



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIA *Clavibacter michiganensis* PROMOTORA DEL CÁNCER MICROBIANO DEL TOMATE RIÑÓN (*Lycopersicon esculentum* Mill), EN EL CANTÓN URCUQUÍ.

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERA AGROPECUARIA

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 3. Conservación de la Biodiversidad

Sublínea 3.1 Estudio, conservación y manejo de la biodiversidad

AUTORA: Tania Elizabeth Mantilla Guayanay

ASESOR: M.Sc. Santiago Xavier Mafla Andrade

IBARRA, SEPTIEMBRE 2019



CERTIFICACION DEL ASESOR

Ibarra, 2019

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f): 

M.Sc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 100265839-9



PAGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

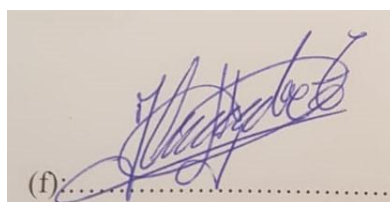
El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

A photograph of a signature in blue ink on a light-colored background. The signature is written over a dotted line. To the left of the signature, the text "(f):" is visible.

MSc. Santiago Xavier Mafla Andrade
C.C.: 100265839-9

A photograph of a signature in blue ink on a light-colored background. The signature is written over a dotted line. To the left of the signature, the text "(f):" is visible.

MSc. Diego Manuel León Tapia
C.C.: 1711668895

A photograph of a signature in blue ink on a light-colored background. The signature is written over a dotted line. To the left of the signature, the text "(f):" is visible.

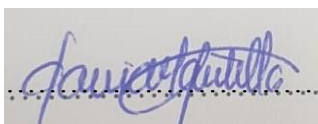
PhD. Jhenny Marlene Cayambe Terán
C.C.:1721122370



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Tania Elizabeth Mantilla Guayanay, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 2019

f): 

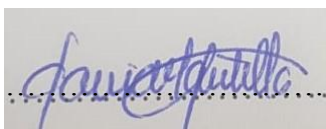
Tania Elizabeth Mantilla Guayanay

C.C.: 1722195615



AUTORÍA

Yo, Tania Elizabeth Mantilla Guayanay, portadora de la cédula de ciudadanía N°1722195615, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

f): .....

Tania Elizabeth Mantilla Guayanay

C.C.: 1722195615



DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: Tania Elizabeth Mantilla Guayanay, con CC: 1722195615, autora del trabajo de grado intitulado: “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIA *Clavibacter michiganensis* PROMOTORA DEL CÁNCER MICROBIANO DEL TOMATE RIÑÓN (*Lycopersicon esculentum* Mill), EN EL CANTÓN URCUQUÍ”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniera Agropecuaria en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, Septiembre 2019

(f.) 

Tania Elizabeth Mantilla Guayanay

C.C. 1722195615



DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIA *Clavibacter michiganensis* PROMOTORA DEL CÁNCER MICROBIANO DEL TOMATE RIÑÓN (*Lycopersicon esculentum* Mill), EN EL CANTÓN URCUQUÍ”, lo propuesto en el Código de Ética de la Investigación y el Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con la fecha 15 de enero de 2018.

Ibarra, 2019

Tania Elizabeth Mantilla Guayanay

C.C.: 1722195615

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Honorio y Piedad, porque son la mayor bendición que Dios me ha otorgado. Nuestro sacrificio fue la distancia, pero nuestra recompensa es el éxito.

A mi amado JP por darme su amor incondicionalmente y ser el mejor amigo que alguien puede tener, muchas veces dejas de lado tus metas para ayudarme a cumplir las mías. Te Amo.

A mi Arita preciosa por escuchar cada dato curioso, cada aprendizaje nuevo y acompañarme cuando estudiaba, aunque te aburriera de tanto repetir.

No puedo dejar de dedicar este trabajo a mi pequeño Ismael, gracias bonito mío por la ternura que me transmites, por ese amor tan puro e inocente, un día leerás esto y sabrás que cada día pienso en ti.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por todas las bendiciones que me da día a día. A mis padres gracias por todas las malas noches de duro trabajo y enseñarnos que todo se puede lograr si trabajamos por ello.

Gracias a ti mí amado JP por confiar en mí aun cuando ni yo misma lo hacía y motivarme a ser mejor.

A mis hermanos: Fernando, Franklin, Margarita, Gonzalo y Aracely a quienes amo tanto, esto es gracias a todos ustedes porque siempre me han hecho sentir que el éxito de uno es el éxito de todos.

Gracias familia porque ustedes me brindan paz, seguridad, motivación y el impulso para seguir cada día.

Gracias por tanto amor...

No puedo dejar de agradecer a mis amigos y compañeros de clase, Hugo, sin ti este proyecto no hubiera sido posible, gracias por tu compañía y tu apoyo, eres un gran amigo.

Xavier, Bryan y Omar gracias por su amistad sincera y desinteresada, me apoyaron siempre que lo necesite, los quiero mucho mis mosqueteros.

Quiero agradecer también a mi profesor y asesor de tesis el MSc Santiago Mafla, por los conocimientos impartidos, la paciencia y la ayuda para lograr la culminación de este proyecto.

Un agradecimiento especial a mi querido doctor Manly por no limitarse al momento de enseñar y siempre compartir su experiencia.

A todos mis profesores quienes supieron sembrar en mí el interés por cada tema impartido y la búsqueda del éxito personal.

Quiero agradecer también al Dr. Modesto Bazante y a Andrés Torres por su guía y colaboración en la realización de este proyecto.

Gracias a todos ustedes ya que por su apoyo, enseñanzas y motivación he culminado con éxito esta etapa de mi vida, infinitas gracias los llevo a todos en mi corazón.

Esto es para ustedes con mucho amor.

Tania

ÍNDICE

CERTIFICACION DEL ASESOR.....	ii
PAGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS	iv
AUTORÍA	v
DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN.....	vi
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTO	ix
ÍNDICE.....	x
Índice de figuras.....	xiv
Índice de tablas	xv
1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVES	xvi
2. ABSTRACT.....	xvii
3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1 OBJETIVOS.....	3
3.1.1 Objetivo General.....	3
3.1.2 Objetivos Específicos.	3
3.2 VARIABLES	3
3.2.1 Variable independiente	3
3.2.2 Variable dependiente	3

4.	ESTADO DEL ARTE	4
4.1	Investigaciones Previas.....	4
4.2	Bases teóricas.....	5
4.2.1	Aspectos generales de las bacterias	5
4.2.1.1	Morfología microscópica de las bacterias.	6
4.2.1.2	Morfología macroscópica de las bacterias.	7
4.2.2	Enfermedades bacterianas.....	8
4.2.3	Bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i>	8
4.2.3.1	Condiciones predisponentes	10
4.2.3.2	Afecciones de la bacteria.....	12
4.2.3.3	Impacto económico de la bacteria	13
4.2.3.4	Medidas de erradicación y prevención de la bacteria	14
4.2.4	Descripción general y taxonómica del tomate.....	15
4.2.4.1	Etapas fenológicas del tomate.....	18
4.2.4.2	Enfermedades del tomate.....	18
4.2.5	Proceso de la caracterización molecular	20
4.2.5.1	Pruebas bioquímicas	20
4.2.5.2	Técnica utilizada para la identificación de cepas.....	23
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1	Población y muestra.....	28

5.2	Instrumentos.....	29
5.3	Procedimiento.	30
5.4	Análisis resultados	33
6.	RESULTADOS Y DISCUSION	33
6.1	Resultados.....	33
6.1.1	Cuestionario aplicado a los productores.	33
6.1.2	Aislamiento de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i>	43
6.1.3	Identificación molecular de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i>	45
6.1.4	Distribución espacial de las cepas identificadas en las zonas de producción.	46
6.2	Discusión de Resultados.	49
6.3	Socialización de resultados	51
7.	CONCLUSIONES.....	61
8.	RECOMENDACIONES.....	62
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	63
	ANEXOS	67
	Anexo 1: Información proporcionada por el INIAP respecto a la bacteria <i>Cmm</i>	67
	Anexo 2: Encuesta a los productores	68
	Anexo 3: Fotografía de aplicación de la encuesta a los productores.	68
	Anexo 4: Recolección de muestras vegetales	69
	Anexo 5: Trabajo en laboratorio	69

Anexo 6: Protocolo de extracción de ADN	70
Anexo 7: Secuenciación de ADN	71
Anexo 8: Identificación de ADN	72
Anexo 9: Socialización de resultados	72
Anexo 10: Llenado de encuestas	73
Anexo 11: Lista de asistentes.....	73

Índice de figuras

Figura 1. Morfología microscópica de las bacterias	7
Figura 2. Diagrama de la pared bacteriana.	8
Figura 3. Área cultivada de tomates por invernadero del Cantón Urcuquí	34
Figura 4. Variedades de tomates cultivados por los productores del Cantón Urcuquí.	35
Figura 5. Etapas de los cultivos de tomates en el cantón Urcuquí.....	37
Figura 6. Enfermedades recurrentes en los cultivos de tomates del Cantón Urcuquí	38
Figura 7. Frecuencia de fumigación en los cultivos de tomates del Cantón Urcuquí.....	40
Figura 8. Conocimiento por parte de los productores del Cantón Urcuquí sobre la existencia de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i>	41
Figura 9. Conocimiento por parte de los productores sobre la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i>	43
Figura 10. Aislamiento y Tinción Gram de las colonias	43
Figura 11. Prueba de fermentación	44
Figura 12. Electroforesis.....	46
Figura 13. Presencia de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> subespecie <i>michiganensis</i> en los cultivos de tomate del cantón Urcuquí.....	48
Figura 14. Mapa de distribución de los invernaderos con cultivos de tomates en el cantón Urcuquí	49
Figura 15. Comodidades de la sala de exposición	52
Figura 16. Material audiovisual usado en la exposición.....	53
Figura 17. Dominio del expositor sobre el tema.....	54
Figura 18. Manejo del auditorio	55
Figura 19. Facilidad de expresión.....	56
Figura 20. Importancia de la investigación para la sociedad.....	57
Figura 21. La investigación posee perspectiva para estudios complementarios.....	58
Figura 22. Beneficios de la presente investigación para la sociedad.....	59
Figura 23. Cumplimiento de los objetivos planteados.....	60

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de la bacteria.....	9
Tabla 2. Marco de plantación del tomate.....	11
Tabla 3. Químicos para el control preventivo de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> ...	15
Tabla 4. Clasificación taxonómica del tomate riñón	16
Tabla 5. Variedades de tomate presentes en el Ecuador	17
Tabla 6. Descripción de la población.....	29
Tabla 7. Área de producción.....	34
Tabla 8. Variedades de tomates que se cultivan en el cantón Urcuquí.....	35
Tabla 9. Edad promedio del cultivo de tomates en el cantón Urcuquí	36
Tabla 10. Enfermedades recurrentes en los cultivos de tomates del cantón Urcuquí.....	38
Tabla 11. Frecuencia de fumigación de los cultivos de tomates en el cantón de Urcuquí .	39
Tabla 12. Conocimiento por parte de los productores del cantón Urcuquí sobre la existencia de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i>	41
Tabla 13. Conocimiento por parte de los productores sobre la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i>	42
Tabla 14. Secuenciación de ADN	45
Tabla 15. Subespecies de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i>	46
Tabla 16. Distribución por parroquia y coordenadas de los invernaderos con cultivo de tomates en el cantón Urcuquí.....	47
Tabla 17. Presencia de la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i> subespecie <i>michiganensis</i> , en los cultivos de tomate del cantón Urcuquí.....	48
Tabla 18. Comodidades de la sala de exposición	52
Tabla 19. Material audiovisual usado en la exposición	53
Tabla 20. Dominio del expositor sobre el tema	54
Tabla 21. Manejo del auditorio.....	55
Tabla 22. Facilidad de expresión	56
Tabla 23. Importancia de la investigación para la sociedad	57
Tabla 24. La investigación posee perspectiva para estudios complementarios.	58
Tabla 25. Beneficios de la presente investigación para la sociedad	59
Tabla 26. Cumplimiento de los objetivos planteados	60

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVES

Los cultivos de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill) se ven afectados por diversos agentes patógenos, resaltando entre ellos la bacteria *Clavibacter michiganensis*, la cual produce el cáncer bacteriano que causa efectos perjudiciales tanto en la cosecha como en los costos. Controlar los efectos de la mencionada bacteria requiere conocer específicamente la cepa que está actuando en el cultivo. Por tal motivo, el propósito general de este proyecto es caracterizar molecularmente la bacteria *Clavibacter michiganensis* promotora del cáncer bacteriano en tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill), en el cantón Urcuquí. El proceso de caracterización molecular se apoyó en los basamentos teóricos planteados por Mota (2008), Romero (2011), Dickinson (2003), Carbajal (2013), respecto a las técnicas fundamentales para llevar a cabo la caracterización molecular de una bacteria. Para lograr el objetivo mencionado previamente, se determinaron 13 puntos de muestreo, constituido por invernaderos dedicados al cultivo del tomate riñón, de los cuales solo dos no marcaron positivo. Posteriormente, se procedió a la extracción de ADN de las muestras infectadas usando el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®), y fue enviado a Macrogen Korea Inc. para su respectiva secuenciación, identificando que la cepa causante de enfermedad de los cultivos, independientemente de la etapa fenológica en la que se encontraban pertenecen a la misma secuencia relativa más cercana: *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, con un porcentaje de identificación del 87,69 %, siendo de la clase bacteriana Actinobacteria. Luego se realizó un proceso electroforesis y se ratificó los resultados arrojados por la secuenciación de ADN, pues se obtuvo un promedio de 270 pares de bases (bp) aproximadamente, coincidiendo con lo señalado por Pastrik y Rainey (1999), en su estudio sobre las cinco subespecies de la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

Palabras claves: Caracterización molecular, *Clavibacter michiganensis*, cáncer microbiano, tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill)

2. ABSTRACT

Crops of kidney tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) are affected by various pathogens, among them the *Clavibacter michiganensis* bacteria, which produces bacterial cancer that causes harmful effects on both harvest and costs. Controlling the effects of the mentioned bacteria requires knowing specifically the strain that is acting in the culture. For this reason, the general purpose of this project is to molecularly characterize the bacterial *Clavibacter michiganensis* promoter of bacterial cancer in kidney tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill), in the Urcuquí canton. The molecular characterization process relied on the theoretical foundations proposed by Mota (2008), Romero (2011), Dickinson (2003), Carbajal (2013), regarding the fundamental techniques for carrying out the molecular characterization of a bacterium. To achieve the previously mentioned objective, 13 sampling points were determined, consisting of greenhouses dedicated to the cultivation of kidney tomatoes, of which only two did not mark positive. Subsequently, DNA was extracted from infected samples using the PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) commercial kit, and sent to Macrogen Korea Inc. for sequencing, identifying the disease-causing strain of the cultures, regardless of the phenological stage in which they were, belong to the same closest relative sequence: *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis*, with an identification percentage of 87.69%, being of the bacterial class Actinobacteria. An electrophoresis process was then carried out and the results obtained by DNA sequencing were ratified, since an average of approximately 270 base pairs (bp) was obtained, coinciding with that indicated by Pastrok and Rainey (1999), in their study on five subspecies of the bacterium *Clavibacter michiganensis*.

Keywords: Molecular characterization, *Clavibacter michiganensis*, microbial cancer, kidney tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill)

3. INTRODUCCIÓN.

La tecnología, investigaciones y estudios vinculados con la agricultura ha apoyado significativamente a la mejora de técnicas, conocimientos y saberes para los cultivos, no obstante, a la par de esta evolución se han ido desarrollando y expandiéndose bacterias y microorganismos patógenos, que han acabado con muchos cultivos, perjudicando a la producción de alimentos y a los ingresos económicos provenientes de los mismos.

En relación a la propagación de agentes patógenos en los cultivos, cabe destacar el caso de la bacteria *Clavibacter michiganensis*, que se mantuvo confinada al noroeste de los Estados Unidos, en Sinaloa, México y de 1994 a 1996 se extendió rápidamente, estableciéndose en las principales áreas hortícolas de exportación de los Estados de Jalisco, y desde ese entonces se ha ido diseminado por el mundo, trayendo como consecuencia pérdidas significativas en las cosechas de tomates de invernadero y del campo, pues mata plantas jóvenes y disminuye su producción comercial. (Borboa et. al, 2009).

Es de agregar que esta bacteria se transmite por semillas infectadas que luego penetra a los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidátides de la hoja, originando que los folios se marchiten, aparezca estría necróticas, siendo estas las características que permite a los agricultores percatarse de la presencia de la mencionada bacteria, y que muchas veces desconocen como suministrar un tratamiento para contrarrestar y detener su reproducción.

Adicionalmente, es de mencionar que cuando se detecta la bacteria en el cultivo ya existe una epidemia en la plantación, además, por tratarse de una enfermedad vascular, una vez que las plantas se infectan, el control químico es prácticamente imposible. De igual forma, cabe destacar que no existen en el mercado híbrido o cultivares con resistencia genética aceptable, en consecuencia, el manejo debe basarse en prácticas preventivas, dirigidas a reducir el inóculo inicial mediante el uso de semillas/ plantines libres del patógeno, junto con la rotación de cultivo.

Sobre la base de todo lo descrito previamente, se aprecia que en el caso particular de Ecuador, donde se estima que existen cerca de 2000 hectáreas de tomates sembradas bajo invernadero (Ausay, 2015), la presencia de una bacteria patógena como es la *Clavibacter*

michiganensis, que daña los cultivos y es capaz de infectar a cultivos enteros haciendo que se pierdan cifras significativas de las plantas jóvenes, ocasionando pérdidas de orden económico a los agricultores, representa un problema importante que requiere soluciones orientadas hacia la generación de mecanismos reductores de su propagación y permitan la erradicación temprana sin perder grandes escalas de producción.

En otras palabras, es imprescindible controlar los efectos causados por la *Clavibacter michiganensis*, en los cultivos de tomates, para lo cual en primer plano es necesario conocer la cepa que está actuando en el cultivo y evaluar la etapa de formación del mismo, a fin de poder implementar un tratamiento adecuado, valorando factores como tiempo, costos de inversión y posibles pérdidas. En tal sentido, es conveniente destacar, que para conocer la cepa es fundamental identificarla a través de una caracterización molecular, porque sobre la base de ello, es que se puede ejercer el tratamiento adecuado para controlar la bacteria y minimizar las pérdidas del agricultor.

Por todo lo anteriormente expuesto, surge la motivación de caracterizar molecularmente la bacteria *Clavibacter michiganensis* promotora del cáncer microbiano del tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el cantón Urcuquí de la provincia Imbabura. Es conveniente señalar, que la selección del mencionado cantón se debe en primer término a la imposibilidad práctica de abarcar todos los cultivos de tomates en el Ecuador, dada su amplitud y distribución por todo el territorio nacional y en segundo lugar porque es una zona de vocación agrícola, destacándose los cultivos del fréjol, caña de azúcar, maíz y el tomate riñón.

