

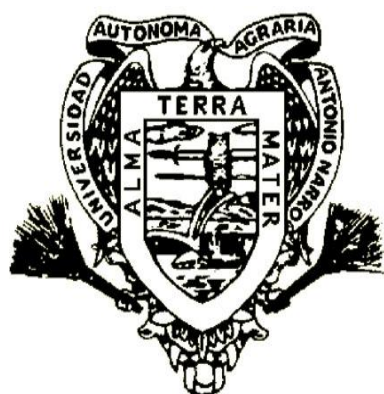
**VARIABILIDAD DE FITOBACTERIAS DE PAPA
(*Solanum tuberosum* L) Y TOMATE (*Solanum
lycopersicum* Mill) DE COAHUILA, NUEVO LEÓN
JALISCO Y SINALOA.**

MA ELIZABETH GALINDO CEPEDA

TESIS

**Presentada como requisito parcial para
Obtener el Grado de:**

**DOCTOR EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio 2012

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

Variabilidad de Fitobacterias de papa (*Solanum tuberosum* L) y tomate
(*Solanum Lycopersicum* Mill) de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y
Sinaloa.

TESIS

POR

MA ELIZABETH GALINDO CEPEDA

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y
aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:


Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor:


Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor:

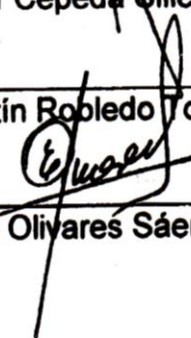

Dr. Melchor Cepeda Siller

Asesor:


Dr. Valentín Robledo Torres

Asesor:


Dr. Emilio Olivares Sáenz


Dr. Fernando Ruiz Zarate.
Subdirector de Postgrado
Buena vista, Saltillo Coahuila, Junio de 2012

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme una familia maravillosa y colocar tantos ángeles en mi camino, que me han apoyada, orientado y consolada.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por permitir la superación profesional de sus hijos, como buena Madre.

A I CONACyT por su apoyo para realizar mis estudios.

Al Dr. Alberto Flores Olivas por darme la libertad para trabajar, lo que me permitió cometer mis propios errores y aprender de ellos, por su paciencia y comprensión con mi persona.

Al Dr. Francisco D. Hernández Castillo, por su colaboración en la revisión de este documento, y acertada participación

Al Dr. Melchor Cepeda Siller por ser parte de mi comité, escuchar mis dudas y darme sus consejos.

Al Dr. Valentín Robledo Torres por su disponibilidad en colaborar y sus sugerencias, por su apoyo para terminar este documento.

Al Dr. Emilio Olivares Sáenz de la Universidad de Nuevo León, por permitirme conocer otras formas de trabajo y su valiosa participación.

Al Dr. Eugenio Guerreo (†) por alentarme a iniciar este proyecto, gracias Dr. Donde quiera que este.

A la TLQ Silvia Ovalle Nava, por su colaboración en trabajo de laboratorio, por estar a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida.

A la QFB Blanca Estela Mares Fermín del laboratorio de Parasitología Molecular por su apoyo en la realización del trabajo de tesis, deseando que no dejes de ser un gran ser humano.

A la TLQ. Cristina Sánchez Flores, por compartir sus conocimientos y apoyarme en la elaboración de medios de cultivo y reactivos.

A la TLQ Graciela del Dpto. de Ciencias Básicas.

A las secretarias del Departamento de Parasitología, Teresita de Jesús Espinoza, Claudia Godinez, Anabel Ayala, Luz María Trejo, por su apoyo durante mis estudios, por ser parte de esta gran familia de Parasitología.

A las secretarias del la Dirección de Postgrado. Juanita Alvizo, Yolanda Sánchez, Ana Valdez por atenderme, orientarme y brindarme su amistad.

A Miguel Muñiz y Gabriel Valenzuela por facilitarme los materiales, equipo y conservar las áreas en buen estado.

A todas aquellas personas que en estos momentos se me olvidan pero que de una o mil maneras estuvieron conmigo durante este tiempo apoyándome moral o físicamente muchas gracias.

Al Departamento de Parasitología por permitirme realizar mis estudios

DEDICATORIA

A mis Padres: Dina Cepeda Márquez y Víctor Galindo Fuentes.

Por ser el tronco del que prenden buenos frutos, gracias mamá por ser el ejemplo vivo de amor hacia la familia, por sacrificar tantas cosas por ella, papá gracias por los valores de responsabilidad, honorabilidad y lealtad que inculcaste en tus hijos.

A Mi Esposo Jaime Eduardo Martínez Rosales, el gran amor de mi vida, porque siendo tan diferentes somos el complemento perfecto, por tener un corazón tan noble y generoso, que me apoyo en este tiempo.

A mis Hermanas (os) y Hermanos (as) políticos:

Dina y Mario, Víctor y Dora, Claudia y Maro Enrique, María Eugenia y Marco Antonio, Araceli y Víctor., J. Antonio y Blanca M. por los momentos que compartimos, aunque nuestros papas digan que parecemos mueganos, que las ocupaciones diarias no alejen de esta gran familia.

A mis sobrinos como un ejemplo de que la edad no es un impedimento para realizar los sueños, para que busque superarse día a día.

Dina. Enrique Alejandro, Víctor Martín, Marco Antonio, Laura Elizabeth, Juan Crisóstomo, Marely Eugenia, Fátima del Rosario, José Eduardo, Mario, Víctor, Víctor Renardo, Victoria, Claudia Belén, Dina Esmeralda, Cecilia Araceli, Román. Julieta, Josafat, Romeo, Samuel.

A doña Juana Rosales (†) aunque compartí muy poco tiempo, con ella, gracias por confiarme a su hijo

COMPENDIO

Las enfermedades causadas por bacterias en papa y tomate ocasionan pérdidas del 30% en México. Se desconoce los géneros de bacterias fitopatógenas asociadas a estos cultivos, en los diferentes agroecosistemas. Por lo que planteó en este trabajo el objetivo de identificar bioquímicamente y molecularmente las cepas bacterianas presentes en estos cultivos. Se tomaron muestras de tubérculos de papa en 16 lotes comerciales en los estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa. En tomate las muestras fueron de plantas completas, follaje y frutos en separado en 8 lotes comerciales de los 4 estados anteriores y de 10 invernaderos en Coahuila y Nuevo León. Se realizó el aislamiento en medio de cultivo B'de King (KB), se purificaron e identificaron mediante pruebas bioquímicas y mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Se identificaron los géneros *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium chrysanthemi*, *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum* en papa; y en tomate *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

Palabras claves: Papa, Tomate, bacterias, identificación bioquímica y molecular por la PCR.

ABSTRACT

Diseases caused by bacteria in potato and tomato cause losses of 30% in México. It is not known genera of plant pathogenic bacteria associated with these crops in different agro ecosystems. As suggested in this paper the objective of biochemically and molecularly identify the bacterial isolates presents in these cultures. They took them samples of potato tubers in 16 commercial lots in the states of Coahuila, Nuevo León, Jalisco and Sinaloa. In tomato samples were of complete plants, foliage and fruit separately in 8 commercial lots of the former and 4 of 10 greenhouses in Coahuila and Nuevo León. Were isolated in culture medium B"of King (KB) purified and identified by biochemical reaction and polymerase chain. We identified the genera *Pectobacterium carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium chrysanthemi*, *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum* in potato; and tomato *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.

Key word. Potato, tomato, bacteria, identified biochemical and molecular by PCR

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	5
Técnicas Moleculares de Detección de Bacterias.....	5
Bacterias Asociadas a Papa y Tomate.....	7
<i>Pectobacterium spp.</i>	7
<i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	8
<i>Xanthomonas campestris pv vesicatoria</i>	9
<i>Ralstonia solanacearum</i>	11
MATERIALES Y METODOS.....	14
Obtención del material Biológico.....	14
Papa.....	14
Tomate.....	14
Aislamiento de Bacterias.....	15
Papa.....	15
Tomate.....	15
Identificación.....	16
Pruebas Bioquímicas Específicas.....	18
Conservación de Cepas.....	18
Identificación Molecular.....	18
Determinación de la <i>concentración</i> de ADN.....	19
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	19
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
Aislamientos de Papa.....	22
Aislamiento de Tomate.....	24
Pruebas Bioquímicas Preliminares.....	25
Pruebas Bioquímicas Específicas.....	28
<i>Clavibacter</i>	29
<i>Ralstonia</i>	30

<i>Pseudomonas</i>	30
<i>Xanthomonas</i>	31
<i>Clavibacter</i>	32
Identificación Molecular.....	32
Confirmación de las Cepas Bacterianas.....	34
<i>Pectobacterium</i>	34
<i>Xanthomonas</i>	35
CONCLUSIONES	39
LITERATURA CITADA	40
APÉNDICE	54

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Bacterias aisladas en papa de los estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa, variedades muestreadas y número de cepas obtenidas durante 2006, 2007 y 2008 ...	23
2	Bacterias aisladas en plantas de tomate, muestreadas en campo e invernadero durante la temporada 2006, 2007 y 2008.....	25
3	Caracterización fenotípica para diferenciar géneros bacterianos provenientes de tubérculos de papa guante 2006, 2007 y 2008.....	26
4	Pruebas bioquímicas preliminares para diferenciar géneros de bacterias aisladas de tomate de campo e invernadero.....	28

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Síntomas de pudrición negra <i>P.c.</i> subsp. <i>atrosepticum</i> en tubérculos de papa de la variedad Fiana.....	22
2	Tubérculos asintomático de la variedad Vivaldi, portadores de <i>P.c.</i> subsp. <i>carotovorum</i>	22
3	Síntomas de mancha negra <i>X. vesicatoria</i> , en tomate de la variedad Gabriela, proveniente decampo.....	24
4	Plantas de tomate con síntomas bacterianos de <i>C. michiganensis</i> de la variedad Gabriela en Invernadero.....	24
5	Respuesta parcial, a las 24h de la respiración fermentativa, de <i>Pectobacterium</i> , proveniente de Sinaloa.....	30
6	colonias de <i>C. michiganensis</i> aislados de papa de la variedad Alpha, del estado de Jalisco.....	30
7	Respuesta variable de cepas de <i>X. vesicatoria</i> , en el aprovechamiento de la arginina.....	32
8	Crecimiento de la cepa 2 de <i>X. vesicatoria</i> , aislada de tomate variedad Gabriela, del estado de Coahuila.....	32
9	Análisis de la calidad del DNA, de 20 cepas de <i>Pectobacterium</i> spp. en un gel de agarosa al 1% TAE, con, azul de bromafenol como indicador.....	33
10	Analisis de la Calidad de ADN de <i>Xanthomonas vesicatoria</i> en un gel de agarosa al 1% TAE, con azul de bromafenol....	34
11	Confirmación de <i>Xanthomonas vescicatoria</i> mediante la PCR y observando los valores en un gel de agarosa al 1 % TAE.....	36

INTRODUCCION

La papa (*Solanum tuberosum* L), y el tomate (*Solanum Lycopersicum* Mill), son dos productos hortícolas importantes en México, por la mano de obra que utilizan, así como por las divisas generadas (FAO, 2004). La papa ocupa el cuarto lugar en importancia económica en México superado solo por maíz, trigo, arroz con una superficie cosechada de 55,646 ha con una producción de 1.5 millones de ton con un valor comercial de 11, 622,048 mil pesos (SIAP 2010). Dentro de los estados productores de papa se encuentran Chihuahua, Nuevo León, Puebla, Estado de México. Jalisco, Michoacán, Veracruz, y Coahuila entre otros, en 2008 su cultivo genero 17,500 empleos directos y 51,600 indirectos (Conpapa, 2008).

