas con características morfológicas macroscópicas diferentes, que desarrollaron halos de inhibición con diámetros de 2 a 6.2 cm (Figura 4). Estas se agruparon por su eficiencia en la inhibición del crecimiento de *Cmm* (Cuadro 2), de ellas, 6 se aislaron de los residuos de col deshidratados y 5 de la rizósfera de mezquite. La cepa 5 fue la que presentó el mayor halo de inhibición (4.3 a 6.2 cm), se perfiló como el mejor antagonismo *in vitro* a *Cmm*, y se obtuvo de los residuos de col; la cepa que tuvo menor inhibición fue la 12, que también fue aislada de los residuos de col. En la observación microscópica preliminar, la mayoría de las cepas fueron Gram + (Cuadro 2).



**Figura 4.** Antagonismo *in vitro* exhibido por las diferentes cepas aisladas de la rizósfera de mezquite y de los residuos de col deshidratados, a través de halos de inhibición del crecimiento de *Cmm*.

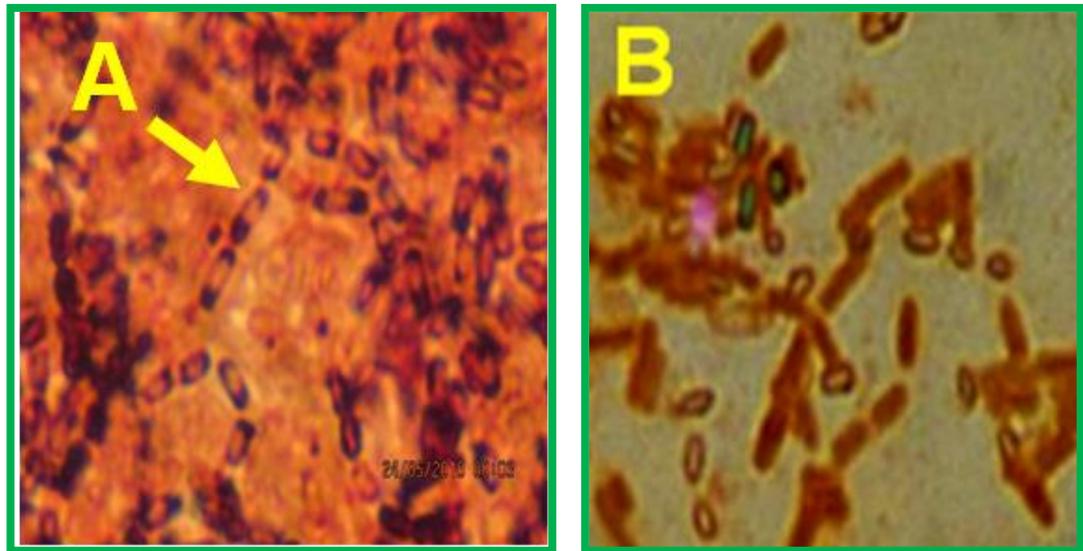
**Cuadro 2.** Cepas de bacterias que presentaron antagonismo *in vitro* a *Cmm*.

<b>Cepa</b>	<b>Halo de inhibición (cm)</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Tinción de Gram</b>
<b>GRUPO I</b>			
5	4.3-6.2	Residuos col	+
7	4.0-4.5	Residuos col	-
8	3.7-4.0	Rizósfera mezquite	+
1	3.5-4.0	Rizósfera mezquite	+
9	3.0-3.2	Residuos col	+
13	2.8-3.7	Rizósfera mezquite	+
<b>GRUPO II</b>			
4	2.0-3.0	Rizósferae mezquite	+
2	2.0-2.5	Residuos de col	-
6	2.0-2.5	Rizósfera mezquite	- y +
3	2.0-2.2	Residuos de col	-
12	1.5-2.0	Residuos de col	- y +

#### Identificación con pruebas bioquímicas y fisiológicas

Después de la purificación se amplió el número de cepas a 14, y la caracterización preliminar con tinción de Gram, indicó que 4 son Gram (-) y 10 Gram (+); además en el grupo de bacterias Gram (+) se observó que a excepción de una cepa, las restantes presentaron endospora central (Figura 5A), estructura corroborada con la tinción de Schaeffer y Fulton

(Figura 5B). La morfología microscópica y esta estructura de endospora, indican que estos antagonistas corresponden al género *Bacillus*. Los resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas se muestran en el Cuadro 3, y para las cepas de bacilos Gram (+), con excepción de la cepa 4.15A, éstos corresponden a las características establecidas para *Bacillus* spp., lo que coincide con la identificación microscópica. También se puede apreciar que las cepas 9.14A y 13.12 presentaron diferencias en las pruebas de metabolismo O/F, oxidasa y movilidad con respecto a las demás cepas Gram (+), al respecto Cowan y Steel (1974) refieren que para este grupo de pruebas bioquímicas y fisiológicas primarias, las especies de algunos géneros presentan variabilidad, al igual que las subespecies o biovares, lo que nos indica que las cepas aisladas pueden ser diferentes especies o subespecies. Con estas pruebas bioquímicas y fisiológicas no se pudo aproximar la identificación a nivel de género para las bacterias Gram (-), así como para la cepa 4.15A que no exhibió endospora central (Cuadro 3).



**Figura 5.** Bacterias del género *Bacillus* antagonistas a *Cmm*. (A) Bacilos Gram (+) con endospora central-Tinción de Gram y (B) endospora central (tinción de Schaeffer y Fulton).

**Cuadro 3.** Pruebas bioquímicas primarias con la que se identificó que nueve cepas antagonicas corresponden al género *Bacillus*.

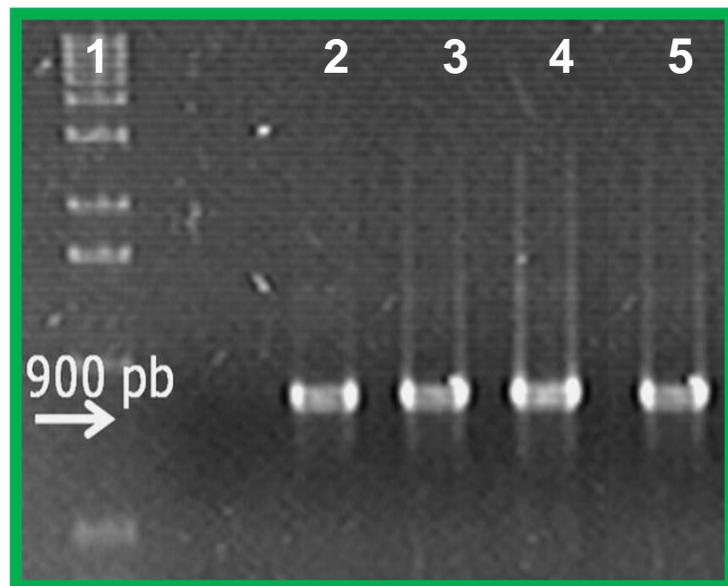
CEPA	TINCIÓN GRAM/ KOH	AcR	M- O/F	CA/Ca	CAT	OXI	MOV	GLUCOSA	EC
<b>BACILOS GRAM +</b>									
1.5	+/-	-	-	CA	+	-	-	+	+
8.11	+/-	-	-	CA	+	-	-	+	+
9.12	+/-	-	-	CA	+	-	-	+	+
<b>9.14A</b>	<b>+/-</b>	<b>-</b>	<b>F</b>	<b>CA</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
9.15B	+/-	-	-	CA	+	-	-	+	+
<b>13.12</b>	<b>+/-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>CA</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
9.14B	+/-	-	-	CA	+	-	-	+	+
1.14	+/-	-	-	CA	+	-	-	+	+
<b>4.15A</b>	<b>- y +/-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>CA</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
4.15B	- y +/-	-	-	CA	+	-	-	+	+
<b>BACILOS GRAM -</b>									
<b>1.12</b>	<b>-/+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>CA</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>3.10</b>	<b>-/+</b>	<b>-</b>	<b>F</b>	<b>CA</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>5.10</b>	<b>-/+</b>	<b>-</b>	<b>O</b>	<b>CA</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>7.10</b>	<b>-/+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>CA</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

AcR: Ácido Resistencia,  
 + Prueba positiva  
 - Prueba negativa  
 EC: Endospora Central  
 OXI: Oxidasa

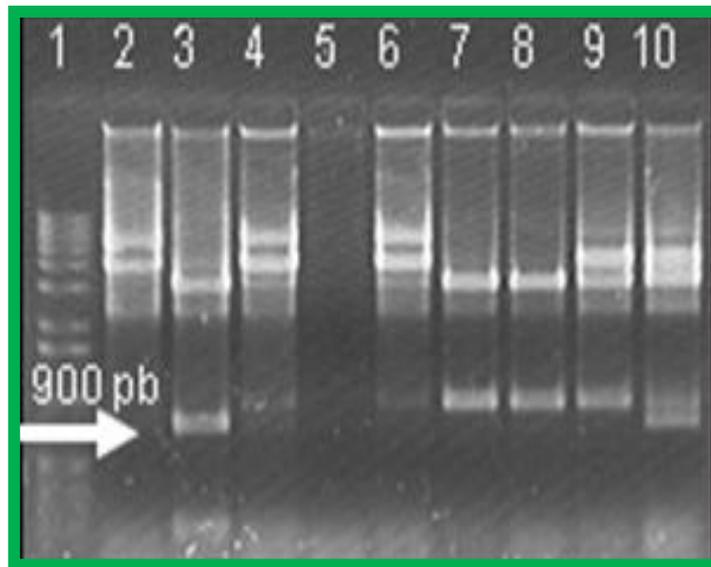
M- O/F: Metabolismo Oxidativo/Fermentativo  
 CA: Crecimiento aerobio  
 Ca: Crecimiento anaerobio  
 CAT: Catalasa  
 MOV: Movilidad

