

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



Efecto de los rayos UV sobre el Exopolisacárido Xantano de *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin *et al.* y su efecto en la Patogenia sobre Tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

Por:

JORGE ANTONIO PÉREZ LIMONES

TESIS

Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

Saltillo, Coahuila, México.

Enero 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**

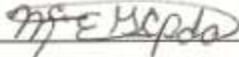
Efecto de los rayos UV sobre el Exopolisacárido Xantano de *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin et al. y su efecto en la Patogenia sobre Tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

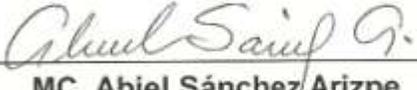
**Por:
JORGE ANTONIO PÉREZ LIMONES**

TESIS

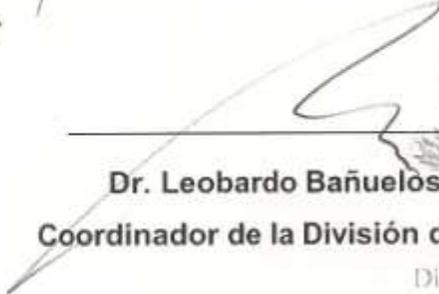
Presentado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO


**MC. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Asesor Principal**


**MC. Abiel Sánchez Arizpe
Coasesor**


**Dr. Melchor Cepeda Siller
Coasesor**


**Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía**


Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Enero 2012

DEDICATORIA

A mis Padres:

El presente Proyecto de Tesis está dedicado a mis padres *José Antonio Pérez Vázquez* y *María Neri Limones Velázquez*, autores de mi vida, quienes supieron encaminar mis pasos en la dirección correcta; hoy puedo asegurar que su optimismo, esfuerzo y sacrificio empiezan a reflejarse en mi vida, una de sus obras maestras.

A mis hermanos:

Dulce Fabiola Pérez Limones y Luis Daniel Pérez Limones

Agradezco a ustedes, por todo el apoyo que me ofrecieron y la confianza que en mi depositaran para terminar los estudios, gracias por todo hermanos.

A mis compañeros de la generación:

A todos mis amigos de la especialidad de parasitología, pero en especial a: **Laura del C. Echeverría Utrilla, Rosivel A. Bautista, Elida B. Schaper Sifuentes, María del R. Molina Hidalgo, Efrén P. Villanueva, Gregorio A. Estrada Muñoz.** Gracias por haber compartido los momentos de felicidad y de tristeza durante todo el transcurso de la carrera.

Finalmente, está dedicado a la compañera de mi vida Rosi, amiga y complemento, con quien he caminado a través de senderos de dicha y adversidad, aprendiendo en cada paso que el sol puede entristecer tanto, como la lluvia alegrar; persona grata con quien prefiero transitar este hermoso sueño que es vivir.

Jorge A. Pérez Limones

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar felizmente a este día y te pido que con tu luz me guíes y me acompañes siempre a lo largo de mi vida profesional.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por haberme formado como profesionista.

Al **Departamento de Parasitología**, por haberme permitido realizar mi trabajo de tesis.

Especiales agradecimientos a la MC. **Ma. Elizabeth Galindo Cepeda**, por su dirección y apoyo, sin los cuales no hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

Al MC. **Abiel Sánchez Arizpe**, por sus acertados comentarios y sugerencias.

A TLQ. **María Cristina Sánchez Flores**, por guía a lo largo del proyecto.

A TLQ. **Silvia Ovalle Nava** por su invaluable ayuda en la realización del Proyecto de Tesis.

Les doy las gracias:

A mi tía, **Leticia Pérez Vázquez**, por el incondicional amor, apoyo, consejo, sacrificio y comprensión.

A mi Abuela, **Teresa Vásquez Robles**, por enseñarme que el trabajo duro sólo es válido si lo repites día a día.

Jorge A. Pérez Limones

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE DE CONTENIDO	V
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE CUADROS	IX
RESUMEN	X
INTRODUCCION	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	3
REVISION DE LITERATURA	4
Generalidades del cultivo del Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	4
Importancia económica.....	4
Clasificación científica.....	5
La familia Solanaceae.....	6
Caracteres botánicos.....	6
Sistema radicular.....	6
Tallo.....	6
Hoja.....	7
Flor.....	7
Fruto.....	7
Características de las bacterias fitopatógenas.....	9
Aislamiento y purificación.....	9
Morfología colonial.....	9
Medios de cultivo.....	10
Cultivos puros.....	10
Aspectos del metabolismo de las bacterias fitopatógenas relacionadas con la patogenicia.....	11
El xantano o xantán.....	12

Características.....	12
Estructura.....	13
Usos.....	13
La Mancha Bacteriana (<i>Xanthomonas vesicatoria</i> (ex Doidge) Vauterin et a).....	15
Importancia de la enfermedad.....	15
Etiología.....	15
Taxonomía.....	16
Ciclo de la enfermedad y epidemiología.....	17
Epifitología.....	18
Características del patógeno.....	18
Sintomatología.....	19
Manejo de la enfermedad.....	20
MATERIALES Y METODOS.....	21
Localización.....	21
Metodología experimental.....	22
Procesos.....	22
Obtención de Material Vegetal de Tomate.....	22
Obtención de cepas bacterianas.....	23
Aislamiento.....	23
Pruebas preliminares y bioquímicas.....	24
Metabolismo oxidativo (fermentación de glucosa).....	24
Producción de levana.....	25
Hidrólisis de almidón.....	25
Pruebas de leche Litmus.....	25
Obtención del inóculo.....	26
Exposición de la bacteria <i>Xanthomonas vesicatoria</i> a rayos UV.....	26
Diseño experimental.....	26
Descripción de tratamientos.....	26
Inoculación.....	27
Preparación de Inóculo.....	28

Aislamiento de la bacteria.....	29
RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
Material Vegetal.....	30
Cepa bacteriana.....	30
Supervivencia del Inóculo.....	33
CONCLUSIONES.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	37
APENDICE.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura		
1	Producción mundial de tomate (del año 2002).....	5
2	Tipos de crecimiento del tomate.....	8
3	Técnica de Estría Cruzada.....	10
4	Método de vertido en placa.....	11
5	Ciclo de la enfermedad Mancha Bacteriana (<i>Xanthomonas vesicatoria</i>).....	17
6	Localización de la UAAAN en Saltillo, Coahuila, México.....	21
7	Distribución de las unidades experimentales en invernadero.....	27
8	Material Vegetal antes de la inoculación con <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	30
9	Tratamiento 5 (testigo), se observa el tejido sano, Saltillo Coahuila, 2011.....	33
10	Tratamiento con cepa 1, <i>Xanthomonas vesicatoria</i> pigmentación amarilla, Saltillo Coahuila, 2011.....	33
11	Tratamiento cepa 2, <i>Xanthomonas vesicatoria</i> verde sin exposición a luz UV, Saltillo Coahuila, 2011.....	33
12	Número de horas transcurridas en relación a los primeros síntomas de <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	34

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Ubicación taxonómica del tomate.....	5
2	Bacterias útiles asociadas a las plantas.....	13
3	Tratamientos en plantas de tomate con <i>Xanthomonas vesicatoria</i> ...	28
4	Características fisiológicas y bioquímicas de la especie <i>X. campestris</i> del género <i>Xanthomonas</i>	31
5	Tratamientos e incidencia de síntomas a las 24 horas y 48 horas después de la inoculación con <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	32

RESUMEN

México ocupa mundialmente el décimo lugar como productor de tomate rojo (*Solanum lycopersicum* L.), pero es el tercer comercializador de esta hortaliza en el mundo con volúmenes de exportación cercanos a los 600 mil ton anuales.

El tomate es una hortaliza muy conocida a nivel mundial; en México es una de las hortalizas más importantes, por el número de hectáreas sembradas, generando un mayor número de empleos y entrada de divisas, en el año 2001 se sembró una superficie de alrededor de 71,000 has, el volumen de producción fue del orden de 1, 943,000 ton, la entrada de divisas también fue de 552.8 millones de dólares.

El cultivo del tomate en las zonas hortícolas de México se encuentra afectado por diferentes enfermedades foliares, entre las cuales se encuentran las causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, es por tal razón que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la producción de xantano un exopolisacárido del género *Xanthomonas* que funciona como mecanismo de protección para la sobrevivencia a condiciones desfavorables. Se llevaron a cabo aislamientos empleando método de tejido enfermo por diluciones, se seleccionaron tejidos de plantas más dañados de cada muestra. El material obtenido se sembró en medios de cultivo KB, se seleccionó la colonia bacteriana característica al género *Xanthomonas*, llegando hasta la identificación de *Xanthomonas vesicatoria* (causante de la Mancha Bacteriana en tomate). La cepa de *Xanthomonas vesicatoria* obtenida por aislamiento de tejido enfermo de color amarillo huevo y una cepa previamente identificada proporcionada por la MC. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda del departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro de coloración verde ambas sometidas a rayos de luz UV e inoculadas en plantas de tomate. Los rayos de luz UV redujo la rapidez en expresar los primeros síntomas de *Xanthomonas vesicatoria* después de inoculadas.

Palabras clave: tomate, *Xanthomonas vesicatoria*, xantano, protección.