El tomate ocupa un lugar muy importante en relación al desarrollo económico y social de la horticultura en México, pues es uno de los principales generadores de divisas en el país. Durante el 2010 la exportaciones de tomate tuvieron un valor comercial de 177,233 mil dólares (Banco de México 2010), en el año se sembraron 55 mil ha con una producción de 2.3 millones de ton (SIAP, 2010).

Sin embargo la superficie dedicada a la producción ha ido decreciendo gradualmente debido a problemas de plagas, altos costos de

producción y a la disponibilidad de recursos hídricos limitados (Productores de hortalizas 2010).

Las regiones con mayor producción son Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Morelos, Michoacán, Nayarit Sonora, Puebla Jalisco entre otros. Este cultivo genera fuentes de trabajo por actividades que van desde labores de cultivo y cosecha hasta la selección, empaque y venta del producto (Cruz *et al.*, 1998).

El costo de producción de estos cultivos varia de 25 a 125 mil pesos/ha, dependiendo la región, nivel de tecnificación y de las condiciones ambientales. Gran parte del costo se invierte en pesticidas para evitar del daño de insectos y enfermedades ocasionadas por hongos bacterias, fitoplasmas, virus, nematodos entre otros. En los últimos años las pérdidas de producción por enfermedades bacterianas se ha incrementado oscilando entre un 3 y un 30%, aunque en algunos años ha sido del 100% (Flores *et al.*, 2004; Velásquez y Medina, 2005). Entre las bacterias que afectan a dichos cultivos se encuentran la marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) que se encuentra distribuida en las regiones de clima tropical, subtropical y templado del mundo, se reporta en casi todos los países productores de la papa, afecta a cerca de 2 millones de ha, lo que representa el 2 % de las áreas cultivadas con papa y las pérdidas totales estimadas son de 950 millones de dólares por año (Prior *et al.*,2006). *Ralstonia* es considerada como un agente de agro terrorismo en la Unión Europea y los Estados Unidos de Norteamérica, (Lambert, 2002; Swanson *et al.*, 2005).

La pudrición suave (*Pectobacterium carotovorum*) tiene una distribución mundial, es considerada una bacteria muy importante en papa, zanahoria, pepino, chile, tomate entre otros; junto con *Dickeya chrisanthemi* causan pérdidas estimadas entre 50 – 100 millones de dólares (Burr *et al.*, 2006). La mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*), reduce el valor comercial del fruto del tomate al causarle una lesión negra al igual que en las hojas (Quintero, 2008) y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate y *C. m.* subsp. *sepedonicus* en papa, son bacterias de interés cuarentenario para el país considerado en el grupo A1 ya que la subespecie *michiganensis* se encuentra presente en áreas restringidas del país (Chiapas, Sinaloa y San Luis Potosí) (Velásquez y Medina, 2005; SAGARPA, 2004). La subespecie *sepedonicus* tiene importancia en la certificación de semilla de papa por presentar cero tolerancia a este patógeno (Roberts *et al.*, 2006; Rivera 2005).

Las fitobacterias causan diversos síntomas en campo, invernadero y/o almacén, por lo que se utilizan diferentes métodos para detectar los géneros y especies de cada una de estas. Los métodos más usados son los bioquímicos y patogénicos (Kargan *et al.*, 2002.; Seo *et al.*, 2002) sin embargo estos estudios fenotípicos deben de ser complementados con otros métodos de detección y caracterización de las especies (Terta *et al.*, 2010), como son el análisis de esteres metílicos de ácidos grasos (FAME) (De Boar *et al.*, 2006), el análisis mediante técnicas serológicas y enzimáticos (ELISA), inmunofluorescencia e inmunocaptura (Smith *et al.*, 1995;Janse, 1988) así como el uso de técnicas moleculares basados en la

reacción de la polimerasa en cadena (PCR) que son una herramienta rápida y sensible (Helias *et al.*, 1998). La detección en la variabilidad fenotípica, bioquímica y genética de las bacterias, su rango de hospederos, la homología con bacterias de otros orígenes son importantes para el establecimiento de programas preventivos en el manejo de la enfermedad en base a las condiciones ambientales de cada región, (Peñaval *et al.*, 2009). En México no hay reporte de una caracterización fenotípica y molecular de cepas bacterianas aisladas de solanáceas, en las diferentes regiones productoras del país que nos ayuden a implementar tratamientos preventivos o de control de las enfermedades bacterianas en papa y tomate, por lo que los objetivos del presente estudio son identificar los géneros, especies y subespecies de bacterias presentes en papa y tomate en los estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa y describir la variabilidad que existe entre los aislamientos.

REVISION DE LITERATURA

Técnicas Moleculares de Detección de Bacterias

La detección de bacterias fitopatógenas mediante técnicas moleculares se basan en la presencia de secuencias repetitivas de DNA, en los genomas de eucariontes y procariontes, (Louws *et al.*, 1999), y genes del rRNA bacteriano evolutivamente conservados en la regiones 16SrRNA, 5SrRNA y 23SrRNA , los cuales generan iniciadores universales presentes en tres familias , (REP, ERIC y elementos BOX), los que amplifican regiones de DNA presentes en un grupo de bacterias, como es el caso de las entrobacteriaceas en donde se utilizan secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP), en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos (Vila *et al.*, 1996).

Dentro de las secuencias repetitivas del ADN bacteriano se buscan secuencias específicas en funciones desconocidas o conocidas como la de los genes asociados a la patogenicidad de la bacteria (Leite *et al.*, 1994), el entendimiento de los mecanismos de patogenicidad ha permitido el diseño de números oligos (iniciadores) que se derivan de estos, Darrasa *et al.*, (1994) diseñaron un iniciador que codifica la enzima pectoliasa(genpel) la cual esta asociada al síntoma de pudrición blanda que provocan cepas de

Pectobacterium carotovorum (*Erwinia carotovora*) y con los cuales se pueden identificar las especies pectolíticas *wasabie*, *atroseptica* y *odorifera* pero no a *betavascularum* u otras especies de *Pectobacterium*.

Tiago *et al.* (2007), analizaron la secuencias de dos genes encontrados en diferentes especies de *Xanthomonas*, relacionados con los factores de patogenicidad (*rpf8*) y la síntesis del ATP (*atpD*), encontraron 11 grupos con un 55% de similitud entre las especies y en el séptimo grupos de encuentran las especies *vesicatoria* y *axonopodis*

Dafna *et al.* (2007), encontraron en la cepa de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Gen BankAM039952) caracterizada por Thieme *et.al.*, (2005) un gen asociado a virulencia *avrBs2*, el cual es conocido como un efector tipo III de virulencia (Sambrook, 1989) así como otros genes involucrados en el metabolismo bacteriano que formar enzimas *bga2* con la cual degrada polisacáridos del tomate para alimentarse

Eichelaub *et al.* (1992) encontraron una cepa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) con genes de patogenicidad *pat.1* en un plásmido pCM1, Meletzus *et al.* (1993) un gen para una endocelulasa (*cel A*) en un plásmido pCM2, usando una secuencia parcial el gen de patogenicidad *pat 1*, Dreir *et al.* (1995) diseñaron un juego de iniciadores (CMM-5 y CMM-6) que detectan solamente cepas virulentas de *Cmm* que les ayudo a establecer un método de diagnostico por PCR para este patógeno en tejidos vegetales y semillas.

Seal *et al.* (1999) uso los Oligonucleótidos OLI1 y Y2 cuyas regiones blanco son secuencias específicas de la región 16S rADN de *Ralstonia*

solanacearum que amplifica un patrón de banda de 292 pb y detecto la bacteria en tubérculos asintomático y con síntomas provenientes de Colombia

Bacterias Asociadas a Papa y Tomate

Pectobacterium spp

Las bacterias responsables de la pudrición de raíz y pudrición negra, se encuentran en el grupo conocido como entericas y descritas como *Erwinia* por Lelliot and Dickey (1984), las cuales fueron propuestas para estar actualmente en el género *Pectobacterium* (Hauben *et al.*, 1998).

Pectobacterium spp. Ocasiona pudriciones de raíz en un amplio rango de especies de plantas incluyendo, papa, tomate, chile, zanahoria entre otras, la taxonomía del género *Erwinia* es compleja y está constituida por varios grupos. El más relevante es el grupo *carotovora* que se caracteriza por incluir la especie *E. chrysanthemi* (Ech) y las subespecies *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) y *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca). De acuerdo a Hauben *et al.* (1998) éstas han sido clasificadas en el antiguo género *Pectobacterium*, como *P. chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, sin embargo, esta nomenclatura no ha sido ampliamente aceptada por los fitopatólogos. Los síntomas causados por estas bacterias en tubérculos y base de los tallos son la clásica alteración enzimática de los tejidos, que se tornan blandos y

húmedos. Así mismo, también como acción bacteriana se puede presentar una errática emergencia de los tallos y la posterior caída de los mismos. Otro síntoma, es el colapso del pedúnculo de la flor ya cortada durante el período de poscosecha. Además, el tejido degradado y macerado por las *Erwinia* spp. bajo condiciones naturales es de consistencia blanda, de aspecto opaco, de color blanco y desprende un fuerte olor a podrido. (Welsh, 1991; Dole y Wilkins, 1999).

***Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*.**

Esta enfermedad fue estudiada por primera vez por Smith (1910), ya que se detectó un año antes en Michigan, Estados Unidos, actualmente se encuentra dispersa en todo el mundo, es considerada una de las enfermedades más importantes en diferentes regiones productoras de tomate a nivel mundial (Nazari *et al.*, 2007).

C. michiganensis subsp. *michiganensis* fue clasificado como *Corynebacterium michiganensis* desde 1930 a 1980, hasta que fue reclasificada en el género *Clavibacter*, basado en el conocimiento sobre la composición de la pared celular (Davis *et al.*, 1984). *C. m* encuentra dentro del grupo de las bacterias Gram-positivas con alto contenido de guanina citosina (G + C), dentro de este género se encuentran patógenos que afectan varias especies de solanáceas forrajes, céspedes y granos (Lee *et al.*, 1997).

La especie *michiganensis* se subdivide en cinco subespecies de acuerdo al rango de hospederos, *C.m.* subsp *sepedonicus* en papa, (*Solanum tuberosum*), *C.m* subsp. *nebraskensis* en maíz (*Zea mays*) *C.m.* subsp. *tesselarius* en trigo (*triticum aestivum*), *C.m.* subsp. *insidiosus* en alfalfa (*Medicago sativum*), y *C.m.* subsp. *michiganensis* en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Gartemann *et al.*, 2003).

C.m.m puede sobrevivir durante dos o tres años en restos de plantas que se encuentran en el suelo, y puede entrar a la planta a través de heridas y aberturas naturales como las estomas.

El patógeno puede infectar la semilla y también puede ser transmitido a las áreas libres por medio de semillas comerciales (Luo *et al.*, 2007). La semilla es el principal vector a larga distancia y el comercio facilita la diseminación de la enfermedad en todo el mundo (De León *et al.*, 2007).

Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria

El género *Xanthomonas* fue propuesto por primera vez por Dowson (1939) quien describió 60 especies, todo este tiempo fue clasificada de acuerdo a características fenotípicas, bioquímicas, morfológicas y patogénicas, pero con los avances de biología molecular es necesario, reevaluar la posición taxonómica de las especies de *Xanthomonas*. Algunos de los efectores fueron hechos en basa a la homología del DNA-DNA, la utilización de las fuentes de carbón sugieren la clasificación de 20 especies dentro del género (Yang *et al.*, 1993; Vauterin *et al.*, 1995)

La relación filogenético de estas 20 especies fue evaluada basada en el gen 16S rRNA y únicamente encontrón tres grupos ya que hay una alta similitud (98%) entre las especies (Hauben *et al.*, 1998), en 2002 Gong y Rosato encontraron seis grupos filogenéticos basados en el análisis de la región espaciadora de los genes de 16S -23S rRNA, sin embargo hay grupos de muchas especies que no pueden diferenciarse, Tiago *et al.* (2007), analizaron la secuencias de dos genes encontrados en diferentes especies de *Xanthomonas*, relacionados con los factores de patogenicidad (rpf8) y la síntesis del ATP (atpD), encontraron 11 grupos con un 55% de similitud entre especies y en el 7 agruparon a las especies *vesicatoria* y *axonopodis*

Este género causa la mancha bacteriana de tomate y chile, puede encontrarse en casi todas las regiones donde se cultiva estos hospederos (Stall, 1995) según sus características fenotípicas y genéticas, *Xcv* se clasifico en cuatro distintos grupos A, B, C, y D. Dos de cuatro grupos el Ay B se encuentran distribuidos en todo el mundo y son los más estudiados en términos de taxonomía, en 1995 fueron reclasificados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* y *Xanthomonas vesicatoria* respectivamente. El Grupo C se aisló en 1991 y recientemente se le ha encontrado en muchas regiones productoras de tomate de México y estados Unidos. Las cepas del grupo D, originalmente aisladas en Costa Rica se determino que se encontraban estrechamente relacionadas con *X. gardneri*, aislada en Yugoslavia en 1957.

El grupo D, se identificó en Canadá y Brasil. En 2005 el grupo A fue reclasificado a *X. euvesicatoria*, el grupo C se clasificó como *X. performans* y el grupo D como *X. gardneri* (Jonás, 2008)

La bacteria inverna en la semilla contaminada durante la extracción, en los restos de las plantas infectadas que se encuentran sobre el suelo y quizás en otros hospederos (Agrios, 2005)

Ralstonia solanacearum

La podredumbre parda de la patata se describió por primera vez en Estados Unidos en 1896, se ha considerado una bacteria de zonas tropicales y sub tropicales, aunque se ha detectado en los cinco continentes. *Ralstonia solanacearum* es la bacteria fitopatógena, después de *Agrobacterium tumefaciens*, que puede afectar a un mayor número de especies vegetales, se ha citado sobre más de 200 especies distintas, de alrededor de 50 familias. (Ito *et al.*, 1998) La familia más susceptible, referida a número de especies afectadas es la Solanácea, en la que se encuentran huéspedes de mayor importancia económica como la papa, tomate, pimiento, berenjena, algodón, tabaco, cacahuete etc.

Los primeros reportes la mencionan como una *Pseudomonas* no fluorescente en 1983 fue asignada al género *Burkholderia* por He *et al.*, (1983). En 1992 fue transferida al grupo II de homología del rRNA en base al análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos del gen 16S rRNA fue reclasificada como *Ralstonia* (Yabuchi *et al.*, 1995).

Esta bacteria es una especie compleja, heterogénea que comprende diversas poblaciones, tanto en estudios bioquímicas como moleculares (Hayward, 1991, Martins 2000), la cual se observa en la especificidad de la bacteria para aprovechar diferentes fuentes de alcoholes y disacáridos la especie se ha dividido en cinco biovars (Engelbrech, 1989) así como el rango de hospederos (patogenicidad) la especie se dividió en III razas (Hayward y Hartman, 1994). La raza III (biovar 2), que afecta a las solanáceas, adaptada a temperaturas más bajas 28-30 °C Raza I (biovar 1,3, 4 y 5) con un amplio rango de hospederos (papa, tomate, tabaco etc.) temperatura 33-37 °C y la raza II (biovar 1) afecta principalmente a bananero con una temperatura óptima de 33-37 °C.

R. solanacearum contiene varios genes involucrados en la interacción hospedero-patógeno que han servido para diseñar iniciadores que detecten a esta bacteria en tejido asintomático o con síntomas como son el OLI y Y2 que amplifican una región del 16S rRNA de 288 pb y que son conocidos como hrp (hypersensitive reaction and pathogenicity) por se responsables del inicio de los síntomas en plantas hospederas y el desenvolvimiento de la reacción de hipersensibilidad en plantas no hospederas (Feng *et al.*, 1992)

Chavarro y Ángel (2007), usaron estos mismo iniciadores para la identificación de *R. solanacearum* en tubérculos asintomáticos y usando cinco iniciadores reproducibles (OPA13, OPC6, OPC8, OPC11, y OPD7) mencionados por Thwaites *et al.*, (1999) analizo el polimorfismo de amplificación al azar del DNA (RAPD) diferencio y agrupo las cepas de esta

bacteria de acuerdo a las regiones geográficas de procedencia y razas, encontrando una alta variabilidad genética

MATERIALES Y METODOS

Durante los años 2006, 2007 y 2008 se colectaron muestras de plantas de papa y tomate con síntomas de bacteriosis en campo e invernadero en los municipios de: Arteaga Coahuila; Navidad, Nuevo León; Tapalpa, Jalisco y en los Mochis, Sinaloa. La obtención de aislados, identificación bioquímica y molecular se realizó durante 2007 -2010 en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro de Saltillo Coahuila México.

Obtención de Material Biológico

Papa. Se muestrearon cuatro lotes comerciales de papa en c/u de los estados de Coahuila, Jalisco, Nuevo León y Sinaloa. La metodología usada fue acorde a la Norma Fitosanitaria número 40 (NOM-FITO 040-1995), en la que indica que se deben de recorrer 200 m lineales por surco, en cinco puntos por lote, obteniéndose 2000 tubérculos por estado.

Tomate. Se muestrearon 10 invernaderos, 5 en Coahuila y 5 Nuevo León. Se colectaron 50 plantas completas y 400 muestras de frutos y follaje. En

Jalisco y Sinaloa se muestrearon cuatro lotes comerciales por estado para obtener 80 plantas completas y 800 muestras de frutos y follaje.

Aislamiento de Bacterias.

Papa

Se revisaron visualmente los 2000 tubérculos de cada estado y se seleccionaron 800 con síntomas de pudrición. En estos se obtuvieron muestras compuestas de cinco tubérculos cada una, de donde se tomaba cinco g de tejido por tubérculo, y se macero en 10mL de agua destilada estéril. Se dejó reposar por una hora, realizando diluciones seriadas, sembrando 100 μ M en placas de medio B de King (KB), (King *et al.*, 1954), se incubaron a 25 ± 2 °C/24 h. En seguida se seleccionaron colonias de aspecto mucoso, con borde circular, con un diámetro de 2 a 4 mm., de colores crema, amarillo y/o rosáceas. Las colonias fueron purificadas en placas de KB incubadas a 25 ± 2 °C/48 h, las colonias cremas y rosas, las de color amarillo se incubaron por cinco días. (Noval, 1987).

Tomate.

50 y 80 plantas completas de tomate provenientes de invernadero y campo fueron procesadas separando los tejidos de raíz, tallo, follaje y fruto. Se tomaron 5 g de cada tejido y se maceraron en 10 mL de agua destilada estéril, se dejó reposar por una hora, se realizaron diluciones seriadas sembrándose 100 μ M en placas de KB, incubándose a 25 ± 2 °C/24 h. Las

400 muestras de invernadero de follaje y fruto se analizaron mediante 40 muestras de cada estado, compuestas de cinco tejidos diferentes tomando 2 g de cada uno, los que se maceraron en 20 mL de agua destilada estéril, incubándose 1h, realizando las diluciones seriadas de las que se tomaron 100 μ M de solución depositando en placas de KB, incubadas a 25 °C/24 horas.

De las 800 muestras de follaje y fruto de campo se analizaron 40 muestras de cada lote comercial mediante una muestra compuesta de 5 tejidos diferentes de los que se tomaron 2 g de tejido macerados en 20 mL agua destilada estéril, incubadas 1 h, realizando diluciones seriadas depositando 100 μ M en placas de KB, incubadas a 25 °C/24 h, las colonias de color crema y amarillas convexas de 4mm, y las de color amarillo de 1 a 2 mm de diámetro se incubaron siete días a 25 °C.

Identificación de Bacterias

A las cepas purificadas se les realizaron las pruebas bioquímicas y fisiológicas preliminares de Gram, RYO, Oxido – Fermentación (O/F) (Hugo-Leiffeson, 196 Levana, Oxidasa, pectolisis de papa, Arginina e hipersensibilidad del tabaco (LOPAT), presencia de flagelos y morfología colonial de acuerdo a la metodología de cada una de ellas. (Schaad *et al.*, 2001; López, 2001; Janse, 2005).

Pruebas bioquímicas específicas

En base a los resultados preliminares se detectaron presuntamente los géneros *Pectobacterium*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Clavibacter* y *Pseudomonas*, por lo que se procedió a realizar las pruebas bioquímicas específicas para cada especie y/o sequovar (Schaad *et al.*, 2001; Janse, 2005).

Las pruebas bioquímicas específicas para cada especie se basan en el requerimiento de oxígeno del género, en la descomposición de macromoléculas, la hidrólisis del almidón, el crecimiento en temperaturas extremas, la acidificación de diferentes fuentes de carbón, y el aprovechamiento de estas, la sensibilidad a los antibióticos, la actividad de diferentes enzimas, así como el crecimiento en medios diferenciales o selectivos.

Conservación de las Cepas

Las cepas se mantuvieron en soluciones de crió conservación a base de NaCl 1%, Glicerina al 70%, agua destilada estéril y medio líquido extracto de levadura (YDC), en tubos de ensayo de capacidad de 15ml, a 4 °C en un congelador convencional, y un duplicado de estas así como en tubos eppedor de capacidad de 1.5ml en el ultracongelador REVCO a -70°C. (Lapage *et al.*, 1970; Hatt, 1980)

Identificación Molecular

Extracción del ADN

Para la extracción de ADN bacteriano se utilizó la técnica de Harwood y Cutting (1999), modificada, en donde las bacterias fueron inoculadas en medio líquido Luria-Bertani (LB), el cual contenía Triptona 10 g, cloruro de sodio 5 g, extracto de levadura 5 g/L de agua, en tubos de capacidad (13x100) en los que contenían 3 mL de medio, se incubaron a 37 °C con agitación vigorosa para llegar a la fase estacionaria (16 h), la extracción se realizó de la siguiente forma. Se colocó el crecimiento bacteriano en un tubo eppendorf de 1.5 mL centrifugándolos a 14,000 rpm y se desechó el sobrenadante, a la pastilla se le adicionaron 150 µl de buffer de lisis (0.1 M NaCl, 50mM EDTA pH 7.5) y 15 µl de N-lauryli sarcosine y se mezcló con vortex, se le adicionó fenol frío 200 µl se mezcló con vortex y se centrifugó a 14,000 rpm/5min. Se recuperó la fase acuosa y se le dio el mismo tratamiento con fenol, se le adicionó 200 µl de acetato de sodio 3M con pH 4.8 a 5.2 y sin agitar 500 µl de etanol puro frío, se incubó a 4 °C/20 min; se lavó la pastilla con etanol 70% por dos veces y se re-suspendió la pastilla en 200 µl agua bi destilada estéril y se almacenó a -4 °C.