## Identificación con técnicas moleculares

La identificación molecular se realizó únicamente para las dos mejores cepas antagónicas del grupo Gram (+) (1.14 y 8.11) y las dos mejores Gram (-) (7.10 y 5.10). Con la técnica de extracción utilizada se obtuvo ADN de calidad y cantidad para efectuar la técnica de PCR. Para las cuatro cepas se logró la amplificación del gen ADNr 16S, con el par de oligos universales 533 F/1391 R que generaron amplicones de 900 pb (Figura 6). Los amplicones se clonaron en el vector pGEM-T Easy, lo cual fue confirmado por la liberación del inserto de 900 pb en el ADN plasmídico digerido con la enzima *EcoRI* (Figura 7). El ADN plasmídico de las clonas seleccionadas para cada cepa (una clona de cada una de las cepas excepto de la cepa 1-14 que fueron dos clonas) fue secuenciado, y las secuencias se indican en los Cuadros 4 y 5.



**Figura 6.** Amplificación del gen ADNr 16S. 1 Marcador molecular de 1 Kb, 2-5 cepas 8.11, 5.10, 7.10 y 1.14, con un tamaño de banda esperado de 900 pb.



**Figura 7.** Liberación del inserto del vector pGEM-T Easy del tamaño de banda esperado de 900 pb. 1 Marcador molecular 1 Kb, 2-10 cepas clonadas.

El análisis de las secuencias con el método de Blast (Cuadro 4), reveló que las cepas 1.14 y 8.11 de bacilos Gram (+) efectivamente pertenecen al género *Bacillus* y la especie con la que tienen mayor porcentaje de similitud e identidad es *B. atropheus*. Estas cepas fueron aisladas de la rizósfera de mezquite. Las cepas del grupo Gram (-) se identificaron como *Pseudomonas aeuroginosa* (Cuadro 5) y ambas cepas fueron procedentes de residuos de col.

Del GenBank se obtuvieron secuencias registradas para varias especies de *Bacillus*, incluyendo a *B. atropheus*, con ellas y con las de las cepas en estudio obtenidas, se estableció una relación filogenética por medio del programa Neighbour-Joining, a través de datos gráficos en un dendrograma (Figura 8). Este análisis corroboró que las clona de las cepas Sec8.11 y Sec1.14-2 corresponden a *B. atropheus*, y éstas son variantes genéticamente convergentes; a diferencia de la clona Sec1.14-3 que no correspondió a *B. atropheus* y no tiene relación cercana con ninguna de las especies utilizadas en la construcción del dendrograma, por lo que solo se estableció que pertenece a *Bacillus* sp.

Estos resultados coinciden con las variaciones que se presentaron al realizar las pruebas bioquímicas y las diferencias observadas en la morfología macroscópica de las colonias.

**Cuadro 4.** Identificación de *Bacillus atrophaeus* con las secuencias de un fragmento del ADNr 16S, amplificado con los iniciadores 533 F y 1391 R.

CLONA Sec8.11

GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGCAAGCGTTGTCCGGAATTATGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCT  
 TAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATTGGAACCTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAG  
 TGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTGGTCTGTA  
 GACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAA  
 TGTTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAACTGAA  
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA  
 GGTCTTGACATCCTCTGAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC  
 AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCAC  
 TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAACCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC  
 ACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAGACCGCGAGGTAAGCCATCCCACAAATCTGTTCTCAGTCCGGAT  
 GCAGTCTGCACTGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTATCGCGATCAGCATGGCCGCGGGTGAATACGTTCCGGCT  
 GTAACACCTGCCCCGTAATCCTATGGATCCGGGCCGCTGCAAGTGCATCATATGGGAGTCCAACCCGGTGGAGGCTAGC  
 TTGAATTCTAGGTCCTAATGCTGGGAATCTGGCTAGCGGTTCTGGGAATGTTACCGCCATTTCCACTTCAAGCGAACT  
 AGGTAACCTGGGGCTAAGGAAATCCCATTGTGGTGG

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Query coverage	Max ident
<a href="#">JF411316.1</a>	Bacillus atrophaeus strain KM40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	98%
<a href="#">JF411292.1</a>	Bacillus atrophaeus strain M43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	98%
<a href="#">HQ727972.1</a>	Bacillus atrophaeus strain Aj080319IA-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	98%
<a href="#">HM585062.1</a>	Bacillus atrophaeus strain BKS1-45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	98%
<a href="#">HQ123472.1</a>	Bacillus atrophaeus strain F3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	83%	98%

CLONA Sec1.14-3

GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTAC  
 GCAGTTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTCTCGTGCCTTTG  
 TTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTACATAAGGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTG  
 TCACCGGACGATCACTTAGAGTGCCTCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCCTTGGCGGACTTAACC  
 CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTGCCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTTAGG  
 GGTGTGAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC  
 CCCCCTCAATTCCTTTGAGTTTCACTTTCGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGTGCAGACTAAG  
 GGGCGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGCCTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACG  
 CTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCG  
 CTACACGTGGAATTCCTCTCTCTTCGCACTCAAGTTCCTCCAGTTTCCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTT  
 TCACATCAGACTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATATGCCGACAACGCTTGCCACCTACGTATACCGCG  
 GCGGTGCACATGTACCTAGATAGCTGGCGTATCATGGCTAGGCGTGTTCCTGTGTGGAATGGTTATCGGCTCAAAG  
 GCCCAACACATACGGGCCCGGAAGAAAAAGGTAAGCCTGTGGGGTCTAAGAGGGGACTACTCCACCGATTGCGTGG  
 GCCTTCGCGCGTTTTCATTCCGGAACCTTTGGCAGACGCTTGAATC

Sequences producing significant alignments

Accession	Description	Query coverage	Max ident
<a href="#">JF411316.1</a>	Bacillus atrophaeus strain KM40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	99%
<a href="#">JF411292.1</a>	Bacillus atrophaeus strain M43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	99%
<a href="#">HQ727972.1</a>	Bacillus atrophaeus strain Aj080319IA-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	81%	99%

**Continuación Cuadro 4 (cont.).** Identificación de *Bacillus atrophaeus* con las secuencias de un fragmento del ADNr 16S, amplificado con los iniciadores 533 F y 1391 R.

CLONA Sec1.14-2  
 CGGGGACGTCCGGTGAACATATAGGGCGATTGGGCCGACGTGCGATGCTCCCGGCCCATGGCGGCCGCGGGAATTC  
 GATTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTT  
 TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAG  
 AGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA  
 CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTA  
 AGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGA  
 AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA  
 GGTCTTGACATCCTCTGAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTC  
 GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTC  
 TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTAGACCTGGGCTACACA  
 CGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAGACCAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG  
 CAGTCTGCAACTGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC  
 TTGTACACACCGGCCGTCATCACTAGTGAATTCGCGGGCGGCTGCAGGTCGACCATATGGGGAGAGCTCCCAACGCGTG  
 GATGCATAGCTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTGGGCGTAATCATGGTGCATAGCTGGTTCTGTGTGAAATGGTT  
 ATCCGCTCACAATTGCCACACATCATAACGAAGCGGGAAGCATAAAGGTGTAAGGCTGGGGGGTGTAAAGAGAGTGAA  
 GCTAACTCAAATAAATGGCGGTGAGCTCCACGGGCCGTTTCATGTGCGGGAAATCATGTGTCGGTGTGCGACACCCTCC  
 CATAG

**Sequences producing significant alignments**

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Query coverage</u>	<u>Max ident</u>
<a href="#">JF411316.1</a>	Bacillus atrophaeus strain KM40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	69%	99%
<a href="#">JF411292.1</a>	Bacillus atrophaeus strain M43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	69%	99%
<a href="#">HM585062.1</a>	Bacillus atrophaeus strain BKS1-45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	69%	99%
<a href="#">HQ123472.1</a>	Bacillus atrophaeus strain F3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	69%	99%

**Cuadro 5.** Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* con las secuencias de un fragmento del ADNr 16S, amplificado con los iniciadores 533 F y 1391 R.