INTRODUCCION

En México se siembran 512,000 ha con hortalizas lo que equivale un 3.5 % de la superficie nacional; en esta superficie el 13 % corresponde al tomate rojo (*Solanum lycopersicum* L.), y el 4 % al tomate verde. La economía agrícola mundial, anualmente, se ve afectada debido a enfermedades causadas por agentes de diversa índole, entre los cuales figuran preponderadamente, los hongos, bacterias, virus y nematodos. Aun en países de grandes recursos científicos y técnicos, se habla de pérdidas que en forma global, fluctúan, entre el 7 y el 8 % de cosecha total (Romero, 1993). Las enfermedades en los cultivos hortícolas constituyen uno de los factores de mayor riesgo de pérdida en la producción, por lo cual resulta importante protegerlos del ataque de las mismas (Pérez y Rico, 2004).

El impacto económico de las enfermedades causadas por bacterias en los cultivos agrícolas ha ido en incremento en los últimos años, en gran medida por el cambio en las condiciones climáticas. Cultivos como tomate se ven seriamente afectados por enfermedades bacterianas tales como: Cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*); Mancha Bacteriana (*Xanthomonas campestris*); marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) y recientemente *Candidatus Liberibacter solanacearum*, transmitida por *Bactericera* (Paratrioza) *cockerelli* (Virgen, 2011).

Las bacterias son microorganismos simples que consisten en general en células procariontes individuales. Se conocen alrededor de 1,600 especies de ellas (Agrios, 2005).

Actualmente existen unas 60 especies reconocidas que incluyen alrededor de 300 subespecies y patovares. La estructura celular de las bacterias fitopatogenas igual que de otros procariontes se caracterizan por la falta de compartimento intracelular en forma de orgánulos. La célula se compone de una envoltura o pared celular y una membrana que engloba el citoplasma. Las bacterias fitopatógenas se distinguen de otros microorganismos fitopatogenos eucariontes en que estos últimos tienen orgánulos intracelulares (mitocondrias, retículo endoplasmático) y generalmente el material genético está repartido en varios cromosomas y englobado por una membrana que forma un núcleo durante la mayor parte de su ciclo vital (Llácer *et al.*, 1996).

El género *Xanthomonas* incluye más patógenos de plantas que todos los otros géneros juntos. Se ha demostrado que la mayoría de las especies que contiene no se puede distinguir de *X. campestris* por consiguiente se han agrupado cinco de las antiguas especies de *Xanthomonas* y más de 110 antiguos patógenos en la especie *X. campestris*. Las manchas foliares y en frutos se originan por la colonización de los espacios intercelulares y necrosis de los parénquimas debido a la infección a través de hidatodos, estomas, tricomas o lenticelas. Son los síntomas más comunes producidos por la mayoría de las especies de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* (Llácer *et al.*, 1996). La mayoría de las bacterias fitopatogenas producen sustancias que intervienen directa o indirectamente en la patogenia, entre las más importantes se incluyen fitotoxinas, exoenzimas, fitohormonas, sideroforos, antimetabólicos y exopolisacaridos como los xantanos (Llácer *et al.*, 1996). Siguiendo este principio las bacterias del genero *Xanthomonas* generan ciertos materiales durante su metabolismo que probablemente influyan para la protección a medios críticos del ambiente natural siendo este último factor para la proliferación de grandes problemas en los cultivos atacados por *Xanthomonas vesicatoria*.

Objetivos

- ✓ Determinar la función protectora del polisacárido extracelular Xantán o Xantano en la supervivencia de la bacteria *Xanthomonas vesicatoria*.
- ✓ Determinar el efecto de los rayos UV, sobre 2 cepas de *X. vesicatoria* y su efecto en la patogenicidad sobre plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

Hipótesis

- ✓ Se encontrará supervivencia y viabilidad de al menos una de las cepas de la bacteria *Xanthomonas vesicatoria* para la infección en plantas de tomate después de ser expuesta a los rayos ultravioleta (UV).

REVISION DE LITERATURA

Generalidades del cultivo de Tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

Importancia económica

El tomate es la hortaliza más importante en numerosos países y su popularidad aumenta constantemente. En la actualidad este cultivo ha adquirido importancia económica en todo el mundo. El tomate o jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos hortícolas con mayor área cultivada y producción global. México ocupó el noveno puesto en la producción con 2,1 millones de toneladas, siendo China el mayor productor con 31,6 y Estados Unidos el segundo con 12,7. (Figura 1). En cuanto a la exportación de tomate fresco, España, los Países Bajos y México se disputan las tres primeras posiciones con cifras que rondan mil millones de dólares. Dada la importancia económica de este cultivo, se hace más patente el esfuerzo tecnológico en cuanto a identificación y tratamiento de plagas y enfermedades, así como en la producción de semillas resistentes, nutrición y técnicas de cultivo adecuadas a la zona productora PRODUCTORES DE HORTALIZAS, (2006).

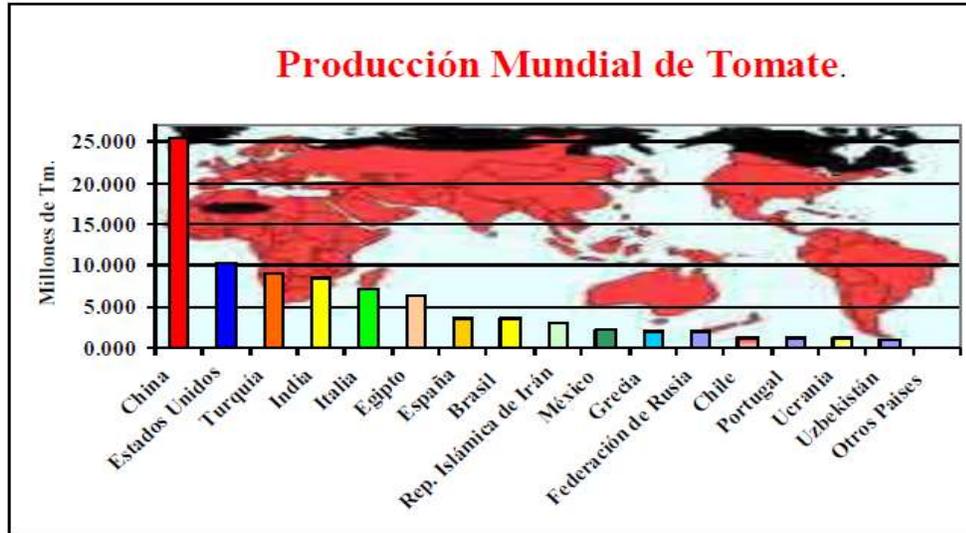


Figura 1. **Producción mundial de tomate (del año 2002) tomado de INFOAGRO.**

Ubicación Taxonómica

Los tomates silvestres se agrupaban hasta hace poco tiempo en el género *Lycopersicum*. Actualmente, ya incluidas en el género *Solanum*, se siguen descubriendo y clasificando nuevas especies de tomates, como por ejemplo *Solanum arcanum* y *S. huaylasense* en el 2005 (Peralta *et al.*, 2005). Esta nueva clasificación se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. **Clasificación científica** (Wikipedia, 2011).

http://es.wikipedia.org/wiki/Solanum_lycopersicum#cite_note-Peralta_et_al_2005-22

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>S. lycopersicum</i> L.

La Familia Solanaceae

La familia Solanaceae posee cerca de 90 géneros y más de 2,600 especies de distribución cosmopolita pero centrada en la zona tropical. Muchas de estas especies son de interés económico, ya sea como cultivos industriales (tabaco, *Nicotiana tabacum*), cultivos medicinales (Belladona, *Atropa belladonna*), cultivos ornamentales (Petunia, *Petunia hybrida*) y especies tan importantes para el ser humano como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), el pimiento (*Capsicum annuum*), la berenjena (*Solanum melongena*) todos susceptibles a daño por heladas y a daño por enfriamiento (Wikipedia, 2008). <http://es.wikipedia.org/wiki/Solanaceae>

Caracteres botánicos

El tomate es potencialmente perenne y muy sensible a las heladas, lo que determina su ciclo anual, de distinta duración según la variedad (Rodríguez *et al.*, 1997).

Sistema radicular.- El sistema radicular de la planta presenta una raíz principal, pivotante que crece unos 3 cm al día hasta que alcanza los 60 cm de profundidad, simultáneamente se producen raíces adventicias y ramificaciones que pueden llegar a formar una masa densa y de cierto volumen. Sin embargo, este sistema radicular, puede ser modificado por las prácticas culturales, y así cuando la planta procede de un trasplante, la raíz pivotante desaparece siendo mucho más importante el desarrollo horizontal. Aunque el sistema radicular puede alcanzar hasta 1.5 m de profundidad, puede estimarse que un 75 % del mismo se encuentra en los 45 cm superiores del terreno (Rodríguez *et al.*, 1997).

Tallo.- La planta de tomate es una herbácea, perene y relativamente de vida corta, cultivada como anual, es ramificada de dos tallos sarmentosos pubescentes en toda su superficie, semileñosos sin dominancia apical, con crecimiento indeterminado o determinado por un racimo floral predominando el primero. El tallo es sobre el cual

se desarrollan las hojas flores y frutos, del diámetro puede ser de 2 a 4 cm y el aporte puede ser de crecimiento determinado e indeterminado (Castellanos, 2004).

Hoja.- Compuesta e imparipinada, con foliolos peciolados, lobulados y con borde dentado, en número de 7 a 9 y recubiertos de los pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alternativa sobre el tallo. El mesofilo o tejido parenquimático está recubierto por una epidermis inferior presente un alto número de estomas. Dentro del parénquima, la zona superior o zona en empalizada, es rica en cloroplastos. Los haces vasculares son prominentes, sobre todo en el envés, y constan de un nervio principal. Una hoja típica de las plantas tienen unos 0.5 m de largo, algo menos de anchura, con gran folio terminal y hasta ocho grandes folios laterales, que pueden ser a su vez compuestas. Los foliolos son usualmente peciolados y lobulados, irregularmente con bordes dentados, las hojas están recubiertas de pelos del mismo tipo que los del tallo (Nuez, 1995).