Determinación de la concentración de ADN

La concentración y la pureza del ADN se estimó por espectrofotometría mediante la lectura de absorbancia a 260-280nm, en un transiluminador Thermo spectronic BioMate 3, el ADN purificado se conservó a -4 °C hasta realizar el ensayo. Para corroborar la pureza del ADN se corrió un gel de agarosa al 1%, usando 5µM de la muestra, por celdilla, visualizando los resultados en un transiluminador.

La confirmación de los géneros y especies detectados mediante las pruebas bioquímicas se realizó usando la reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Pectobacterium carotovorum (Erwinia carotovora)

Se usó un par de iniciadores específicos para el subgrupo de *Pectobacterium carotovorum* pv *carotovorum* el cual amplifica una banda de 500pb (Eisse *et al.*, 2008; Kangan, 2003) las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 2 µM de DNA, 25 pmol de cada iniciador EXPCCF/EXPCC,; 200 µM de cada dNTP, 2.5 µl de buffer PCR 10x incluido MgCl₂ y 0.5U de Taq polimerasa, con el siguiente programa de desnaturalización a 94 °C/ 5min, amplificación 2 µl 5 ciclos a 94°C/30 seg. 72 °C/ 90 seg. Y terminado con un ciclo de incubación de 72 °C/ 5 min.

El producto de amplificación fue observado en un gel de agarosa al 1% usando 3 µl de colorante de azul de bromo fenol y 5 µl de la muestra del producto de PCR y se corrió a 80 V/ 90 min, el resultado se observó en el transiluminador UVP Ultraviolet transiluminator BioImaging Systems GelDoc-IT-IMagning Sistem.

Se utilizaron además los iniciadores Y 45 y Y 46 que detectan a *Pectobacterium carotovora* pv *atroseptica* (Darrese *et al.*, 1994 ; Frechon *et al.*, 1995) bajo las siguientes condiciones de la PCR, 0.2U de taq polimerasa, 5 µl de buffer PCR 10x, 3 µl de cloruro de MG 25mmol, 4 µl de cada uno de los dNTPS 1mmol y 0.2 µl de cada uno de los iniciadores con un paso inicial de desnaturalización a 94°C/5 min., 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C/30 seg., anillamiento a 55°C/45 seg., y extensión a 72 °C/45 seg., con un ciclo final de extensión a 72 °C/7 minutos (Yahioui *et al.*, 2003).

El programa de los iniciadores ERWFOR, ATROREV se realizó bajo las siguientes condiciones de la PCR, en un volumen de 50 µl, dNTPs 0.3 µl, iniciadores, 20 µl de cada uno, buffer PCR 1X, MgCl₂ (mM) 1.5 µl y Taq polimerasa 1.5 U, con el siguiente programa de perfiles térmicos fase 1, 94 °C/4 min, 1 ciclo, Fase 2; 94 °C/60 seg, 55 °C/60seg, 72 °C/2 min., 30 ciclos, Fase 3; 94 °C/60seg, 55 °C/60seg. 72 °C 10 min (Smid *et. al.*, 1995)

***Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (*Xanthomonas euvesicatoria*, *X. vesicatoria*).**

El iniciador que se uso para detectar *X. campestris* pv *vesicatoria* detecta un gen de la familia de proteínas Rhs XCV50 y XCVR50, el cual amplifica una banda de 517pb, la amplificación es en un volumen de 50 µl que contiene 10 mM KCl, 1.5 µl MgCl₂, 0.01 % de gelatina, 0.2 µl de cada dNTP, 10 pM de cada iniciador. 2 U de Taq polimerasa, y 50 nd de DNA. La reacción se corrió con el siguiente programa desnaturalización 94 °C/ 5min 25 ciclos en donde cada ciclo consta de 94 °C/60 seg, 58⁰C/30 seg y 72 °C/ 60 seg, con un ciclo final de extensión de 72 °C/10 min (Dong, 2009)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislados de Tomate.

Durante el 2006, se obtuvieron 100 cepas bacterianas de los estados de Coahuila y Nuevo León en siete variedades de papa, el seis porciento de los tubérculos de la variedad Fiana se asociaron con síntomas presuntivos de pudrición negra (Figura 1), el 10% de los tubérculos de la variedad Atlantic provenían de plantas asociadas con síntomas de marchitamiento Cuadro 1.

En 2007 y 2008 se obtuvieron 100 cepas bacterianas provenientes de tubérculos asintomáticos en seis variedades de papa (Figura 2), en los estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa.



Figura 1. Síntomas de pudrición negra, *P.c* subsp. *atrosepticum*, en tubérculos de la de la variedad Fiana.



Figura 2. Tubérculos asintomático de la variedad Vivaldi, portadores de *P.c* subsp. *carotovorum*

Cuadro 1.- Bacterias aisladas en papa de los estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa, variedades muestreadas y número de cepas obtenidas durante 2006, 2007 y 2008

Estado	Variedad	Año	Género bacteriana	No Cepas
			<i>Pectobacterium carotovorum</i>	20
Coahuila	Gigant	2006	<i>Pseudomonas</i> spp	5
Coahuila	Atlantic	2006	<i>Ralstonia solanacearum</i>	15
	Vivaldi (Micro			5
Coahuila	tubérculos	2006	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
Coahuila	Cesar	2006	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	5
Coahuila	Monalisa	2006	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	5
			<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1
Coahuila	Felsina	2007	<i>Ralstonia solanacearum</i>	3
	Fiana	2007	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1
	Vivaldi (2 lotes)	2007	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1
Nuevo			<i>P.c. atrosepticum,</i>	15
León	Fiana	2006	<i>Ralstonia solanacearum</i>	8
Nuevo				12
León	Mondial	2006	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
Nuevo				1
León	Gigant	2007	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
Nuevo				1
León	Fiana	2007	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
Nuevo				1
León	Mondial	2007	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
Nuevo				1
León	Vivaldi	2007	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
Jalisco	Apha	2007	<i>P.c.subsp. atrosepticum</i>	1
			<i>Pectobacterium cartovorum.</i>	1
Jalisco	Fiana	2007	<i>Clavibacter michiganensis</i>	6
Jalisco	Felsina	2007	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1
Jalisco	Vivaldi	2007	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1
Sinaloa	Alpha	2007	<i>P.c. subsp. atrosepticum</i>	1
Sinaloa	Vivaldi	2008	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1
Sinaloa	Alpha	2008	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1
Sinaloa	Alpha	2008	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1

Aislados de Tomate.

En 2006 se obtuvieron 60 cepas bacterianas de plantas con síntomas de mancha negra, provenientes de invernadero y campo en los estados de Coahuila y Nuevo León en 3 variedades de tomate.

Durante 2007 y 2008 se aislaron 100 cepas provenientes de los estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa, el 80% de estas cepas se aislaron de síntomas presuntivos de mancha negra (Figura 3), el 10% de estas cepas fueron de Jalisco, de la Variedad Toro, las cuales se aislaron de plantas con síntomas de cáncer bacteriano (Figura 4), el 10% presentaron síntomas de pudrición.



Figura 3. Síntomas de mancha negra *X. vesicatoria* en tomate de variedad Gabriela



Figura 4. Plantas de tomate con síntomas de cáncer bacteriano, *C.michiganensis* plantas tomate de la var. Gabriela,

Se aislaron 3 género de bacterias en tres variedades de tomate de invernadero y campo, la variedad toro fue la que presento mayor diversidad de síntomas ya que de Jalisco se aisló a *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. en Coahuila *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y en Nuevo León a *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum*. (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Bacterias aisladas en plantas de tomate, muestreadas en campo e invernadero durante la temporada 2006, 2007 y 2008.

Estado	Variedad	Año	Patógeno
Coahuila Inv.	Gabriela	2006	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i>
Coahuila Inv.	Gabriela	2007	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Coahuila Inv.	Toro	2007	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Nuevo León Inv.	Toro	2006	<i>Pectobacterium carotovorum</i> pv <i>carotovorum</i>
Nuevo León			
Campo	Gabriela	2007	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Jalisco campo	Toro (2)	2007	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp <i>michiganensis</i>
Jalisco campo	Tequila	2007	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Jalisco campo	Gabriela (4)	2008	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
Sinaloa campo	Gabriela	2008	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>

Pruebas Bioquímicas Preliminares

De los 100 aislados de papa, 40 de ellos fueron consistentes con las propiedades fisiológicas y bioquímicas para el género *Pectobacterium*, 30 para *Clavibacter*, 25 para *Ralstonia* y 5 para *Pseudomonas*. (Cuadro 3).

(Thornley, 1960; Dye y Kemp.1977; Thomson *et al.*, 1981; Dickey y Kelman ,1988).

Cuadro 3.- Caracterización fenotípica para diferenciar géneros bacterianos provenientes de tubérculos de papa guante 2006, 2007 y 2008.

Prueba	<i>Pectobacterium</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Clavibacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
Gram	-	-	+	-
RYO	+	+	-	+
O/F	+ +	+ -	+ -	+ -
Levana	-	-	-	-
Oxidasa	- 23 +17	+	-	+
Pectolisis P	+	+	+	-
Arginina	-	-		
Híper, Tab	+	+	+	+
Flagelos	+	+	-	+ 1 polar
Catalasa	+	+	+5,-25	+
Morfo.bord	liso	liso	liso	liso
Diámetro	2mm	5mm	1-3mm	4mm
Consistencia	Mucoide	Fluida	Mucoide	Mucoide
elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Coloración	Crema	Blanca	Amarilla	Crema

De las 40 cepas presuntivas de *Pectobacterium* solo 23 dieron un 100% de homología a las pruebas bioquímicas preelminares, 17 de ellas dieron positivas a la prueba de oxidasa., por lo que fueron descartadas ya que este género no presenta la enzima citocromo C oxidasa. (Lelliot and Stade, 1987)

En el caso de *Ralstonia* solo cinco cepas no crecieron en NaCl al 7%, por lo que 20 de ellas fueron descartadas, pues este género no tiene

tolerancia para desarrollarse en concentraciones altas de cloruro de sodio (Schaad *et al.*, 2001).

Para *Clavibacter* cinco cepas dieron un 100% de homología para las pruebas sugeridas las restantes dieron una respuesta negativa a la prueba de la catalasa, es decir que las cepas obtuvieron su energía por la vía fermentativa.

En cuanto a *Pseudomonas* las 5 cepas dieron un 100% de homología a las pruebas preeliminares.

Las 80 cepas aisladas de tomate presentaron color amarillo, consistencia mucóide, diámetro de 3 mm, de ellas solo 11 se confirmaron como *Xanthomonas* pues el resto no presentó movilidad, (McGuire *et al.*, 1986). 10 cepas presentaron homología del 100% para *Pectobacterium* (Dickey y Kelman 1988) y 10 para *Clavibacter*, (Fatimí y Schaad, 1988)
Cuadro 4.

Cuadro 4.- Pruebas bioquímicas preliminares para diferenciar géneros de bacterias aisladas de tomate de campo e invernadero.

Prueba	<i>Pectobacterium</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Clavibacter</i>
Gram	-	-	+
RYO	+	+	-
O/F	+	+	-
Levana	-	+	-
Oxidasa	-	-	-
Pectolisis P	+	-	+
Arginina	-	-	
Híper, Tab	+	+	+
Flagelos	+	1polar	-
Catalasa	+	+	+
Morfo.bord	liso	liso	liso
Diámetro	2mm	1-4 mm	1-3mm
Consistencia elevación	Mucoide Convexa	Mucoide Convexa	Mucoide Convexa
Coloración	Crema	Amarilla	Amarilla

Pruebas Bioquímicas Específicas.