CLONA Sec7.10

GTGCCAGCCGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAG  
 CAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACATGCATCCAAAACACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGT  
 GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACCACCTGGACTGATACT  
 GACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGACTAGCC  
 GTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAAAC  
 TCAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGC  
 CTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC  
 TCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTGTCTTATTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTC  
 TAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGACCCCTACGGCCAGGGCTACA  
 CACGTGCTACAATGGTGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGAAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGA  
 TCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTCCCGGA  
 CTTGTACCACCGTCCGTCAATCACTATGAATCCCCTGCGCTGCAGTGAACAATATGGGAAGCTCCAACCGGTGGAATGC  
 ATAGCCTAGAAAATTCTAAGGTTACACTAATAGCTGGGCATATACTAGGCTAACCGTTTCTGGTGAATGTTTCCCGCTC  
 CAATGCCACACAACATACAGTAGCCGAAACTAAGGTAAGCTGGGGTCTAGGTGACAATCATTATGCGTGTATTGCC  
 TTT

Sequences producing significant alignments

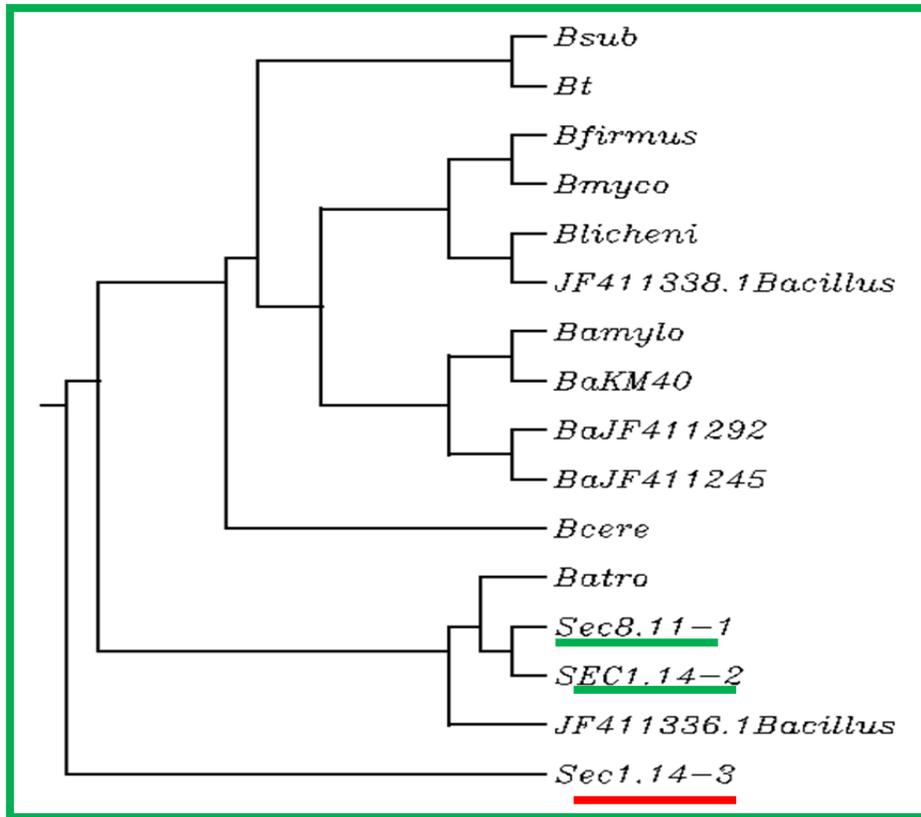
Accession	Description	Query coverage	Max ident
<a href="#">JF758866.1</a>	<i>Pseudomonas</i> sp. PTK IAA 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	98%
<a href="#">GQ203616.1</a>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain KS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	98%
<a href="#">AF094716.1</a>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ATCC 27316 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	98%
			98%
<a href="#">JF911362.1</a>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ECA17-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	

CLONA Sec5.10

GTGCCAGCCGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAG  
 CAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACATGCATCCAAAACACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGT  
 GGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGACCACCTGGACTGATACT  
 GACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGTTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGACTAGCC  
 GTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAAAC  
 TCAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGC  
 CTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC  
 TCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCCTGTCTTATTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTC  
 TAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGACCCCTACGGCCAGGGCTACAC  
 ACGTGCTACAATGGTGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGAAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGAT  
 CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCAG  
 GACCTTGTACACACCGCCCGTCAATCACTAGTGAATCGCGCCGCTGCAGTCGACAATATGGGAAAGCTCAACCGTGA  
 TGCAAGCTGGAATTTATGTCATAAATAGCTGAGCGTATCATGCCTAGCTGTTTCTGGTGAATGATGCGCTCCAATC  
 CACAAACATCAGGCCGGAGCTAGTTAAGCTGGGGTCTTAGTGACCACGTCATGTTGGTTGCCCTCAGGAACTTTG  
 CCACCTTTTAAATAAAAC

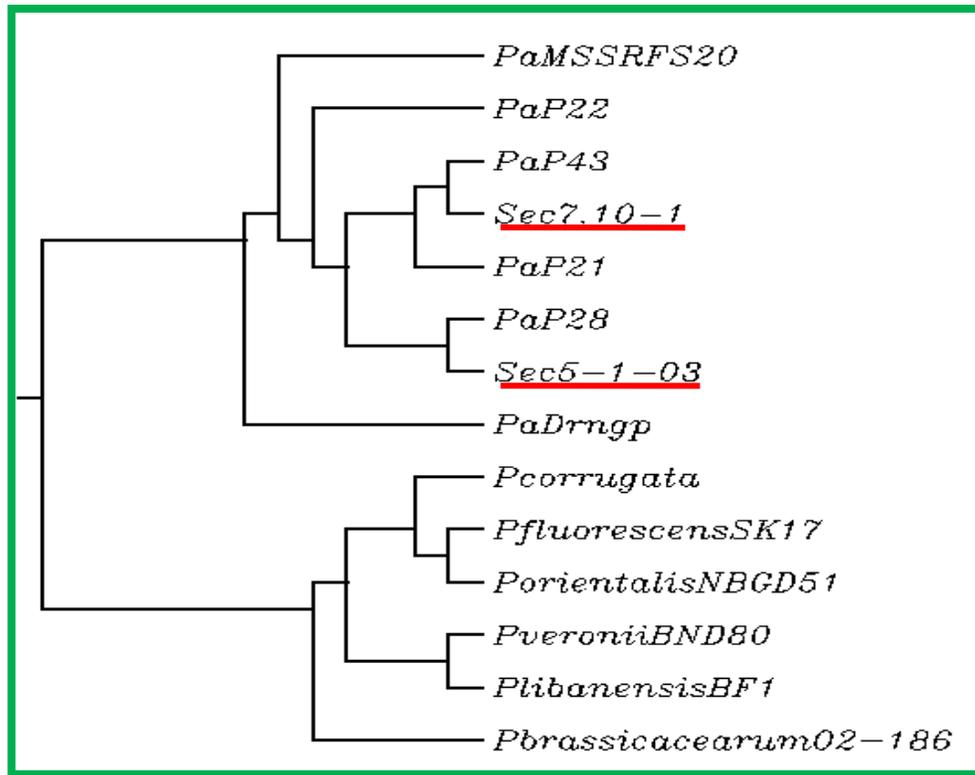
Sequences producing significant alignments

Accession	Description	Query coverage	Max ident
<a href="#">AF094716.1</a>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ATCC 27316 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	99%
<a href="#">HQ457014.1</a>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain HSD1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	99%
<a href="#">AF094720.1</a>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ATCC 33350 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	99%
<a href="#">JF911362.1</a>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ECA17-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	99%
<a href="#">JF911361.1</a>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain ECA19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	79%	99%



**Figura 8.** Dendrograma construido por el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining) con el programa Clustal W, con el que se identifica que las clonas Sec8.11-1, Sec1.14-2 corresponden a *Bacillus atrophaeus* y la Sec1.14-3 a *Bacillus* sp.

De manera similar, se obtuvieron secuencias registradas en el GenBank de especies de *Pseudomonas* y éstas junto con las de las cepas en estudio se analizaron con el programa Neighbour-Joining, obteniendo en dendrograma respectivo (Figura 9). Este confirma que ambas clonas corresponden a *Pseudomonas aeruginosa* y que son cepas genéticamente divergentes por lo que se agruparon en diferentes clados. Estos resultados también coinciden con los de las pruebas bioquímicas, ya que en ellas se observaron variaciones, así como en su morfología macroscópica.



**Figura 9.** Dendrograma construido por el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining) con el programa Clustal W, que muestra que las cepas Sec 5.1 y Sec 7.10 corresponden a *Pseudomonas aeruginosa* pero las cepas son genéticamente divergentes.

## DISCUSIÓN

### **Efecto Tóxico *In Vitro* de los Compuestos Volátiles Liberados de los Residuos de Col Deshidratados sobre el Crecimiento de *Cmm***

El efecto biofumigante *in vitro* e *in situ* de los diversos compuestos derivados de la hidrólisis de los glucosinatos de diferentes *Brassicas*, sobre patógenos del suelo, ha sido constatado ampliamente por varios autores (Njoroge *et al.*, 2008; Momma, 2008; Díez *et al.*, 2010). Se han identificado cerca de 100 diferentes glucosinatos. Estos compuestos son hidrolizados por una enzima asociada a la membrana de la célula que es la tioglucosidasa glucohidrolasa (mirosinasa), la cual está compartimentalizada en idioblastos y separada de los glucosinatos, cuando los tejidos están intactos. Esta enzima sólo actúa cuando los tejidos vegetales son dañados y sufren una autólisis o cuando se fermentan y los productos finales de la hidrólisis son compuestos químicos volátiles caracterizados como isiotiocianato, nitrilos, tiocianatos, oxazolinetionas y epinitrilos (Brown y Morra, 1997, pero también se sintetizan otros compuestos solubles de baja volatilidad como la 5-viniloxazolidina-2-tiona y probablemente otros (Smolinska *et al.*, 1997). Las características y funciones del tipo de producto resultante está determinado por el grupo R del glucosinolato y las condiciones químicas y físicas en las cuales se lleva a cabo la reacción, y por ello tienen actividad biocida variable, incluso alguno de ellos al ser consumidos sin tratamiento térmico pueden causar la enfermedad conocida como bocio y otros son anticarcinogénicos. Los isiotiocianatos son los compuestos más estudiados que tienen actividad biocida similar al compuesto químico fumigante metam-sodio, el cual libera metil-isotiocianato. Se ha comprobado que algunos de estos compuestos son de amplio espectro y otros actúan como insecticidas, fungicidas y nematocidas, sin embargo, pocos estudios se han realizado con bacterias, y sobresalen los efectuados con *Ralstonia solanacearum* (Kirkegaard *et al.*, 2008).