Flor.- Las flores aparecen en racimos, siendo sencillos en la parte baja y después más divididos en ramificados. Las flores son pequeñas, pedunculadas de color amarillo, formando corimbos axilares; el cáliz tiene 5 pétalos, corolada soldada inferiormente, con 5 pétalos que conforman un tubo pequeño, los 5 estambres están soldados en estilo único que a veces sobresale de los estambres, el ovario contiene muchos óvulos. El número de flores depende del tipo de tomate (Castellanos, 2004).

Fruto.- Baya que está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas. El fruto puede recolectarse separándolo por la zona de abscisión del pedicelo, como ocurre en las variedades industriales, en la que es indeseable la presencia de parte del pecíolo, o bien puede separarse por la zona peduncular de unión al fruto. El fruto maduro es un ovario succulento comparativamente grande y jugoso. De acuerdo con la variedad difiere en tamaño, forma, color, número de celdas y disposición de las celdas (Edmond *et al.*, 1984).

Existen dos tipos de cultivares de tipo determinado y de tipo indeterminado como se indica en la Figura 2, los determinados producen una inflorescencia junto con cada hoja o cada dos hojas, suelen ser más precoces y de porte bajo, terminando el tallo en un racimo floral. Los de tipo indeterminado presentan inflorescencias más espaciadas. El tallo termina en una yema vegetativa, lo cual determina que la planta continúe creciendo de manera indefinida (Devlin, 1989).

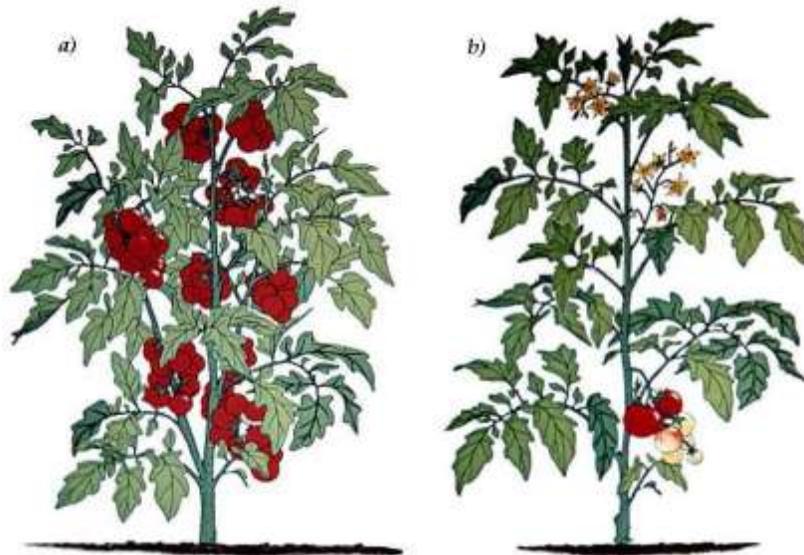


Figura 2. **Tipos de Crecimiento del Tomate** (Jaramillo *et al.*, 2007).

a) Tomate de crecimiento determinado

b) Tomate de crecimiento indeterminado

Características de las bacterias fitopatógenas

Aislamiento y purificación

Uno de los requisitos para considerar a una bacteria como el agente inductor de una enfermedad, es aislar y purificarla a partir del tejido enfermo. Para llevar a cabo esta etapa existen diferentes metodologías y la elección de cualquiera de ellas dependerá del tipo de síntoma, órgano afectado, grado de avance de la enfermedad y del material y equipo disponible. Entre las técnicas de aislamiento más comunes se encuentran las siguientes: maceración del tejido, punción directa, inmersión del tejido en agua estéril y siembra directa del tejido enfermo. El aislamiento de los patógenos por cualquiera de estas técnicas puede ser exitoso, siempre y cuando las muestras presenten zonas de avance de la enfermedad y sean frescas, lográndose obtener al o los patógenos en cultivo puro. Un requisito indispensable para el control de las enfermedades bacterianas, es la identificación exacta de ellas. Actualmente existen métodos muy sofisticados para la identificación, que incluyen la determinación de la composición y homología del DNA, Polimerización en cadena (PCR) (Rodríguez, 2001).

Morfología colonial

El aspecto general del crecimiento bacteriano en medio de cultivo, con frecuencia nos da una idea acerca de su identidad por esto es conveniente tomar muy en cuenta las características de las colonias bacterianas, sobre todo al realizar aislamientos de patógenos a partir de material enfermo, ya que de esta manera se pueden descartar todas aquellas colonias que no presenten las características del patógeno o patógenos esperados. Dentro del género *Xanthomonas* las colonias son amarillo huevo, (aunque pueden haber blancas como *X. albilineans*), pulvinadas brillantes y de consistencia mucóide, su diámetro oscila entre 1-5 mm (Rodríguez, 2001).

Medios de cultivo

Para el cultivo *in vitro* de bacterias, se requiere de la elaboración de un medio que proporcione todos los requerimientos nutricionales que permitan su reproducción, los cuales se le conocen como medios de cultivo. Los medios de cultivo contiene cuatro componentes esenciales: fuentes de carbono y nitrógeno, minerales y vitaminas. Existe una gran variedad de fuentes de carbono que se pueden emplear en los medios de cultivo como son: alcoholes, peptosas, hexosas, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, glicoles, glucósidos, ácidos e hidroxiaácidos ya sean solos o en combinación (Rodríguez, 2001).

Cultivos puros

El cultivo puro, es una condición artificial en el crecimiento de bacterias bajo condiciones de laboratorio. Para determinar las características de una especie bacteriana en particular, es imperativo que el organismo sea aislado y multiplicado en el laboratorio en cultivo puro. Existe una variedad de técnicas para el aislamiento y desarrollo de cultivos puros como son: técnica de estría cruzada (Figura 3) y la de vaciado en placa (Figura 4) (Rodríguez, 2001).

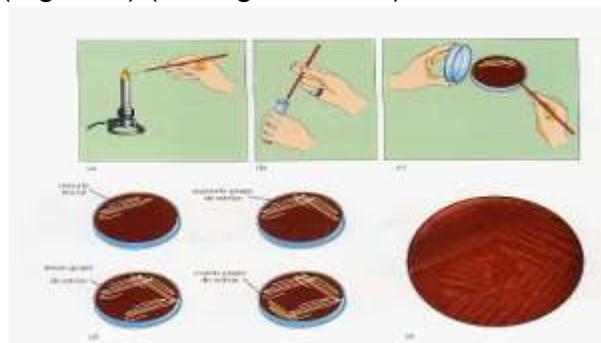


Figura 3. **Técnica de Estría cruzada.** Esterilizar un asa, introducirla en la suspensión bacteriana, sembrar haciendo estrías sobre la superficie de un medio sólido en una placa Petri, y volver a esterilizar el asa, tocar en la zona de la placa ya sembrada y hacer un segundo grupo de estrías en una región nueva de la placa. Repetir el proceso una tercera y una cuarta vez.

http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/documen/uni_02/56/cap301.htm

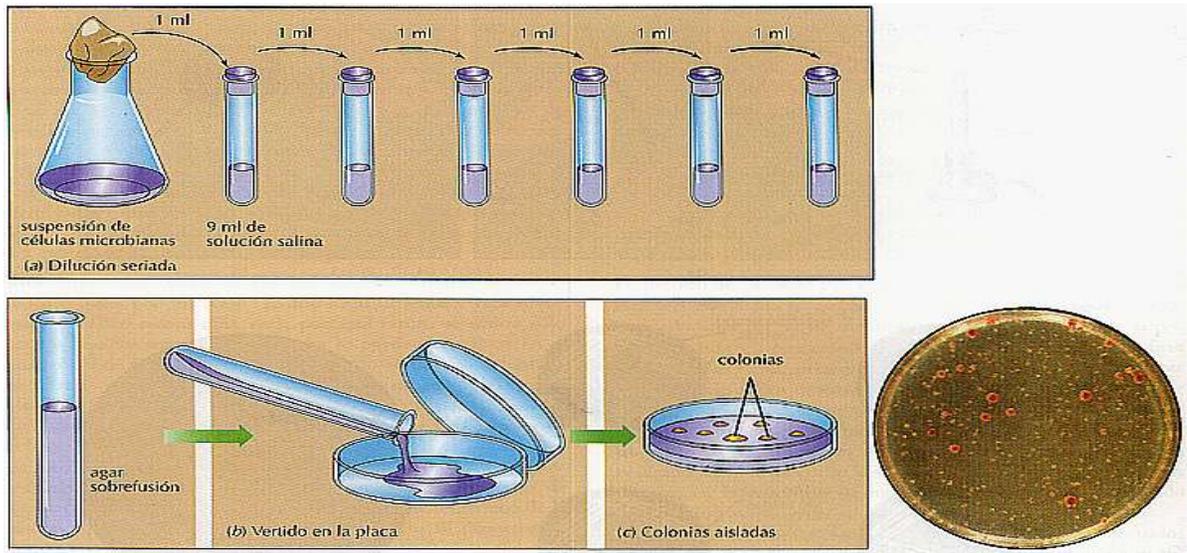


Figura 4. **Método de vertido en placa.** Hacer diluciones seriadas de la suspensión bacteriana hasta obtener una muestra con sólo unos pocos cientos de bacterias, (b) verter la muestra en un tubo con agar a sobrefusión, mezclar y verter el contenido en una placa Petri. (c) Después de la incubación, se desarrollan colonias en el agar (más pequeñas) y en su superficie (más grandes).

http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/document/uni_02/56/cap301.htm

Aspectos del metabolismo de las bacterias relacionados con la patogenicia

La mayoría de las bacterias fitopatogenas producen sustancias que intervienen directa o indirectamente en la patogenicia, entre las más importantes se encuentran los exopolisacáridos como los xantanos. La importancia de los exopolisacáridos en las bacterias fitopatogenas está relacionada tanto con su ecología como la patogenicidad. La producción de exopolisacáridos está asociada generalmente a condiciones desfavorables de crecimiento de la bacteria. Su función en la patogenicia no está muy clara, aunque contrariamente a lo que se creía en un principio, no actúan como inductores de hipersensibilidad. En algunos casos si parecen estar implicados en la formación de cavidades hidroceles y en la obturación del sistema conductor de la planta. La producción de exopolisacáridos está muy extendida entre los patovares de *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, y *Erwinia* sp. (Llácer *et al.*, 1996).