En relación al Cantón San Miguel de Urcuquí, es de resaltar que se encuentra ubicado en la Provincia de Imbabura a 2384msnm, con una superficie de 767 km², donde se ha desarrollado la agricultura desde los asentamientos de la población, gracias a las condiciones y entorno natural que posee; sin embargo, existe un alto porcentaje de agricultores de la zona que no realizan estudios previos de suelo para la fertilización química u orgánica en la siembra o en las diferentes etapas fenológicas de los cultivos del tomate, lo que hace que estos cultivos sean muy vulnerables a la actuación y propagación de la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

De acuerdo a lo expresado hasta aquí, se originó la siguiente interrogante ¿Es posible a través de la caracterización molecular identificar más de una cepa de la bacteria que está afectando a los cultivos de tomate riñón en el cantón Urcuquí?, la cual orienta la presente investigación.

3.1 OBJETIVOS.

3.1.1 Objetivo General.

Caracterizar molecularmente la bacteria *Clavibacter michiganensis* promotora del cáncer bacteriano en tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill), en el cantón Urcuquí.

3.1.2 Objetivos Específicos.

Aislar las cepas bacterianas de (*Clavibacter michiganensis*) de cada uno de los cultivos.

Identificar de forma molecular la bacteria *Clavibacter michiganensis* promotora del cáncer bacteriano en tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill), mediante marcadores moleculares.

Determinar la distribución espacial de las cepas identificadas en las zonas de producción.

Socializar los resultados obtenidos.

3.2 VARIABLES

3.2.1 Variable independiente

Caracterización molecular de la bacteria *Clavibacter michiganensis* presente en los cultivos de tomate riñón del cantón Urcuquí

3.2.2 Variable dependiente

Presencia de las diferentes cepas de la bacteria *Clavibacter michiganensis* en los cultivos de tomate riñón del cantón Urcuquí

4. ESTADO DEL ARTE

4.1 Investigaciones Previas.

Concerniente a la caracterización molecular de la bacteria *Clavibacter michiganensis* promotora del cáncer microbiano del tomate riñón se examinaron diferentes investigaciones que se relacionan, consideradas relevantes mencionar aquellas que aportan para la construcción del problema y metodología, las cuales se muestran a continuación:

Borboa et al. (2009) realizaron una investigación titulada “Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Cmm) en el tomate del estado de Sonora, México” cuyo objetivo consistió en la detección Cmm en tomate en el Estado de Sonora. Para ello, se tomaron muestras de semilla, hoja, tallo y fruto en nueve localidades del estado, comprobando la presencia de Cmm mediante la prueba ELISA, cultivo en medio YDC y NBY, e identificación de colonias por medio de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Este estudio aportó para la contextualización del problema, pues sostiene que los problemas fitosanitarios en cultivos se han incrementado por la ausencia de un diagnóstico certero y oportuno. También señalan, que la caracterización precisa del agente causal del problema es clave para el manejo integrado de enfermedades. Por otro lado, es referente en cuanto a metodología, en especial el muestreo por localidades, el cual se llevó a cabo en sistemas de siembras de invernaderos, casa sombra y campo a cielo abierto.

(Siri, et al. 2015) efectuaron una investigación sobre la temática “Identificación, caracterización y diagnóstico molecular de bacterias patógenas que afectan a los cultivos de tomate” cuyo objetivo fue presentar los avances de investigación en relación al estudio de dos importantes bacterias patógenas de tomate: *Xanthomonas* spp., agente causal de la mancha bacteriana y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), responsable del cancro bacteriano del tomate, enfocándose principalmente en el tipo de cepas presentes en Uruguay, principales vías de infección y diseminación y herramientas moleculares utilizadas para identificación, tipificación y diagnóstico de estos patógenos. Este estudio contribuye a la presente investigación, especialmente en la metodología, pues destacan entre los procedimientos para llevar a cabo una caracterización molecular, el aislamiento de las cepas, la extracción de ADN mediante protocolos clásicos de extracción para bacterias gram negativas (*Xanthomonas*) y gram positivas (Cmm) y expresan que por lo general, se utilizan

dos abordajes moleculares diferente, siendo uno de ellos la amplificación utilizando el método de multiplex-PCR desarrollado por Araújo y colaboradores en el año 2012.

El estudio “Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Schuster, Hoff, Mandel y Lazar) Vidaver y Mandel, usando la reacción en cadena de la polimerasa” realizado por Ayala, Rodríguez, Aguilar, Lara, y Quero, (2004) con el propósito de detectar la *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* en semillas infectadas y plántulas de maíz, es un referente para la presente investigación, en particular lo que se refiere al método utilizado para la caracterización molecular, el cual incluyó la extracción del ADN de plántulas de maíz, las colonias bacterianas fueron aisladas, la identificación de la bacteria se realizó por medio de la PCR utilizando ADN de la cepa y del tejido infectado. Además, concluyen que la técnica de PCR puede presentarse como la mejor opción para la identificación de patógenos puesto que es muy sensible y rápida, demostrando de esta forma que es posible la identificación molecular usando PCR.

4.2 Bases teóricas

La exposición de los aspectos teóricos que sustentan la investigación constituyen un aspecto fundamental tras haber realizado la investigación bibliográfica de varias fuentes, partiendo de considerar los aspectos más generales y de conocimiento universal, nacional y finalmente analizar y establecer que características moleculares presenta la bacteria dentro del área de estudio propuesto con el trabajo de investigación.

4.2.1 Aspectos generales de las bacterias

De acuerdo Iracheta (2009), las bacterias son: “células procarióticas sin núcleo definido, tienen una estructura sencilla cuando se comparan con las células eucariotas; sus formas y tamaños” (p.115) Del mismo modo señala, que las bacterias carecen de sistemas de membranas internas, en el citoplasma se localizan los cuerpos de inclusión, los ribosomas y el nucleóide con el material genético, poseen membrana plasmática, pared celular y en relación a su tamaño puede oscilar desde las más pequeñas con diámetro menor que 0,2 μm ; y las de mayor tamaño de longitud de alrededor de los 500 μm .

Con respecto a su clasificación Iracheta (2009) indica que la mayoría de las bacterias se clasifican en gram positivas y gram negativas, las primeras están formada por una capa de

péptidoglicanos separada de la membrana plasmática por el espacio periplásmico, mientras la pared de una bacteria gram-negativa es compleja, posee una capa de péptidoglicanos que rodea la membrana plasmática y una membrana externa.

En relación a la visualización de los microorganismos, Mora, (2012) sostiene que se usan diversas sustancias colorantes, tales como como la fucsina o safranina, que permite visualizar las bacterias Gram positivas de color azul-violáceo mientras que las Gram negativas se visualizaran de color rojo o rosa, destacando que la reacción de las bacterias a la coloración de Gram se relaciona con diferencias fundamentales de la envoltura celular de estas dos clases de células.

4.2.1.1 Morfología microscópica de las bacterias.

La morfología de las bacterias ha sido un gran tema de discusión e investigación en la comunidad científica, las bacterias según la teoría de Dominguez, (2011), toman las formas determinadas por “sus muros celulares y sus citoesqueletos, y sus formas son tan importantes que determinan su capacidad de sobrevivir y conseguir nutrientes”. Según Lara, (2015) las bacterias por lo general “pueden tener forma de bastón (bacilos), ser esféricas, elipsoidales, espirales, en forma de una coma, o filamentosa” y también afirma que la morfología de las bacterias también se ven afectadas por la forma en la que se pegan en superficies y forman pequeñas colonias llamadas esteras bacterianas.

Por otra parte, de acuerdo a los estudios de Mota y Pérez, (2006), la forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral); dentro de estas últimas se encuentran: *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*. Las espirilos varían en el número de vueltas, desde pocas (*Borrelia*) a muchas (*Treponema*).

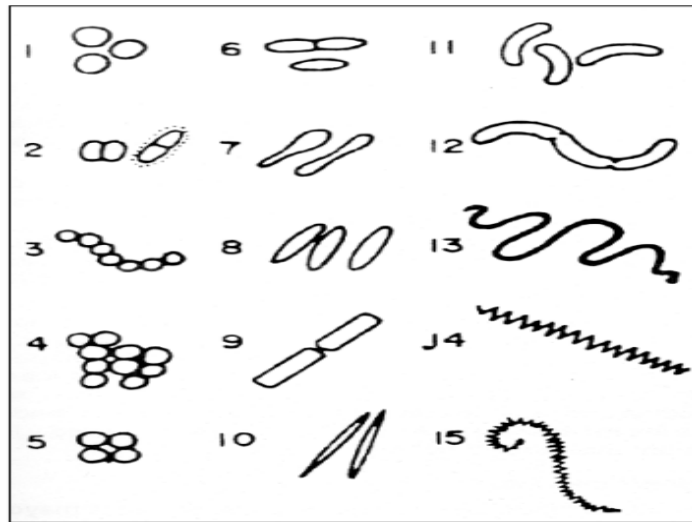


Figura 1. Morfología microscópica de las bacterias
Fuente: Pérez y Mota (2006)¹

4.2.1.2 Morfología macroscópica de las bacterias.

Al respecto Pérez y Mota (2006) aseveran que “la mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados, requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima” (p.23) y generalmente una colonia está constituida por los descendientes de una o unas pocas células, la forma de la colonia que constituyan puede ser circular (*Staphylococcus*), irregular o filamentosa (*Bacillus*).

Las bacterias pueden tener estructuras variables dentro de un mismo grupo bacteriano o una misma cepa bacteriana, todo depende de las condiciones en donde se desarrolle, pues las estructuras variables no resultan esenciales para la vida de la bacteria.

¹ 1. Cocos, 2. Diplococo, 3. Cocos en cadenas, 4. Cocos en racimos, 5. Cocos en tétradas, 6. Cocobacilos, 7. Bacilos, 8. Bacilos bordes redondeados, 9. Bacilos bordes rectos, 10. Bacilos fusiformes, 11. Bacilos curvos, 12. Bacilos curvos, 13. Espiroquetas, 14. Espiroquetas, 15. Espiroquetas

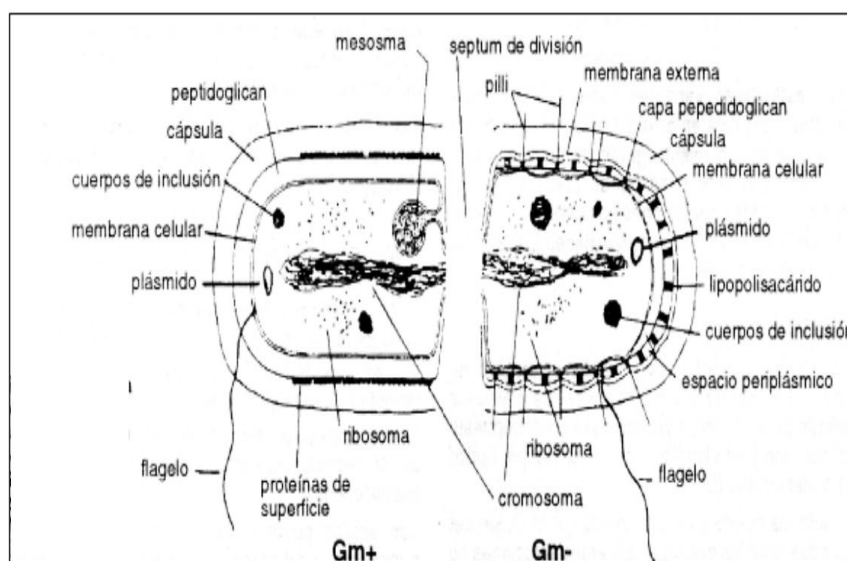


Figura 2. Diagrama de la pared bacteriana.

Fuente: Mota y Pérez, (2006)²

4.2.2 Enfermedades bacterianas

Lara (2015) manifiesta, que una enfermedad en vegetales se puede definir como cualquier proceso nocivo que interfiere con el normal funcionamiento de una planta y que es provocado por un patógeno o causa abiótica, deben estar presentes organismos patogénicos y una planta susceptible.

De igual modo, expresa que el desarrollo de una enfermedad no se producirá si no existen las condiciones ambientales adecuadas para que el patógeno ataque la planta”, es decir, las enfermedades se desarrollan cuando hay la interacción entre el patógeno, planta y ambiente, además la variabilidad de uno de estos factores afectará severamente el desarrollo de una enfermedad.

4.2.3 Bacteria *Clavibacter michiganensis*

Esta bacteria es un bacilo Gram positivo, no móvil, aeróbico, productor de capsula, que en agar nutritivo desarrolla colonias de color amarillo claro o naranja, mucóide, cuya temperatura óptima de crecimiento in vitro es de 25 a 28°C. De acuerdo a Schaad et al., 2000; Jones et al., 2001 (citados en Borboa et al, 2009), esta bacteria también es conocida

² Bacteria gram positiva a la derecha y bacteria gram negativa a la izquierda.

como: “Ojo de pájaro”, “mancha ocular” y “marchitez bacteriana”, nombre que recibe de acuerdo al daño que ocasiona dicho patógeno y convertida actualmente en una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de tomate en México y el mundo, ya que puede llegar a causar pérdidas en la producción de hasta un 70 % en cultivos a campo abierto y en los protegidos pueden ser totales, sino se trata adecuadamente.

El chancro bacteriano del tomate es una enfermedad causada por *Clavibacter michiganensis* subespecie. *michiganensis*, [Cmm] detectada por primera vez en Michigan, Estados Unidos, en el año 1910, considerada hoy día como la principal bacteriosis de este cultivo a escala mundial, la enfermedad bacteriana más grave del tomate, responsable de pérdidas económicas muy importantes en todo el mundo, al punto de acabar hasta con el 90% de la producción de tomate. (Infoagro, 2010)

De lo dicho hasta aquí, se pone de manifiesto como esta bacteria se ha expandido a nivel mundial, afectando en cualquier campo las plantaciones de tomate, generando pérdidas significativas en su producción ya sea al aire libre como en los invernaderos.

En cuanto a la taxonomía, Borboa et al, (2009) señala lo que se refleja en la tabla 1.

Tabla 1.

Taxonomía de la bacteria

Dominio:	Bacteria
Clase:	Actinobacteria,
Subclase:	Actinobacteridae
Orden:	Actinomycetales,
Suborden:	Micrococccineae
Familia:	Microbacteriaceae
Género:	<i>Clavibacter</i>
Especie:	<i>michiganensis</i>

Adaptado de: Borboa et al. (2009)

En relación a los signos que indican presencia de *Clavibacter michiganensis*, según Martínez (2012), destaca la marchitez bacteriana y manchas en los tomates, siendo el marchitamiento marginal de folíolos, uno de los primeros síntomas en plantas de todas las edades,

posteriormente aparecen estrías necróticas que se extienden desde la parte inferior del peciolo hasta el punto de unión con el tallo.

Hay que mencionar, además que en las plantaciones al aire libre, los síntomas suelen aparecer al final de la primavera o comienzo del verano, mostrando fundamentalmente el marchitamiento sistemático de la planta, lo que implica la curvatura hacia abajo (epinastia) de los folíolos más cercanos al suelo, que a menudo ocurre de forma unilateral, el abarquillamiento hacia arriba y el secado de los márgenes de los folíolos, que acaban secándose totalmente, los brotes aparecen mustios, denotando la falta de agua debido a la invasión de los vasos por la bacteria, los cuales progresan tallo arriba. (Infoagro, 2010).

Otros rasgos a resaltar, es que la bacteria *Clavibacter michiganensis* prospera en ambientes cálidos y húmedos, salen por las grietas en los tallos a su superficie, posteriormente se extienden a las hojas y frutos donde causan infecciones secundarias impidiendo su cosecha y el consumo humano, perjudicando significativamente al cultivo en toda su proporción generando pérdidas al agricultor. Por consiguientes, para evitar estas bacterias en los cultivos se requiere tomar medidas de precaución desde la siembra de los tomates, durante y después de la recolección de los productos, ya que únicamente son necesarios niveles muy bajos de contaminación de la semilla para iniciar una epidemia importante.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, se aprecia que es imprescindible controlar esta bacteria debido a su peligrosidad de invasión total del cultivo y en el caso de observar alguno de los síntomas previamente puntualizados, se debe poner en conocimiento a los organismos reguladores de la producción agrícola como a los productores de esta especie, con el fin de tomar medidas para interactuar en contra de la bacteria.

4.2.3.1 Condiciones predisponentes

Son algunos factores que deben conjugarse para corroborar al desarrollo de esta bacteria, uno de ellos es la temperatura que oscila entre los 18-24° C y una elevada humedad relativa 80%, constituyen condiciones que favorecen las infecciones.

Así mismo, cuando se usan los utensilios de poda a intervalos regulares (al comienzo de la fila) y no se toman medidas como sumergirlos en alcohol o hipoclorito de sodio, lavarse las manos frecuentemente con agua y jabón. Evitar los riegos por aspersión, el exceso de

humedad en general ayuda a que la bacteria se desarrolle. Se recomienda la rotación de cultivos eliminando los residuos de la siembra para eliminar cualquier tipo de infección.

Otra de las características que se debe tomar en cuenta es el manejo de distancia de siembra, ya que, si la densidad es muy alta, es muy probable que la incidencia de enfermedades sea mayor debido a la baja aireación, mientras que las plantas competirán entre ellas por la luz, el agua y los nutrientes, además el proceso de aporcado y poda se harán más difíciles por falta de espacio entre las plantas para trabajar. En tal sentido, Escobar & Lee, 2009 señalan que “una densidad más elevada de lo recomendado implicará un mayor costo en material vegetal y en insumos, mayores problemas sanitarios y una menor calidad en el tamaño de los frutos” (p.85)

Por su parte López, (2016) manifiesta que independientemente del área que se utilice para el cultivo es importante tener en cuenta el marco de plantación, ya que este varía dependiendo si el cultivo se desarrolla a campo abierto o bajo invernadero, pues “la densidad de siembra en ambientes protegidos se encuentra entre 20 000 plantas/ha y 22 000 plantas/ha.” (p.77). Concerniente a los marcos de plantación del tomate, se tiene lo siguiente:

Tabla 2.

Marco de plantación del tomate

1,0 x 0,20 m	=	50 000 plantas por hectárea
1,10 x 0,30 m	=	33 333 plantas por hectárea
1,20 x 0,30 m	=	27 777 plantas por hectárea

Fuente: Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar (2003)

Por otro lado, Martinez, (2012), también señala como condición predisponente el hecho de no se desinfectar las espalderas, estructuras de invernadero, cuerdas y alambres con hipoclorito de sodio o agua con formol, pues en algunas ocasiones solo los tratamientos del suelo con bromuro de metilo han fallado.

En síntesis, son diversas las condiciones o factores a considerar para evitar la afectación a causa de la bacteria *Clavibacter michiganensis* y mantener un cultivo sano.