En el presente trabajo, los volátiles liberados de los residuos de col deshidratados y preservados por dos y cinco años no tuvieron efecto tóxico *in vitro* sobre el crecimiento de *Cmm*, los cuales mostraron actividad biocida en particular para hongos y bacterias

acidófilas habitantes de la rizósfera del mezquite. Podemos referir que *Cmm* no es sensible a los volátiles liberados de la col que en otros estudios han exhibido actividad fungicida y fungistática, en particular para *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Tapia, 2001; Escandón, 2007) pero es probable que lo pudiera ser a otro tipo de volátiles liberados por otras especies de brasicas, o bien a compuesto en extractos acuosos que no fueron probados en este trabajo, también sería importante probar liofilizados de residuos de col para ver si se liberan otro tipo de volátiles que sean efectivos contra *Cmm*. En el caso de *Ralstonia solanacearum*, para esta bacteria, mediante ensayos de laboratorio y campo se ha confirmado su sensibilidad a los isotiocianatos de un gran número de especies de brasicas como *B. juncea*, *B. napus*, *Sinapis alba*, *Raphanus sativus* y *B. nigra*. (Bayot *et al.*, 2004; Matthiessen y Kirkegaard, 2006). De los isotiocianatos liberados de estas brasicas, el 2-feniletil- isotiocianato fue el compuesto más eficaz en condiciones “*in vitro*” (Smith y Kirkegaard, 2002). Arthy *et al.* (2002), encontraron que las *Brassicacae* protegen a plantas de tabaco contra *R. solanacearum*; y Akiew *et al.* (2005), continuaron el estudio del impacto de los isotiocianatos contra *R. solanacearum* demostrando que aquellas brasicas con una mayor cantidad de glucosinolatos precursores de isotiocianatos, como las mostazas, resultaron más efectivas que aquellos biofumigantes con menores concentraciones o que desprendían menos compuestos volátiles en su descomposición. También se ha demostrado que las mostazas contienen altas concentraciones de propenil isotiocianato y que éstos son los mejores biofumigantes contra *R. solanacearum*, bajo condiciones adecuadas que en el campo favorezcan la distribución de las sustancias volátiles (Matthiessen y Sackleton, 2005). Los autores citados no indican a *B. oleraceae* como biofumigante para *R. solanacearum*. En contraste, en los ensayos preliminares realizados por Yulianti (2008), se encontró que los extractos acuosos de brócoli y coliflor tuvieron efecto biocida, en tanto que los de col fueron inhibitorio sobre el crecimiento *in vitro* de *R. solanacearum*; coincidiendo también en la fase de campo, en que los mejores resultados fueron obtenidos con coliflor y brócoli y no con la col. En Sudáfrica en un ensayo realizado en invernadero, se encontró que la biofumigación con residuos deshidratados de *B. oleraceae* var *capitata*, redujo el daño causado para la bacteria *Streptomyces scabies* en papa pero no al 100% (Gouws, 2006). Por lo expuesto, es factible que la col no contenga los isotiocianatos o compuestos volátiles con actividad bactericidas. Hasta el momento, no encontramos

referencias de investigaciones de los efectos de los isotiocianatos procedentes de brasicas *in vitro* ni *in situ* sobre el crecimiento y población de *Cmm*. Se tienen resultados del efecto de la biosolarización sobre *Cmm*, derivados de un trabajo realizado en macetas, en invernadero pero no con residuos de brasicas, sino con los mismos tejidos de jitomate infectados con *Cmm* y sometidos a temperatura de 45 °C. En este trabajo se encontró que *Cmm* en asociación con el material vegetal resulta patógena hasta la cuarta semana de tratamiento tanto a 25 como a 45 °C, de modo que la temperatura no será un factor determinante en este caso. En cambio, al introducir la bacteria libremente en el substrato sin tejidos vegetales nunca se recupera *Cmm* en placas con medio de cultivo del tratamiento a 45 °C pero si a 25 °C (se detecta hasta la tercera semana de tratamiento) observándose, además, reacciones de antibiosis en placa. Por lo que se concluye que el factor biocida es principalmente la temperatura (Zanón, 2009). Resultados contrastantes a los de Zanón (2009) fueron los de Medina-Ramos *et al.* (2010), quienes en otro estudio de biosolarización también realizado en un invernadero pero con camas de suelo naturalmente infestado por *Cmm*, aplicaron residuos de brócoli, estiércol y diferentes dosis de combinaciones de brócoli-estiércol. Con la solarización (plástico térmico) se logró incrementar las temperaturas hasta 70 °C, efectuando una pasteurización del suelo, que en este caso no logró eliminar a *Cmm*. Sin embargo, todas las combinaciones de brócoli-estiércol, y el estiércol con solarización logran eliminar este patógeno. Estos estudios concluyen que el estiércol es más determinante que el brócoli, lo que se explica, debido a que de este se libera una gran cantidad de amonio (que se transforma en amoniaco) y compuestos azufrados que aunados a la alta temperatura son los que tienen un efecto negativo en poblaciones de *Cmm*, sin embargo, los volátiles derivados del brócoli pueden tener un efecto sinérgico y más aún las especies microbianas termotolerantes que se promueven con la solarización. En nuestro trabajo se demostró que al menos los compuestos volátiles liberados de *B. oleraceae* var *capitata* no tienen ningún efecto sobre el crecimiento de *Cmm*.

### **Aislamiento, Selección e Identificación de Microorganismos Antagonistas**

En la rizósfera del mezquite y en los residuos deshidratados y fermentados de col se encontraron en mayor y menor grado, varias cepas de microorganismos antagonistas a

*Cmm*. Las rizósferas en particular de especies vegetales resistentes a factores abióticos y bióticos como las xerófitas u otras especies con estas características, son una apropiada fuente de microorganismos antagonistas a patógenos, debido a los procesos fisiológicos especiales que estas plantas poseen, y por ello las sustancias que secretan a la rizósfera definen una comunidad microbiana con mecanismos de defensa eficientes. Esto se corroboró en el estudio de la rizósfera de *Ornithogalum umbellatum*, planta silvestre usada en Colombia como ornamental pero reconocida en otras partes del mundo por los componentes químicos del bulbo y la aplicación de estas sustancias en el tratamiento alternativo de diferentes enfermedades. El análisis microbiológico evidenció microorganismos que demostraron antagonismo *in vitro* para los hongos *Botrytis cinerea* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Además, se observó que algunos de los morfotipos microbianos aislados presentaban un antagonismo muy discreto pero ocasionaban cambios en la estructura y color de las hifas de los hongos fitopatógenos utilizados; posiblemente la concentración influye sobre los mecanismos de biocontrol (Benítez *et al.*, 2007). Los mecanismos propuestos para explicar el control de patógenos, incluyen su capacidad de producir sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles y enzimas líticas (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en la presente investigación concuerdan con lo antes expuesto, debido a que se aislaron cinco eficientes cepas específicas para *Cmm* de la rizósfera del mezquite. Por otro lado, ratificamos los resultados de Tapia (2001), Escandón (2007) y Rodríguez *et al.* (2010) en relación a que los residuos de col deshidratados y fermentados, tienen una microflora caracterizada por agentes de biocontrol, en particular por *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* y *Penicillium*, los cuales fueron confrontados contra *F. oxysporum* y *Rhizoctonia solani* pero no para bacterias y mucho menos para *Cmm*.

En cuanto a los métodos de identificación, es importante considerar que la identificación con pruebas bioquímicas se fundamenta en las características metabólicas específicas de cada microorganismo, en la detección de la actividad de ciertas enzimas y en su fisiología para vivir en un hábitat con ciertas características ambientales (Gamazo *et al.*, 2005). Las pruebas bioquímicas primarias seleccionadas por Cowan y Steel (1974), fueron designadas para la identificación a nivel de género de una gran cantidad de bacterias de interés médico pero también han sido de gran utilidad para la identificación de los géneros de un gran

número de bacterias presentes en diferentes fuentes microbianas, y en algunos casos llegan a ser un procedimiento rápido y eficaz. Con esta metodología se identificó que el género predominante de bacterias antagonistas es *Bacillus* (9 cepas), sin embargo la variabilidad genética en algunos géneros y especies se reflejan en estas pruebas bioquímicas y por ello no pudimos identificar a las cinco cepas restantes de las 14 aisladas. La identificación molecular es precisa pero costosa, y optamos por identificar a nivel de especie únicamente a las cuatro mejores cepas antagonistas, y con esta metodología identificamos que dos cepas de bacilos Gram (+) corresponden a *B. atropheus* (B 8.11 y B 1. 14), pero además en la cepa B 1. 14 aparentemente pura, también se detectó molecularmente otra cepa que no se pudo identificar a nivel de especie quedando como *Bacillus* sp. debido a que no se relacionó con ninguna de las especies de *Bacillus* seleccionadas para elaborar el dendrograma y establecer la relación filogenética (Figura 8). Las otras dos mejores cepas son bacilos Gram (-) identificadas como dos subespecies o variantes genéticamente divergentes de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las bacterias del género *Bacillus* y las del grupo de *Pseudomonas* fluorescentes, son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces. Nuestros hallazgos concuerdan con esta premisa, debido a que 9 de los antagonistas aislados pertenecen al género *Bacillus*, y dos de ellos son de los más eficientes. Los otros dos mejores se ubican en el género *Pseudomonas*, y en el grupo fluorescente.