Para el caso de *Pectobacterium* se observó que una cepa aislada de tubérculos provenientes de Sinaloa a las 24 h presentó una respiración fermentativa parcial, el resto de las cepas fue de manera total, el grupo de las Enterobacteriaceas es de manera total en este tiempo. (Figura 5). (Hugg-Leifesson, 1953; Hayman *et al.*, 1998)

El 73.1 % de las cepas de *Pectobacterium* correspondieron a la especie *carotovorum*, el 30.4% a la especie *atrosepicum* y el 6.5% de las cepas presentaron una actividad proteica en el indol, y aprovecharon de

manera parcial al citrato como fuente de carbón, así como formaron ácido del disacárido sorbitol por lo que corresponde a la especie *chrysanthemi* (Garden *et al.*,2003), las especies de las pectobacterias pueden utilizar diferentes fuentes de azúcares para su metabolismo como la glucosa, sacarosa, rafinosa, arabitol, melobiosa, o lactosa entre otras (De Borar y Kelman, 2001), esta especie tiene la característica de ser sensible al antibiótico eritromicina. La especie *chrysanthemi* debe ser confirmada con la actividad pectinolítica de producción del indol que fue positiva sin embargo no uso como fuente de carbón la arabinosa ni el malonato (Garden *et al.*, 2003).

Clavibacter

El 100% de las cepas de *Clavibacter* aisladas de papa presentaron morfología colonial idéntica en cuanto al borde liso, aspecto mucoso, amarillas, diámetro de 2 mm, después de 15 días de incubación a 25⁰C, las 5 cepas presentaron un 100% de homología de tinción de Gram, prueba de RYO, oxidasa, y se observaron bacilos pleomorficos agrupados en "V", hidrolizaron almidón y no presentaron movilidad (Agrios, 2005; SAFRINET, 2000) Figura 6.



Figura 5. Respuesta parcial, a las 24h de la respiración fermentativa, de *Pectobacterium* edo. de Sinaloa

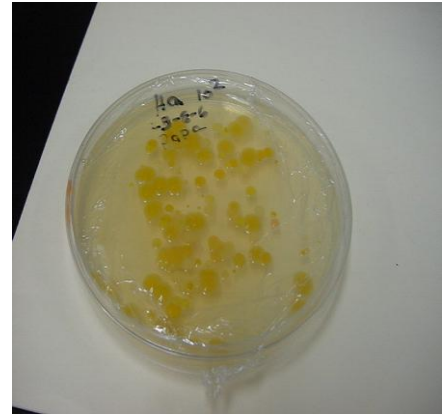


Figura 6. Colonias de *C. michiganensis* aisladas de papa de la variedad Alpha proveniente del edo. de Jalisco

Ralstonia

El 100% de las cepas en medio KB, presentaron color crema, borde circular de 4mm de diámetro, no fluorescentes presentaron un 100% de homología a las pruebas de Gram, RYO, oxidasa, catalasa, levana, pectolisis de papa, arginina, hipersensibilidad de tabaco, respiración oxidativa, y en el medio selectivo sur África modificado (SMSA) las colonias eran fluidas con el borde irregular blancas con el entro rosado después de 5 días de incubación (French *et al.*, 1995; Schaad *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2005).

Pseudomonas

El 60% de las cepas(3) en medio B de King presentaron fluorescencia, bacilos cortos, Gram - con un flagelo, metabolismo respiratorio

fermentativo, oxidasa (+), catalasa(+). aprovecharon como fuente de carbón al sorbitol, redujeron los nitratos a nitritos, el 40% las cepas (2) dieron una respuesta (-) y no aprovecharon al sorbitol como fuente de carbón (Gerhardt *et al.*, 1981) de acuerdo a estas pruebas se trata de la especie *aureaginosa* reportada como un patógeno oportunista en plantas, el cual puede causar la pudrición de raíz en lechuga y *Arabidopsis* ya que esta bacteria es capaz de formar un biofilm que le confiere resistencia a los antibióticos segregados por las raíces de las plantas (Rhame *et al.*, 1995; Walter, *et al.*, 2004)

Xanthomonas

Solo 11 cepas presentaron un 100% de homología en las pruebas sugeridas por Safrinet, (2001) y Schaad *et al.* (2001). El 56.6% de las cepas presentaron una respuesta variable en la prueba de la catalasa y de la arginina (Figura 7).

El 100% de las cepas aprovecharon como fuente de carbón al glicerol, sorbitol, y maltosa así como la hidrólisis del almidón, se formaron dos grupos en cuanto el aprovechamiento de la melobiosa ya que el 55.4% de las cepas lo hizo de manera total y el 45.6% de manera parcial y el 100% aprovecho a la rafinosa. El *sequovar vesicatoria* formo un halo transparente en el medio Tween 20, las colonias en el medio SX fueron de color morado y en el CPG las cepas 2,3 y 4 presentaron una coloración verde amarillo.

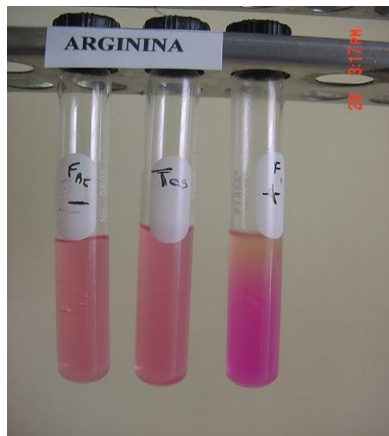


Figura 7. Respuesta variable de cepas *X. vesicatoria* en el aprovechamiento De la arginina

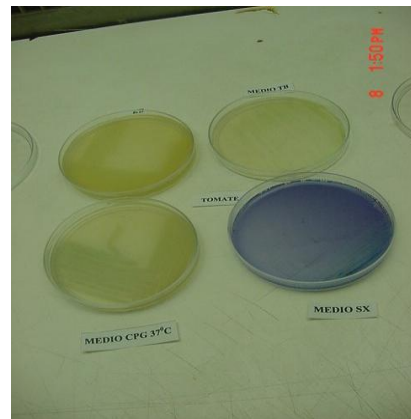


Figura 8. Crecimiento de *X. vesicatoria* en los medios diferenciales y específicos

Clavibacter

10 cepas de *Clavibacter* aisladas de tomate presentaron un 100% de homología en la morfología colonial de color, aspecto, borde, elevación y tamaño a 15 días de incubación a 25 °C, así como en tinción de Gram, prueba de RYO, oxidasa, hidrolizaron almidón y no presentaron movilidad. (Agris 2005).

Identificación molecular

Mediante la técnica de Miniprep (Velásquez, 1996) de 13 muestras de DNA del *Pectobacterium*, presentaron valores $DO_{260/280}$ entre 0.728 y 1.224, de acuerdo a Valadez y Kahl (2000), estos valores nos indican contaminación con proteínas y/o fenol. Al hacer el análisis en un gel de agarosa al 1% se observaron las siguientes bandas (Figura 9).

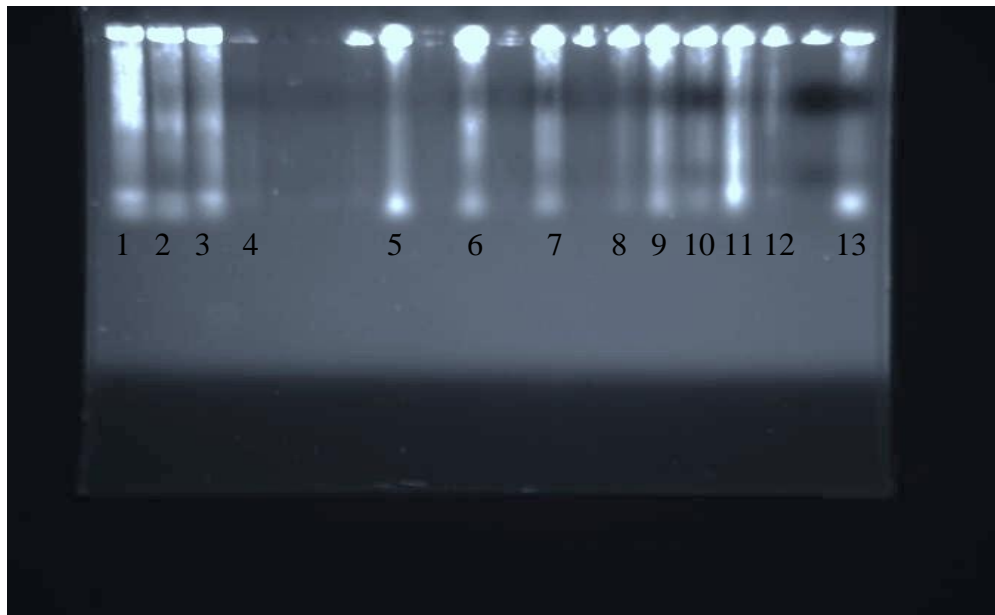


Figura 9. Análisis de la calidad del DNA, de 20 cepas de *Pectobacterium* spp. en un gel de agarosa al 1% TAE, extraídas con la técnica del Miniprep

Al usar la técnica de Harwood y Cutting (1990) en DNA de *Pectobacterium* los valores $DO_{260/280}$ fueron entre 0.968 - 2.112

En este mismo género y especie la usar la técnica sugerida por Almeida (2009), los valores se encontraron $DO_{260/280}$ 1.072 - 1.702

En el caso de *Xanthomonas* la calidad del DNA de 16 muestras los valores $DO_{260/280}$ se encontraron entre 0.263 y 3.250 lo que nos indica de acuerdo a estos autores la contaminación con proteínas y/o fenol, además las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa al 1% con TAE (Figura 10).

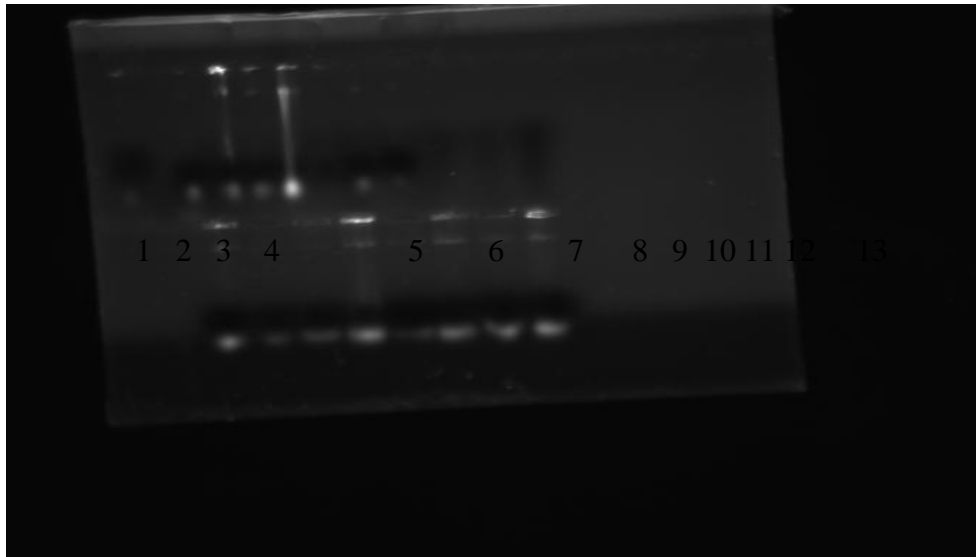


Figura 10.-Análisis de la Calidad de ADN de *Xanthomonas vesicatoria*
En un gel de agarosa al 1% TAE, con azul de bromafenol.

Confirmación de las Cepas Bacterianas.