4.2.3.2 Afecciones de la bacteria.

Las plantas infectadas con *Clavibacter michiganensis*, en particular por la subespecie *michiganensis* (Cmm), pueden pasar desapercibidas, simulando ser plantas sanas pues presentan una infección latente que no muestra síntomas o éstos son muy leves y los síntomas de la enfermedad solo son observables cuando la infección ya está avanzada y es muy difícil erradicar, por lo que es importante cultivar y comprar semillas en establecimientos autorizados que cumplan con los certificados de calidad. Las plantas con infecciones de este tipo constituyen una fuente de semillas contaminadas, y son la mayor causa de nuevos brotes de la infección. Delgadillo et al. (Guerra, Delgadillo, Hernandez, Guerra, y Sanchez, 2016)

En esta misma dirección, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias Chile, (2016) estima que la principal afección es el marchitamiento sistémico de la planta, lo cual incluye enrollamiento de hojas basales, necrosis marginal de folíolos, marchitez unilateral de hojas. Así mismo, señala que el progreso de la infección es lento, atacando al final el brote en crecimiento, ocasionando en el interior una decoloración del tejido vascular, amarillo rojizo a pardo rojizo y cuando son ataques severos se observa decoloración de la médula, la que adquiere una consistencia harinosa.

Es de agregar que los síntomas en hoja son difíciles de determinar, ya que suelen ser confundidos con una mala aplicación de agroquímicos cuando las manchas necróticas se extienden, también puede confundirse con otras enfermedades como la mancha bacteriana, peca bacteriana, tizón temprano o daño por ácaros, pero la ubicación de las afecciones en la planta puede determinar porque enfermedad es causada. Además, al ser una enfermedad localizada en el sistema vascular, sus síntomas dependerán de múltiples factores como las prácticas culturales, estado nutricional del cultivo, estado fenológico de la planta, y sin duda, de las variables climáticas y de la capacidad propia de la bacteria para colonizar. (Fertilab, 2018)

En otras palabras, ataca al sistema vascular y al tejido parenquimatoso, por lo que sus síntomas dependerán de distintos factores, los agricultores pueden percatarse de la existencia de la bacteria por presentar hojas inicialmente con pequeñas áreas húmedas de color verde claro, luego se desecan, toman una apariencia de color pardo claro y se extienden. Además, los daños en la planta pueden darse en cualquier edad o etapa fenológica que este, por lo cual

un monitoreo constante puede prevenir la infección de los cultivos si se retira a tiempo las plantas infectadas.

También cabe resaltar que uno de los principales síntomas en el follaje es la flacidez del último foliolo de la tercera o cuarta hoja del brote principal hacia abajo, estos síntomas son más evidentes en las horas más calurosas del día.

Por otra parte, es de mencionar que, aunque el pimiento y otras especies de solanáceas también son sensibles a la enfermedad, el tomate es la especie más afectada, y en la que puede llegar a ocasionar pérdidas importantes, tanto en cultivos protegidos como al aire libre. La gravedad de la enfermedad se ve incrementada por su facilidad de dispersión y porque no existen tratamientos químicos curativos. (Infoagro, 2010)

Además, se propaga a otras plántulas al tocarlas con las manos o herramientas contaminadas y por el agua en los cultivos a pleno campo, por ejemplo: por salpicaduras de lluvia o irrigación, tanto en los invernaderos como en el campo, la bacteria puede sobrevivir un tiempo en los residuos del cultivo. Las numerosas labores de manipulación del cultivo facilitan la dispersión y la penetración de la bacteria en los tejidos vegetales infectando a grandes porcentajes de la producción.

4.2.3.3 Impacto económico de la bacteria

Son muchos los impactos económicos que puede producirse por la bacteria *Clavibacter michiganensis* en el cultivo del tomate, el principal se evidencia en la pérdida total del cultivo afectando la economía por la pérdida del capital de inversión, sin embargo, cuando no se presenta una propagación completa, también representa económicamente un impacto ya que generan gastos para la identificación de la cepa, del territorio afectado, y de la implementación de los bactericidas necesarios para que el cultivo del tomate continúe con su proceso de desarrollo.

En el Ecuador no se registra información oficial que demuestre la presencia de esta bacteria en el territorio nacional, esto se pudo constatar luego de realizar una exhaustiva búsqueda de información a través de medios físicos y digitales, solicitar información al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], quienes corroboraron la inexistencia de datos acerca de esta bacteria en el país (anexo 1), sin embargo, existen trabajos de titulación realizados en diferentes universidades del país entorno a esta bacteria, tales como:

- Obtención de un coctel de bacteriófagos líticos para el control de bacteriosis en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) del Cantón Ambato, Provincia de Tungurahua. (Lara , 2015)
- Determinación y caracterización de enfermedades bacterianas del tomate riñón (*Lycopersicon sculentum*), cultivado bajo invernadero en doce áreas de la cordillera central del Ecuador. (Guevara, Terry, Coello, y Norma, 2008)

Los estudios mencionados anteriormente denotan la presencia de la bacteria, sin embargo, ninguno de ellos hace un estudio que revele cifras económicas relacionadas con los impactos que trae la bacteria.

4.2.3.4 Medidas de erradicación y prevención de la bacteria

Cuando la bacteria ya ha infectado el cultivo es muy difícil contrarrestarla, si viene a ser cierto no existen tratamientos químicos ni medidas efectivas para el control de esta enfermedad. Las medidas de lucha se basan en la prevención, en la higiene y calidad de las semillas, otra de las alternativas es evitar densidades de plantación altas y abonados nitrogenados excesivos. (Infoagro, 2010)

Es fundamental implantar el cultivo con semillas (test de inmunofluorescencia u otros) o plantines sanos. En caso de que se presenten plantas enfermas, es necesario recolectarlas en una bolsa, así como las sanas próximas a ellas, y quemarlas. (Martinez, 2012), también se debe desinfectar la maquinaria y herramientas utilizadas en el cultivo, quemar los restos vegetales que quedan en el suelo tras la cosecha y realizar rotación de cultivos con plantas no solanáceas durante al menos dos años.

En muchos de los casos el desconocimiento de la existencia de la *Clavibacter michiganensis* ha permitido que los agricultores tengan gastos inútiles, pues aplican químicos que por referencia escucharon de otros vecinos sin proveer a los cultivos de asistencia técnica, para combatir esta bacteria. Al respecto, el Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura de Mexico, (2016) recomienda, que si se desea incorporar químicos a los cultivos para luchar contra esta bacteria se puede aplicar químicos autorizados por la Agencia de Protección Ambientas de Estados Unidos [EPA] empleados para cáncer bacteriano, los cuales se reflejan en la tabla 3.

Tabla 3.

Químicos para el control preventivo de la bacteria Clavibacter michiganensis

Ingrediente activo	Dosis/ha (Kg)	LMR (ppm)	Días a cosecha	Tipo de acción	Grupo Toxicológico	Modo de acción
Oxicloruro de cobre	2 - 4	Exento	Sl	Preventivo	Inorgánico	Protector de contacto
Mancozeb	2 – 4	4	5	Preventivo	Ditiocarbamatos	Protector de contacto, preventivo.
Estreptomicina	0,3 – 0,4	0,25	5	Preventivo	Aminoglucósidos	Sistémico; absorbido vía foliar
Hidróxido cúprico	2 - 4	Exento	Sl	Preventivo	Inorgánico	Protector de contacto
Acibenzolar –s- metil	0,02 – 0,04	1	17	Preventivo	Benzotiadiazoeles	Sistémico

Fuente: Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura de Mexico, (2016)³

4.2.4 Descripción general y taxonómica del tomate

Nombre vulgar: Tomate

Tipo de cultivo: Hortícolas

Nombre científico: *Solanum esculentum*

El centro primario de origen del tomate y de las especies silvestres emparentadas, es el “Genocentro sudamericano” que comprende las regiones situadas a lo largo de la cordillera de los Andes. El descubrimiento de su riqueza vitamínica, junto con su agradable gusto y color popularizó el consumo, y actualmente ocupa unos de los primeros puestos en el consumo mundial de los productos hortícolas.

³ LMR: Límite máximo de residuos
Sl: Sin límite

Taxonomía:

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las Solanáceas. De acuerdo con Hunzinker (1979), la taxonomía generalmente aceptada, es tal como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4.

Clasificación taxonómica del tomate riñón

Clase:	Dicotyledoneas.
Orden:	Sonales (Personatae).
Familia:	Solanaceae.
Subfamilia:	Solanoideae.
Tribu:	Solaneae.
Género:	Solanum.
Especie:	<i>Lycopersicum</i> .

Fuente: Hunzinker (1979)

La producción de tomate en el país tiene gran relevancia en la alimentación, economía y salud, los cultivos se han desarrollado gracias a las propiedades de clima y suelo que el país ofrece; la mayor parte de los consumidores eligen la variedad del tomate de acuerdo a sus características relacionadas con el sabor, dureza, tamaño y tiempo de conservación al ambiente. Conociendo las exigencias del mercado los productores se han orientado en cultivar las variedades que cumplan con estas características, de acuerdo a la información de los estudios realizados por Varela (2018) hace referencia que las variedades más consumidas en el Ecuador son los señalados a continuación en la tabla 5:

Tabla 5.

Variedades de tomate presentes en el Ecuador

VARIEDAD	CARACTERÍSTICAS
Fortaleza	Es ideal para invernadero. El fruto crece aún en zonas frías y con baja luminosidad. Tiene excelente color y firmeza. Crece, principalmente, en los valles de la Sierra.
Fortuna	A los tres meses comienza a producir. Se cultiva bajo invernadero. Es resistente y dura hasta un mes en la percha.
Cherry	El fruto es del tamaño de una cereza. Necesita mucha luz y crece en clima tropical. Su área de producción es mínima y su mercado está dirigido a la cocina gourmet.
Chonto	Es una variedad de fruto mediano. La consistencia del tomate chonto es dura y muy resistente a los viajes largos.
Pietro	La mata es vigorosa. Tiene larga vida en la percha.
Charleston	Es un híbrido de larga vida. Los frutos son firmes y tienen un excelente sabor
Titán	Su fruto es redondo. Es ideal para el cultivo a campo abierto y bajo invernadero. Son muy firmes y resistentes a la manipulación.
Sheila	Esta variedad es muy apreciada para cultivos a campo abierto y en invernadero

Fuente: Varela (2018)

En tal sentido, Jaramillo, (2015) menciona que las variedades de tomate se diferencian principalmente por el uso: consumo fresco e industrial, esto explica el cultivo de diferentes tipos de tomate, además que el consumo está condicionado por la oferta del mercado, de acuerdo a la temporada y ubicación geográfica.

4.2.4.1 Etapas fenológicas del tomate

La fenología del tomate comprende las etapas que forman su ciclo de vida, distinguiéndose tres principales de desarrollo, que reciben el nombre de: inicial, vegetativa y reproductiva

Las plantas jóvenes son más vulnerables que las adultas, en estas la bacteria está ubicada en los vasos del xilema, después de la infección, sobreviene un largo periodo latente, apareciendo los síntomas a medida que la planta alcanza su madurez, cuando atraviesa la etapa de estrés máximo debido a la pesada carga que constituyen sus frutos. (Jensen, 2008)

El cáncer bacteriano es una enfermedad que desafortunadamente no suele presentar síntomas en etapas tempranas por lo que es difícil detectar a tiempo para tener un buen control los síntomas iniciales se presenta cuando inicia el periodo de floración donde se llegan a ver plantas con una marchitez unilateral que posteriormente se expande a toda la planta. (Martínez, 2016)

La enfermedad puede desarrollarse en la semilla, por lo cual es sumamente importante cerciorarse que las compañías semilleras manejen protocolos higiénicos de desinfección, sin embargo, la desinfección no sólo puede provenir de la semilla, pues también “las bacterias penetran a los tejidos vasculares principalmente a través de heridas, aunque también penetran por estomas, tricomas e hidátides de las hojas” (Vargas, 2005, p.23)

Las plántulas son vulnerables en cualquier etapa de desarrollo, por lo tanto, se debe procurar estar pendiente a cualquier síntoma; generalmente las plántulas infectadas se mueren rápidamente o producen plántulas débiles, si las condiciones para el desarrollo de la enfermedad no son favorables las plántulas pueden generar plántulas aparentemente sanas hasta el trasplante a campo. (Blancard, 2011)

2.1.4.2 Enfermedades del tomate

El tomate riñón, según Sosa (2013) es uno de los productos hortícolas que ha sido atacado por “hongos, bacterias, virus y micoplasmas, o pueden ser malformaciones fisiológicas producidas por factores ambientales, nutricionales y de manejo de cultivo, entre otros” (p.9), para su control y erradicación los horticultores usan agroquímicos que en varios casos no son recomendados por quienes brindan asistencia técnica. Los cultivos del tomate muestran afecciones similares en la hoja, tallos y frutas con ubicaciones y pigmentación diferente de

acuerdo a la enfermedad patrocinatora. Muchos horticultores pueden identificar la presencia de un agente patógeno o afección por la experiencia adquirida de manera nata, mas no tienen la certeza técnica de los patógenos que aquejan los sembríos.

Debido al gran número de enfermedades que atacan al cultivo de tomate es entendible que se genere confusión entre los agricultores al momento de identificar los síntomas, realizando una comparación bibliográfica de los síntomas provocados por la bacteria *Clavibacter michiganensis* con otros patógenos se comprueba que hay similitudes, por ejemplo una de las características de *Clavibacter michiganensis* es los tejidos vasculares al principio toman un color amarillento que posteriormente se vuelven de color marrón, esta característica puede ser confundida con el *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, el primer síntoma que se observaba sobre las plantas era el amarillamiento de las hojas más viejas que se veía de un solo lado en los folíolos. Otro síntoma característico es el color marrón oscuro de los vasos que se observaba al cortar el tallo tanto a lo ancho como a lo largo; otra de las afecciones con características similares es la *Ralstonia solanacearum* donde el sistema vascular de la planta al principio aparece de un color amarillento para posteriormente tornarse marrón oscuro con el avance de la enfermedad.

Además, cuando la planta es atacada por *Clavibacter michiganensis* la corteza del tallo se desprende fácilmente. Los síntomas aparecen más rápido en las plantas jóvenes que en las adultas. En la fruta aún inmadura se observa la clásica mancha de «ojo de pájaro».

Cabe recalcar que el Cáncer Bacteriano es causado por una bacteria, pero existen hongos que pueden afectar a las plántulas del tomate con síntomas parecidos que provocan la confusión a la hora de determinar la afección de la planta.

De manera que lo más recomendable es diagnosticar correctamente el problema, para seleccionar el producto a aplicar a fin de erradicar la afección, otro de los aspectos que se debe tener presente es suministrar la dosis recomendada en la etiqueta, utilizar el equipo de aplicación en buen estado, aplicar correctamente el producto logrando un buen cubrimiento y de manera oportuna.

4.2.5 Proceso de la caracterización molecular

La caracterización sirve para determinar las cualidades o rasgos característicos de una persona o una cosa, en este caso particular está asociado a las cualidades y rasgos de la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

Respecto a la caracterización molecular, la institución Colección española de cultivos tipo [CECT], (2017) señala que es un estudio de la morfología colonial de la cepa (homogeneidad, tamaño, forma, color, opacidad y textura de las colonias) y su observación al microscopio (forma y tamaño celular, movilidad, etc.), incluye además la determinación del Gram, la catalasa y la oxidasa para células procariotas.

Por medio de la caracterización del tomate riñón se podrá identificar microorganismos, diferenciar cepas, su desarrollo y características, cuyos resultados servirán como aporte para estudios de distribución epidemiológica y de esta manera conocer las características del organismo para poder clasificarlo y apartarlo evitando que se propague en toda la producción.

Según la consultora M y O Consulting (2008) “la caracterización morfológica y/o molecular de individuos permite determinar el grado de diversidad genética y su distribución, entre y dentro de poblaciones de una determinada especie; así como, el establecimiento de relaciones filogenético” (p.1)

4.2.5.1 Pruebas bioquímicas

Tinción Gram

La coloración de Gram es la más usada en bacteriología; debe su nombre a quién la describió en 1884. Es una coloración diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en gram positivas o gram negativas. Las primeras se tiñen de color azul violeta y las segundas adquieren un color rosado o rojo. La diferente reacción de las bacterias a la coloración de Gram se relaciona con diferencias fundamentales de la envoltura celular de estas dos clases de células, (Mota y Pérez, 2006)

De acuerdo a la morfología la Cmm se caracteriza por 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”. (Romero, 2011, p.17).

En esta coloración los reactivos actúan de la siguiente manera: El cristal violeta colorante primario tiñe las bacterias y la solución yodada hace de mordiente o fijador de color y las bacterias se observarán teñidas de un azul más fuerte.

Vale mencionar que antes de procesar la coloración se debe realizar la preparación de frotis, cuya actividad consiste en extender homogéneamente la muestra, para posteriormente secarse y fijarse, con la primera se pretende la muerte de los microorganismos, la adhesión a la lámina y la conservación de su morfología. Después de preparar y fijar el frotis, se puede realizar cualquier tipo de coloración.

Fermentación de azúcares con agar [TSI]

El TSI es un medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de los hidratos de carbono: glucosa, lactosa y sacarosa y a la producción de ácido sulfúrico, para su aplicación Hajna (citado en Dickinson, 2003) desarrolló la siguiente fórmula de agar TSI:

Añadiendo sacarosa a la fórmula de azúcar doble (glucosa y lactosa) de agar Kligler hierro^{1,2}. El agar triple azúcar hierro contiene tres carbohidratos (glucosa, lactosa y sacarosa). Cuando dichos carbohidratos se fermentan, la producción resultante de ácido es detectada por el indicador rojo fenol. Se producen cambios de color: amarillo para la producción de ácido y rojo para la alcalinización. Dado que la lactosa y la sacarosa se encuentran presentes en concentraciones mucho más elevadas que la glucosa. (p.9)

Cabe destacar, que Borboa et al. (2009), señalan que la bacteria *Clavibacter michiganensis* es fermentadora de glucosa, sacarosa y maltosa, esta reacción comprobada en diferentes estudios donde mediante la caracterización bioquímica se seleccionaron “las colonias que presentaron crecimiento en NaCl 6 %, fermentaron glucosa, sacarosa y maltosa, pero no fermentaron arabinosa ni xilosa; además utilizaron glicerol y manitol como fuentes de carbono y no expresaron actividad de citocromo oxidasa”. (p.322)

Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico total se realiza a partir de la bacteria previamente aislada y purificada mediante el uso del protocolo para bacterias gram positivas proporcionado por

PureLink® Genomic DNA para utilizar el Mini Kit, hay considerar que su correcta aplicación puede ahorrar un valioso tiempo en la ejecución del experimento y generar los resultados que se busca con la investigación.