Se sabe que el género *Bacillus* se encuentran comúnmente en el suelo, rizósfera y filósfera de diversas especies vegetales (Wulff *et al.*, 2002), es heterogéneo y comprende especies que se han tipificado por diversas propiedades como agentes de biocontrol, entre ellas, ser promotor del crecimiento de las plantas, biofungicidas, inductor de mecanismos de resistencia y antagonistas (competencia) a una gran cantidad de fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium solani*, *Alternaria carthamy*, *Sclerotium rolfsii* (entre otros), en diferentes cultivos ya sea *in vitro*, *in vivo*, en invernadero o campo (Guillén-Cruz *et al.*, 2006; Paredes-Escalante *et al.*, 2009). Estas bacterias antagonistas también ayudan a promover otros efectos benéficos, por ejemplo, se ha encontrado una mayor emergencia de plántulas y reducción de hongos fitopatógenos por la aplicación de *Bacillus* a la semilla de jitomate (Brada *et al.*, 1995), como aconteció en la investigación realizada *in vitro*, en la cual

*Bacillus* sp tuvo un efecto benéfico sobre la germinación y el desarrollo de semillas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporium* var. *cubensis* (Jongebloed *et al.*, 1993). Se tiene amplio conocimiento del potencial de *Bacillus* sp. para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana y por ello se ha utilizado en control biológico de fitopatógenos. De los péptidos antifúngicos producidos por *Bacillus* podemos citar a micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas. Las iturinas presentan actividad hemolítica y antifúngica contra varias levaduras y hongos patógenos, pero tienen una limitada actividad antibacteriana (Stein, 2005; Romero *et al.*, 2007). Varios autores concuerdan que surfactina sola no inhibiría el desarrollo de hongos fitopatógenos, pero actúa sinérgicamente e incrementa significativamente la actividad antifúngica de iturina A. La formación de endosporas les otorga una alta viabilidad comparada con células vegetativas, ya que son resistentes a la desecación y al calor, en consecuencia se pueden formular fácilmente productos estables.

*B. subtilis* es la especie más aislada y utilizada en el control biológico. Garay y Ciampi (s/f) tipificaron varias cepas de *Bacillus subtilis* que fueron antagónicas para *R. solani* y *Erwinia carotovora*, con base en la producción de lipopéptidos de la familia iturina. Actualmente, se comercializan a gran escala productos a base de *B. subtilis*, siendo desde 1994, Estados Unidos el líder en este campo, y Alemania en ese año aprobó la comercialización de productos con *B. subtilis* como ingrediente activo. Estos productos están indicados como fungicidas más que bactericidas y hasta la fecha no hay un producto biológico comercial indicado para *Cmm*.

Son pocas las investigaciones realizadas sobre control biológico de *Cmm*, y en relación a *Bacillus*, Faraj (2002), seleccionó de un gran número de bacterias aisladas de diversos suelo de Hungría de las cuales resalta una cepa denominada HIR225, identificada como *Bacillus subtilis*, la cual resultó un buen antagonista *in vitro* y moderadamente efectiva *in situ* contra *Cmm*. Por otro lado, en Sudamérica, Flores (2004), evaluó tres cepas nativas de *Bacillus* sp. aisladas de suelo de tres regiones del Maule, Chile. Estas cepas inhibieron *in vitro* a *Cmm* y coincidieron con nuestras cepas en estudio, en el tamaño del halo de inhibición (4.43 a 2.92 cm), además resultaron mejores que la cepa comercial QST 713 de *Bacillus subtilis* (Serenade-Moviagro), por lo que es importante contar con cepas nativas ya adaptadas a la región. También, de suelos de zonas silvestres de la región de Talca,

Chile se aislaron 4 cepas de *Bacillus* spp. con las que se logró niveles de inhibición del crecimiento *in vitro* de *Cmm*, a concentraciones bajas de  $1 \times 10^3$  ufc/mL; además de inhibir a otros patógenos como *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Asimismo se observó un sinergismo entre algunas cepas de *Bacillus* spp., lo que podría estar indicando diferentes formas de acción biocontroladora y esto abre la posibilidad para su uso en cultivos de tomate y árboles frutales como el durazno y ciruelo (Donoso *et al.*, 2004).

Además de *B. subtilis*, existen otras especie identificadas como agentes de biocontrol, por ejemplo *B. amyloliquefaciens* en combinación con *B. subtilis* protegieron plantas de tomate contra el cáncer bacteriano. Se observó que la reducción en la incidencia de la enfermedad fue directamente proporcional al incrementó en la enzima Fenil alanina liasa y al contenido total de fenoles, lo que está relacionado con la inducción de mecanismos de defensa de las plantas (Girish y Umesha, 2005).

La especie *B. atrophaeus*, identificada en este trabajo como antagonista *in vitro* a *Cmm*, fue considerada por mucho tiempo como una subespecie de *B. subtilis*, hasta que Nakamura (1989), usando técnicas moleculares (hibridación del ADN) definió esta nueva especie. Esta bacteria es catalogada como una rizobacteria promotora del crecimiento y ha mostrado también características como agente de biocontrol *in vitro* e *in vivo* contra los patógenos del jitomate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Alternaria solani* (Shanmugam *et al.*, 2011). En China, otro aislamiento de *B. atrophaeus* de igual forma inhibió en mayor grado el desarrollo de las lesiones del tizón del arroz causadas por *Rhizoctonia solani* (Vijay *et al.*, 2009); y además en la India, la cepa S2BC-2 de *B. atrophaeus* interactuando con *Burkholderia cepacia* (TEPF-Sungal) inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* y disminuyeron la incidencia de la marchitez y pudrición del corno del gladiolo. En estos tres trabajos se encontró que *in vivo*, la menor severidad e incidencia de la enfermedad está relacionada con la inducción de la expresión de genes de defensa para la síntesis de quitinasa,  $\beta$ -1, 3-glucanasa, peroxidasa y polifenol oxidasa. Se ha demostrado *in vitro* la excreción de antibióticos, biocidas volátiles y enzimas líticas y ambos mecanismos pueden estar también involucrados *in vivo* (Pal y McSpadden Gardener, 2006). Podemos considerar que las cepas de *B. atrophaeus* aisladas

en este trabajo tienen potencial como agentes de biocontrol para ser probadas *in vivo* contra *Cmm*.

Además del género *Bacillus*, otro género que constituye las comunidades microbianas rizosféricas, caracterizada también como promotora del crecimiento, es *Pseudomonas* con una gran diversidad de especies (Mark *et al.*, 2006). Asimismo *Pseudomonas* spp. ha llamado la atención como agente de biocontrol debido a su versatilidad catabólica, su excelente habilidad para colonizar las raíces y la producción de una amplia gama de metabolitos como sideróforos, 2,4 diacetilfloroglucinol, pioluterion, pirrolnitrin y fenacina (Raaijmaker *et al.*, 2002). Las diversas especies de este género que actúan como agentes de biocontrol ejercen todos los mecanismos de control biológico, como competencia por nichos ecológicos y nutrientes, antibiosis y predación; en conjunto con la inducción de mecanismos de defensa en las plantas. *Pseudomonas fluorescens* es el más estudiada y conocida, sin embargo existen numerosos trabajos que refieren a *Pseudomonas aeruginosa* como una rizobacteria prevalente en el rizoplasma y en el suelo, que exhibe antagonismo contra muchos hongos y oomicetes fitopatógenos habitantes del suelo, no obstante, son menos las investigaciones para bacterias fitopatógenas. Desde 1996, se tienen referencia de la actividad antifúngica de la cepa 7NSK2 de *P. aeruginosa* debido a la producción de tres tipos de sideróforos en condiciones limitantes de hierro que son la pioverdina amarillo-verde fluorescente, la pioquelina derivado del ácido salicílico y el ácido salicílico. Estos sideróforos están involucrados en la supresión de la enfermedad Damping-off causada por el oomicete *Pythium* en tomate, y además de competir por el Fe del ambiente, se relacionaron con la inducción de mecanismos de resistencia en las plantas (Buysens *et al.*, 1996). No solo los sideróforos participan en el control biológico, otros compuestos están involucrados, por ejemplo, la cepa GRC1 de *P. aeruginosa* inhibió *in vitro* a *Macrophina phaseolina* y *Fusarium oxysporum*. Esta cepa se aisló de la rizósfera de la papa y se caracterizó por el desarrollo de sideróforos en 48 h, producción de ácido cianhídrico y ácido indol acético (Gupta *et al.*, 1999). En trabajos posteriores se demostró que algunas cepas como la PNA1 de *P. aeruginosa* secretan antibióticos fenazina, fenazina-1-carboxílico y oxiclrorafin que están involucrados en la reducción significativa de la incidencia y daño causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* y *Fusarium udum* en plantas de *Cicer arietinum* y *Cajanus cajan* (Anjaiah *et al.*, 2003); así como la combinación