El Xantano o Xantán

“La goma de xantano” es un heteropolisacáridos de naturaleza gomosa producido por la mayoría de las cepas de *Xanthomonas*. Están formados por una cadena lineal de celulosa con ramificaciones laterales de trisacáridos O-acetilados u O-cetilados compuestos por D- manosa y ácido D-glucurónico (Llácer *et al.*, 1996).

Características.- El aspecto físico del xantano es el de un polvo color crema que se disuelve en agua caliente o fría produciendo soluciones de viscosidad relativamente alta a concentraciones bajas. Estas características son muy favorables para la economía de operaciones donde se la usa como espesante. El descubrimiento del xantano fue el resultado de un programa de búsqueda sistemática o screening iniciado por el departamento de agricultura de EUA. Como consecuencia del éxito comercial del dextrano en la década de 1940, el departamento inició un programa exhaustivo de búsqueda de microorganismos capaces de producir polisacáridos solubles en agua en cultivos sumergidos. El resultado de este programa fue el descubrimiento del xantano en la década de 1950 en los laboratorios del Northern Regional Research Laboratories (NRRL) (Wikipedia, 2011). <http://es.wikipedia.org/wiki/Xantano>

Durante la década de 1960 se llevaron a cabo investigaciones a escala piloto en varios laboratorios industriales y la producción comercial comenzó a principios de 1964. El conocimiento acumulado en la época sobre los requerimientos nutricionales de *X. campestris* era amplio por tratarse de un importante fitopatógeno, causante de enfermedades en plantas crucíferas. El xantano se convirtió en el primer producto biopolimérico de una fermentación a base de azúcar de maíz que tuvo importancia comercial. A raíz de su éxito comenzaron a estudiarse otros polisacáridos microbianos, pero a la fecha el xantano es el que posee mayor volumen de producción, rango de aplicaciones y el único aprobado para uso en alimentos (Wikipedia, 2011). <http://es.wikipedia.org/wiki/Xantano>

Estructura.- La molécula de xantano consta de una cadena principal de D-glucopiranosilo con enlace beta 1-4, como en la celulosa. A la cadena se anexan cadenas laterales de trisacárido compuestas por residuos de D-manopiranosilo y de ácido D-glucopiranosilurónico. Los residuos de manosilo con enlace a 1-2 tienen sustitutos 6-o-acetilo. Un promedio de aproximadamente la mitad de los grupos terminales del a-D-manosilo tienen sustitutos 4,6-o-(1-carboxietilideno) (Wikipedia, 2011). <http://es.wikipedia.org/wiki/Xantano>

Usos.- Algunas bacterias fitopatógenas u organismos relacionados, han sido usadas ampliamente en la agricultura y producción de alimentos, como se señala en el Cuadro 2 (APS, 2011). La goma xantán es un polisacárido extracelular derivado de la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, que se usa como espesante y gelificante en una enorme variedad de productos (Wikipedia, 2011). <http://es.wikipedia.org/wiki/Xantano>

Cuadro 2. **Bacterias útiles asociadas a las plantas** (APS, 2011).

Taxón	Función
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84 y K1026	Control biológico
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14	Biodegradación de Atrazina, un herbicida agrícola
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Plásmido vector para la transformación de las plantas (ingeniería genética)
<i>Erwinia amylovora</i>	Fuente de harpina (<i>Messenger</i>), un inductor de la resistencia a las enfermedades en las plantas
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Goma xantán, un polisacárido usado en la producción de alimentos, agricultura, cosméticos y farmacia

La mejor forma de realizar la transformación o ingeniería genética de las plantas es usando vectores desarmados (plásmidos) de *Agrobacterium tumefaciens*. La eliminación de un gen que codifica para la formación de hielo a temperaturas relativamente altas en una *Pseudomonas syringae* no patógena hizo historia (Lindow, 1987) ya que previene el daño por heladas cuando se aplica a las plantas. Otras propiedades esperan ser descubiertas y explotadas.

El xantano se agrega a los alimentos y produce un gran efecto sobre propiedades como la textura, liberación de aroma y apariencia, que contribuyen a la aceptabilidad del producto para su consumo. Su comportamiento como antioxidante es mayor que el de otros polisacáridos debido a su gran capacidad de unirse a metales y su comportamiento viscoso (García *et al.*, 2000).

En la agricultura el xantano se usa como agente de suspensión o espesante. Se utiliza para mejorar la eficiencia de fungicidas, herbicidas e insecticidas al suspender uniformemente los componentes sólidos de las formulaciones en sistemas acuosos o al estabilizar emulsiones y sistemas multifásicos líquidos. Las propiedades reológicas facilitan la pulverización, reducen la dispersión con el viento, e incrementan la persistencia y adhesión del pesticida (García *et al.*, 2000).

La Mancha Bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin *et al.*)

Importancia de la enfermedad

La mancha bacteriana es una de las enfermedades más devastadoras del pimiento y tomate. La enfermedad se presenta en todo el mundo, donde el pimiento y el tomate se cultivan en zonas cálidas y húmedas. Se presenta inmediatamente después del trasplante cuando las condiciones meteorológicas son favorables para el desarrollo de la enfermedad, los resultados suelen ser la pérdida total del cultivo (APS, 2011).

La Mancha bacteriana se observó por primera vez en tomate en el sur de África en 1914. Está presente en cualquier lugar en el que se cultive tomate o pimiento, aunque es más importante en regiones tropicales y subtropicales, donde la cantidad de precipitación es alta o moderada. La enfermedad está considerada como el mayor limitante de la producción de tomate alrededor de todo el mundo ya que ataca cada una de las partes de la planta (Jones *et al.*, 2001; Shenge *et al.*, 2007).

Etiología

Durante casi medio siglo, fue una especie bacteriana única, clasificada como *Xanthomonas vesicatoria*, y más tarde como *X. campestris* pv. *vesicatoria*, esta se consideró como la causa de la mancha bacteriana de los pimientos y tomates (APS, 2011).

En la década de 1990, se demostró que dos grupos distintos (posiblemente especies) existían dentro de las cepas del pv. *vesicatoria*. Vauterin *et al.* (1995) reestructuraron la clasificación del género *Xanthomonas* al proponer las especies de estos grupos: *X. vesicatoria* y *X. axonopodis* (sin. *campestris*) pv. *vesicatoria*. Más recientemente, se ha demostrado que las bacterias que pertenecen a cuatro grupos distintos (anteriormente denominados A, B, C y D) causan la mancha bacteriana (APS, 2011).

Jones *et al.* (2004) propone que estos deberían haber estado en las especies: *X. euvesicatoria* = *X. campestris* (*axonopodis*) pv. *vesicatoria* (grupo A), *X. vesicatoria* = *X. vesicatoria* (grupo B), *X. perforante* = grupo C, y *X. gardneri* = grupo de la cepa D. Las cepas de los grupos A y B son los más ampliamente distribuida.

La gran mayoría de las cepas que infectan al pimiento está en el grupo A y posiblemente algunos de los grupos B y D. No se han encontrado cepas en el grupo C, sin embargo, las cepas de los cuatro grupos se han aislado de tomate. Algunas cepas infectan sólo el pimiento (designado cepas de pimiento), algunos sólo infectan a tomate (designado cepas de tomate), y algunos pueden infectar tanto al pimiento y el tomate (designado pimiento / cepas de tomate). La gama de huéspedes de las diferentes cepas puede ser determinada por la inoculación de una suspensión bacteriana en la hoja y observar los síntomas. Dentro de 18 a 36 horas una respuesta de resistencia se muestra mediante un rápido colapso de la zona inoculada (una respuesta de hipersensibilidad, RH). En una planta susceptible, el área desarrolla un síntoma clorótico, empapados de agua, esto después de 3 a 5 días de la inoculación (APS, 2011).

Taxonomía de acuerdo a lo que indica SENASA, (2011).