Los factores que se deben considerar para la aplicación del Ki de extracción son los siguientes:

- Origen de la muestra: puesto que los kits son utilizados según su procedencia, estos pueden ser tejidos humanos, sangre, pelo, tejidos de roedores, hojas, bacterias, levaduras, hongos, insectos, heces, fluidos corporales, esporas, suelo, muestras clínicas, muestras forenses y huellas dactilares.
- Forma de preparación: Otra de las consideraciones que se debe tener presente es la forma de preparación esta puede ser: “precipitados frescos o previamente congelados, secciones de tejidos embebidos en parafina o fijados con formalina, secciones de tejido congelado, células fijadas en etanol y muestras preservadas en Orange®”, (Carbajal, 2013).
- Uso previsto: La calidad y pureza del ADN obtenido con el kit debe ser la adecuada para las subsiguientes aplicaciones, las cuales pueden ser secuenciación, determinación del perfil genético, PCR, qPCR, Southern blot, RAPD, AFLP y RFLP, digestiones con enzimas de restricción, preparación de bibliotecas génicas mediante secuenciación por “shotgun”. (Carbajal, 2013)
- Contenido húmico: Si la muestra presenta contenido húmico tal como compost, sedimento y estiércol, se debe utilizar un kit/método que elimine tales sustancias, ya que podrían inhibir las subsiguientes aplicaciones como la PCR. (Carbajal, 2013)
- Cantidad de muestra: El kit a ser utilizado depende del número de células de mamífero cultivadas (105-107) y células bacterianas (106-1011), tejido (mg), cantidad de sangre (100 µl a 1 ml), suelo (250 mg - 10 g), tejido de hoja de planta (mg), etc. (Carbajal, 2013)
- Rendimiento.
- Automatización.
- Simplicidad.

Es conveniente señalar que por lo general para la extracción del ADN cada uno de los kits trae las instrucciones según su fabricante y su operación depende de la experiencia del personal. (Carbajal, 2013).

4.2.5.2 Técnica utilizada para la identificación de cepas

A veces no es suficiente con la identificación de especies y es necesario ir más allá., a fin de poder diferenciar a nivel de cepas. Para ello, existen otras técnicas de biología molecular, entre las cuales se distinguen de acuerdo a Bouton et al. (2016), las siguientes:

- Cariotipo o separación de cromosomas en PFGE: “La técnica se basa en la separación de cromosomas en electroforesis de campos pulsados (Pulsed Field Gel Electrophoresis) que provoca una reorientación molecular del ADN, que es diferente dependiendo del tamaño molecular”. (p.4)
- Análisis de restricción del ADN mitocondrial [ADNmt]: El ADNmt de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es una pequeña molécula con variabilidad dentro de la especie, así que puede ser utilizada para diferenciar cepas. Necesita un trabajo previo de extracción del ADNmt mediante la obtención de protoplastos y purificación del material genético.
- RAPD-PCR: La técnica RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic ADN-PCR) consiste en amplificar al azar secuencias mediante la utilización de oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria. Estos oligonucleótidos hibridan de manera inespecífica y aleatoria a diferentes lugares del genoma, lo que permite la amplificación de fragmentos polimórficos de ADN. La gran ventaja de esta técnica es que no es necesario información previa de ninguna secuencia determinada y el principal inconveniente, es la reproducibilidad de resultados.
- Microsatélites: Los microsatélites son repeticiones en serie de secuencias cortas. Estas repeticiones están distribuidas a lo largo del genoma y son altamente variables entre especies. Este elevado polimorfismo hace que los microsatélites sean unos buenos marcadores moleculares para la identificación intra e ínter específico.
- Secuencias delta (δ): “Estos elementos son secuencias de 330 pares de base que están distribuidos de manera frecuente en el genoma de las levaduras. La técnica se basa en

la utilización de cebadores específicos a estos elementos delta (δ) para amplificar las secuencias comprendidas entre estos elementos”. (p.6)

- **AFLP:** La técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) se basa en la amplificación selectiva mediante PCR de los fragmentos de restricción de la digestión total de ADN. La detección de polimorfismo se observa en un gel de poliacrilamida a través de electroforesis capilar. Es una técnica muy sensible y reproducible, pero requiere alta inversión y personal especializado, por lo que no es muy utilizada en enología.
- **Microarrays:** “La técnica de análisis del ADN mediante la utilización de microarrays, ha revolucionado la investigación y el desarrollo de estudios genómicos. Gracias a la alta densidad de los modernos microarrays, se puede medir el nivel de expresión de genes funcionales” (p.7)
- **PCR a tiempo real:** La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase Caín reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología, como se ha visto antes, se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

Reacción en Cadena de polimerasa - PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). (Tamay de Dios, Ibarra, y Velasquillo, 2013)

En tal sentido Pérez, (s.f) refiere que “la importancia del descubrimiento de la PCR reside la posibilidad de generar muchas copias de un fragmento de DNA y distinguirlo del resto del DNA total extraído (p.4), y gracias a esta propiedad es utilizada en muchas áreas de la biología, medicina, ecología y agronomía.

Por su parte, Rodríguez, (2007) expresa que la PCR en tiempo real es uno de los métodos cuantitativos más confiables y sensibles para análisis de expresión génica. Esta técnica ha sido ampliamente aplicada para la verificación de microarreglos, genotipificación, cuantificación de cáncer, determinación de número de copias de genes heterólogos, y estudio de terapias de drogas.

Cebadores para PCR

Al igual que otras ADN polimerasas, la Taq polimerasa solo puede hacer ADN si hay un cebador, una corta secuencia de nucleótidos que proporciona un punto de partida para la síntesis de ADN. En una reacción de PCR, la región de ADN que será copiada, o amplificada, se determina por los cebadores que el o la investigadora elija.

De acuerdo a Khan Academy (2017), los cebadores para PCR “son pedazos cortos de ADN de cadena sencilla, generalmente de unos 20 nucleótidos de longitud. En cada reacción de PCR se utilizan dos cebadores que están diseñados para flanquear la región blanco (la región que debe ser copiada)”. Es decir, se agregan secuencias que harán que se unan a cadenas opuestas del molde de ADN solo en los extremos de la región a copiar. Los cebadores se unen al molde según el complemento de las bases.

Es de mencionar, que para este estudio se utilizará el espaciador intergenico ubicado entre los genes ribosomales 16S y 23S, ya que estos fueron utilizados en investigaciones anteriores donde el objetivo fue el desarrollo de métodos fáciles y rápidos basados en PCR para la identificación y diferenciación de subespecies de *Clavibacter michiganensis* aplicando

PSA – 4: 5'TCA – TTG –GTC – AAT –TCT – GTC – TCC- C-3'

PSA – R: 5' - TAC – TGA – GAT – GTT – TCA – CTT – CCC-C-3'

Modelos que también fueron aplicados por Pastrok y Rainey, (1999), y además desarrollan estudios donde mencionan dos técnicas diferentes basadas en PCR, siendo estas las siguientes:

- Amplificación con subespecies: cebadores específicos basados en datos de secuencia de la región espaciadora intergénica entre los genes de ARN 16S y 23S.
- Amplificación con cebadores aleatorios: El espaciador intergénico en el operón de ARNr entre los loci 16S y 23S se ha utilizado para comparar organismos relacionados de forma estrecha y distante.

Por otra parte, Holley, (2012) manifiesta que el ARN-m en bacterias, parece llevarse a cabo gracias a la existencia de unas secuencias cortas que preceden a los codones de iniciación y que son complementarias de secuencias del extremo 3' del ARN-r 16S de la subunidad pequeña (30S) de los ribosomas. Dichas secuencias fueron detectadas por Dalgarno y Shine (1974) y se las ha denominado secuencias Dalgarno - Shine. En eucariontes no se han detectado estas secuencias en el ARN-r 18S y la traducción comienza siempre por el triplete AUG más cercano al extremo 5' del ARN-m. Se ha propuesto que el ribosoma se une al ARN-m por su extremo 5' con el tapón o cap y se movería hacia el extremo 3' hasta encontrar el primer AUG.

En relación al objetivo de los genes ribosomales 16S y 23S, Vallejo, (2010) lo considera como una función estructural, sirviendo como un soporte para definir la posición de las proteínas ribosomales. “La subunidad 30S contiene una molécula única de ARNr, denominada ARNr 16S” (p.9) el gen ribosomal 16S con el 23S rRNA, favorecen la unión de las subunidades 50S y 30S.

Por otro lado, Suárez, (2017) asevera que para determinar el microbioma en una muestra biológica, se parte del ADN que se extrae, se amplifica y se secuencian los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN (ácido ribonucleico) ribosomal, molécula antigua ya propuesta por Carl Woese en 1975, pero presente en todas las bacterias actuales, y cuya estructura y función han permanecido constantes a lo largo del tiempo. La subunidad 16S del ARN ribosomal es considerada como la diana universal para la identificación bacteriana, por sus características y propiedades que permiten la caracterización taxonómica de las bacterias.

Adicionalmente, (Vallejo, 2010) sostiene que conjuntamente con sitios de unión para partidores altamente conservados, la secuencia del gen 16S rRNA contiene regiones hipervariables que pueden proporcionar secuencias específicas muy útiles para la identificación de bacterias. . En la actualidad se ha implementado el uso de técnicas

moleculares para una correcta identificación de los bacilos Gram positivos aerobios no esporulados, siendo la secuenciación parcial del gen 16S ARNr la más utilizada. Sin embargo, este procedimiento requiere una carga laboral y consumo de tiempo importantes, lo cual dificulta su uso en el laboratorio clínico.

Secuenciación de ADN

Necochea y Canul, (2004) aseveran que en 1977, se reportaron dos protocolos para la secuenciación de ADN. Uno fue el de Maxam y Gilbert y el otro el de Sanger, no obstante, con los dos se obtiene una autoradiografía en donde puede leerse una secuencia.

En este orden de ideas, es de resaltar que la comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. En microbiología clínica la identificación molecular basada en el ADNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. Así mismo, la amplificación del gen, para su posterior secuenciación, parte preferentemente de ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, pero también puede conseguirse directamente de una muestra clínica. (Izquierdo, 2007)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En función a los objetivos planteados, esta investigación se enmarca en el método cuantitativo, debido a que el investigador deja de lado la subjetividad para caracterizar molecularmente la bacteria *Clavibacter michiganensis* promotora del cáncer bacteriano en tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill), en el cantón Urcuquí. Por consiguiente, también se considera descriptiva y el diseño investigativo es de campo, ya que se tomaron datos en forma directa de la realidad, sin alterarlos ni manipularlos.

Respecto a la estrategia de investigación utilizada, se circunscribe al método deductivo, en virtud de que se recolecto datos sobre los cultivos de tomate en el Cantón Urcuquí, y luego se analizaron de acuerdo a referentes teóricos.

La hipótesis establecida para el desarrollo del presente trabajo de investigación es la siguiente: Es posible a través de la caracterización molecular identificar más de una cepa de la bacteria que está afectando a los cultivos de tomate del cantón Urcuquí.

5.1 Población y muestra

La investigación se efectuó en el cantón Urcuquí, Provincia de Imbabura, el cual posee grandes extensiones de sembríos de tomate riñón, en invernaderos de techo cubierto.

Se llevó a cabo un sondeo preliminar in situ, observando que la población total de los invernaderos usados con sembríos de tomate riñón son trece, los cuales constituyen la población para la presente investigación.

Cabe destacar, que solo se consideraron los invernaderos del Cantón Urcuquí que corresponden a una Unidad de Producción Agropecuaria [UPA], definida por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censo del Ecuador [INEC] como una extensión de tierra de 500 m² o más, dedicada total o parcialmente a la producción agropecuaria, considerada como una unidad económica, que desarrolla su actividad bajo una dirección o gerencia única, independientemente de su forma de tenencia y de su ubicación geográfica.

En cuanto a las plantas de tomates en cada invernadero, a considerar para el estudio, se llevó a cabo un muestro no probabilístico o por conveniencia, basándose en la presencia o no de síntomas, a fin de recolectar las muestras de tejido vegetal (follaje) de los diferentes invernaderos, cuyos cultivos se encontraban en diferentes etapas fenológicas ya que para este tipo de cultivo los productores no tienen establecido un calendario de siembra.

Las localidades de los invernaderos en estudio fueron específicamente en las parroquias: Cahuasquí, Pablo Arenas, San Blas, Urcuquí, y Tumbabiro. Cada invernadero se identificó con un correlativo numérico, tal como se describe a continuación en la tabla 6.

Tabla 6.

Descripción de la población

Número identificación	Localidad	Nombre propietario
1	Urcuquí	Hugo Córdova
2	Urcuquí	Luis Chachala
3	Tumbabiro	Wilson Cuasapaz
4	Tumbabiro	Pompillo Yépez
5	Tumbabiro	Pompillo Yépez
6	Tumbabiro	Pompillo Yépez
7	Pablo Arenas	Janeth Enríquez
8	Tumbabiro	Alex Piñán
9	Cahuasqui	Silvana Quilca
10	Cahuasqui	Anibal Vargas
11	San Blas	Marlene Huera
12	San Blas	Germania Quiranza
13	San Blas	Mario Cevallos

Fuente: Cuestionario aplicado a los productores

5.2 Instrumentos.

La técnica usada para recopilar información de los productores fue la encuesta y el instrumento asociado a dicha técnica para registro de datos, el cuestionario, el cual estuvo conformado por 7 preguntas orientadas a conocer previamente la población a estudiar, como numero de invernaderos que cultivan tomate, parroquia específica donde están ubicados, área de producción, las variedades de tomate que cultivan, conocimiento sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

En relación a los ensayos de laboratorios realizados para lograr el propósito de caracterizar molecularmente la bacteria *Clavibacter michiganensis*, se recurrió a la técnica de Spread Plate para la siembra de la muestra bacterianas. Además, se utilizaron las pruebas bioquímicas de tinción Gram y Fermentación de azúcares a fin de aislar la bacteria. También se efectuó la extracción de ADN de las bacterias aisladas bajo el protocolo de PureLink® Genomic DNA para el uso de Mini Kit (anexo 6).

5.3 Procedimiento.

Aislar las cepas bacterianas de (Clavibacter michiganensis) de cada uno de los cultivos.

Se recolectaron las muestras de tejido vegetal en los diferentes invernaderos de cultivo de tomate en el Cantón Urcuquí, de acuerdo al criterio del investigador, teniendo en cuenta la presencia de síntomas o no. Posteriormente, se realizó un macerado de las muestras de tejido vegetal recolectadas, diferenciándolos según su etapa fenológica, mediante técnica de Spread-Plate, en donde 1 ml de la muestra se distribuye uniformemente sobre la superficie de agar y luego se incubó a 40 °C por 72 horas (Koster, 2003). Luego de este tiempo se analizaron las colonias desarrolladas y se identificó el cumplimiento de las características señaladas por la bibliografía previamente consultada.

Además, se realizaron pruebas de control, la primera de ellas es una prueba de tinción Gram para clasificar las bacterias según su pared celular, en Gram positiva y negativa. Esta se efectuó de la siguiente manera: mediante el uso de asa bacteriológica se colocó la muestra de la bacteria aislada sobre un portaobjetos, luego con la ayuda de la llama del mechero se fijó la muestra evitando que se quemara. Una vez fijada la cepa, se agregó sobre ella cristal violeta durante 30 segundos y transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de colorante con agua destilada. Después se cubrió la muestra con lugol por 1 minuto, se dejó reposar nuevamente por 60 segundos y se eliminó el exceso de colorante con agua destilada. Para la decoloración de la muestra se agregó alcohol al frotis durante 15 segundos y se procedió a enjuagarlo. Finalmente se tiñe el frotis con una solución de safranina dejándola reaccionar durante 60 segundos antes del último lavado. Para observar la estructura de la bacteria se agregó aceite de inmersión al frotis y se procedió a observar bajo el microscopio a 100x y una vez identificadas las características de la bacteria se tomó una muestra de esta y se la colocó en caldo nutritivo para su crecimiento aislado.

La otra fue la prueba bioquímica utilizando agar TSI (triple sugar iron), específica para fermentación de dextrosa, lactosa y sacarosa produciendo un cambio de coloración luego de su implementación.

Identificar de forma molecular la bacteria Clavibacter michiganensis promotora del cáncer bacteriano en tomate riñón (Lycopersicon esculentum Mill), mediante marcadores moleculares.

Una vez transcurridas 48 horas de incubación de las bacterias previamente aisladas, se procede a extraer el ADN de las mismas, bajo los protocolos establecidos por PureLink® Genomic DNA para el uso de Mini Kit de extracción, el cual contiene 7 reactivos y se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Preparación del lisado de bacterias Gram positivas: Se recolectaron las muestras: en un tubo Eppendorf de 2 ml, se colocaron 1,5 ml de cultivo y se centrifugó a 10 000 rpm, al finalizar se formó un pellet. Al pellet obtenido se le colocó 180 µl de Lysozyme Digestion Buffer se mezcló en el agitador (vórtex) por 5 segundos. Esta mezcla se llevó a la incubadora por 30 minutos a una temperatura de 37°C. Al completarse el tiempo de incubación se añadió al tubo del preparado 20 µl de Proteinase K, se agitó durante un tiempo corto la mezcla y se agregó 200 µl Genomic Lysis / Binding Buffer, se realizó la mezcla en el vórtex (agitador) por 5 segundos y se incubó a 55°C por 30 minutos. Al resultado se le agregó 200 µl de etanol (96-100%) y se mezcló hasta la obtención de una solución homogénea.
- Unión de ADN: Para realizar esta acción se transfirió 640 µl del lisado (solución homogénea) a una de las columnas PureLink™ (en adelante la columna giratoria) con tubo de recolección y se centrifugó a 10 000 rpm, se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna en otro tubo de 2 ml que estuviera limpio.
- Lavado de ADN: Al tubo de recolección limpio con la columna giratoria utilizada en el paso anterior se le colocó 500 µl de Wash Buffer 1 y se le puso a centrifugar (10 000 rpm) durante un minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo de recolección con el líquido en su interior y puso la columna giratoria dentro de un nuevo tubo de recolección limpio y seco. A esto se le agregó 500 µl de Wash Buffer 2 y finalmente se centrifugó por 3 minutos a máxima velocidad.
- Elución de ADN: Se colocó la columna de centrifugado en un tubo estéril de microcentrífuga de 1,5 ml, luego se agregó 50 µl de tampón de elución genómico PureLink® a la columna, se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto, centrifugando la columna en velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente y es cuando el tubo contiene purificado ADN genómico.