de fenazina con otros de sus metabolitos, los ramnolípidos biosurfactantes y lipopéptidos cíclicos, los cuales actuaron sinérgicamente en la inhibición del daño causado por *Phytophthora* spp. en varias especies vegetales, y *Rhizoctonia solani* en frijol, respectivamente. Estos metabolitos provocaron la vacuolización, desintegración y excesiva ramificación de las hifas (Perneel *et al.*, 2008; D'aes *et al.*, 2011). Esta especie bacteriana tiene actividad antifúngica no solo para hongos habitantes del suelo, sino también para hongos fitopatógenos foliares, y por ello la cepa *P. aeruginosa* WS-1 disminuyó la severidad del tizón foliar causado por *Alternaria dianthicola* en un 80% cuando se aplicó a plantas de *Whitania somnifera* (conocida como ginseng de la India) afectadas en campo por este patógeno (Chandan *et al.*, 2011). En este rubro, la cepa PNA1 ha controlado eficientemente a *Botrytis cinerea* induciendo resistencia en plantas de frijol y tomate (De Meyer y Hofte, 1997; Audenaert *et al.*, 2002). Este agente de control biológico además ha exhibido tolerancia a agentes abióticos como alta salinidad y al fungicida thiram (Kishore *et al.*, 2005; Al-Hinai *et al.*, 2010). Finalmente la actividad antagonista de *P. aeruginosa* y la de otros agentes de biocontrol, *in vitro* e *in vivo* se potencia cuando actúan en consorcios microbianos. La incorporación al suelo de *P. aeruginosa*, *Paecylomyces lilacinus* con residuos de la planta medicinal *Launae nudicaulis* L., incrementó significativamente sus propiedades antagónicas contra *M. phaseolina*, *F. solani* y *R. solani* (Mansoor *et al.*, 2007). Existe información mínima acerca del antagonismo de *P. aeruginosa* hacia bacterias fitopatógenas. El trabajo de Karuna *et al.* (1997), refiere que las cepas de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* inhibieron *in vitro* el crecimiento de *Ralstonia solanacearum*. Estas bacterias se aplicaron a semillas de tomate que fueron sembradas en suelo y lograron disminuir la mortalidad. En ambos experimentos, el mejor agente de biocontrol fue *P. fluorescens*. En la actualidad, esta información es relevante debido a que el control biológico no se está realizando con un microorganismo en particular sino con consorcios de tal forma que los tres agentes de biocontrol resultan importantes, tal como aconteció en el trabajo de Mishra y Arora (2011), quienes aislaron de la rizósfera de *Brassica campestris*, una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (KA19) y una de *Bacillus thuringiensis* (SE), que utilizadas en combinación y aplicadas a la semilla de *Brassica campestris* y al suelo, lograron reducir las lesiones de la pudrición negra por *Xanthomonas campestris*, además de reducir las poblaciones de este patógeno en el suelo. KA19 produjo sideróforos

extracelulares identificados como 4-hidroxi-2-nonil-quinoleína y SE dos factores antibacterianos correspondientes a autolisinas  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa y AHL-lactonasa. Finalmente los mecanismos de resistencia inducidos por las rizobacterias están siendo clave en el manejo de enfermedades virales, Wahyuni *et al.* (2010) indujeron resistencia en plantas de tabaco contra el *Cucumber mosaic virus*, al tratarlas con extractos de composta adicionados con *P. aeruginosa* ch 1.

Debido a la limitada disposición de estudios sobre agentes de control biológico para *Cmm* y a la falta de agentes eficientes para el control del cáncer bacteriano, las investigaciones expuestas denotan la importancia que tienen las cepas de *B. atrophaeus* y *P. aeruginosa* identificadas en este trabajo. Las perspectivas son evaluar su actividad antagónica en consorcio contra *Cmm*, *in vivo*. Por otro lado, se debe considerar incorporar estos agentes de biocontrol a residuos de crucíferas para que pueden ser integrados al suelo y en conjunto con las poblaciones microbianas biocontroladoras que de forma natural posee esta enmienda, y aunado a los compuestos biofungicidas que se liberan, se podrán utilizar para un manejo en general de fitopatógenos habitantes del suelo y no solo para *Cmm*. Además de favorecer la fertilidad del suelo por incremento en materia orgánica y nitrógeno.

Otro aspecto importante a considerar es la variabilidad genética de las cepas de *Cmm* y que para cada región agrícola deberá considerarse este aspecto para la selección del mejor agente de biocontrol.

## CONCLUSIONES

1. Los compuestos volátiles derivados de los glucosinolatos de los residuos deshidratados de col (*Brassica oleraceae* var *capitata*) *in vitro*, no tienen efecto bactericida ni bacteriostático sobre *Cmm*.
2. Los residuos de col fermentados y la rizósfera del mezquite son excelentes fuentes de microorganismos. De ellas se aislaron en conjunto 14 antagonistas para *Cmm*. En ambas fuentes predominó el género *Bacillus*.
3. Las mejores cepas antagónicas *in vitro* fueron identificadas con técnicas moleculares y resultaron ser *B. atrophaeus*, *Bacillus* sp, y *Pseudomonas aeruginosa*.
4. El análisis filogenético refiere que las dos cepas de *Bacillus atrophaeus* son genéticamente convergentes, y las de *Pseudomonas aeruginosa* son subespecies o variantes genéticamente divergentes, concordando con las diferencias morfológicas y fisiológicas observadas.
5. Es el primer trabajo que refiere a *Bacillus atrophaeus* y *Pseudomonas aeruginosa* como agentes de biocontrol para *Cmm*.

## LITERATURA CITADA

- Akiew S. E., Kirkegaard J. A., Robinson M. C., y Hopkinson R. 2005. A laboratory screen for biofumigation-related suppression of *Ralstonia solanacearum*. Proceedings 15<sup>th</sup> Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference, pp.62. APPS, Geelong.
- Al-Hinai, A. H., Al-Sadi, A. M., Al-Bahry, S. N., Mothershaw, A. S., Al-Said, F. A., Al-Harthi, S. A., y Deadman, M. L. 2010. Isolation and characterization of *pseudomonas aeruginosa* with antagonistic activity against *Pythium aphanidermatum*. J Plant Pathol. 92 (3): 653-660.
- Alpuche-Solís A. G., Escandón-Martínez, M. A., Monreal-Vargas, C. T., Moreno-Chávez, J. G., Argüello-Astorga, G. R., Zárate-Chávez, V., y Castillo-Collazo, R. 2007. Importancia de la detección oportuna y control de enfermedades en ornamentales y hortalizas. Vinculación con empresarios de San Luis Potosí. En: La Tecnología Mexicana al Servicio de la Industria. Ed. Foro Consultivo Científico y Tecnológico A.C. 140-147 p.
- Alvarez, A. M., y Kaneshiro, W. S. 1999. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed. En: Seed Health Symposium. Iowa, EUA. p 93-97.
- Anjaiah, V., Cornelis, P., y Koedam N. 2003. Effect of genotype and root colonization in biological control of fusarium wilts in pigeonpea and chickpea by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. Can J Microbiol. 49(2):85-91.
- Arthy, J. R., Akiew, E. B., Kirkegaard, J. A., y Trevorrow, P. R. 2002. Using *Brassica* spp. as biofumigants to reduce the population of *Ralstonia solanacearum*. En: Proceedings of the 3rd International Bacterial Wilt Symposium. (Eds. Prior, P., Allen C. & Elphinstone, J.). p 25.
- Audenaert, K. Pattery, T., y Cornelis, P. 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. Mol Plant Microbe In. 15(11):1147-1156.
- Baker, K. F., y Cook, R. J. 1974. Plant pathologist's definition of biological control. En: Biological Control of Plant Pathogens. Ed. WH Freeman and company. 43 pp.
- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis-Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I., y Sessa, G. 2008. Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. Plant Physiol. 146:1797–1809.
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M.W., y Pace, N. R. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Microbiology. 91:1609-1613.

- Bautista, G., Mendoza, H., y Uribe, D. 2007. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Biol. Colomb.* 12:19-32.
- Bayot, R. G., Justo, V. P., y Danzan, J.P. 2004. Evaluation of crucifer wastes as biofumigants for bacterial wilt control. *Journal of Tropical Plant Pathology.* 40(1-2):73-74.
- Benhamou, N. 1991. Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* localization of some glycoproteins in infected host leaf tissues. *Phys Mol Plant Pathol.* 38:15-38.
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamente, P., Sánchez, L. C. y Corrales, L. 2007. Aislamiento de los microorganismos cultivables en la rizósfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.* 5(8):147-153.
- Biddle, J. A., McGee, D. C., y Bahro, E. J. 1990. Seed transmission of *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense* in corn. *Plant Dis.* 74:908-911.
- Bongornio, M., Larrosa, C., Maidana, A., Arenas, M., Cruz, Y., López, R., Gianuzzi, L., y Cap, G. 2009. Biofumigación con recursos locales: el caso de la producción hortícola de los quinteros del Parque Pereyra Iraola. *Leisa Revista de Agroecología.* 25-28 pp.
- Boone, D. R., Garrity, G. M., Castenholz, R. W., Brenner, D. J., Krieg, N. R., y Staley, J. T. 2001. Irregular, nonsporing gram-positive rods. En: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9a ed. Ed: Lippincott Williams and Wilkis. 591 pp.
- Brada, I.E.; Quintana, E.;Pelaya, E.; y Araujo, T. 1995. Efecto de *Bacillus* sp.sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl.var. *cubensis* Smith. *Resúmenes Bioplág 95.* Ciudad Habana, Cuba. INIFAT. p. 11.
- Brown, P. D., y Morra, M. J. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. En: *Advances in Agronomy,* vol 61:167-231.
- Buskov, S., Serra, B., Rosa, E., Sørensen, H., y Sørensen, J. C. 2002. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* Cv. Woll). *J Agric Food Chem.* 50(4):690-5.
- Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J., y Hofte, M. 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-Induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl Environ Microbiol.* 62(3):865-871.
- Camacho, B., Pineda, J., y González, H. 2010. Uso de enmiendas orgánicas para el control de enfermedades en cultivos agrícolas. *INIA Divulga.* 9-12 pp.