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Xanthomonadales

Familia: Xanthomonadaceae

Ciclo de la enfermedad y epidemiología

Las bacterias tienen una supervivencia muy limitada de días o semanas en el suelo, por lo que su supervivencia está casi siempre en asociación con restos de plantas infectadas o enfermas (Figura 5). El agente patógeno se ha informado que persisten en asociación con las raíces del trigo, así como pocas especies de maleza; las malas hierbas, sin embargo, se considera que desempeñan un papel menor en la supervivencia del patógeno. Los residuos de las plantas de tomate y, posiblemente, en hojas de chile son una fuente potencialmente importante de inóculo en algunos lugares. En las regiones más frías, donde el material vegetativo es destruido, las bacterias sobreviven principalmente en la semilla contaminada o trasplantes infectados (APS, 2011).

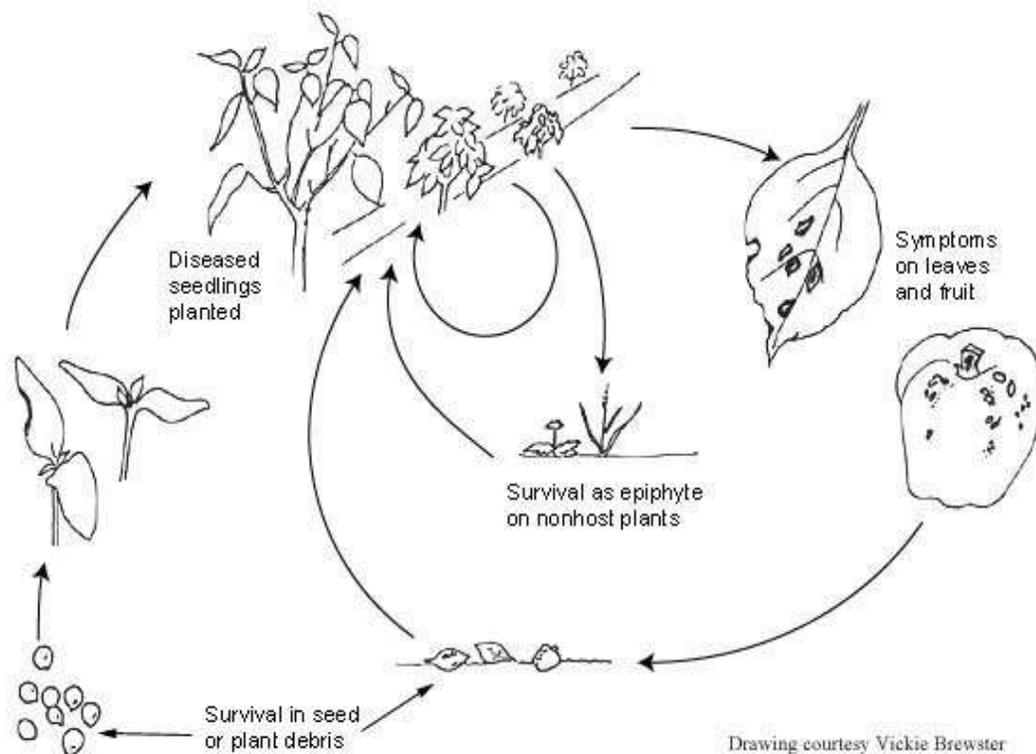


Figura 5. **Ciclo de la enfermedad Mancha Bacteriana** (*Xanthomonas vesicatoria*) (APS, 2011).

Epifitiología

El desarrollo de esta enfermedad se ve favorecido con temperaturas templadas (24-30 °C) (Álvarez); y con un óptimo de 25 °C (Blancard, 1996). Debido a la inexistencia de cultivares resistentes.

Aguiar *et al.* (2003) manifiestan que esta bacteria puede ocasionar problemas muy graves cuando el cultivo es conducido en condiciones de lluvias prolongadas y temperaturas de 22 a 32 °C.

Características del patógeno

Por lo general, en condiciones naturales las bacterias fitopatógenas sobreviven en residuos vegetales sobre la superficie del suelo, en o sobre semillas, en el suelo, y asociadas con hospedantes perennes. Pero algunas bacterias también pueden sobrevivir en el agua, y algunas hasta en objetos inanimados, o sobre o dentro de insectos. Por ejemplo *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, el agente causal de la podredumbre anular de la papa, sobrevive en maquinaria y material de empaque. Conocer la forma de supervivencia suele ser esencial para prevenir la diseminación y para el manejo de la enfermedad (APS, 2011).

La mayoría de las bacterias del género *Xanthomonas* producen pigmento amarillo lo cual es exclusivo de la bacteria y son útiles en la taxonomía como indicadores de diagnóstico. Los pigmentos (Xantano) aparentemente no son importantes para el desarrollo de la infección de *Xanthomonas vesicatoria* después de la infección a la planta huésped, pero se han expuesto poblaciones de cepas de *X. vesicatoria* a la radiación ultravioleta, y las poblaciones de la cepa se redujeron de 8,5 a 2,4 log ufc / ml durante un período de 40 s. La supervivencia de las cepas con pigmento expuestas a luz UV se comparan con cepas expuestas a la luz visible durante 60 minutos y las cepas expuestas a luz UV fueron reducidas en la supervivencia en comparación de ambas Paplawsky *et al.*, (2000).

Estudios recientes han demostrado que existen cepas de *Xanthomonas vesicatoria* que presentan coloración verde por lo que se les ha determinado el pigmento clorofílico en los medios CPG y CPG1. Cheyla *et al.* (2001) mencionan que la ficocianina es un pigmento con propiedades antioxidantes capaz de secuestrar los radicales libres peroxilicos involucrados en los procesos de peroxidación lipídica y citotoxicidad.

Por su parte Yashuiro *et al.* (2005) aislaron de la bacteria *Brevandimus* spp. un carotenoide llamado xantofilina el cual es un inhibidor de los efectos de la peroxidación de los lípidos, por su parte Armstrong (1994) señala que los carotenoides proveen una protección contra el daño resultante fotooxidativo de la exposición de luz visible, luz UV en organismos no fotosintéticos.

Paplawsky *et al.* (2000) mencionan que las xantomonadinas producidas por las bacterias fitopatógenas como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* son importantes para evitar el daño fotobiológico ya que evitan la peroxidación lipídica en la membrana celular, Paplawsky y Chun (1997) siguieron que *Xanthomonas vesicatoria* al igual que *X. campestris* forma una gran cantidad de xantomonadina y factor difusible extracelular los cuales son importantes en la sobrevivencia epifítica de la bacteria así como su protección contra luz, esto podría explicar la coloración de esta cepa bacteriana.

Sintomatología

Shenge *et al.* (2007) señalan, que esta bacteria ataca a cada una de las partes de la planta de tomate, y que los síntomas de esta enfermedad, aparecen en hojas, flores peciolas, tallos y raíces.

Los primeros síntomas que se observan son el oscurecimiento de las hojas que se vuelven acuosas, apareciendo puntos angulosos de menos de 3 mm de diámetro, que pueden estar rodeados o no de un halo amarillo (Álvarez, s/f).

Los síntomas de hojas consisten en pequeñas manchas aguanosas que llegan a ser cafés y circulares; sin embargo aclaran que numerosas lesiones pueden ocurrir en conjunto causando áreas necróticas (Shenge *et al.*, 2007).

Cuando las condiciones son óptimas para el desarrollo del cultivo, las lesiones producidas en hojas, peciolo, y en el raquis, coalescen y forman estrías oscuras alargadas cuando esto tiene lugar, deviene un marchitamiento generalizado de follaje y las plantas parecen amontonadas debido a una epinastia severa (Jones *et al.*, 2001).

En frutos inmaduros produce pequeñas lesiones necróticas, rodeadas de un halo acuoso, posteriormente toman un color pardo y una apariencia sarnosa (Latorre, 1999).

Manejo de la enfermedad

Barros & Rosato (1996) indican que, el control de la enfermedad es proporcionado principalmente por el empleo de bactericidas basados en formulaciones cúpricas y antibióticos como la estreptomina; sin embargo indican, ambos compuestos se han vuelto menos efectivos debido al desarrollo de resistencia por algunas cepas de *Xanthomonas*.

Latorre (1999) señala que para complementar el combate al agente se debe mantener una rotación de cultivos, que permita la total descomposición de los residuos enfermos y la utilización de semilla sana producida en zonas libres de esta.

MATERIALES Y METODOS

Localización

El trabajo experimental del presente trabajo se estableció dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro unidad Saltillo, Coahuila, México (Figura 6). Al sur de la ciudad con domicilio en Calzada Antonio Narro # 1923 Buenavista C.P. 25315. Para la obtención de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) se estableció en el invernadero de Parasitología, la caracterización de la bacteria se realizó en el laboratorio de Fitopatología.



Figura 6. Localización de la UAAAN en Saltillo, Coahuila, México.

Metodología experimental

Procesos

Las actividades del proceso experimental se dividieron, desde la obtención de plantas de tomate de 25 días, el aislamiento de la bacteria *Xanthomonas vesicatoria*, exposición de rayos UV e inoculación en plantas de tomate.

Obtención del Material Vegetal de Tomate

- Se uso la variedad Sweet Hearts proporcionado por el Dr. Gabriel Gallegos Morales maestro investigador del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Es un tomate tipo uva de crecimiento indeterminado que es muy prolífico, planta de vigor medio, altamente productiva. En México se está convirtiendo en la variedad número uno de tomate tipo uva para cultivo protegido, en manejo de poda. Recomendado para cultivos en malla-sombra y/o invernadero, en donde expresa su mayor potencial de calidad y rendimiento. Sus frutos tienen el tamaño y sabor ideal para el mercado. Los frutos pesan de 8 a 14 gramos. Y su contenido de grados Brix oscila de 8 a 10°, dándole un sabor y dulzura muy apreciado en el mercado. Las semillas se pusieron a germinar en una charola de 96 cavidades previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio, el sustrato peat moss fue esterilizado.
- El trasplante de las plantas fue a los 25 días cuando las plantas tenían 20 cm de altura en bolsas de plástico de 10 kg de color negro.
- Las plantas se colocaron en un microtúnel, se aislaron de toda fuente de contaminación (maleza, residuos vegetales) antes de ser inoculadas con la bacteria *Xanthomonas vesicatoria*.