- Amplificación de ADN: Se utilizó el termociclador y se realizaron consecutivamente las siguientes acciones: Desnaturalización inicial a 94°C por 2,5 minutos, seguido de 40 ciclos con tres segmentos: 94°C por 30 segundos; hibridación a 63 °C por 20 segundos; extensión a 72°C por 45 segundos y polimerización final que se hizo a 72°C por cinco minutos.
- Electroforesis: a las muestras mencionadas anteriormente fueron separadas en un gel de agarosa al 2% al cual se le agregó 5 µl de Diamond™ Nucleic Acid Dye y se dejó polimerizar durante 15 minutos, una vez polimerizado el gel este fue introducido en el equipo de electroforesis, el cual posee una cámara de electroforesis cargada con buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1m M EDTA, pH 8,3 a 25°C). Mediante el empleo de una micropipeta se cargó en el primer pocillo del gel 5ul del indicador de peso molecular DNA Ladder 100 bp, seguidamente fueron cargados a los pocillos restantes muestras de 8 ul, compuestas por una mezcla de 5 ul del ADN obtenido, más 3 µL del buffer de carga Blue/Orange Loading Dye, 6X. Una vez que todas las muestras fueron colocadas se procedió a tapar la cámara de electroforesis y se colocó los electrodos en la fuente de energía. La electroforesis fue corrida a un voltaje de 90 v (voltios) y 500 A (Amperios) durante un lapso de tiempo de 45 minutos.

Una vez aislado el ADN se enviaron las muestras a MACROGEN KOREA INC, para efectuar su respectiva secuenciación.

Determinar la distribución espacial de las cepas identificadas en las zonas de producción.

Se tomaron las coordenadas geográficas de los invernaderos a través de un sistema de posición global [GPS], luego se elaboró un mapa de la zona en estudio y se localizaron en este los invernaderos donde se detectó la presencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

Socializar los resultados obtenidos.

Una vez obtenidos los resultados, se eligió el sitio para socializar, siendo este un aula de la Unidad Educativa Urcuquí, seguidamente se cursaron las invitaciones a los alumnos del programa Educación básica para jóvenes y adultos [EBJA], debido a que estos son productores, jornaleros y trabajadores de la zona inmersos en las actividades relacionadas con el cultivo del tomate riñón. Por último, se presentó el proyecto el 25 de julio de 2019.

5.4 Análisis resultados

Se tabularon cada una de las preguntas que conformaron el cuestionario por medio de tablas, con el propósito de obtener características preliminares de las trece muestras referenciales de cada invernadero conforme a las respuestas obtenidas; para mayor comprensión de los lectores se detalla tablas donde se evidencian las interrogantes, las respuestas presentadas; la frecuencia absoluta y la frecuencia porcentual que se deriva de la segunda. La primera interrogante realizada se describe como información básica y de rigor para el inicio del cuestionario, por lo tanto, no representa un valor o índice porcentual relevante para la presente investigación. A partir de la segunda pregunta se generan valores porcentuales que posteriormente serán la base de la propuesta referente a discusión y resultados. Los resultados obtenidos en los ensayos de laboratorio se analizaron a la luz de referentes teóricos.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Resultados

6.1.1 Cuestionario aplicado a los productores.

1. Área de producción de tomate de los invernaderos del Cantón Urcuquí

El área de producción se refiere al tamaño del espacio que se dedica cultivo de tomates, y sirve de referencia para inferir sobre el marco de la plantación. Las respuestas de los productores sobre dicho aspecto se reflejan en la tabla 7.

Tabla 7.

Área de producción

Invernadero N°	Área de producción
1	2 000 m ²
2	2 200 m ²
3	2 700 m ²
4	3 000 m ²
5	6 000 m ²
6	7 500 m ²
7	1 500 m ²
8	2 000 m ²
9	2 300 m ²
10	1 800 m ²
11	2 000 m ²
12	1 600 m ²
13	1 500 m ²

Fuente: Cuestionario aplicado a los productores de tomate riñón en invernaderos del Cantón Urcuquí

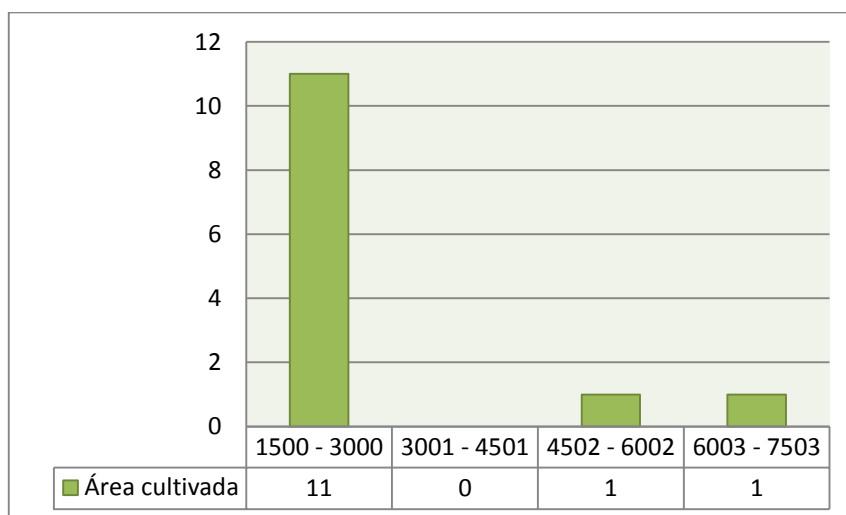


Figura 3. Área cultivada de tomates por invernadero del Cantón Urcuquí

En la figura 3 se evidencia que la mayor extensión que posee cultivos de tomate es de 7 500 m², mientras que la menor corresponde a 1 500 m², según información de los propietarios en estas extensiones se albergan entre 4400 y 27000 plantas. Al considerar las recomendaciones de marco de plantación provistas por la Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar (2003), indicando que debería es conveniente cultivar utilizando distancias de 1,0 x 0,20 m,

1,10 x 0,30m o 1,20 x 0,30m; se infiere una saturación en la capacidad del invernadero pues no se observó ninguno de los marcos de plantación sugeridos, ya que el utilizado por los productores de la zona es de 0,85 metros por 0,30 m aproximadamente.

2. Variedades de tomates cultivadas por los productores en el Cantón de Urcuquí

Tabla 8.

Variedades de tomates que se cultivan en el Cantón Urcuquí

Invernadero N°	Tipo de tomate
1	Belfast
2	Lezaforta
3	Gladiador
4	Pietro
5	Pietro
6	Gladiador
7	Toivo
8	Eterei
9	Charleston
10	Pietro
11	Lezaforta
12	Titan
13	Lezaforta

Fuente: Cuestionario aplicado a los productores de tomate riñón en invernaderos del Cantón Urcuquí.

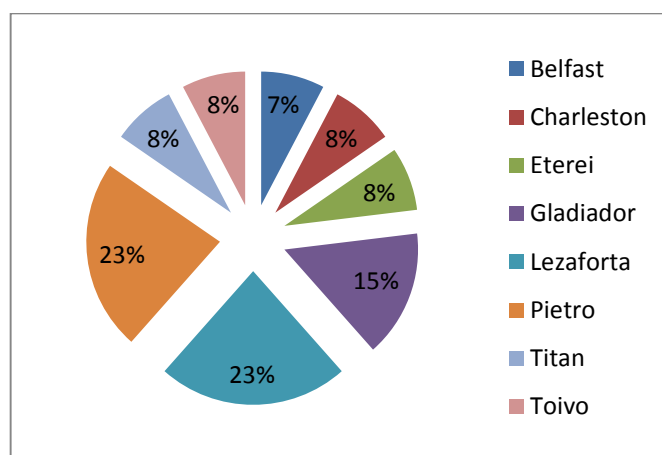


Figura 4. Variedades de tomates cultivados por los productores del Cantón Urcuquí.

Los resultados obtenidos de la segunda pregunta del cuestionario, tal como se muestra en la tabla 8, permitieron identificar que se cultivan 8 variedades de tomate riñón en el cantón Urcuquí, aunque la preferencia se centra en tres variedades como se puede observar en la figura 4, pietro y lezaforta con el 23% y gladiador con el 15%, %. Es probable que esta predominancia de las tres variedades mencionadas se deba a sus características organolépticas, facilidad de cultivo y rusticidad frente a condiciones desfavorables.

3. Edad promedio de los cultivos de tomates en el Cantón de Urcuquí

La edad de los cultivos mostrados en la tabla 9 son indicativos de la etapa fenológica de la planta, factor a tener en cuenta para detectar el contagio de la bacteria *Clavibacter michiganensis*, pues de acuerdo a los estudios de Martínez (2016), los síntomas iniciales se presenta cuando inicia el periodo de floración donde se llegan a ver plantas con una marchitez unilateral que posteriormente se expande a toda la planta.

Tabla 9.

Edad promedio del cultivo de tomates en el cantón Urcuquí

Invernadero	Edad del cultivo	Etapas fenológicas
1	3 meses	Vegetativa
2	2,5 meses	Vegetativa
3	0,87 meses	Vegetativa
4	0,33 meses	Inicial
5	2 meses	Vegetativa
6	5 meses	Reproductiva
7	3 meses	Reproductiva
8	1,5 meses	Vegetativa
9	0,7 meses	Inicial
10	1 mes	Vegetativa
11	4 meses	Reproductiva
12	6 meses	Reproductiva
13	3 meses	Reproductiva

Fuente: Cuestionario aplicado a los productores de tomate riñón en invernaderos del Cantón Urcuquí.

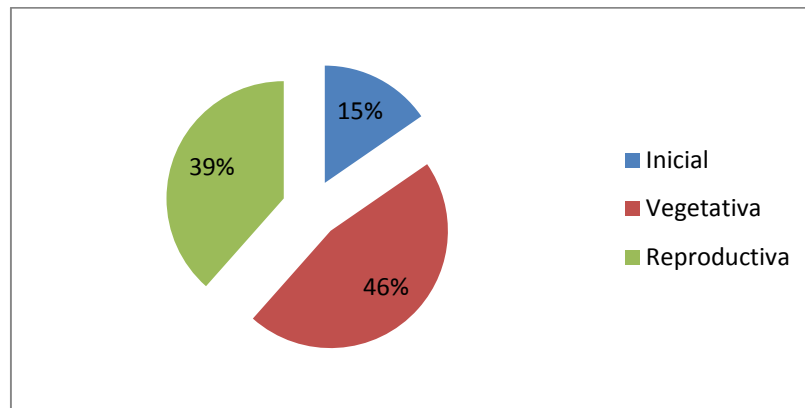


Figura 5. Etapas de los cultivos de tomates en el cantón Urcuquí

En la figura 5 se puede observar que existen cultivos de tomate en las tres etapas fenológicas, predominado la vegetativa con el 46%, seguido por el 39% la reproductiva y el 15% en la inicial. La explicación de la existencia de las diferentes edades de las plántulas de cada plantación analizada probablemente está asociada a que la mayoría de los horticultores manejan sus cultivos bajo principios y conocimientos empíricos, no manejan estudios para producir el tomate, sino se rigen por el precio del producto sin tomar en cuenta los periodos de siembra.

De acuerdo a estos resultados y atendiendo al planteamiento de Blancard (2011), el cual expresa que independientemente de la etapa fenológica del tomate esta propensa a ser atacada por hongos, virus y bacterias, se puede decir que todos los cultivos del cantón Urcuquí están expuestos a estar contaminados por la bacteria *Clavibacter michiganensis* }

4. Enfermedades recurrentes en los cultivos de tomates del Cantón Urcuquí,

Existen varias enfermedades que afectan a los cultivos del tomate, indagar sobre este aspecto permite tener idea de las más frecuentes en estos cultivos del cantón de Urcuquí, así mismo, si han detectado en alguna oportunidad la producida por la bacteria *Clavibacter michiganensis*. Los hallazgos en relación este aspecto se reflejan en la tabla 10.

Tabla 10.

Enfermedades recurrentes en los cultivos de tomates del cantón Urcuquí

Invernadero N°	Enfermedades recurrentes
1	Sí, <i>Fusarium</i> , <i>Botrytis</i> .
2	Sí, <i>Botrytis</i>
3	Sí, pudrición, mancha blanca
4	No, cultivo nuevo
5	Sí, <i>Botrytis</i>
6	Si, <i>Fusarium</i> , <i>Botrytis</i> , pudrición del tallo
7	Sí, <i>Fusarium</i> , nemátodos
8	Sí, <i>Fusarium</i> , mosca blanca.
9	No, cultivo nuevo.
10	Sí, <i>Fusarium</i>
11	Sí, <i>Fusarium</i> .
12	Sí, enfermedades bacterianas.
13	Sí, <i>Botrytis</i>

Fuente: Cuestionario aplicado a los productores de tomate riñón en invernaderos del Cantón Urcuquí.

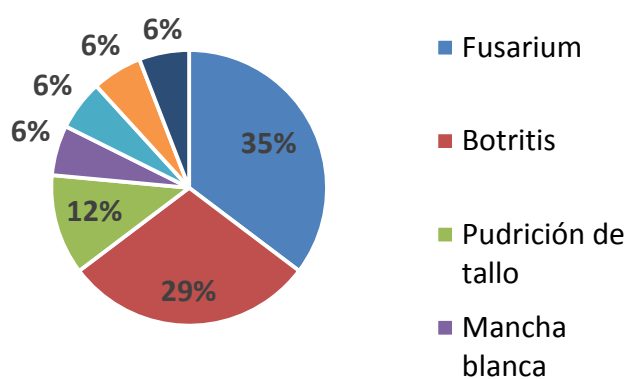


Figura 6. Enfermedades recurrentes en los cultivos de tomates del Cantón Urcuquí

La información obtenida tras la ejecución de las encuestas denota la existencia de siete principales afecciones del tomate riñón, siendo las más recurrentes *Fusarium* 35%, *Botritis* 29% y pudrición de tallo 12%; tal como se puede apreciar en la figura 6. De acuerdo a la Bernal (2010), estas enfermedades presentan síntomas similares entre ellas, de manera que

pudiera confundir a los productores y ejercer acciones inadecuadas para combatir el agente patógeno. De igual modo se observa, que ninguno manifestó el cáncer microbiano como enfermedad recurrente, lo que conlleva a dos posibles lecturas, no han sido afectadas o carecen del conocimiento sobre los síntomas de esta enfermedad causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

5. Frecuencia de fumigación de los cultivos de tomates en el Cantón de Urcuquí.

Las fumigaciones van focalizadas a prevenir o a combatir la presencia de patógenos, deben realizarse de acuerdo a recomendaciones técnicas para evitar la contaminación de suelo y agua por residuos. Al preguntar a los productores cada cuanto tiempo fumigan los cultivos, se obtuvieron las respuestas presentadas en la tabla 11.

Tabla 11.

Frecuencia de fumigación de los cultivos de tomates en el Cantón de Urcuquí

Invernadero N°	Frecuencia de fumigación
1	15 días
2	15 días
3	8 días
4	Aún no fumiga
5	15 días
6	15 días
7	15 días
8	15 días
9	8 días
10	15 días
11	15 días
12	15 días
13	15 días

Fuente: Cuestionario aplicado a los productores de tomate riñón en invernaderos del Cantón Urcuquí.

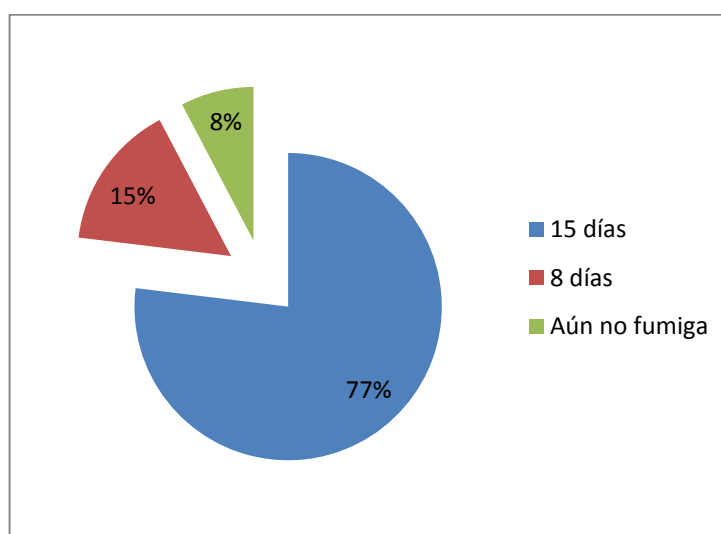


Figura 7. Frecuencia de fumigación en los cultivos de tomates del Cantón Urcuquí

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede ver en la figura 7 que el 77% de propietarios fumiga cada 15 días, mientras que el 15% lo hace cada 8 días, según los productores la frecuencia con la que realizan las fumigaciones depende de la etapa fenológica en la que se encuentra la planta, puesto que en la etapa inicial la planta apenas se están estableciendo en el cultivo y en su mayoría necesita de adicionamiento de nutrientes, tanto en la etapa vegetativa como reproductiva la necesidad de cuidar la planta del ataque de patógenos aumenta ya que se busca asegurar el producto final.

Vale destacar que los productos químicos enfocados a la nutrición, fertilización o control de enfermedades en el cultivo del tomate riñón, deben ser aplicados bajo la supervisión de asistencia técnica, de esta forma se asegura el uso de productos químicos específicos a las necesidades del cultivo, lo que evita que el productor pierda dinero aplicando productos alternos que lamentablemente no tienen la misma efectividad.

6. Conocimiento por parte de los productores del Cantón Urcuquí sobre la existencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

Conocer sobre los posibles agentes patógenos que afectan los cultivos, sus efectos, es imprescindible para cualquier productor agropecuario, pues le permite tomar precauciones oportunamente y poder así minimizar el riesgo de pérdidas de índole económico. En el caso en particular, de los cultivos de tomates es de suma importancia conocer sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis*, en virtud de la grave y devastadora enfermedad que produce. Por tal motivo, se formuló una pregunta a los productores con la intención de indagar si

conocen el agente patógeno conocido como *Clavibacter michiganensis*, obteniendo como resultado lo que se muestra en la tabla 12

Tabla 12.

*Conocimiento por parte de los productores del Cantón Urcuquí sobre la existencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis**

Invernadero Nº	Conocimiento sobre la bacteria <i>Clavibacter michiganensis</i>
1	No
2	No
3	No
4	Si
5	Si
6	Si
7	No
8	Si
9	No
10	No
11	Si
12	No
13	No

Fuente: Cuestionario aplicado a los productores de tomate riñón en invernaderos del Cantón Urcuquí.

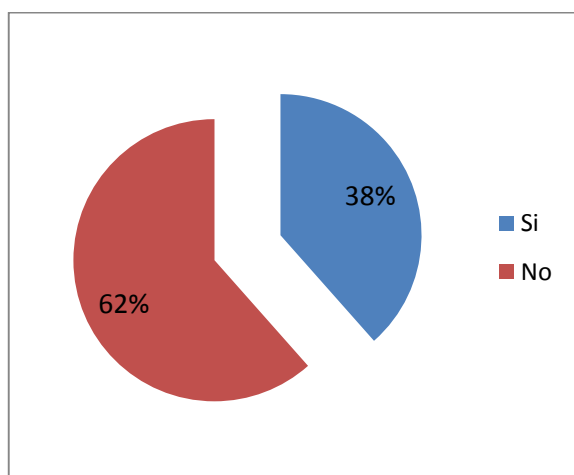


Figura 8. Conocimiento por parte de los productores del Cantón Urcuquí sobre la existencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

Como se puede ver en la figura 8, solamente el 38% de los propietarios conocen sobre la existencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis*, mientras que el 62 % desconoce la existencia del patógeno en cuestión. Este resultado pone al descubierto una carencia importante de fundamentos técnicos sobre el cultivo de tomates, a pesar de ser esta una de

las bacterias causante de una grave enfermedad en el tomate riñón, lo que hace inferir que la mayoría de los productores de tomate en el cantón Urcuquí se guían por conocimientos empíricos producto de la cultura agrícola que se maneja en la localidad. Además, evidencia la necesidad de sociabilización de las investigaciones vinculadas con este tema en la localidad o en medios de comunicación comunes, a fin de que los horticultores discernan sobre los diferentes agentes patógenos o afecciones que pueden atacar los cultivos del tomate.