- Cárdenas-Sierra, N., Medina-Ramos, G., Godoy-Hernández, H., Villalobos-Reyes, S., y Delgadillo-Sánchez, F. 2011. Evaluación de la patogenicidad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causante del cáncer bacteriano en jitomate (*Solanum lycopersicum*) en diferentes localidades del estado de Guanajuato, México. En: Memorias del XIII Congreso internacional y XXXVIII Congreso nacional de Fitopatología. Tlaxcala. México. p 19.
- Carlton, W. M., Braun, E. J., y Gleason, M. L. 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*. 88(6):525-529.
- Chandan, K., Maiti, S. S., Amal, K. P., y Krishnendu, A. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* WS-1 for biological control of leaf blight disease of *Whitania somnifera*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. (Published on lines) DOI: 10.1080/03235408.2011.597150.
- Chang, R. J., Ries, S. M., y Pataky, J. K. 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*. 81(10):1276-1281.
- Chang, R. J., Ries, S. M., y Pataky, J. K. 1992a. Reduction in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial canker. *Plant Dis*. 76(8):805-809.
- Chang, R. J., Ries, S. M., y Pataky, J. K. 1992b. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology*. 82(5):553-560.
- Chang, R. J., Ries, S. M., y Pataky, J. K. 1992c. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Dis*. 76(11):1150-1155.
- Chávez, N. P. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis de Maestría. Costa Rica.
- Coaker, G. L., Willard, B., Eric, M. K., Stockinger, J., y Francis, D. M. 2004. Proteomic analysis of resistance mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. *Mol Plant Microbe*. 17(9):1019-1028.
- Cowan, S. T., y Steel K. J. 1974. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd. Ed. Cambridge University Press. New York.
- Crinò, P., Veronnes, P., Stamigna, C., Chiaretti, D., Lai, A., Bitti, M. E., y Saccardo, F. 1995. Breeding for resistance to bacterial canker in Italian tomatoes for fresh market. *Hort Science*. 24(2):362-365.
- D'aes, J., Hoang Hua, G. K., De Maeyer, K., Pannecouque, J., Forrez, I., Ongena, Lars, M., Dietrich, E. P., Thomashow, L. S., Mavrodi, D. V., y Höfte. M. 2011.

- Biological control of Rhizoctonia root rot on bean by phenazine- and cyclic lipopeptide-producing *Pseudomonas* CMR12a. *Phytopathology*. 101(8): 996-1004.
- Davis, M. J., Gillaspie, Jr. A. G., Vidaver, A. K., y Harris, R. W. 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. *Int J Syst Bacteriol*. 34(2):107-117.
- De León, L., Rodríguez, A., López, M. M., y Siverio, F. 2009. Control químico del chancro bacteriano del tomate en invernadero. *Phytoma España: la Revista Profesional de Sanidad Vegetal*. 214:28-35.
- De León, L., Siverio, F., López, M. M., y Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Dis*. 95(11):1328-1338.
- De Meyer, G., y Hofte M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*. 87:588-593.
- Díez, R. M. A., López, P. J. A., Urbano, T. P., y Bello, P. A. 2010. Biodesinfección de suelos y manejo agronómico. Ed. Ministerio del Medio Ambiente y Medio Rural Marino. España. pp. 407.
- Donoso, E., Lolas, M., Ibarra, A., y Sandoval, C. 2004. Evaluación de cepas nativas de la bacteria *Bacillus* spp. en el biocontrol de enfermedades bacterianas de cultivos hortofrutícolas. En: Resúmenes-Posters. XIV Congreso Nacional de Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Talca, Chile.
- Dreier, J., Meletzus, D., y Eichenlaub, R. 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol Plant Microbe In*. 10(2):195-206.
- Eichenlaub, R., Gatermann, K-H., y Burger, A. 2006. *Clavibacter michiganensis*, a group gram-positive phytopathogenic bacteria. En: *Plant-Associated Bacteria*. Ed: S.S. Gnanamanickam. 385-421 p.
- Eichenlaub, R. y Gatermann, K-H. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 49:445-464.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. On line: [http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter\\_m\\_michiganensis/COR\\_BMI\\_ds.pdf](http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/COR_BMI_ds.pdf)

- Escandón, M. A. 2007. Diagnóstico y manejo biológico de patógenos radicales asociados a la especie ornamental *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agronomía, UASLP. México.
- Fahey, J. W., Zalcman, A. T., y Talady, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 56(1):5-51.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2011. Anuario estadístico de producción. ONU para la agricultura y la alimentación. On line: <http://www.fao.org>.
- Faraj, A. K. 2002. A novel antagonistic bacteria as prospective agents for the biocontrol of some plant bacterial diseases. Ph. D. Dissertation. Faculty of Horticultural Sciences. Szent István University. Budapest, Republic of Hungary.
- Fatmi, M. y Shaad, N W. 1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. *Phytopathology*. 78(1):121-126.
- Fatmi, M. y Shaad, N. W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol*. 51:149-154.
- Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 62:96-100.
- Flores, F. E. 2004. Evaluación *in vitro* del control de *Bacillus* sp. sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Tesis de licenciatura. Universidad de Talca. Chile.
- Francis, D. M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B., y St. Clair, D. 2001. Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Dis*. 85:1171-1176.
- Frank, G. D. 1999. Persistence and latency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in field grown seed potatoes. *Plant Dis*. 83:247-250.
- Gamazo, C., López-Goñi, I., y Díaz, R. 2005. Pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana. En: *Manual Práctico de Microbiología*. 3ª ed. Ed. Masson. 47 p.
- Garay, Y., y Ciampi, L. (s/f). Aislamiento y caracterización de metabolitos con actividad antagonista de cepas de *Bacillus* spp. hacia los agentes fitopatógenos *Erwinia carotovora* (Dye) Hall y *Rhizoctonia solani* Kühn. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.  
[www.bioinsumos.cl/archivos/difusion/minisimposio1/06garay\\_y.pdf](http://www.bioinsumos.cl/archivos/difusion/minisimposio1/06garay_y.pdf)
- Gaterman, K-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalata, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Pohle, S., Rückert, Ch., Shneiker, S., Zellermann, E.,

- Pühler, A., Eichenlaub, R., Kaiser, O., y Bartels, D. 2008. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol.* 190:2138-2149.
- Girish, N., y Umesha, S. 2005. Effect of plant growth promoting bacteria on bacterial canker of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 38(3): 235-243.
- Gitaitis, R., McCarter, S., y Jones, J. 1992. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. *Plant Dis.* 76(7):651-656.
- Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., y Voloudakis, A. E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Dis.* 75:834-838.
- Gleason, M. L., Gitaitis, R. D., y Ricker, M. D. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Dis.* 77(11):1069-1076.
- Gouws, R. 2006. Etiology and integrated control of common scab on seed potato in South Africa. Dissertation for degree Magister Scientiae. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Pretoria, South Africa.
- Gupta, C. P., Sharma, A., Dubey, R. C., y Maheshwari, D. K. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* (GRC1) as a strong antagonist of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum*. *Cytobios.* 99(392):183-9.
- Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C.N., Padrón-Corral, E., y Reyes-Valdés, M. H. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp, *Rhizoctania solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonina y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo del chile. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 24(2):105-114.
- Hausbeck, M. K., Bell, C., Medina-Mora, C., Podolsky, R., y Fulbright, D.W. 2000. Effect of bactericides on population size and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology.* 90:38-44.
- Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-Lauzardo, A. N. 2006. Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 24(1):42-49.
- Hoitink, H. A. J., y Boehm, M. J. 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu Rev Phytopathol.* 37: 427-446.

- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., y Pace, N. R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol.* 180(18):4765-4774.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J., y Eichenlaub, R. 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environ Microbiol.* 1(2):113-118.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., y Eichenlaub, R. 2000. The endo- $\beta$ -1-4-glucanase Cel A of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt for tomato. *Mol Plant Microbe In.* 13(7):703-714.
- Janisiewicz, W. J., y Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol.* 40:411-41.
- Jongebloed, P. H., Kessel, J., y Molhoek, G. J. T. 1993. Biological control of *Phytophthora infestans* with compost extracts and selected bacterial antagonists. *Bulletin OILB SROP* 16:16
- Kado, C. I., y Heskett, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology.* 60:969-976.
- Karuna, K., Khan, A. N. A., y Ravikumar M. R. 1997. Potential of biocontrol agents in the management of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Memorias 2<sup>nd</sup> International Bacterial Wilt Symposium.* Guadeloupe, French West Indies. 22-27 June.
- Kim, D-O., James, R., y Weller, D. M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Biol Control.* 87(5):551-558.
- Kirkegaard, J. A. 2004. Evaluating biofumigation for soil-borne disease management in tropical vegetable production. *ACIAR Review Report LWR2/2000/114.*
- Kirkegaard, J.A., Akiew S, Pattison T, Young A, y Prior L. 2008. Understanding mechanism of plant pest suppression using *Brassica* green manures. *Proceedings of 3<sup>th</sup> Int. Biofumigation Symposium.* Canberra, Australia, 21-25 Jul., 21 p.
- Kishore, G. K., Pande, S., y Podile, A. R. 2005. Biological control of collar rot disease with broad-spectrum antifungal bacteria associated with groundnut. *Can J Microbiol.* 51(2):123-132.
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Weinthal, D., Chalupowicz, L., Gartemann, K-H., Eichenlaub, R., y Manulis-Sasson S. 2008. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur J Plant Pathol.* 121:463-475.

- Lugtenberg, B. y Leveau, J. 2007. Biocontrol of plant pathogens: principles, promises and pitfalls. En: The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. Eds. Pinton R, Varanini Z and Nannipieri P eds. 2nd, Boca Raton, FL, USA: CRC press, Taylor and Francis Group, pp.267-296.
- Mark, G. L., Morrissey, J. P., Higgins, P., y O'Gara, F. 2006. Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology Applications. FEMS Microbiol Ecol. 56: 167-77.
- Mansoor, F., Sultana, V., y Ehteshamul-Haque, S. 2007. Enhancement of biocontrol potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *Paecilomyces lilacinus* against root rot of mungbean by a medicinal plant *Launaea nudicaulis*. L Pak J Bot. 39(6): 2113-2119.
- Matthiessen, J. N., y Kirkegaard J. A. 2006. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. Crit Rev Plant Sci. 25: 235-265.
- Matthiessen, J. N., y Shackleton M. A. 2005. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. Pest Manag. Sci. 61: 1043-1051.
- Medina-Ramos, G., Cuevas-Ruiz, J. A., Villalobos-Reyes, S., Pérez-Mora, E., Quintana-Martínez, M. C., Martínez-Sánchez A., y Godoy-Hernández, H. 2010. Biofumigación y solarización una alternativa sostenible para control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. En: Memorias X Seminario de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria en el Estado de Querétaro. 6 p.
- Milijašević, S., Todorović, B., Potočnik, I., y Rekanović, E. 2009. Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. Pestic Phytomed. (Belgrade). 24:19-27.
- Mishra, S., y Arora, N. K. 2011. Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. World J Microbiol Biotechnol. (Published on line) DOI 10.1007/s11274-011-0865-5.
- Mitidieri, M. 2005. La biofumigación en el marco del manejo integrado de plagas y enfermedades en cultivos hortícolas. On line: [http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/2005/mm\\_0507.htm](http://www.inta.gov.ar/sanpedro/info/doc/2005/mm_0507.htm).
- Mojica-Marín, V., Luna-Olvera, H. A., Sandoval-Coronado, C. F., Pereyra-Alfárez, B., Morales-Ramos, L. H., González-Aguilar, N.A., Hernández-Luna, C. E., y Alvarado-Gomez, O. G. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. Revista Internacional de Botánica Experimental. 78:105-110.
- Molina, G., Zaldúa, S., González, G., y Sanfuentes, E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Bosque. 27(2):126-134.

- Momma, N. 2008. Biological soil desinfestation (BSD) of soilborne pathogens and its possible mechanisms. *JARQ*. 42(1):7-12.
- Monreal, C. T. 2005. Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. A.C. México.
- Monreal, C. T. 2008. Diagnóstico de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en chile y jitomate mediante técnicas moleculares. *Claridades Agropecuarias*. 173:26-34.
- Montesinos, E., Badosa, E., Bonaterra, A., Peñalver, R., y López, M. M. 2007. Aplicación de la biotecnología al control biológico de bacterias y hongos fitopatógenos. En: *Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología*. Eds. Pallás, E., Escobar, C., Rodríguez, P., Marcos, J. F. Ed. Mundi-Prensa. Pp. 317-343.
- Morales, L. J. A. 2009. Identificación de enfermedades en plantas de interés hortícola. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Nakamura, L. K. 1989. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 39:295–300.
- Njoroge, S. M. C.; Riley, M. B., y Keinath, A. P. 2008. Effect of incorporation of *Brassica* spp. residues on population densities of soilborne microorganisms and on Damping-off and Fusarium wilt of watermelon. *Plant Dis*. 92(2):287-294.
- Oyoque, G. 2008. Inducción de resistencia en jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) con extractos de bacterias patógenas. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- Pal, K. K., y B. McSpadden Gardener, 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. (Published on line) DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Paredes-Escalante, J. E., Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Allende-Molar, R. A., Sañudo-Barajas, J. A., y Valdez-Torres, J. B. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27:27-34.
- Park, Y. H., Suzuki, K., Lee, K. C., Yoon, J., Kim, S., Kho, Y. H., Goodfellow, M., y Komagata, K. 1993. Suprageneric classification of peptidoglycan group B actinomycetes by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 64(3-4):307-313.
- Perneel, M., D'hondt, L., De Maeyer, K., Adiobo, A., Rabaey, K., y Höfte, M. 2008. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environ Microbiol*. 10(3):778-88.

- Quiroz-Sarmiento, V. F., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., y Lara, M. E. 2008. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan el cultivo del ajo. *Revista Mexicana de Micología*. 26:27-34.
- Raaijmakers, J., Vlami, M., y de Souza, J. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81:537-547.
- Ramírez, J., y Sáinz, R. 2006. Manejo Integrado de las Enfermedades del Tomate. Ed Once Ríos. 19p.
- Rodríguez, K. A. 2009. Residuos de col: un modificador de pH y fuente de microorganismos para el manejo de fitopatógenos del suelo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.
- Rodríguez, K. A., Monreal, V. C. T., Huerta, D. J., Soria, Colunga J. C., y Flores, R. J. A. 2010. Residuos de col: un modificador de pH y fuente de microorganismos para el manejo de fitopatógenos del suelo. Memorias Primer Simposio Nacional: Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable. Zacatecas, Zac. México. 22-26 de Marzo.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., Pérez-García, A. 2007 The Iturin and Fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podoshaera fusca*. *Mol Plant Microbe In*. 20:430-440
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Ed: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. 3ª ed.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2009. Programa de trabajo de la campaña manejo fitosanitario de hortalizas, a operar con recursos del componente de sanidad e inocuidad del programa del soporte 2009.
- Shanmugam, V., Kanoujia, N., Singh, M., Singh, S., y Prasad, R. 2011. Biocontrol of vascular wilt and corm rot of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. gladioli using plant growth promoting rhizobacterial mixture. *Crop Prot*. 30:1-7.
- Shetty, K. G., Subbarao, V., Huisman, O. C., y Hubbard, J. C. 2000. Mechanism of broccoli-mediated verticillium Wilt reduction in cauliflower. *Phytopathology*. 90(3):305-310.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2011. Producción Agrícola. Año Agrícola 2009. Ed. SAGARPA, México.
- Smith B. J., y Kirkgaard J. A. 2002. *In-vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant. Pathol*. 51: 585-593.

- Smolinska, U., Morra M. J., Knudens G. R. y Brown P. D. 1997. Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal toward *Aphanomyces euteiches* f. Sp. pisi. *Phytopathology*. 87: 77-82.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol*. 56(4): 845-857.
- Tapia, S. M. 2001. Efecto microbiológico y fungitóxico *in vitro* de los residuos de col sobre *Fusarium oxysporum* (Zinder y Hausen) f. sp. *lycopersici* y *Rhizoctonia solani* Kuhn. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.
- Vijay, K. K. K., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., Lawrence, K. S., Groth, D. E., Miller, M. E., Sudini, H. y Du, B.. 2009. *In-vitro* efficacy of various rhizobacterial isolates against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight disease. En: *Plant Growth Promotion by Rhizobacteria for Sustainable Agriculture*. Ed. M. S. Reddy, S. Desai, R. Z. Sayyed, V. K. Rao, Y. R. Sarma, B. C. Reddy, K. R. K. Reddy, A. R. Podile y J. W. Kloepper. Scientific Publishers, India. 624 pp.
- Wahyuni, W. S., Mudjiharjati, A., y Sulistyaningsih, N. 2010. Compost extracts of vegetables wastes as biopesticide to control *Cucumber mosaic virus*. *HAYATI. J Bioscience*. 17(2):95-100.
- Werner, N. A., Fulbright, D. W., Podolsky, R., Bell, J., y Hausbeek, M. K. 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Dis*. 86:535-42.
- Wulff, E. G., Mguni, C. M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., y Hockenhull, J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol*. 51: 574-584.
- Yulianti, T. 2008. Potency of Brassica residues as biofumigation for control of bacterial wilt of tobacco in Indonesia. Third International Biofumigation Symposium. CSIRO Discovery Centre. Australia. 21-25 July.
- Zanón, M. J. 2009. Efecto de la biofumigación y biosolarización en el control de agentes fitopatógenos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Zassada, I. A., y Ferris, H. 2004. Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles. *Soil Biol Biochem*. 36:1017-1024
- Zavaleta, E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra Latinoamericana*. 17(3):201-207.