Obtención de cepas bacterianas

Una cepa se aisló de muestras vegetales con síntomas característicos de la Mancha Bacteriana realizándose las pruebas sobre las Características fisiológicas y bioquímicas de la especie *X. campestris* del genero *Xanthomonas*. La otra cepa fue proporcionada por la MC. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda la cual fue caracterizada bioquímicamente y se comprobó su identidad con el indicador XCVR 50 que amplifica un patrón de banda de 517 pb.

Aislamiento

Se utilizo el método de siembra de tejido enfermo por diluciones, posteriormente del total de la muestra se seleccionaron los tejidos más dañados de cada planta con sus respectivas secciones. Con la ayuda de una navaja se cortaron las hojas en pequeños trozos, y se colocaron con unas pinzas previamente flameadas en una bolsa de maceración con 5 ml de agua destilada y sobre una gradilla se dejo reposar durante al menos cinco minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se llevo el material a la cámara de transferencia, la cual había sido previamente desinfectada con alcohol etílico al 99%, y ahí se realizaron las diluciones de las siguiente manera: haciendo uso de una pipeta esterilizada y a punta de mechero se coloco 1 ml de la solución inicial (10^{-1}) en un tubo de ensaye con siete ml de agua destilada estéril, obteniendo así la solución 10^{-2}

Para el vaciado en los medios de cultivo, se utilizaron las diluciones 10^{-3} , que en teoría son las concentraciones en las cuales las colonias bacterianas crecerían de manera más separadas, la cual facilitaría y permitiría hacer una mejor selección de las colonias de interés. El vaciado se hizo de la siguiente manera: con una pipeta estéril y a punta de mechero se vació 0.1 ml de la dilución 10^{-3} en dos cajas Petri con medio de cultivo de KB; las cuales estaban etiquetadas con la sección de donde se obtuvo la muestra.

Posteriormente con una varilla de cristal previamente flameada y a punta de mechero se esparció la muestra haciendo girar la caja Petri y repitiendo una y otra vez el movimiento de la varilla de cristal con la finalidad de no concentrar el crecimiento en un solo punto de la superficie del medio de cultivo y una vez concluida esta labor, las cajas del medio de cultivo se sellaron con Kleen pack y se colocaron en la incubadora a 28 °C.

Las colonias desarrolladas en los diferentes medios se seleccionaron en cuanto a su forma, y característica de desarrollo en cada uno de los medios: y se llevaron a la cámara de transferencia la cual había sido previamente desinfectada con alcohol al 99% y haciendo uso de una asa bacteriológica previamente flameada, bajo un estereoscopio, se tomo una porción de cada colonia seleccionada y de esta manera se transfirieron por estría cruzada a una nueva caja de medio de cultivo del mismo tipo donde habida sido extraída, con la finalidad de obtener cultivos puros. Las cajas se sellaron con Kleen pack y fueron colocadas de manera invertida en la incubadora a 28 °C.

Pruebas preliminares y bioquímicas

Para determinar si la bacteria es gram negativa o positiva se empleó la prueba de KOH, en un portaobjeto se fijó una gota de KOH y una asada de cultivo bacteriano, posteriormente se mezcló con el asa bacteriológica, si se puede levantar un hilo viscoso con el asa la prueba se declara como positiva y se trata de una bacteria gram (-), dicha prueba resulto positiva para esta investigación de acuerdo a las características antes mencionadas.

Metabolismo oxidativo (fermentación de la glucosa)

Con el asa se tomo una muestra de la bacteria y se sembró por picadura en 2 tubos. A un tubo se le adicionaron dos mililitros de aceite mineral esterilizado y se incubo 48 horas.

Producción de levana

Con el asa bacteriológica se sembró la bacteria en forma de puntos sobre la superficie del medio y se dejó incubar durante 48 horas luego se determinó la elevación mucosa y elevada.

Hidrólisis de almidón

El almidón es un polímero de glucosa, ampliamente distribuido en el reino vegetal como sustancia de reserva. Ciertas bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas* en su mayoría), son capaces de depolimerizar el almidón por medio de enzimas extracelulares como α y β amilasas, las cuales hidrolizan el almidón a maltosa (Rodríguez, 2001).

- En el medio de cultivo de almidón se sembró la bacteria en cuatro puntos y se incubó a 28 °C durante 48 horas.
- Después se le adicionó unas gotas de lugol sobre el cultivo bacteriano y se observó que se formó un halo transparente por alrededor del crecimiento bacteriano considerado la prueba positiva.

Pruebas con leche Litmus

Se sembró la bacteria en un tubo y un testigo, se incubó a 28 °C por 48 horas y luego se comparó el tubo sembrado con el testigo lo cual debe presentar una coloración azul grisáceo.

Obtención del Inóculo

Se colectaron en los invernaderos de la UAAAN hojas de tomate con los síntomas característicos del patógeno de la mancha bacteriana. Estas muestras se colocaron en papel periódico humedecido para luego ser llevados al laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Exposición de la bacteria *Xanthomonas vesicatoria* a los rayos UV.

Una vez identificada la bacteria se tomaron 4 cepas bacterianas (2 cepas aisladas con un tono de coloración amarillo huevo y 2 con una pigmentación verde claro proporcionado por MC. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda) de 48 horas y 2 cepas (una de cada color) de ellas fueron expuesta a los rayos ultravioleta de la cámara de flujo laminar por un tiempo de 1 hora. Dos cepas de ambas coloraciones no se expusieron a los rayos UV.

Diseño experimental

El experimento se estableció con el diseño Bloques al Azar en el cual, los tratamientos se asignaron aleatoriamente a un grupo de unidades experimentales denominado bloque o repetición. El diseño de bloques al azar se usa por tanto, donde las unidades experimentales pueden agruparse en bloque relativamente homogéneos, de manera tal que las diferencias observadas entre unidades sean primordialmente debidas a los tratamientos.

Descripción de tratamientos

El experimento consistió en la selección de 10 plantas de tomate de 30 días de edad. Fueron cuatro tratamientos (T) con 2 repeticiones cada una excepto un tratamiento con tres repeticiones. Se inocularon 2 plantas de tomate con soluciones

de la bacteria de coloración amarillo sin exposición a rayos UV, 2 plantas con bacterias de coloración amarillo expuestas a rayos UV, 3 plantas inoculadas con bacterias de pigmentación verde claro expuestas con luz UV y 2 plantas con bacterias de coloración verde claro sin exposición a luz UV (Cuadro 3). Y la distribución de estas en el invernadero se determinó, como se detalla en la Figura 7.

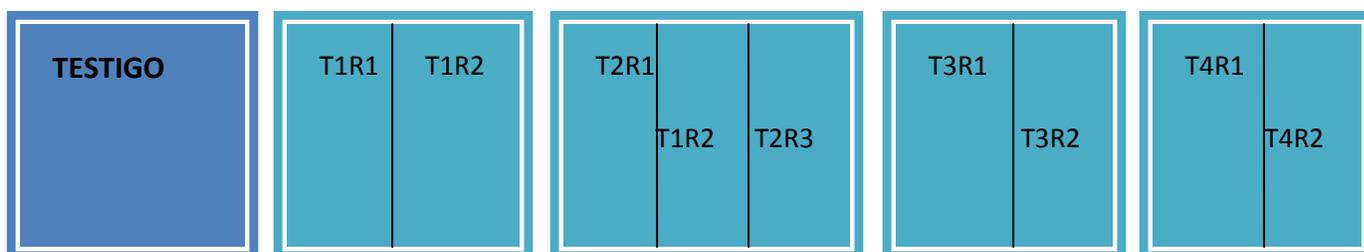


Figura 7. **Distribución de las unidades experimentales en invernadero.**

Inoculación

La inoculación se hizo en hojas jóvenes asperjando la solución bacteriana con un atomizador sobre las microheridas hechas con carburandum. El testigo fue inoculado con agua estéril con el mismo proceso. Todas las plantas inoculadas se le colocó una bolsa de plástico transparente con el fin de crear un ambiente favorable para el desarrollo de la bacteria. A las 24 horas se presentaron los primeros síntomas y se tomaron los primeros datos y a las 48 horas los últimos datos.

Cuadro 3. **Tratamientos en plantas de tomate con *Xanthomonas vesicatoria*.**

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	DESCRIPCION
T1	R1	Cepa amarilla sin exposición a rayos.
	R2	Cepa amarilla sin exposición a rayos.
T2	R1	Cepa amarillo expuestas a rayos UV
	R2	Cepa amarillo expuestas a rayos UV
T3	R1	Cepa verde expuestas a luz UV
	R2	Cepa verde expuestas a luz UV
	R3	Cepa verde expuestas a luz UV
T4	R1	Cepa verde sin exposición a luz UV.
	R2	Cepa verde sin exposición a luz UV.
T5	T	TESTIGO

Preparación de Inóculo

Antes de inocular se prepararon soluciones bacterianas de la siguiente manera:

- Se prepararon 2 soluciones de cada una de las cuatro cepas (expuestas a luz UV Y NO expuestas)
- Con un asa bacteriológica se tomo suficiente colonias bacterianas de un cultivo puro de *Xanthomonas vesicatoria* para ser colocados en tubos de 15 ml, con 9 ml de agua esterilizada. La masa bacteriana se disolvió con el agua teniendo una solución homogénea. Y así con cada una de las cepas. En total se obtuvieron 8 soluciones bacterianas.
- Para conocer la concentración aproximada de bacterias de cada tubo se hizo una comparación entre las soluciones bacterianas y una solución de BaCl₂ y H₂SO₄, en la escala de McFaland, usando la concentración del tubo 4. La semejanza entre turbidez era la concentración del número de bacterias. En este experimento

se obtuvo una concentración de 1, 200, 000,000 en las soluciones bacterianas para la inoculación.