7. Conocimiento por parte de los productores sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis*

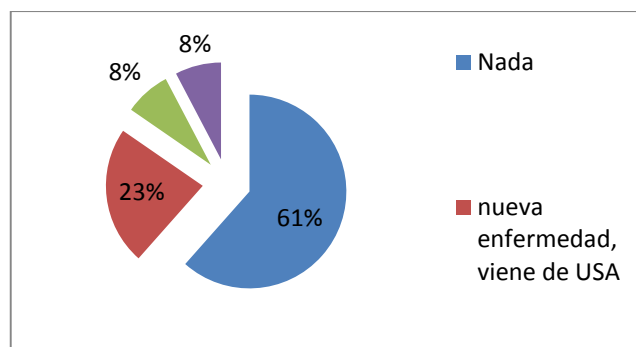
Muchas veces las prácticas culturales agrícolas permiten que los productores conozcan sobre el contagio de plagas y enfermedades en sus cultivos, sin embargo, carecen de los conocimientos técnicos referidos a las afecciones, causas y formas de contrarrestarlas. A fin de indagar que conocen específicamente sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis*, se le pregunto a los productores, que saben en particular de esta bacteria, obteniendo las respuestas que se reflejan en la tabla 13.

Tabla 13.

Conocimiento por parte de los productores sobre la bacteria Clavibacter michiganensis

Invernadero N°	¿Qué conoce de esta bacteria?
1	Nada
2	Nada
3	Nada
4	Nueva enfermedad, viene de USA
5	Nueva enfermedad, viene de USA
6	Nueva enfermedad, viene de USA
7	Nada
8	Es una enfermedad reciente
9	Nada
10	Nada
11	Nueva enfermedad, pudre las plantas
12	Nada
13	Nada

Fuente: Cuestionario aplicado a los productores de tomate riñón en invernaderos del Cantón Urcuquí.



*Figura 9. Conocimiento por parte de los productores sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis**

En la figura 9, se observa que la mayoría representada por el 61% de los encuestados, no sabe nada de esta bacteria, y el resto saben que es una enfermedad, sin embargo, ninguno manifestó que conocía los síntomas y como contrarrestarla sus efectos, motivo que conlleva a decir que los productores de tomate del cantón Urcuquí desconocen de las afecciones, causas y formas de neutralizar a la bacteria *Clavibacter michiganensis*,

6.1.2 Aislamiento de la bacteria *Clavibacter michiganensis*

Se evidenció el crecimiento de colonias cuyo color varía de blanquecino a amarillento con aspecto mucoso en agar nutritivo; por medio de la tinción gram se pudo observar la presencia de bacilos Gram positivos, cuya forma característica es la de un bastón. De acuerdo a Domínguez (2011) la forma de las bacterias está determinada por su citoesqueleto y estas formas son muy importantes ya que determinan su capacidad de sobrevivir y conseguir nutrientes.

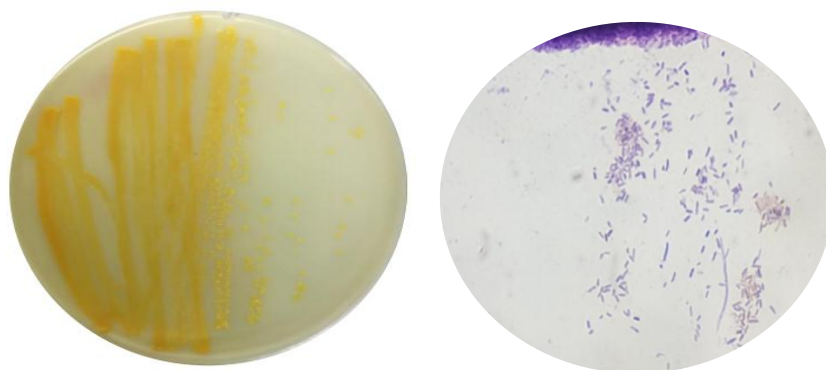


Figura 10. Aislamiento y Tinción Gram de las colonias

Los resultados obtenidos en cuanto a aislamiento y tinción gram concuerdan con lo señalado por Schaad y Jones (citado en Borboa et al. 2009) quienes describen los resultados de su investigación acerca de la bacteria como: “un bacilo Gram positivo, no móvil, aeróbico, productor de capsula, que en agar nutritivo desarrolla colonias de color amarillo claro o naranja, mucoide, cuya temperatura óptima de crecimiento in vitro es de 25 a 28°C.”.

Con los aspectos relacionados a forma y tinción, atendiendo a Romero (2011) concuerda en que la bacteria *Clavibacter michiganensis* es un “bacilo Gram positivo y posee un contenido de 73% de Guanina + Citocina en su genoma”, en cuanto a las características bioquímicas de la bacteria se pudo corroborar la fermentación de glucosa y sacarosa por medio de la aplicación de agar TSI, cuyo indicador es el cambio en la coloración, estos resultados son similares a lo establecido por, Borboa et al. (2009); quienes señalan que la bacteria *Clavibacter michiganensis* es “fermentadora de glucosa, sacarosa y maltosa”.



Figura 11. Prueba de fermentación

Luego de la confirmación del cumplimiento de las características requeridas por parte de la bacteria, se genera una primera representación de la existencia de la *Clavibacter michiganensis* en los cultivos de estudio, mostrando la presencia de la bacteria en la mayoría excepto, en los invernaderos 4 y 9, los cuales presentan la particularidad de que son cultivos en etapa inicial y su edad promedio era de 30 días.

6.1.3 Identificación molecular de la bacteria *Clavibacter michiganensis*

Al terminar la extracción de ADN de cada una de las muestras positivas, fueron enviadas a Macrogen Korea Inc. para su respectiva secuenciación. Al obtener los resultados de dicha empresa, se los codificó en el programa FinchTV, la cadena de nucleótidos resultante se introdujo en un lector BLAST OnLine en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos, obteniendo los siguientes resultados:

Se identificó la existencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* según el Infoagro, (2010) es considerada como “la causante de la enfermedad bacteriana más grave del tomate”. Tras la aplicación de las pruebas de identificación por PCR, se determinó la presencia de la misma cepa en 11 de los trece invernaderos de estudio. Los resultados obtenidos concuerdan con la secuenciación *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*, como se describe en la tabla 14:

Tabla 14.

Secuenciación de ADN

CEPA	Secuencia relativa más cercana	Porcentaje de identificación	Identificación de la Secuencia.	Clase bacteriana
1	<i>Clavibacter michiganensis</i> <i>subs. michiganensis</i>	87.69 %	HQ144234.1	Actinobacteria

Luego de realizar el proceso de electroforesis, de la PCR reamplificada se obtuvo un resultado de una media de 270 pares de bases (bp) aproximadamente, lo cual coincide con lo señalado por Pastrok y Rainey (1999), luego de que ellos realizaron sus estudios dando a conocer cinco subespecies de la bacteria *Clavibacter michiganensis* y las diferencias de los pesos moleculares entre ellas, tal como se puede apreciar en la tabla 15

Tabla 15.

Subespecies de la bacteria Clavibacter michiganensis

Primer	Bacteria	Tamaño del fragmento de ADN amplificado
Forward		
PSA - 1	<i>C.m. sepedonicus</i>	502 bp
PSA - 4	<i>C.m. michiganensis</i>	270 bp
PSA - 5	<i>C.m. insidiosus</i>	393 bp
PSA - 2	<i>C.m. tessellarius</i>	587 bp
PSA - 7	<i>C.m. nebraskensis</i>	393 bp

Fuente: Pastrik y Rainey, (1999)

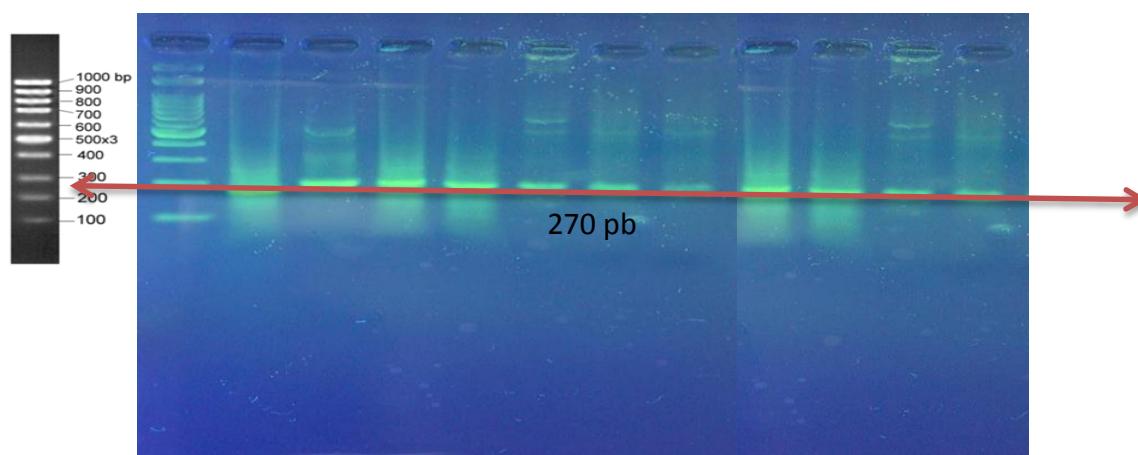


Figura 12. Electroforesis

6.1.4 Distribución espacial de las cepas identificadas en las zonas de producción.

La ubicación de los invernaderos en el Cantón San Miguel de Urcuquí, se localizaron específicamente en las parroquias: Cahuasquí, Pablo Arenas, San Blas, Urcuquí, y Tumbabiro tal como se muestra en la tabla 16, con sus respectivas coordenadas geográficas.

Tabla 16.

Distribución por parroquia y coordenadas de los invernaderos con cultivo de tomates en el Cantón Urcuquí

Número identificación	Parroquia	Coordenadas	
		X UTM	Y UTM
1	Urcuquí	812148	10045256
2	Urcuquí	808349	10045652
3	Tumbabiro	808477	10045634
4	Tumbabiro	806223	10044868
5	Tumbabiro	808977	10050166
6	Tumbabiro	812624	10051460
7	Pablo Arenas	811498	10057352
8	Tumbabiro	811003	10057432
9	Cahuasqui	808561	10050087
10	Cahuasqui	813166	10050436
11	San Blas	812782	10045463
12	San Blas	812387	10045464
13	San Blas	813054	10045460

Una vez culminada todas las pruebas para identificar la presencia de la bacteria en cuestión en los cultivos de tomate bajo invernadero del cantón Urcuquí, se detectó que la mayoría de están contaminados por la bacteria *Clavibacter michiganensis*, subespecie *michiganensis*, excepto los asentados en los invernaderos 4 y 9, los cuales tienen en común que están en la etapa fenológica inicial, es decir menos de 30 días, tal como se refleja en la tabla 17.

Tabla 17.

Presencia de la bacteria Clavibacter michiganensis subespecie michiganensis, en los cultivos de tomate del Cantón Urcuquí

N° de invernadero	Presencia		Etapa fenológica
	Si	No	
1	X		Vegetativa
2	X		Vegetativa
3	X		Vegetativa
4		X	Inicial
5	X		Vegetativa
6	X		Reproductiva
7	X		Reproductiva
8	X		Vegetativa
9		X	Inicial
10	X		Vegetativa
11	X		Reproductiva
12	X		Reproductiva
13	X		Reproductiva

En términos porcentuales, tal como se refleja en la figura 13, en el 85% de los cultivos de tomate del cantón Urcuquí está presente la bacteria *Clavibacter michiganensis*, subespecie *michiganensis*, y al relacionarlo con la etapa fenológica se aprecia que el 55% de los cultivos contaminados se encuentran en la vegetativa mientras que el 45% en la reproductiva.

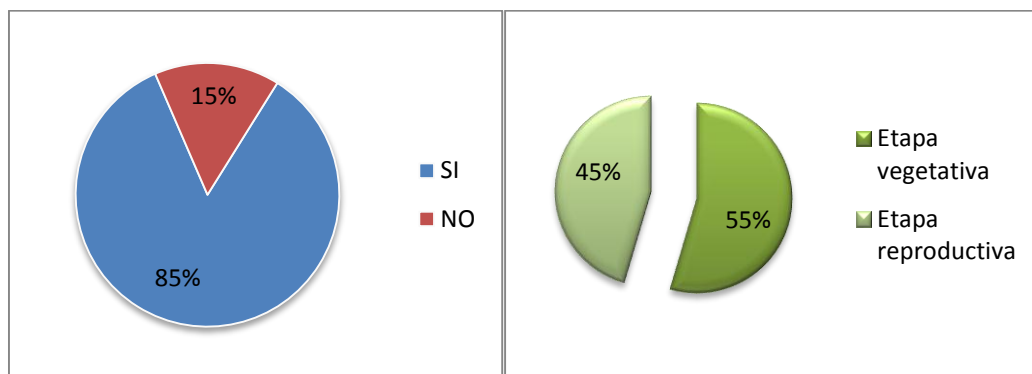
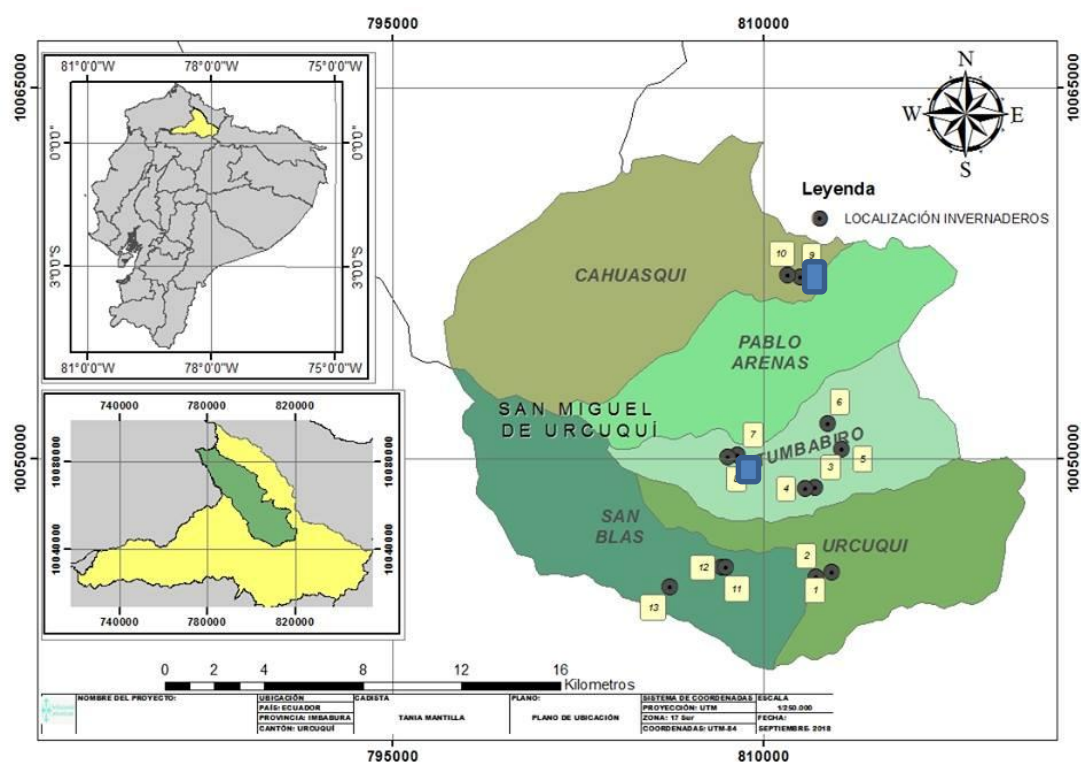


Figura 13. Presencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en los cultivos de tomate del Cantón Urcuquí.



Leyenda: □ Cultivo con presencia de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*
 ■ Cultivo sin presencia de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*

Figura 14. Mapa de distribución de los invernaderos con cultivos de tomates en el Cantón Urcuquí

Al realizar la distribución espacial, como se muestra en la figura 14, se pudo apreciar que los cultivos donde no se detectó presencia de la bacteria en estudio, se encuentran cerca de cultivos contaminados por *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, considerando su facilidad de propagación, existe una alta probabilidad de contaminación, en caso de que no se tomen las medidas adecuadas para evitarla

6.2 Discusión de Resultados.

En los cultivos de tomate del Cantón Urcuquí se encontró predisposición a presentar problemas fitosanitarios debido a la elevada densidad identificada, pues según Escobar y Lee (2009), este factor impulsa “problemas sanitarios y una menor calidad en el tamaño de los frutos”. Por consiguiente, los cultivos del tomate riñón en el cantón Urcuquí se predispone para el desarrollo de la *Clavibacter michiganensis*. En lo que se refiere, a la etapa fenológica predominó la vegetativa, sin embargo, no se considera un factor predisponente

ya que de acuerdo a Blancard (2011), independiente de la etapa fenológica del tomate, es susceptible de ser atacada por hongos, virus y bacterias.

Las enfermedades que los productores manifestaron como recurrentes fueron *Fusarium* 35%, *Botritis* 29% y pudrición de tallo 12%; cuyos síntomas según Bernal, (2010) son similares, por tanto, es muy probable que se ejerzan acciones inadecuadas para combatirlas por causa de la falta de precisión del patógeno que la causa. En consecuencia, se requiere intervenir con pruebas de PCR o laboratorio que permitan identificar el agente patógeno que lo produce, incluyendo la bacteria *Clavibacter michiganensis*, cuyos indicios de su presencia es presentar hojas inicialmente con pequeñas áreas húmedas de color verde claro, con manchas necróticas, la flacidez del follaje del último foliolo de la tercera o cuarta hoja del brote principal hacia abajo.

El escaso o casi nulo conocimiento de los productores sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis*, coloca en una posición muy vulnerable los cultivos de tomates riñón del cantón Urcuquí, ya que según Infoagro (2010), el tomate riñón es la especie más afectada por esta bacteria, pudiendo ocasionar pérdidas importantes, por su facilidad de dispersión tanto en cultivos protegidos como al aire libre aunado al hecho de que no existen tratamientos químicos curativos. La carencia de conocimiento sobre la bacteria *Clavibacter michiganensis*, se ratifica al comparar los resultados de la encuesta y los obtenidos en laboratorio, pues se detectó que el 85% de los cultivos en estudio están infectados por la *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* y solo el 38% manifestó conocer la existencia de esta bacteria.

La presencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis* en los cultivos de tomate del cantón Urcuquí corrobora los hallazgos del estudio de Estrella y Guevara quienes determinaron y caracterización enfermedades bacterianas del tomate riñón (*Lycopersicon sculentum*), cultivado bajo invernadero en doce áreas de la cordillera central del Ecuador, encontrando que en las provincias de Chimborazo, Imbabura y Tungurahua existe contaminación por causa de la bacteria *Clavibacter michiganensis*.

En síntesis, la caracterización molecular de la bacterias aisladas del tejido vegetal de los cultivos de tomate del Cantón Urcuquí, permitió detectar la presencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis*, subespecie *michiganensis* en el 85% de la población estudiada, confirmando la premisa de Estrella y Guevara, (2008) que en la Provincia de Imbabura existe

contaminación a causa de la mencionada bacteria en los cultivos de tomates, así como también la primera representación de hallazgos en la presente investigación sobre la presencia de la bacteria en los cultivos de tomate del cantón Urcuquí.

Por otra parte, la ubicación geográfica de los cultivos donde no se detectó la presencia de *Clavibacter michiganensis*, subespecie *michiganensis*, representa un factor predisponente de contaminación, dada la cercanía existente con otros cultivos donde se determinó la presencia de dicha bacteria, en virtud de la facilidad de propagación manifestada por Jensen, (2008), quien indica una de las tantas formas de llegar la bacteria a un lugar, es por la visita de personas que vengan de sitios donde este presente la bacteria, traerla en su ropa y contaminan el campo, lo que hace aun mayor el riesgo, pues los cultivos no contaminados, ademas de estar cercas de focos de contaminacion, pertenecen a productores que poseen cultivos donde se determino la presencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis*, subespecie *michiganensis* y es muy probable que los trabajadores se movilicen de un invernadero a otro, sin cambiarse de ropa o sin realizar la desinfección de su vestuario antes de entrar a cada invernadero.

6.3 Socialización de resultados

La socialización de resultados se llevó a cabo como parte del cumplimiento de los objetivos del proyecto de investigación, este evento se realizó el día jueves 25 de julio de 2019, en el cantón Urcuquí en las aulas de la Unidad Educativa Urcuquí y los asistentes fueron alumnos del programa EBJA (Educación básica para jóvenes y adultos), quienes son productores, jornaleros y trabajadores de la zona inmersos en las actividades relacionadas con el cultivo del tomate riñón.

Pregunta 1:

¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?

Tabla 18.

Comodidades de la sala de exposición

Nulo	0
Bajo	1
Medio	4
Alto	14
Muy alto	11

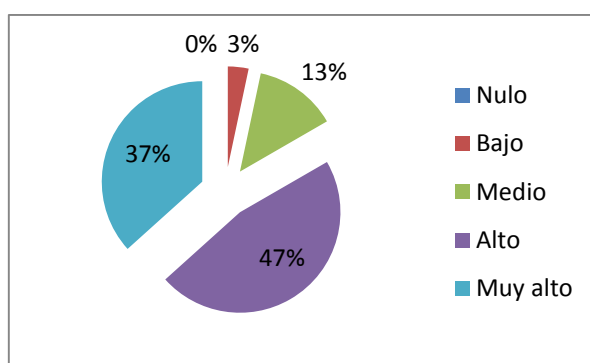


Figura 15. Comodidades de la sala de exposición

La mayor parte de los asistentes a la socialización consideran que la sala tuvo las comodidades necesarias para poder concentrarse en la temática tratada, este espacio físico fue facilitado por la coordinación del programa EBJA (Educación básica para jóvenes y adultos); de la Unidad Educativa Urcuquí.

Pregunta 2:

¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?

Tabla 19.

Material audiovisual usado en la exposición

Nulo	1
Bajo	0
Medio	5
Alto	10
Muy alto	14

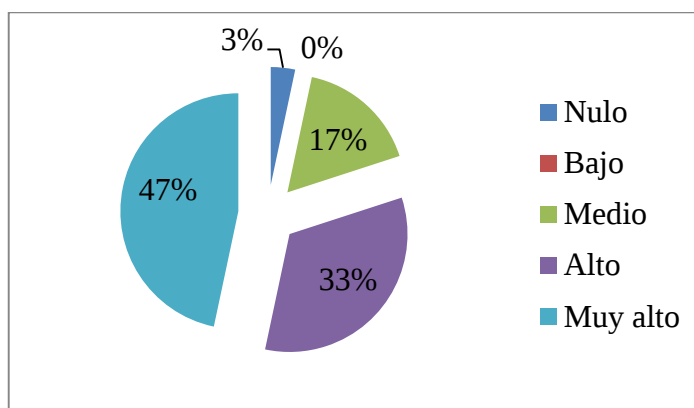


Figura 16. Material audiovisual usado en la exposición

El 80% de los asistentes concuerdan en que el material audiovisual utilizado fue de calidad, por lo que lo califican entre alto y muy alto, gracias a esta percepción se refleja el trabajo didáctico audiovisual realizado pensando en llegar de una manera clara y entendible al público participante en la socialización.

Pregunta 3:

¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema?

Tabla 20.

Dominio del expositor sobre el tema

Nulo	0
Bajo	0
Medio	2
Alto	8
Muy alto	20

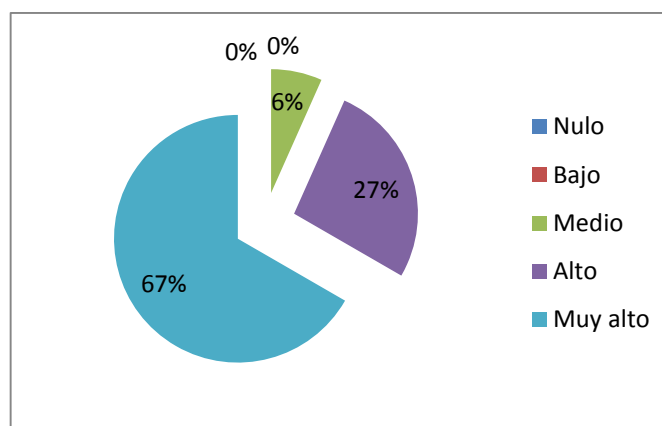


Figura 17. Dominio del expositor sobre el tema

El dominio del tema obtenido gracias a la fundamentación científica, trabajo de campo y de laboratorio que se realizó permitió tener facilidad para desenvolverse frente al público, las preguntas del auditorio obtuvieron resultados positivos y certeros.

Pregunta 4:

¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?

Tabla 21.

Manejo del auditorio

Nulo	0
Bajo	0
Medio	3
Alto	10
Muy alto	17

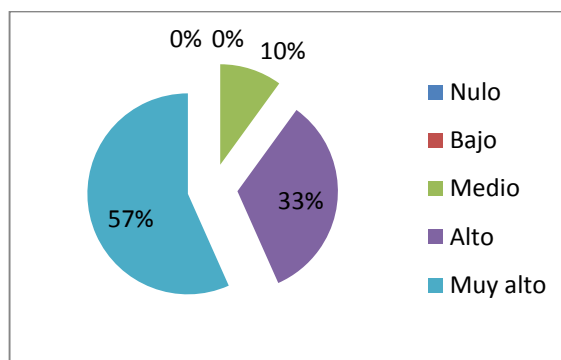


Figura 18. Manejo del auditorio

El 90% de los asistentes manifiestan que hubo un buen manejo de auditorio por parte del expositor, lo que permite que la información de la investigación se difunda con mayor facilidad, proveyendo a los asistentes conocimientos científicos importantes para uso en la vida cotidiana.

Pregunta 5:

¿Considera usted que el expositor demostró facilidad de expresión?

Tabla 22.

Facilidad de expresión

Nulo	0
Bajo	0
Medio	0
Alto	10
Muy alto	20

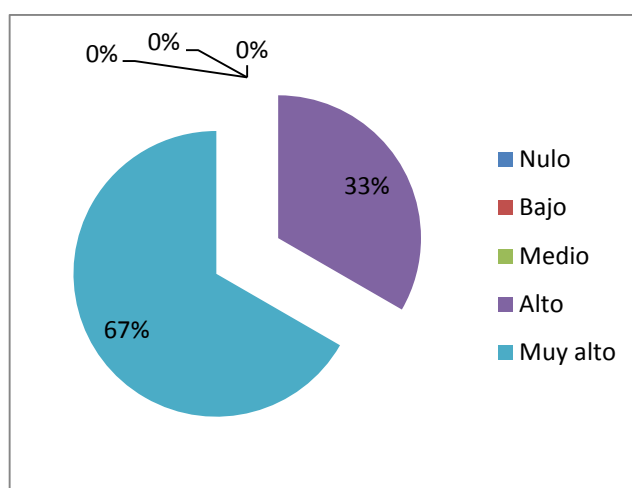


Figura 19. Facilidad de expresión

El 100% del auditorio está totalmente satisfecho con la facilidad de desenvolvimiento oral en la socialización, pues gracias al conocimiento adquirido en el proceso de desarrollo del proyecto, se tuvo fuentes para expresar y resolver las inquietudes propuestas en la sala; además la exposición se la realizó usando términos adecuados para que la información fuera entendible.

Pregunta 6:

¿Considera usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?

Tabla 23.

Importancia de la investigación para la sociedad

Nulo	0
Bajo	0
Medio	4
Alto	10
Muy alto	16

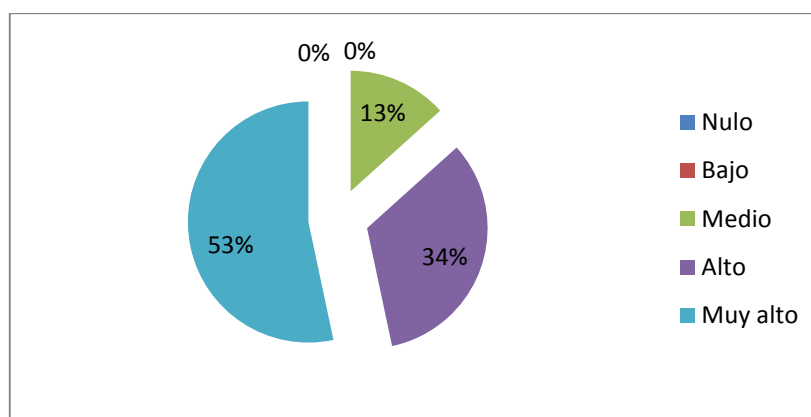


Figura 20. Importancia de la investigación para la sociedad

El 87% considera que es una investigación importante para el sector agropecuario sobre todo para quienes trabajan con hortalizas, para el caso de los asistentes a la socialización se apreció el interés en la temática para aplicar los conocimientos impartidos en sus propiedades donde laboran a diario.

Pregunta 7:

¿Considera usted que esta investigación posee perspectiva para estudios complementarios posteriores?

Tabla 24.

La investigación posee perspectiva para estudios complementarios.

Nulo	0
Bajo	0
Medio	1
Alto	8
Muy alto	21

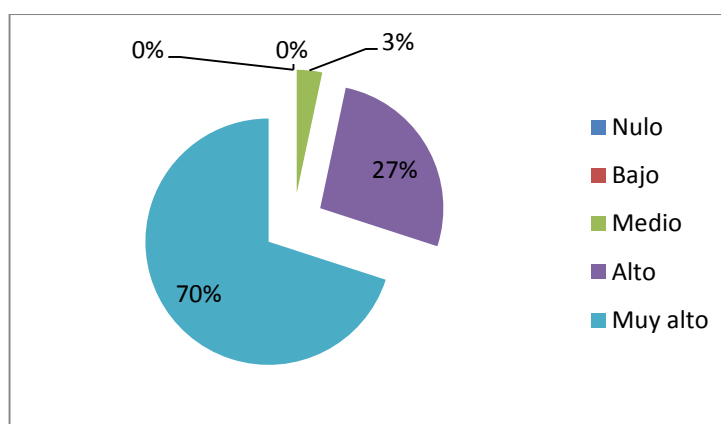


Figura 21. La investigación posee perspectiva para estudios complementarios.

La mayoría de los asistentes manifiestan que este estudio posee bases teóricas para aplicarlas en la vida práctica del cultivo de las hortalizas, además que es el inicio para emprender nuevas investigaciones científicas para el desarrollo de la biotecnología en la parroquia.

Pregunta 8:

¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?

Tabla 25.

Beneficios de la presente investigación para la sociedad

Nulo	0
Bajo	0
Medio	1
Alto	5
Muy alto	24

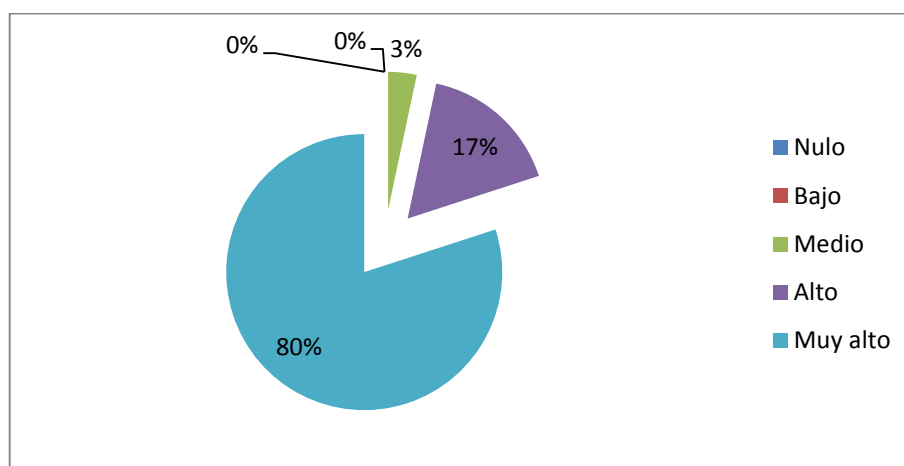


Figura 22. Beneficios de la presente investigación para la sociedad

Actualmente todos los asistentes consideran que han obtenido beneficios académicos y laborales pues desconocían científicamente de la existencia de *Clavibacter michiganensis* en los cultivos de sus propiedades, ya que solo poseían el conocimiento empírico, entonces confundían este patógeno con otras enfermedades de manera que no se lograba contrarrestar directamente las afecciones que produce la bacteria. De manera que consideran que este tema trae beneficios para toda la colectividad

Pregunta 9:

¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que estos se cumplieron?

Tabla 26.

Cumplimiento de los objetivos planteados

Nulo	1
Bajo	0
Medio	2
Alto	9
Muy alto	18

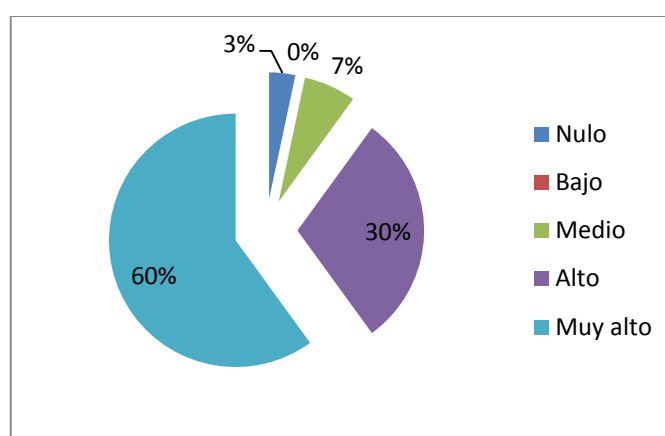


Figura 23. Cumplimiento de los objetivos planteados

Casi la totalidad de los asistentes concuerdan que la investigación logro los objetivos planteados al inicializarse el proyecto, de manera que están satisfechos teniendo puntos referenciales de la bacteria, afecciones, caracterización molecular, daños y controles relacionados con la *Clavibacter michiganensis*,

7. CONCLUSIONES.

Al aislar la cepa bacteriana *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, se encontró presente en once de trece cultivos que constituyeron la muestra, sin discriminar fase fenológica, variedad o localidad en la que se encontraban.

Se constató el cumplimiento de las características moleculares de la bacteria como fueron: forma, color y comportamiento bioquímico, finalmente la secuenciación de ADN fue la corroboración final de que se trataba de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, con una similitud del ADN obtenido de más del 50% con el ADN existente en la base de datos referencial.

La presencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se detectó en once de los trece cultivos estudiados, la excepción fueron los asentados en los invernaderos identificados con los numerales 4 y 9, ubicados en las parroquias Tumbabiro y Cahuasqui respectivamente, compartiendo una característica particular que es ser cultivos nuevos, es decir fueron instalados recientemente y en terrenos que nunca antes fueron usados para ninguna actividad agropecuaria; sin embargo, se encuentran cerca de cultivos contaminados y pertenecen a productores con cultivos donde se determinó la presencia de la bacteria en cuestión, por tanto, considerando el factor ubicación existe un alto riesgo de proliferación de esta bacteria, ya que se propaga fácilmente, por diferentes maneras, como por ejemplo el uso de un mismo canal de riego.

La socialización de resultados contribuyó a que los productores obtengan información acerca de un patógeno desconocido para ellos, pero que está presente en sus cultivos y puedan diferenciarlo de otros, debido a que la bacteria al generar una sintomatología similar a las enfermedades causadas por hongos es fácilmente confundida.

8. RECOMENDACIONES

Realizar una corroboración del estudio, utilizando los mismos materiales y métodos; de encontrarse resultados similares, estos pueden ser utilizados como fuente para el registro oficial de la presencia de la bacteria *Clavibacter michiganensis subs. michiganensis* en el cultivo de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el Ecuador.