Pectobacterium

Usando los iniciadores EXPCCR y EXPCCF, 17 cepas ampliaron un patrón de banda de 500pb como producto de la PCR (Ese *et al.*, 2004; Kangan, 2003) por lo que se confirmó que pertenece a la subsp *carotovorum*. Mahmoud *et al.*, (2007) detectaron en *Fritillaria imperialeis* a esta bacteria con los mismos iniciadores, además de las pruebas bioquímicas y morfológicas encontrado en estas variaciones en el aprovechamiento de la maltosa. El DNA de 6 cepas no amplificó este patrón de banda, y son las que se desarrollaron a 25 °C, y aprovecharon el ketometil glucósido, así como el indol como fuente de proteínas por lo que se

usaron los iniciadores ERWORF y ATROREV, propios de la subespecie *atroseptica* (Smid *et al.*, 1995) que amplifica un patrón de banda de 389pb en la PCR, y está relacionada con genes que codifican la metilproteasa. Además de los iniciadores Y45 y Y 46 que amplificaron un patrón de banda de de 438pb que codifica al gen *pelB* de la pectoliasa el cual lo diferencia de otras pectobacterias ya que son activados al momento que la bacteria entra en contacto con las células del hospedero causando una pudrición (Frechón *et al.*, 1998; Perombelon, 2002)

De Boer and Ward (1995), utilizaron los iniciadores ECA1c y ECA2r que codifican la enzima pectoliasa propia de esta subespecie y la cual amplifica en un patrón de banda del producto de PCR de 690 pb.

Xanthomonas

Como producto de la PCR, usando los iniciadores XCVF y XCVR en las cepas presuntivas de *X. campestris* pv. *vesicatoria* se observo un patrón de banda de 500pb propio de la especie *vesicatoria* (Jonás *et al.*, 2004 y 2006). La literatura menciona que existen cuatro especies involucradas en la enfermedad conocida como mancha negra de tomate, las especies *euvesicatoria*, *performans* y *gardeneri* amplifican patrones de banda de 550 bp y la especie *vesicatoria* que amplifica un patrón de banda de 500pb. Dong *et al.*, (2007) utilizaron este mismo iniciador que amplifica un gen de la familia *rhs* que es altamente variable entre los patovares de *Xanthomonas*, y muy específico para detectar a *X.c.* pv *vesicatoria* en plantas de tomate y

chile, ya que únicamente amplifica un patrón de banda como producto de la PCR de 517pb.

Leite *et al.*, (1994) mencionan que los iniciadores que se obtiene del gen *hrpB* amplifican fragmentos específicos de patogenicidad de 28 patovares fitopatógenos de *X. campestris* así como de 31 especies de *Xanthomonas* el tamaño , es de 840pb, Mitrev y Kavacevic (2006), usando un iniciador de este gen caracterizaron cepas de *X. axonopodis* pv *vesicatoria* los cuales amplificaron aquellos aislados que dieron positivos a las pruebas de patogenicidad, estas secuencias son muy conservadas en los patovares fitopatogenoas de las xanthomonadaceas.



Figuro 11.- Confirmación de *Xanthomonas vesicatoria* mediante la PCR y observando los valores en un gel de agarosa al 1 % TAE.

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* se presentó en los estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa, en los 16 lotes muestreados y en las variedades de papa; Gigant, Felsina, Fiana, Mundial, Vivaldi y Apha, así como en los micro tubérculos Cesar, Monalisa y Vivaldi del estado de Coahuila, todas las cepas se aislaron de tubérculos asintomáticos, ya que este patógeno se puede encontrar latente hasta encontrar las condiciones favorables para que se presente la enfermedad y los síntomas sean visibles, (Permobelon y Kelman 1980), la subsp. *carotovorum* es propia de regiones templadas como las que prevalecen en tres regiones, excepto Sinaloa, de la que se aisló una cepa que presentó diferencias metabólicas en el aprovechamiento del carbón contenido en el del citrato, así como en la formación de ácido a partir del sorbitol cuya respuesta es propia de *D. chrysanthemi* (Garden *et al.*, 2003), cuyo patógeno esta reportado como de regiones semitrópicas o tropicales que son las que prevalecen en dicha región, sin embargo su identidad se corrobora con iniciadores asociados a la formación de la enzima pectoliasa (*genpel*), asociada al síntoma de la pudrición blanda (Darrasa *et al.*, 1994), propio de esta especie, que afecta a un gran número de plantas hospederas como el tomate, zanahoria, calabaza cebolla entre otras, por lo que no se deben de realizar rotaciones de cultivo con estos hospederos en aquellos lotes donde se localiza la bacteria ya que puede permanecer por varios ciclos latente.

Pectobacterium atrosepticum se presentó en Coahuila, Jalisco y Sinaloa en las variedades Vivaldi y Alpha, el daño de este patógeno varia de

una localidad otra está influenciada por el clima y condiciones de almacenamiento (Perombelón y Salomón, 1995), esta enfermedad se presenta en climas fríos en suelos con exceso de humedad, condiciones de Tapalpa Jalisco y Arteaga Coahuila,, pero no en Sinaloa, la cepa aislada de este estado, se desarrollo en presencia de eritromicina, aprovecho las proteínas del indol (Garden *et al.*, 2003) respuestas propias de *D. chrysanthemi* responsable de la pudrición en climas cálidos, esta cepa no aprovecho al malonato y arabinosa como fuente de carbón, (De boar y Kelman, 2001) por lo que *D. chrysanthemi* se descarto pues al usar dos indicadores asociados con genes que codifican las enzimas metil proteasa y la pectoliasa que son activadas al momento que la bacteria entra en contacto con la célula hospedera, causando la pudrición (Frenchon *et al.*,1995; Perombelón, 2002), un tubérculo contaminado con este patógeno y almacenado puede infectar 100 kg de semilla, por lo que se considera uno de los patógenos más dañinos en la producción de papa ya que afecta en etapa vegetativa y/o almacenamiento, (Lewoos,1992). *Ralstonia solanacearum* se aliso en Coahuila y Nuevo León, en las variedades Atlantic, Felsina y Fiana esto puede deberse a la cercanía de la frontera con Estados Unidos y Canadá ya que en los últimos años la importación de papa se ha incrementado movilizand o diversos patógenos entre ellos esta bacteria que es considerada como agente de bioterrorismo por el daño económico que ocasiona en la industria del fritura de papas, (Lambert, 2002; Sanson *et.al.*, 2005), de acuerdo a la NOM-FITO-041, permite 3% de contaminación en la semilla básica para siembra en campo, la movilización de otras categorías

de semilla de papa no se tiene tolerancia para *Ralstonia* por lo que de dichos lotes infectados no se debe usar para semilla solo para el consumo en fresco o industrialización. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, se presento en Jalisco afectando a la variedad Fiana, este patógeno de acuerdo a la NOM-FITO-041, tiene cero tolerancia para cualquier categoría de semilla de papa, por lo que esta cuarentenado, el patógeno puede ser fácilmente diagnosticado pero puede pasar desapercibido en tubérculos asintomáticos infectados, para estos la detección serológica es eficiente, por lo que la confirmación de esta puede hacerse mediante técnicas moleculares (De Boar *et al.*, 2005).

Xanthomonas vesicatoria se detecto en plantas de tomate de los estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa, en invernadero y campo en las variedades Gabriela, Toro y Tequila, este patógeno demerita la calidad comercial del fruto ya que la mancha negra al crecer y madurar le da una apariencia al fruto de sarna La torre, 199), en invernadero se debe tener especial cuidado ya que existen las condiciones climáticas 24 – 30°C y alta humedad relativa que favorecen el incremento de la enfermedad, eliminar los residuos de plantas infectadas fuera del invernadero ya que son la principal fuente de inculo (APS, 2011), una vez que la mancha bacteriana se ha presentado se deben hacer rotación de cultivos como cucurbitáceas pero no con chile ya que es otro hospedero de *X. vesicatoria*. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se presento en campo en Jalisco en la variedad tequila es un patógeno cuarentenado A1, restringido a ciertas áreas del país por lo que para evitar si diseminación se debe confirmar la sanidad

de la semilla comercial (Luo *et al.*, 2007) mediante técnica fenotípicas y genotípicas que nos ayuden a detectar cepas virulenta de este patógeno (Dreir *et al.*, 1995) ya que sobrevive durante 2 a 3 años en restos de plantas o suelo e infectar a otras plantas mediante heridas o estomas e infectar al fruto y dispersarse a otras áreas del país.

CONCLUSION

Se aislaron 17 cepas de *Pectobacterium carotovorum* en papa, de los estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa 6 cepas de *Pectobacterium atrosepticum*, 3 del estado de Jalisco., 2 del estado de Sinaloa y una cepa de Nuevo León.

No se presentaron diferencia en los aislados de *Ralstonia solanacearum* de Coahuila y Nuevo León.

Clavibacter michiganensis subsp *sepedonicus* aislada de Jalisco en papa, no se detectaron diferencias entre ellas.

Existió diferencia para el aprovechamiento de la melobiosa como fuente de carbón en los aislados de *Xanthomonas vesicatoria* provenientes de Sinaloa, (7, 8, 9) y Jalisco (10,11).

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* aislada en Jalisco sus cepas no mostraron diferencias fenotípicas.

Pectobacterium carotovorum aislada en tomate no presento diferencias fenotípicas con las aisladas de papa.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. fifth edition. Ed Elsevier Academia Press. San Diego Calif. USA 992 pp.
- Almeida, L. I. S 2009. Protocolos de Fitoplasmas Fitopatógenos. En Curso Taller Calidad Fitosanitaria de Semillas de Hortalizas UAAAN. México PP. 26-28
- APS. 2011. Bacterial spot of pepper and tomato. American Phytopathological Society <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacterialsport.aspx>
- Banco de México 2010. http://www.campo.mexicano.gob.mx7portal_siap/integración/estadística
- Blancard, D., 1996. "Enfermedades del tomate: observar, identificar, luchar" Versión española de Antonio Peña Iglesias, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp: 199.
- Burr, T.; Barnard, M.; Corbett, M.; Pemerton, C.; Simpson, N.; Salmond, G. 2006. Identification of the central quorum sensing regulator of virulence in the enteric phytopathogen, *Erwinia carotovora* the VirR repressor. Molecular Microbiology 59: 113–125.
- Chavarro, M. E., and Ángel, D. J. E. 2006. Establecimiento de un sistema diagnóstico para la detección de *Ralstonia solanacearum* y diferenciación genética utilizando marcadores moleculares RAPD Rev. Colomb. Biotecnol. 1:14-31.
- CONPAPA. 2008. www.org en papa.com .or
- Cruz, O. J., García E.R. y Carrillo F. a 1998.-Enfermedades de las hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. 123pag.