Aislamiento de la bacteria

Después de la inoculación se inicio con la toma de muestras en hojas de todos los tratamientos que presentaron síntomas característicos de la bacteria inoculada con el fin de recuperar a la bacteria y corroborar que los síntomas fueron producidos por *X. vesicatoria*.

Todas las muestras tomadas de los diferentes tratamientos se sembraron en medios YDC para su aislamiento y posteriormente la identificación de la misma.

RESULTADOS Y DISCUSION

Material Vegetal

Imágenes que muestran plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la variedad Sweet Hearts indeterminado, a los 45 días después del trasplante con una altura de 45 cm previas a la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria*.



Figura 8. **Material Vegetal antes de la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria*.**

Cepa bacteriana

De acuerdo a las pruebas del aprovechamiento de carbón se identifico a *Xanthomonas vesicatoria* en un 100% de homología con lo que menciona Schaad *et al.*, (2001). Los datos de estas pruebas se observan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. **Características fisiológicas y bioquímicas de la especie *X. campestris* del genero *Xanthomonas*.**

PRUEBA	Cepa 1(amarillo)	Cepa 2 (verde)
Crecimiento a 35° C	+	+
Hidrolisis de esculina	+	+
Crecimiento mucoide	+	+
Proteólisis de leche	-	-
Hidrólisis de almidón	V	-
Producción de ácido		
Arabinosa	+	+
Glucosa	+	+
Manosa	+	+
Galactosa	+	+
Celobiosa	+	+
Trehalosa	+	+

Además se le realizaron las pruebas indol (-); sorbitol (½); citrato (-); catalasa (+) RYO (+); o/f -+; medio diferenciales CPG; SX-agar; tween.

Se evaluaron 5 tratamientos incluyendo al testigo. En el Cuadro 5 se observa claramente el efecto de los rayos UV sobre la alteración de la patogenicidad de la bacteria *X. vesicatoria* en cuanto a presencia de síntomas.

Cuadro 5. **Tratamientos e incidencia a las 24 y 48 horas después de la inoculación con *Xanthomonas vesicatoria*.**

Tratamiento	Incidencia/24 hrs. (síntomas)	Incidencia/48 hrs. (síntomas)
T1R1	✓	✓
T1R2	✓	✓
T2R1		✓
T2R2		✓
T3R1		✓
T3R2		✓
T3R3		✓
T4R1	✓	✓
T4R2	✓	✓
TESTIGO		✓

T1R1 y T1R2: coloración amarillo sin exposición a rayos. T2R1 y T2R2: coloración amarillo expuestas a rayos UV. T3R1, T3R2 y T3R3: pigmentación verde claro expuestas con luz UV. T4R1 y T4R2: coloración verde claro sin exposición a luz UV.

Supervivencia del Inóculo

Imágenes que muestran síntomas de *Xanthomonas vesicatoria* después de ser expuesta a luz UV e inoculada a plantas de tomate en los distintos tratamientos.



Figura 9. **Tratamiento 5 (testigo)**, se observa el **tejido sano**, Saltillo Coahuila, 2011



Figura 10. **Tratamiento con cepa 1**, *Xanthomonas vesicatoria* **pigmentación amarilla**, Saltillo Coahuila, 2011.



Figura 11. **Tratamiento cepa 2**, *Xanthomonas vesicatoria* **verde sin exposición a luz UV**, Saltillo Coahuila, 2011.

Las diferencias en horas en cuanto a la aparición de los primeros síntomas de todos los tratamientos se observan en la Figura 12.

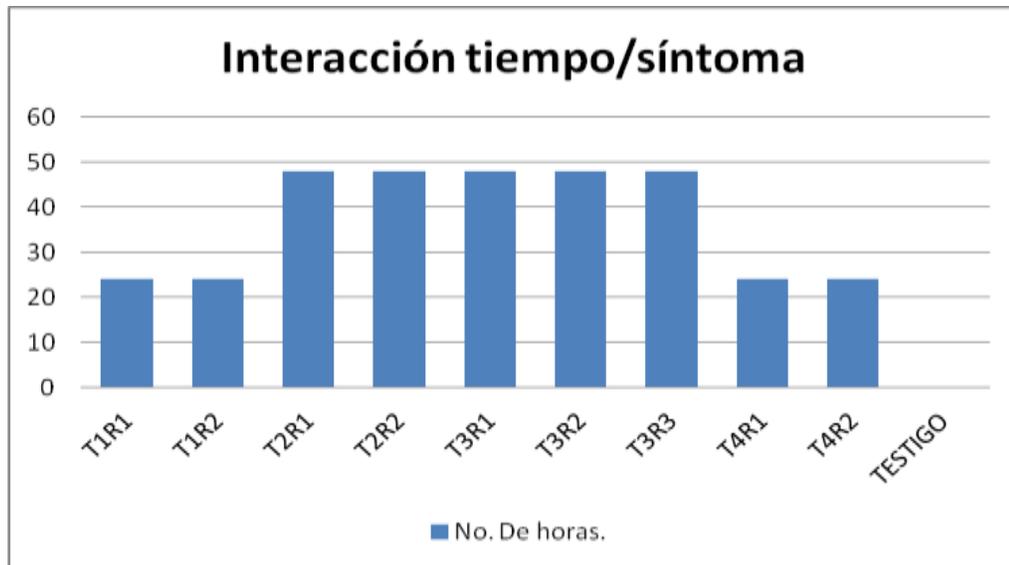


Figura 12. **Número de horas transcurridas en relación a los primeros síntomas de *Xanthomonas vesicatoria*.**

Nota: En la Figura 12 observamos que los tratamientos T2R1, T2R2, T3R1, T3R2 y T3R3 (Tratamientos y repeticiones con exposición a la luz UV) se prolongaron 48 horas en presentar los primeros síntomas, en comparación con los tratamientos T1R1, T1R2 y T4R1, T4R2 (Tratamientos y repeticiones sin exposición de a luz UV). Todos los tratamientos inoculados con *Xanthomonas vesicatoria* presentaron los síntomas.

En cuanto a la cepa de pigmentación verde (sin y con exposición a rayos UV) en comparación con las las cepas de pigmentación amarilla (sin y con exposición a UV) todas a las 48 horas presentaron los síntomas de la infección bacteriana lo que nos indica que ambas cepas presentan la misma patogenicidad en plantas de tomate. En general la diferencia se marca muy bien con las expuestas y las no expuestas a luz UV en el tiempo.

Para reafirmar el patógeno presente en los síntomas de los tratamientos se repitió el proceso de aislamiento obteniendo los datos iguales de identificación de la bacteria a fin.

Se comprobó que el exopolisacárido xantano producido por *Xanthomonas vesicatoria* funciona como protector a la luz UV y garantiza la sobrevivencia y capacidad para infectar en plantas de tomate después de ser expuesta a la luz Ultravioleta. Ya que la bacteria presentó la sintomatología hasta las 48 horas después de inoculadas, esto coincide como lo mencionan Chun, (1997) y Paplawsky *et al.*, (2000). Que el xantano actúa como un fotoprotector que permite la sobrevivencia de la bacteria a condiciones desfavorables.

CONCLUSIONES

El desarrollo de la investigación estableció que la incidencia de síntomas en todas las plantas de tomate tratadas con las cepas 1 y 2 de *Xanthomonas vesicatoria* (coloración amarillo huevo y verde) previamente expuesto a luz UV, presentaron síntomas de la característicos de la Mancha Bacteriana en un lapso de tiempo de 48 horas y todas las plantas tratadas con cepas de *Xanthomonas vesicatoria* de coloración amarillo huevo y verde que no fueron expuestas a la luz UV presentaron síntomas a las 24 horas después de inoculadas, lo que nos indica que la producción del heteropolisacárido xantano funciona como protector para la sobrevivencia y patogenicidad de *Xanthomonas vesicatoria* independientemente de la pigmentación o coloración de las cepas bacterianas que puedan presentar.

Las cepas bacterianas de *Xanthomonas vesicatoria* expuestas a luz UV prolongan el periodo de incubación para la aparición de los primeros síntomas en plantas de tomate en comparación con las cepas no expuestas a UV.

BIBLIOGRAFIA

Agrios, N.G. 2005. Plant Pathology. Edi. Limusa. 5th ed. Printed in the United States of America. Pp 532-533.