Dar a conocer los resultados de las investigaciones sobre patógenos desconocidos en los diferentes cultivos a responsables de casas comerciales, para que de esta forma se puedan desarrollar semillas resistentes a las afecciones que existen en nuestro medio.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar. (2003). *El cultivo de tomate riñón en invernadero*. Cañar: Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar.
- Ausay, E. (2015). *Respuesta de tomate riñón (Lycopersicum esculentum Mill) Cv dominic bajo invernadero a dos relaciones nitrato / amonio mediante fertiriego por goteo*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Ayala, L., Rodríguez, R., Aguilar, C., Lara, F., & Quero, A. (2004). Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Schuster, Hoff, Mandel y Lazar) Vidaver y Mandel, usando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista de Fitopatología Mexicana*, 22(2), 239-245. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222211.pdf>
- Banco central del Ecuador. (2017). *Reporte de coyuntura sector agropecuario*. Banco central del Ecuador.
- Bernal, R. (2010). *Enfermedades de tomate (Lycopersium esculentum Mill) en invernadero en las zonas de salto y bella unión*. Montevideo: Unidad de comunicación y transferencia de tecnología de INIA.
- Blancard, D. (2011). *Enfermedades del tomate*. Madrid: Mundi - prensa.
- Borboa, J., Rueda, E., Acedo, E., Ponce, J., Cruz, M., & Juarez, O. y. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michianensis* en el Tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotec*, 319-326.
- Boutou, S., Carrillo, D., Pascal, C., Fleury, A., Iruzubieta, J., Labadi, D., & Palacios, A. (2016). *Las eficaces técnicas moleculares de identificación de las levaduras enológicas*. La Rioja: Labexcell.
- Carbajal, A. (26 de Mayo de 2013). *Labome*. Obtenido de Labome: <http://www.labome.es/method/DNA-Extraction-and-Purification.html>
- Colección española de cultivos tipo (CECT). (2017). *Cultivos: CECT*. Obtenido de CECT : <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/coleccion-espanola-cultivos-tipo-1285872233521.html>
- Dickinson, B. (2003). Instrucciones de uso - medios en placa listos para usar. *BD Triple Sugar Iron Agar*, 8-12.
- Dominguez, M. (28 de 07 de 2011). *Morfología de las bacterias*. Obtenido de Morfología de las bacterias: <https://www.vix.com/es/btg/curiosidades/2011/07/28/morfologia-de-las-bacterias>

- Escobar, H., & Lee, R. (2009). *Manual de producción del tomate bajo invernadero*. Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Estrella, N., & Guevara, T. (2008). *Determinación y caracterización de enfermedades bacterianas del tomate riñón (Lycopersicon sculentum), cultivado bajo invernadero en doce áreas de la cordillera central del Ecuador*. Sangolquí.
- Fertilab. (20 de Junio de 2018). *Notas técnicas: Clavibacter michiganensis*. Obtenido de Fertilab: <https://www.fertilab.com.mx/blog/267-clavibacter-michiganensis/>
- Guerra, P., Delgadillo, C., Hernandez, J., Guerra, D., & Sanchez, R. (2016). Efecto de la infección con *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*, en el vigor de las semillas de Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). En *Química, Biología y Agronomía Handbook*. Texcoco de Mora: ECORFAN.
- Guevara, B., Terry, F., Coello, E., & Norma, M. (2008). *Determinación y caracterización de enfermedades bacterianas del tomate riñón (Lycopersicon Sculentum), cultivado bajo invernadero en doce áreas de la cordillera central del Ecuador*. Quevedo, Ecuador: Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
- Holley, R. (2012). *Información genética*.
- Infoagro. (2010). *El chancro bacteriano del tomate*. Obtenido de Infoagro: https://www.infoagro.com/hortalizas/el_chancro_bacteriano_del_tomate.htm
- Instituto de Investigaciones Agropecuarias Chile. (04 de Noviembre de 2016). *Enfermedades del tomate*. Obtenido de <http://www.inia.cl/sanidadvegetal/2016/11/04/cancro-bacteriano-clavibacter-michiganensis-sub-sp-michiganensis/>
- Instituto para la Innovación Tecnológica en Agricultura de Mexico. (2016). *Artículos: Intagri, Control de cáncer bacteriano (Clavibacter michiganensis) en el cultivo de tomate*. Obtenido de Intagri: <https://www.intagri.com/articulos/horticultura-protegida/control-de-cancer-bacteriano-en-el-cultivo-de-tomate>
- Iracheta, M. (2009). Bacterias y virus ¿cómo nos defendemos? *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(1), 115-172. Obtenido de <http://www.rac.es/ficheros/doc/00919.pdf>
- Izquierdo, A. (2007). *Diseño y optimización de un sistema de diagnóstico molecular de sepsis neonatal mediante la técnica de PCR - RFLP a partir de cultivos bacterianos*. Sangolquí.
- Jaramillo, J. (2015). *Evaluación agronómica del cultivo de tomate (Solanum lycopersicum) bajo tres diferentes coberturas plásticas*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.

- Jensen, M. (01 de Octubre de 2008). *Cultivos: Diagnóstico y control de Clavibacter michiganensis*. Obtenido de Hortalizas: <https://www.hortalizas.com/cultivos/tomates/diagnostico-y-control-de-clavibacter-michiganensis/>
- Khan Academy. (2017). *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Obtenido de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- Lara, A. (10 de Diciembre de 2015). *Fitopatología unidad II bacterias*. Obtenido de Fitopatología unidad II bacterias: <https://es.slideshare.net/AldoLara5/fitopatologia-unidad-ii-bacterias>
- Lara, L. (2015). *Obtención del un cóctel de bacteriófagos líticos para el control de bacteriosis en cultivos de tomate (solanum lycopersiucum) del cantón Ambato, provincia de Tungurahua*. Ambato, Ecuador: Escuela Politecnica del Ejercito.
- López, L. (2016). *Manual técnico del cultivo de tomate*. Costa Rica: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia Agropecuaria.
- M & O Consulting S.A.C. (2008). *Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en el Perú*. Lima: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo del Peru.
- Martinez, J. (2012). *Bacteria Clavibacter*. Escuintla.
- Martínez, J. (2016). *Manejo del Patosistema Clvibacter michiganensis subsp. michiganensis Smith., con Bacillus subtilis Cohn., en Tomate de Cáscara Physalis ixocarpa Brot., Bajo condiciones de Invernadero*. Saltillo. Mexico: Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2015). Buenas, prácticas agrícolas para tomate riñón. *Buenas, prácticas agrícolas para tomate riñón*, 128.
- Mora, X. (Febrero de 2012). Diferenciando bacterias GRAM+ Y GRAM -. *Selecciones Avícolas*, 25-27. Obtenido de <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2012/2/6536-diferenciando-bacterias-gran-y-gram.pdf>
- Mota, M., & Pérez, M. (2006). *Temas de bacteriología y virología médica*. Montevideo, Uruguay: Universidad de la Republica.
- Necochea, R., & Canul, J. (2004). *Secuenciación de ácidos nucleicos*. Cuernavaca: UNAM.
- Pastrik, H., & Rainey, A. (1999). *Identification and differentiation of Clavibacter michiganensis Subspecies by Polymerasa Chain Reaction - based Techniques*. Berlín: Blackwell Wissenschafts - Verlag.
- Pérez, A. (s.f). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Valencia, España: Universidad Politecnica de Valencia. Obtenido de

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>

- Instituto Nacional de Estadística y Censo del Ecuador (15 de Mayo de 2002). *Ecuador en cifras*. Obtenido de Ecuador en cifras: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/CNA/Tomo_CNA.pdf
- Rodríguez, A. (2007). *Caracterización molecular de poblaciones de Colletotrichum spp. ASOCIADAS A Coffe arabica EN COLOMBIA Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL CBD*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Romero, A. (2011). *Control biológico de Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. San Luis Potosí, Mexico: Universidad autónoma de San Luis Potosí.
- Siri, M., Valentina, C., Lapaz, M., Hernández, F., Montelongo, M., & González Matías: Maeso, D. y. (2015). Identificación, caracterización y diagnóstico molecular de bacterias patógenas que afectan a los cultivos de tomate. (756), 3-16. Obtenido de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9843/1/sad-756-p.3-16.pdf>
- Sosa, M. (2013). *Guía para el reconocimiento de enfermedades en el cultivo de tomate*. El Colorado, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Suárez, A. (2017). Microbioma y secuenciación masiva. *Esp. Quimioter* , 305 - 311.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (Mayo-Agosto de 2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Vallejo, P. (2010). *Caracterización estructural de complejos ribosomales de iniciación y de pre - translocación mediante microscopía electrónica* . País Vasco: Universidad del País Vasco.
- Varela, A. (2018). *Estudio de la producción y comercialización del tomate riñón (Lycopersicum esculentum) en el cantón Pimampiro, de la Provincia de Imbabua*. Ibarra.
- Vargas, C. (2005). *Desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de enfermedades virales, bacterianas y fúngicas en hortalizas*. San Luis Potosí, Mexico: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

ANEXOS

Anexo 1: Información proporcionada por el INIAP respecto a la bacteria *Cmm*.

Información Bacteria *Clavibacter michiganensis*

Victor Hugo Sanchez Arizo <victor.sanchez@iniap.gob.ec>

3 de octubre de 2019, 12:44

Para: tani.mantilla@gmail.com

CC: Maria Batallas <maria.batallas@iniap.gob.ec>, Maria Luisa Insuasti Arrobo <maria.insuasti@iniap.gob.ec>, William Fernando Viera Arroyo <william.viera@iniap.gob.ec>

Estimada Tania,

Respecto a su consulta, me permito indicar que en este Instituto no se han realizado trabajos de investigación que permitan responder a su requerimiento.

Sin que sea en el cultivo que usted solicita, adjunto el siguiente acceso electrónico de un documento que trata sobre *Clavibacter michiganensis*: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/564/html>

En caso de requerir información de los trabajos realizados por el INIAP, por favor consulte en nuestro repositorio digital: <http://repositorio.iniap.gob.ec/>

Saludos cordiales,

Victor Sánchez

Analista

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas Edificio MAG - 4to. piso

Telf.: + (593 2) 2567645 | 2565963 | 2504996 -ext.222

www.iniap.gob.ec

Código postal: 170518

INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS



Anexo 2: Encuesta a los productores

CUESTINARIO

La aplicación de este cuestionario es con fines académicos.
Las respuestas serán establecidas como parte del estudio para
caracterización de la bacteria *Clavibacter Michinganensis*.

1. Nombre del Propietario _____
2. ¿Cuál es el área de producción de su invernadero? _____
3. ¿Cuáles son las variedades de plantas de tomate tiene?

4. ¿Cuál es la edad promedio de las plantas que tiene?

5. ¿Presentan sus plantas enfermedades recurrentes? ¿Cuáles?

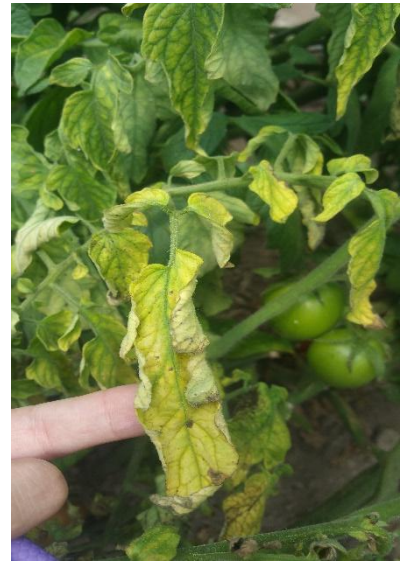
6. ¿Cada cuanto fumiga las plantas? _____
7. ¿Conoce usted información sobre la bacteria *Clavibacter Michinganensis*? _____
- 8.- ¿Qué sabe de esta bacteria? _____

Autor: Tania Mantilla
Tema: **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA BACTERIA *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* PROMOTORA DEL CÁNCER MICROBIANO DEL TOMATE RIÑÓN (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL), EN EL CANTÓN URCUQUÍ.**

Anexo 3: Fotografía de aplicación de la encuesta a los productores.



Anexo 4: Recolección de muestras vegetales



Anexo 5: Trabajo en laboratorio



Anexo 6: Protocolo de extracción de ADN

Gram Positive Bacterial Cell Lysate

Use the following protocol to prepare Gram positive bacterial cell lysate.

1. Set two water baths or heat blocks at 37°C and 55°C, respectively.
2. Prepare Lysozyme Digestion Buffer (see recipe on page 15). To ~200 µL Lysozyme Digestion Buffer/sample, add **fresh** Lysozyme to obtain a final Lysozyme concentration of 20 mg/mL.
3. Harvest up to 2×10^9 Gram positive cells by centrifugation. If you are using a frozen cell pellet, proceed to Step 3.
4. Resuspend the cell pellet in 180 µL Lysozyme Digestion Buffer containing Lysozyme from Step 2. Mix well by brief vortexing.
5. Incubate at 37°C for 30 minutes.
6. Add 20 µL Proteinase K (supplied with the kit). Mix well by brief vortexing.
7. Add 200 µL PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and mix well by brief vortexing.
8. Incubate at 55°C for 30 minutes.
9. Add 200 µL 96–100% ethanol to the lysate. Mix well by vortexing for 5 seconds to yield a homogenous solution.
10. Proceed to **Binding DNA** (page 23).

Binding DNA

1. Remove a PureLink® Spin Column in a Collection Tube from the package.
2. Add the lysate (~640 µL) prepared with PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and ethanol to the PureLink® Spin Column.
3. Centrifuge the column at $10,000 \times g$ for 1 minute at room temperature.
Note: If you are processing >200 µL starting material such as blood, buccal swabs, or Oragene™ preserved saliva, you need to perform multiple loading of the lysate by transferring any remaining lysate to the same PureLink® Spin Column (above) and centrifuge at $10,000 \times g$ for 1 minute.
4. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink® Collection Tube supplied with the kit.
5. Proceed to **Washing DNA**, page 24.

Washing DNA

1. Add 500 µL Wash Buffer 1 prepared with ethanol (page 23) to the column.
2. Centrifuge column at room temperature at $10,000 \times g$ for 1 minute.
3. Discard the collection tube and place the spin column into a clean PureLink® collection tube supplied with the kit.
4. Add 500 µL Wash Buffer 2 prepared with ethanol (page 23) to the column.
5. Centrifuge the column at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Discard collection tube.
6. Proceed to **Eluting DNA**.

Eluting DNA

1. Place the spin column in a sterile 1.5-mL microcentrifuge tube.
2. Add 25–200 µL of PureLink® Genomic Elution Buffer to the column. See **Elution Parameters** (page 13) to choose the suitable elution volume for your needs.
3. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature. *The tube contains purified genomic DNA.*
4. To recover more DNA, perform a second elution step using the same elution buffer volume as first elution in another sterile, 1.5-mL microcentrifuge tube.
5. Centrifuge the column at maximum speed for 1.5 minutes at room temperature.
The tube contains purified DNA. Remove and discard the column.

Storing DNA

- Store the purified DNA at –20°C or use DNA for the desired downstream application.
- For long-term storage, store the purified DNA in PureLink® Genomic Elution Buffer at –20°C as DNA stored in water is subject to acid hydrolysis.
- To avoid repeated freezing and thawing of DNA, store the purified DNA at 4°C for immediate use or aliquot the DNA and store at –20°C for long-term storage.

Fuente: PureLink® Genomic DNA

Anexo 7: Secuenciación de ADN

1 gtgcagtcga acggtgatgt cagagcttgc tctggcggat cagtggcgaa cgggtgagta
61 acacgtgagt aacctgcccc cgactctggg ataactgcta gaaatggtag ctaataccgg
121 atatgacgat tggccgcatg gtctggtcgt ggaaagaatt tcggttgggg atggactcgc
181 ggcctatcag gttgttggtg aggtaatggc tcaccaagcc tacgacgggt agccggcctg
241 agagggtgac cggccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag
301 tggggaatat tgcacaatgg gcgaaagcct gatgcagcaa cgccgcgtga gggatgacgg
361 cttcggggtt gtaaacctct ttagtaggg aagaagcgaa agtgacggta cctgcagaaa
421 aagcaccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg tagggtgcaa gcgttgccg
481 gaattattgg gcgtaaagag ctcgtaggcg gttgtcgcg tctgctgtga aatcccagg
541 ctcaacctcg ggtctgcagt gggtagggc agactagagt gcggtagggg agattggaat
601 tcctggtgta gcggtggaat gcgcagatat caggaggaac accgatggcg aaggcagatc
661 tctgggccgt aactgacgct gaggagcgaa agcatgggga gcgaacagga ttagataccc
721 tggtagtcca tgccgtaaac gttgggaact agatgtgggg accattccac ggtctccgtg
781 tcgcagctaa cgcattaagt tccccgcctg gggagtagcg ccgcaaggct aaaactcaaa
841 ggaattgacg ggggcccgc caagcggcgg agcatgcgga ttaattcgat gcaacgcgaa
901 gaaccttacc aaggcttgac atataccgga aacatgcaga aatgtgtgcc ccgcaaggct
961 ggtatacagg tgggtgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc
1021 gcaacgagcg caacctcgt tctatgttgc cagcacgtaa tggtggggaac tcataggaga
1081 ctgccgggggt caactcggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc
1141 ttgggcttca cgcgtctac aatggccggt acaaagggt gcgataccgt aaggtggagc
1201 gaatcccaaa aagccggtct cagttcggat tgaggtctgc aactcgacct catgaagtcg
1261 gagtcgctag taatcgaga tcagcaacgc tgcggtgaat acgttcccgg gccttgata
1321 caccgcccgt caagtcatga aagtcggtaa caccgaagc cagtggccta accgcaaggg
1381 aggagcgtcg aag

Fuente: National Center for Biotechnology Information (2008)

Anexo 8: Identificación de ADN

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Advanced Search Help

The Nucleotide database will include EST and GSS sequences in early 2019. [Read more.](#)

GenBank Send to: Change region shown Customize view

Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain Cmm VT8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: HQ144234.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

Go to: ☐

LOCUS HQ144234 1392 bp DNA linear BCT 28-JAN-2011
DEFINITION Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain Cmm VT8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION HQ144234
VERSION HQ144234.1
KEYWORDS
SOURCE Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis
ORGANISM Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis
Bacteria; Actinobacteria; Micrococcales; Microbacteriaceae; Clavibacter.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1392)
AUTHORS Lamichane,J.R., Balestra,G.M. and Varvaro,L.
TITLE Severe outbreaks of bacterial canker of tomato caused by Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in central Italy
JOURNAL New Dis. Rep. 22 (2010) In press
REFERENCE 2 (bases 1 to 1392)
AUTHORS Lamichane,J.R., Balestra,G.M. and Varvaro,L.
TITLE Severe Outbreak of Bacterial Canker Caused by Clavibacter

Analyze this sequence
Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence

Related information
Taxonomy
PopSet

LinkOut to external resources
Ribosomal Database Project II [Ribosomal Database Project II]
SILVA SSU Database

Fuente: National center for biotechnology information (2008)

Anexo 9: Socialización de resultados



Anexo 10: Llenado de encuestas



Anexo 11: Lista de asistentes

 Pontificia Universidad Católica del Ecuador ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN			
NOMBRE DEL EXPOSITOR: CARRERA: FECHA:	NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCIÓN A LA QUE REPRESENTA
	Enma Andaranga	100243292-3	Unidad Educativa
	Trinidad Salas	100243292-3	Unidad Educativa
	Hector Torres	100243292-3	Unidad Educativa
	María Fernanda	100243292-3	U.E.U.
	Patricia Wilson	100243292-3	U.E.U.
	María María	100243292-3	U.E.U.
	María Guzmán	100243292-3	U.E.U.
	Lianca Macías	100243292-3	U.E.U.
	Silvia Santacruz	100243292-3	U.E.U.
	Patricia Arévalo	100243292-3	U.E.U.
	Flora Alvarado	100243292-3	U.E.U.
	Isabel Gómez	100243292-3	U.E.U.
	Victor Cárdenas	100243292-3	U.E.U.
	Nayra Arango	100243292-3	U.E.U.
	Edmundo Macías	100243292-3	U.E.U.
	Evelyn Lechón	100243292-3	U.E.U.
	María Flores	100243292-3	U.E.U.
	María Alvarado	100243292-3	U.E.U.