- Dafna, T. A., Navon N. and Burdaman, S. 2007. Identification of Genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Induced during Its Interaction with Tomato Journal of Bacteriology 189: (17) 6359-6371.
- Darrasa, A, Priou, S, Kotoujanseky, A, Y, Bertheou Y. 1994. PCR and restriction fragment-length, polymorphism of *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. Applied on Environmental Microbiology 58:2180-2187
- Davis, M., Gillaspie A. G., Vidaver, A .K. and Harris, R. W. 1984. *Clavibacter*. a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. no., subsp. nov. And *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. Pathogens that cause ratoon stunting, disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. International Journal systematic Bacteriology 34:107-111.
- De Boer S.H and L.J Ward. 1995. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atropetica* associated with potato tissue. Phytopathology 85: 854-858
- De Boer S.H. and A.Kelman 2001.- *Erwinia* soft rot group. In Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria
- De Boer, S.H., A.O. Charkowski., R.T ZinK., J.P.MArtínez,S., A.Flores, o 1995. Procedura for Detection and Identifcacion of *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Spieckermann and Kotthoff) Davis, Gillaspie, Vidaver and Harris, in Potato (*Solanum tuberosum* L) Tubers, Revista Mexicana de Fitopatologia .3. 329- 334
- De Boer, S.H., Elphinstone, J.G. and Saddler, G.S. 2007. Molecular detection strategies for phytopathogenic bacteria. In Biotechnology and Plant Disease Management ed. Punja, Z.K., De Boer, S.H. and Sanfac, on, H. pp. 165–194. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- De León, L., Rodríguez, A., López M., and Siverio, F. 2007. Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. Journal of Microbiology 104:776-78

- Dickey R. S., A. Kelman, 1988. *Erwinia carotovora* or soft rot group. In: Schaad N.W, ed. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, 2nd edn. St Paul, MN: American Phytopathological Society, 44–59.
- Dong Suk Park, Jae Kyung Shima, Jung Sun Kima, Chun Keun Limb, Rosemary Shresthab, c, JangHoHahna, HongGiKimd hunKeunLimb, 2009. - Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on rhs family gene sequences Microbiol Res 164: 36-43
- Dreier, J; A. Bempohol, and R. Eichenlaub. 1995 Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology 85: 462- 468
- Dye, D.W and W.J. Kemp.1977.-A taxonomic study of plant photogenic *Corynebacterium* species N.Z.Journal Agric.Res.20:563-585
- Eichenlaub, R; D,Meletzus; A,Bempohl; J, Dreier and R, Bahro. 1992. Molecular analysis of pathogenic interaction of bacterium *Clavibacter michiganensis* with the host plant p 17-25 in Plant Tissue Culture and Gene Manipulation for Breeding and Formation of Phytochemicals.K.Ono, K.Oouo,T.Hirabayashi, S.Kikuchi,H.Handa y Kajiwaras eds. National Institute of Agrobiological Resources,Tsukuba, Japan.
- Eisse G. de Haan, Toos C. E. M. Dekker-Nooren, Gé W. van den Bovenkamp Arjen G. C. L. Speksnijder, Patricia S. van der Zouwen, Jan M. van der Wolf. 2008. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates Euro J Plant Pathol 122:561–569
- Engelbrecht, M. C.,and Hatting, M. J. 1989. Numerical analysis of phenotypic features of *Pseudomonas solanacearum* isolated from tobacco and other hosts in south Africa. Plant disease 73.839-898
- FAO. 2004.-Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.<http://www.fao.org/index.es.html> (consultada mayo 2006)

- Fatmi, M and Schaad N.1988. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* form tomato seed. *Phytopathology* 78: 121-126
- Feng, J., Zhang, M., Baix., Hang, B., Liu, T., Fang, M.,Tang, J. M .1992.One specific DNA piece in *Pseudomonas solanacearum* affecting *Arachis hypogaea*. International Bacterial wilts Symposium. Kaoshiung.proceeding.Koashuing: ACIAR. 245-251
- Frechon, D., and P: Exbrayat and Bertheau 1995.- Sequences nucleotidiques pour la detection des *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* Institute de la Recherche Agronomic Institut national Agronomique Paris-Grignos Sanofi Diagnostic Pasteur. Brevet Vol 95 (12) 803
- French, E. R., Gutarra, L., Alley, P., and Elphinstone, J. 1995. Culture media for *Pseudomonas solanacearum* isolation, identification and maintenance. *Fitopatología* 30:126-130.
- Garden, L; C, Gouy., R. Christen and R.Samson.2003.-Elevation of three-subspecies of *Pectobacterium carotovorum* species level *Pectobacterium atrosepticum* sp.nov.,*Pectobacterium betavasculorum* sp.nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp.nov *Int.J.Syste.Evol.Microbiol.*53: 381-391
- Gartemann, K. H., Kirchener, O., Engemann, J., Grafen, I., Eichenlaub, R. and Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* . first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium *Journal of Bacteriology* 106: 179-191.
- Gerhardt. P., R. G. E. Murray., R. N. Costilow., E. W. Nester W. A. Wood., N: R Krieg and G. B Phillips.1981. Manual of Methods for general Bacteriology American Society for Microbiology Washington D.C.USA 298 pag.
- Hatt, H. (ed.) 1980."American Type Culture Collection Methods: I. Laboratory manual on preservation, freezing and freeze-drying". American Type Culture Collection. Rockville.

- Hauben, L., E. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck, and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Sist. Appl. Microbiol.* 21:384-397.
- Hayman, L. J., I.K. Toth and M. C. M. Perombelon. 1998. Isolation and identification pages 60-70 in: M. C. M. Perombelon and J.M. van der Wolf eds., *Methods for the detection and quantification of Erwinia carotovora subsp. Atroseptica on potatoes: Laboratory Manual*. Scottish Crop Research Institute. Occasional publication No 10 Ivergowrie, Dundee, DD2 5DA, Scotland UK
- Hayward A. C., Hartman G.L 1994. Bacterial Wilt. The disease and its causative agent. *Pseudomonas solanacearum*. Ed CAB International Guilford.
- Hayward, A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathology.* 29:65-87.
- Hayward, A. C., J. G. Elphinstone, D. Caffier, J. D. Janse, E. Stefani, E. Stefani E., R. French and A. J. Wright. 1998. Round table on bacterial wilt (brown rot) of potato. Pages 410-430 in P. Prior, C. Allen and Elphinstone eds *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Proceedings of the Second International Bacterial Wilt Symposium Springer-Verlag, Berlin.
- He, L.Y., Sequeiro, L., Kelman, A. 1983. Characteristics strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease*. 67(12):1357-1361.
- Helias, V., A.-C. Le Roux, Y. Bertheau, D. Andrivon, J.-P. Gauthier, and B. Jouan. 1998. Characterization of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:685-699.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams eds 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth edition. Williams & Wilkins Baltimore, MD

- Hugh, R. and E. Leifson 1953. The Taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolites of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *L. Bacterial* 66:24-26
- Ito, S., Ushijima, Y., Fujii, T., Tanaka, S., Camella, M., Yoshiwara, S., Kishi, F. 1998. Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in Soil using a semi selective Medium and PCR technique. *Journal of Phytopathology* 146:379-384
- Janse J. D. 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *EPPO Bulletin* 18: 343-351
- Janse J. D. 2005. *Phytopathology principles and practice*. CABI publishing a division of CAB International, Oxfordshire UK 360 pp
- Jonas J. B., Lacey B. C., Bauzar Stall and Schaa N. v 2008. -Biology and manggement of bacterial spot on tomato ND PEPPER. ii SIMPOSIUM International de Bacterias Fitopatognas .Resumenes de la sociedad Mexican de Fitopatología A. c Guadalajara Jalisco México.
- Jonas, J. B., Lacey B. C, Bauzar Stall and Schaad N. V. 2004. -Reclassificacion of *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper *Syst Appl Microbial* 27:755-762.
- Kang, H. W., Kwon, S. W., and Go, S. J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* spp. *carotovorum* by primers generated from URPPCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology*, 52, 127–133.
- King, E. O. M. K Ward and D. E Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresencein J. lab. *Clinin. Med* 44: 301-307
- Lambert, C. D. 2002. *Agricultural bioterrorism protection act of 2002: Possession, use, and transfer of biological; agents and toxins; interim and final rule. (7 CFR Part 331)*. *Federal Register* 67:76908-76938
- Lapage, S. P.; Shelton, J. E.; Mitchell, T. G. and Mackenzie, A. R. 1970. - "Culture collection and the preservation of bacteria". *Methods in Microbiology*. Vol. 3. Academic Press. London, 135.

- Latorre, G. 1999. Enfermedades de las plantas cultivadas, 5ta edición, Ediciones Universidad Católica de Chile, Alfa omega, Pp 646
- Lee, I., Bartoszyk, I. M., Gundersen-rindal, D. E. and Davis, R. E. 1997.- Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2631-2636.
- Leite, R. PJr., Minsuage, G. V; Bonas U; and Stall, A. E. 1994. Detection and identification of phytopathogenicis *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequence related to hrp genus of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *Applied Enverimonet Microbiology* 60:1068.1077
- Lelliot R. A, E. Billing and A. C. Hayward. 1966. A determinative scheme for fluorencens plant pathogenic bacteria *J. Appl. Bact.* 29: 470-478.
- Lelliot, R. A, and D. E. Stead. 1987. Methods for diagnosis of bacterial disease of plants. In *Methods in plant pathology* Ed T. F. U. Vol. 2. Pp 100-200
- López, F. M. C. 2001.- *Manual de Prácticas de Bacteriología*. Departamento de Parasitología Agrícola Universidad Autónoma Chapingo 100 Pág.
- Louws, F. J; Fulbright, D; Stephens, C. T and Debrujin, F. J.1995.- Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesiatoria*. *Phytopathology* 85:528-536
- Louws, F. J; J. L.Rademaker: F. J, Brujin.1999.-The three ds of PCR based genomic analysis of phyto bacteria, Diversity, detection and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 37: 81-125
- Luo, L. X., Walters, C., Bolkan, H., Liu, X. L. and Li, J. Q. 2007. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and real-time PCR assay. *Plant Pathology* 135: 1365-1372.
- Mahmoud E, M. J. Soleimani and M. Taghavi. 2007. Detection of bacterial soft-rot of crow imperial causade by *Pectobacterium carotovorum*

- subsp *carotovorum* using specific PCR primers. *Phytopathol. Mediteer* 46:168-176.
- Martins, O. L. 2000. Polymerase Chain reaction in the diagnosis of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et.al. Georg-August University, Gotting, Germany. 127 págs
- Mc Guire, R. G., J. B. Jonas and M. Sasser 1986. Tween medium for semiselctive isolation of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Disease* 70: 887
- Meletzus ,D ; A. Bermpohl; J. Dreier; and R. Eichenlaub. 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors, in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Journal of Bacteriology* 175:2131-2136.
- Millar, J. M. and J. W. Wright. 1982. Spot indole test: evaluation of four methods. *J. Clin. Patholo.* 15: 589-592.
- Mitrev S and B, Kovacevic 2006.- Characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* isolated from peppers in Macedonia .*Journal of Plant Pathology* 88(3) 321-324
- Nazari, F., Niknam, G. R., Ghasemi, A., Taghavi, S. M., Momeni, H. and Torabi, S. 2007. An Investigation of Strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in North and North West of Iran. *Journal of Phytopathology* 155: 563-569
- NORMA Oficial Mexicana NOM-040-FITO-2002, Requisitos y especificaciones para la producción y movilización nacional de papa comercial. www.senasica.gob.com.mx Normalización, Nor natividad
- Norman, D. and A. M. Alvarez,. 1989. A rapid method for presumptive identification of *Xanthomonas campestris* pv *dieffenbachiae* and other xanthomonads. *Plant. Disease* 73: 654-658
- Noval, A. C 1998. Bacterias. Dirección General de la Sanidad de la Producción Agrícola Madrid España. Manual de Laboratorio. Diagnostico de Hongos, Bacterias Y Nematodos Fitopatógenos, 118-148 p.