Aguiar, L.; O. Kimura; M. Alzimiro; C. Castilho; K. Castilho; D. Ribeiro; F. Akiba & M. Goréte. 2003. Efeito de formulações cúpricas e cuprorgânicas na severidade da mancha bacteriana e na população residente de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em pimentão. (En línea). Horticultura Brasileira, Brasília, Consultado 2008. Disponible en la URL: <http://biblioteca.universia.net/ficha.do?id=522139>

Álvarez, A. s/f. Enfermedades del tomate. (En línea). El Eco de Alhama Nº 18. Economía. Consultado 2007. Disponible en la URL: <http://www.elecodealhama.com/num018/economia.html>

APS, 2011. Bacterial spot of pepper and tomato. American Phytopathological Society <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacterialsplot.aspx>

Armstrong, G., A. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *Bacteriol.* ;176:4795–4802.

Barros, G. & Y. Rosato. 1996. Copper accumulation in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. (En línea) Brazilian Journal of Genetics. Consultado 2008. Disponible en la URL: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010084551996000400002&script=sci_arttext&tIng=pt

- Blancard, D., 1996. "Enfermedades del tomate: observar, identificar, luchar", Versión española de Antonio Peña Iglesias, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp: 199.
- Castellanos Z.J. 2004. Manual de producción hortícola en invernadero. 2da edición, INTAGRI.S.A. Guanajuato, México. 469 págs.
- Chun, W.; Cui, J. y Poplawsky, A. 1997. Purification, characterization and biological role of a pheromone produced by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51: 1-14.
- Cheyra R, D. Ramírez y R. Gonzalez.- 2001. Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxilicos y la peroxidación lipídica, Revista Cubana de Invest. Biomedica Vol 20 (1) 38-41.
- Devlin, R. 1998. Fisiología vegetal. 4ta Edición. Barcelona (España), Omega Pp 443-445.
- Edmon, J.B.; Senn, T. L. y Andrews, F. S. 1984. Principios de horticultura. 3^a edición, editorial continental. México. 574 Págs.
- García Ochoa F., Santos V., Casas J., *Xanthan Gum: Production, Recovery and Properties*, *Biotechnology Advances* 18, 549-579, 2000
- INFOAGRO.com, 2003. El cultivo del tomate (en línea), Consultado 2007. Disponible en la URL: <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>
- Jones, J. J., Jones. R., Stall & T. Zitter. 2001. "Plagas y enfermedades del tomate", The American Phytopathological Society, Traducido por M. Jiménez y Revisado por R. Jiménez, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Pp: 25-30.

- Jones, JB, GH Lacy, H. Bouzar, Puesto de RE, y Schaad NO. 2004. Reclasificación de la xanthomonads asociados con la enfermedad mancha bacteriana del tomate y el pimiento. *Sistemática y Microbiología Aplicada* 27:755-762.
- Jaramillo, J., V.; Rodríguez.; M. Guzmán.; M. Zapata. y T. Rengifo. 2007. Manual técnico: buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas (en línea). Consultado 2007. Disponible en la URL: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s02.pdf>
- Latorre, G. 1999. Enfermedades de las plantas cultivadas, 5ta edición, Ediciones Universidad Católica de Chile, Alfaomega, Pp 646.
- Lindow, Steven E. 1987. La exclusión competitiva de bacterias epifíticas de hielo *Pseudomonas syringae* mutantes. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2520-2527.
- Llácer G.; López M.M.; Trapero A. Y Bello A. 1996. Patología vegetal. Edi. Mundi-prensa. 2ª edición. D.F. México. Pp 491 y 496,497.
- Nuez F. 1995. El cultivo de tomate. 1^{ra} Edición. Mundi Prensa. Madrid, España. Págs. 15-17.
- Nuez, F. 1999. "El Cultivo de Tomate". Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España, pp: 15-20.
- Poplawsky, A. R.; Urban, S.C. y Chun W. 2000. Biological role of Xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5123-5127.
- Pérez M. L. y Rico J. E. 2004. Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato. 1^{ra} edición, Universidad

- de Guanajuato e Instituto de Ciencias Agrícolas. México, D.F. págs.: 63-79.
- Peralta, I., S. Knapp, and D.M. Spooner. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru. *Syst. Bot.* 30:424-434
- PRODUCTORES DE HORTALIZAS. 2006. Plagas y enfermedades del tomate, guía de identificación y manejo. Meister media. http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Tomato_Spanish.pdf
- Rodríguez, M., L. 2001. Manuel para la identificación de bacterias fitopatógenas. Taller de impresión Depto. de Parasitología Chapingo. 2ª. Edición. Estado de México. Pp 13,14 y 31.
- Rodríguez, R., R.; Tabares. R.J.M. y Medina San Juan J.A. 1997. Cultivo moderno del tomate. Edi. Mundi-Prensa. 2ª. Edición. D.F. México. Pp 15.
- Romero, C., S. 1993. Hongos fitopatógenos. 1ª reimpresión. Universidad Autónoma Chapingo. México. Pp 19, 76 y 69.
- Schaad, N.W; J. B. Jonas and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria. 5ª. Ed APS PRESS Minnesota U.S.A. 373 p.
- Shenge, K.; R. Mabagala; C. Mortensen. 2007. Identification and characterization of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Tanzania by biological system and sensitivity to antibiotics (En línea). *African Journal of Biotechnology* Consultado 2008. Disponible en la URL: <http://www.academicjournals.org/AJB>
- SENASA. 20011. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/xanthomonas-campestris-pv-vesicatoria>.

Vauterin, L., B.; H. Kersters. K. y J. Columpios.1995. Reclasificación de *Xanthomonas*. International Journal of Systematic 45:472-489 Bacteriología.

Virgen, C., G. 20011. Congreso internacional del tomate: Manejo integrado de bacterias fitopatógenas en cultivo de tomate. Meistermedia. 5º. Edición. Querétaro, Qro, México.

Yasuhiro.; Nishida.; Kyoko, A.; Hiroaki, K.; Yoshikazu, Shizuri.; Kazutoshi, S. A. S.; Sadao, Komemushi.; Wataru M. and Norihiko Misawa 2005. Elucidation of a Carotenoid Biosynthesis Gene Cluster Encoding a Novel Enzyme, 2,2'- β -Hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. Strain SD212 and Combinatorial Biosynthesis of New or Rare Xanthophylls Applied and Environmental Microbiology, Vol 71 p. 4286-4296

Wikipedia. 2008. Solanaceae. (En línea). Consultado 2008. Disponible en la URL: <http://es.wikipedia.org/wiki/Solanaceae>

Páginas web consultadas

http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Tomato_Spanish.pdf

<http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/xanthomonas-campestris-pv-vesicatoria>

<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacteriaspot.aspx>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Xantano>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Solanaceae>

http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/microbiologia/unidades/document/uni_02/56/cap301.htm

http://es.wikipedia.org/wiki/Solanum_lycopersicum#cite_note-Peralta_et_al_2005-22

APENDICE
MEDIOS PARA AISLAMIENTO
Extracto de levadura-dextrosa (YDC)

Ingrediente	Cantidad
Extracto de levadura	10.0 g
Dextrosa	20.0 g
Carbonato de calcio (polvo fino)	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1000.0 ml

MEDIOS DE CULTIVO DIFERENCIAL
Medio B de King (KB)

Ingrediente	Cantidad
Proteosa peptona	20.0 g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	1.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g
Agar	15.0 g
glicerol	15.0 g
Agua	1000.0 ml

REACTIVOS PARA TINCION DE GRAM

El cristal violeta actúa como colorante primario y se prepara de la siguiente manera:

Ingrediente	Cantidad
Cristal violeta	0.5 g
Fenol	2.5 g
Etanol al 96%	20.0 ml
Glicerina	80.0 ml
Agua destilada	1000.0 ml

Solución de lugol

Esta solución debe tener pH alcalino, porque a PH ácido, las bacterias gram positivas aparecerán como gram negativas y se prepara de la siguiente forma:

Ingrediente	cantidad
Yodo	1.0 g
KI	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Solución de safranina

Es el colorante secundario o de contraste y está formado por lo siguiente:

Ingrediente	Cantidad
Safranina	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Escala de McFalnand

Tuve	ml of 1% BaCl ₂	ml 1% H ₂ SO ₄	Number/bacteria/ml
1	0.1	9.9	300,000,000
2	0.2	9.8	600,000,000
3	0.3	9.7	900,000,000
4	0.4	9.6	1,200,000,000
5	0.5	9.5	1,500,000,000
6	0.6	9.4	1,800,000,000
7	0.7	9.3	2,100,000,000
8	0.8	9.2	2,400,000,000
9	0.9	9.1	2,700,000,000
10	1.0	9.0	3,000,000,000

**Características fisiológicas y bioquímicas de especies del género
Xanthomonas.**

Prueba	<i>X. campestris</i>	<i>X. fragariae</i>	<i>X. albinea</i>	<i>X. axonopodis</i>	<i>X. ampelina</i>	<i>X. populi</i>
Crec. a 35 °C	+	-	+	+	-	-
Hidrólisis de esculina	+	-	+	+	-	-
Crec. mucoide	+	+	-	-	-	+
Licuefacción gelatina	V	+	v	-	-	-
Proteólisis de leche	-	-	-	-	-	Ligero
H ₂ S de peptona	+	-	-	+	v	-
Ureasa	-	-	-	-	+	-
Tolerancia al NaCl	2-5%	0.5- 1%	0.5%	1.0%	1.0%	0.4-0.6%
Hidrólisis del almidón	V	+	-	+	-	-
Producción de ácido						
Arabinosa	+	-	-	-	+	-
Glucosa	+	+	+	+	-	+
Manosa	+	+	+	-	-	+
Galactosa	+	-	v	-	+	+
Celobiosa	+	-	-	-	-	-
Fructuosa	+	+	-	-	-	+
Trehalosa	+	-	-	+	-	+