- Obradovic A. *et al.*, 2003. Characterization and PCR based typing of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* from pepper and tomatoes in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 110: 285-292
- Pérombelom, M. C., and A, Kelman 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Annual Review of Phytopathology*. 18,361.387
- Pérombelon M. C and G. P, Salmond. 1995. Bacterial soft rot. In Singh US, Singh R.P Koahamoto K eds *Pathogenesis and host Specificity in plant Disease Vol I* Oxford,UK: Pergamon Press 1-20
- Perombelon M. C. M & J. M. Der Wolf 1998.- Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* on potatos. *Scottish Crop Research Inst. Occasional Publication No 10* Scotland UK.
- Priou S; O. Barea and P. Aley . 2006. Manejo de la marchitez bacteriana de la papa. Folleto técnico para el manejo de la marchitez bacteriana. Centro Internacional de la papa (CIAP)
- Productores de Hortalizas. 2010. Tomates en México. Revista del agosto. <http://.hortalizas.com/pdh/index.php>
- Qintero, B: J: A. 2008. Mancha bacteriana amenaza para siembras de tomate y chile. El fitosanitario www.jswf.org.mx/downs/fittosanitario
- Rahme, L., E. Stevens, S. Wolfort, J. Shao, R. Tompkins, and F. M. Ausubel. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268:1899-1902
- Rivera C.G. 2005. Conceptos introductorios a la Fitopatología 1ed, San José C:R:EUNCO 346 pp [www. Ciad. edu. mx/salim/redir.asp](http://www.Ciad.edu.mx/salim/redir.asp) (mayo 2006)
- Roberts et-al 2006.-[www.ine.gob.mx/publicaciones libris/440](http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libris/440) cap
- Rodríguez M. M. L. 2001. Manual para la Identificación de Bacterias Fitopatógenas UACH. Chapingo Edo de México 119p.
- Safrinet. 2000.-Manual for Phytopbacteriology .Introduction to Practical Phytobacteriology, Compiled by Gozzazynskot, T., J.J Serfontein and S Serfontein, Bacterial Disease Unit ARC Plant Protection Resecar 1^aed. Institute Pretoria South Africa 83 pag.

- Schaad, N. W; J. B. Jonas and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria. 5^a Ed APS PRESS Minnesota U.S.A. 373 p.
- Seal, S.; Taghavi, M.; Fegan, N.; Hayward, A.; Fegan, M. 1999. Determination of *Ralstonia solanacearum* rDNA subgroups by PCR test. *Plant Pathology*. 48: 115-120.
- Seo, S. T., N. Furuya, C. K. Lim, Y. Takanami, and K. Tsuchiya. 2002. Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia carotovora* *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strains from Asia. *Phytopathol. Z.* 150:120-127.
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2010 SAGARPA [htt: //www Siap.sagarpa.gob.mx/](http://www.Siap.sagarpa.gob.mx/)
- SIAP 2006 SAGARPA [htt://wwwsiap.sagarpa gob, mx](http://wwwsiap.sagarpa.gob.mx)
- Smid, E. J., A. H. Jansen and L. M. Gorris 1995.- Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction *Plant Pathology* 44: 1058-1069.
- Smith A. R. Jonas P, Elphinstone J. G and Ford S. M. 1995. Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum* the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunol*(7): 67-79
- Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., and Allen, C. 2005. Behaviour of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* 95:136-143.
- Thomson S. V., Hildebrand D. C and Schiroth M. N .1981. Identification and nutritional differentiation of *Erwinia* sugar beet pathogen from members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*: *Phytopathology* 71:1037.1042
- Thornley M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism *J.Appl.Bacteriol* 23: 27-52
- Thwaites, R.; Mansfield, J.; Eden - Green, S.; Seal, S. 1999. RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. *Plant Pathology*. 48: 121-128.

- Tiago H. N. Simoes, Edmilson R. Gonçalves, Yoko B. Rosato and Angela Mehta 2007. Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rpoB* and *atpD* genes
- Valadez M. E., y Kahl G. 2000. Huellas del ADN en Genomas de Plantas. Teoría y Protocolos del laboratorio Ed. MundiPrensa México S: A de C, V 147 pág.
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K & Swings J .1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int J Syst Bacteriol 45: 472–489.
- Vázquez, L. A. 1996.-Filogenia de Hongos Endófitos del Género *Pinus* L: Implementación de Técnicas moleculares y Resultados Preliminares: Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias , UNAM. 132 pág.
- Velásquez R y M: M. Medina 2006.- Enfermedades Bacterianas del Tomate De Riego Protección y Nutrición de Cultivos año 4 No 25
- Vidaver, A. K. 1967. Synthetic and complex media for rapid detection of fluorescence of phytopathogenic pseudomonads: Effect of the carbon source. Appl. Microbiol. 15: 1523-1524
- Vila, J; M. A. Marcos and M. T Jiménez. 1996. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of *Actinobacter calcoa*, *Celtius*, *Actinobacter baumannii* .Journal of Medical Microbiology 44: 482-489
- Walker, T. S., H. P. Bais, E. Déziel, H. P. Schweizer, L. G. Rahme, R. Fall, and J. M. Vivanco. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. Plant Physiol. 134:320-331
- Welsh, J. and M. McClelland. 1991.-Nucleic Acids Res 19,861-866
- Williford, R.E and N.W. Schaad 1984. Agar medium selective isolation of *Xanthomonas campestris* PV *carotae* from carrot seeds. Phytopathology 74: 1142 (Abstr)
- Yabuuchi, E., Y. Kasato., I, Yano., H. Hatta., Y. Nishiiuchi. 1995. Transformation of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen.nov: Proposal of *alstonia pickettii* (Ralston, Pellaroni and Duodoroff 1971) comb.no., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb.nov., and

Ralstonia eutropha (Davis 1969) comb.no.Microbiol.Immunol.39:879-904

Yahiaoui, Z. R. Jouan B., and Andrivon D., 2003. Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. Plant pathology 52: 28-40

Yang P, Vauterin L, Vancanneyt M, Swings J and Kersters K .1993. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. Syst Appl Microbiol 16: 47–71..

Yap, M. N., Barak, J. D., and Charkowski, A. O. 2004. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. Applied and Environmental Microbiology 70:3013-3023.

APENDICE

ANEXO 1.-Aislados bacterianos de papa de los estados de Coahuila, Nuevo Leon, Jalisco y Sinaloa y la respuesta a las pruebas bioquímicas de los aislados de *Pectobacterium*

Prueba	Liter	Tes	PVNL1	PVNL2	PVNL3	PVNL4	PFJ5	PFJ6	PFJ7	PFJ8	PFS9
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flagelos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Levana			-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Pectolisís											
+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina			-	-	1/2	1/2	-	-	-	-	-
Tabaco H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
Indol	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Aprov. CHOs											
Arabinosa			+	+	+	+	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Form. Ácidos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPG 37 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CVP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TB			-	-	-	-	-	-	-	-	-
YDC	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA
PDA	AMARILLA	AMARILLA	AMARILLA	AMARILL	AMARILLA	AMARILL	AMARILLA	AMARILLA	AMARILL	AMARILL	AMARILL
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	1/2	+	1/2
B-King	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	+	+	+	+	+
CS	Burbujas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Sorbitol	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CD			+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 7%			+	+	+	+	+	+	+	+	+
V/P			+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketometil	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	-	-	1/2	1/2	-	1/2	-	1/2	1/2
A.fosfatasa			-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sens. Anti			-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morfología											
Color	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema	Cre,a	Cre,a	Cre,a
Tamaño	1-3mm	1mm	1mm	2mm	1mm	2mm	3mm	3mm	1mm	1mm	1mm
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Aspecto	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo
Luz Reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate	Mate
LuzTransmi	Translúcida	Tras.	Tras.	Tras.	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Tras.	Tras.	Tras.
Borde	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado

Continuación de los aislados de papa pertenecientes a Pectobacterum

Prueba	PFS10	PFS11	PVS12	PVS13	PVS14	PAS15	PAS16	PAS17	PFJ18
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flagelos	+	+	per	per	per	+	+	+	+
Levana	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Pectolisís +	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Tabaco H	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	+ +	+ +	1/2 +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aprov. CHOs									
Arabinosa	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Rafinosa	-	-	+	+	+	-	-	-	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	1/2	1/2	1/2	+
Melobiosa	+	+	+	+	+	1/2	1/2	1/2	+
Form. Ácidos	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPG 37 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CVP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TB	-	-	-	-	-	VERDE	VERDE	VERDE	VERDE
YDC	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA
PDA	AMARILLA	AMARIL	AMARIL	AMARILLA	AMARILL	AMARIL.	AMARILLA	AMARIL.	AMARILLA
Catalasa	1/2	+	1/2	1/2	1/2	+	+	+	+
B-King	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	1/2	1/2	+	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
CS	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl 7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V/P	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ketometil	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Citrato	1/2	1/2	1/2	-	-	-	-	-	-
A.fosfatasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sens. Anti	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morfología									
Color	Cre,a	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema
Tamaño	1mm	1mm	1mm	1mm	1mm	2mm	2mm	2mm	1mm
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Aspecto	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo
Luz Reflejada	Mate	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
LuzTransmi	Tras.	Tras	Tras	Tras	Tras	Tras	Tras	Tras	Tras
Borde	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado

Continuacion. - Aislados de *Pectobacterium*

Prueba	PFJ1 9	PFJ20	PVJ21	PVJ22	PVJ23
Gram	-	-	-	-	-
Flagelos	+	+	+	+	+
Levana	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+
Pectolisís					
+	+	+	+	+	+
Arginina	-	-	-	-	-
Tabaco H	+	+	+	+	+
O/F	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-
Aprov. CHOs					
Arabinosa	+	+	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+	+
Melobiosa	+	+	+	+	+
Form. Ácidos	-	-	+	+	+
CPG 37 C	+	+	+	+	+
CVP	+	+	+	+	+
TB	VERDE	VERDE	BLANCA	BLANCA	BLANCA
YDC	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA	CREMA
PDA	AMARILLA	AMARILLA	AMARILLA	AMARILLA	AMARILLA
Catalasa	+	+	+	+	+
B-King	+	+	+	+	+
Maltosa	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
CS	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-
CD	+	+	+	+	+
NaCl 7%	+	+	+	+	+
V/P	+	+	+	+	+
Ketometil	-	-	+	+	+
Citrato	-	-	1/2	1/2	1/2
A.fosfatasa	-	-	-	-	-
Sens. Anti	-	-	-	-	-
Morfología					
Color	Crema	Crema	Crema	Crema	Crema
Tamaño	1mm	1mm	1mm	1mm	1mm
Forma	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
Aspecto	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo	Húmedo
Luz Reflejada	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante
LuzTransmi	Tras	Tras	Tras.	Tras.	Tras.
Borde	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado

ANEXO NO 2.- Cepas Bacterianas Aisladas de Tomate en los Estados de Coahuila, Nuevo León, Jalisco y Sinaloa y Resultado de las Pruebas Bioquímicas. Correspondientes al género *Xanthomonas*

Prueba	Lit	Tes.(+)	TTS1	TTS2	TGC3	TGC4	TGC5	TGC6	TGS7	TGS8	TGS9	TGS10	TGS11
Medio YDC	Amar	Amar	Amar.	Amar	Amar	Amar	Amar	Amar	Amar	Amar	Amar	Amar	Amar
Tween	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SX	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado
CPG	A.V	A.v	A.vA.	A.v	A.v	A.v	A.v	A.v	A.v	A.v	A.v	A.v	A.v
TB	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama	Ama
PDA	Ama	Ama	Ama.	Ama.	Ama.	Ama.	Ama.	Ama.	Ama.	Ama.	Ama.	Ama.	Ama.
Levana	Ama	Ama	Ama.-	Ama.-	Ama.-	Ama.-	Ama/2	Ama.-	A./2	Ama.-	Ama.-	A./2	Ama.-
Oxidas	-	-	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio
Pectólisis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	+ -	- +	- +	- +	- +	- +
Tabaco	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +	- +
Catalasa	+	+	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RYO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flagelos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crec.35 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F.ácidos													
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilización de													
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ketometil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-