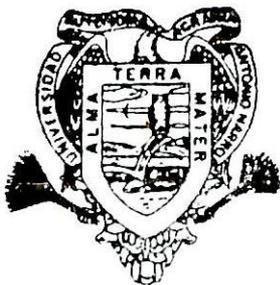


MEMORIA PARA LA DETERMINACION DE *Xanthomonas*
compositis pv. *vesicatoria* EN SEMILLA DE TOMATE
(*Lycopersicon esculentum* Mill).

JORGE LUIS SALAZAR GONZALEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA



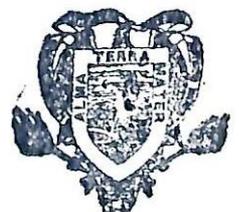
Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.

NOVIEMBRE DE 1997



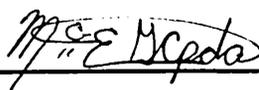
BIBLIOTECA

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para optar al grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal: 
M. C. Abel Sánchez Arizpe

Asesor: 
M. C. María Elizabeth Galindo Cepeda

Asesor: 
M. Sc. Leticia Bustamante García


Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez
Subdirector de Postgrado

Buena Vista, Saltillo, Coahuila. Noviembre de 1997.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme su apoyo en una de mis metas de superación profesional.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro que a través de su Departamento de Parasitología Agrícola recibí una sólida formación profesional y personal.

Al M. C. Abiel Sánchez Arizpe, quien siempre me brindó palabras de estímulo, digno de un verdadero amigo.

Al M. C. María Elizabeth Galindo Cepeda, por su disposición permanente y sus valiosas sugerencias.

Al M. Sc. Leticia Bustamante García, por sus aportaciones para la realización de este trabajo.

A mis compañeros Julieta Retis, Claudia Ramos, Cristina Sánchez, Silvia Ovalle, Adalberto Gómez, Gumaro Quezada, Edgar Rueda, Héctor Hernández,

Nemecio Saucedo, Javier Mena y Bernardo Gómez, con quienes compartí una gran amistad.

A la familia Vargas Palomino, por brindarme su amistad, de quienes recibí un gran apoyo y considerarme un miembro más de la familia. Muchas Gracias.

A mis Grandes Amigos Armando Rodríguez y Vicente Aguirre, por su gran amistad.

DEDICATORIA

A DIOS Nuestro Señor

A mi querida madre **Sra. Emilia González Pérez (+)**, ejemplo de cariño, comprensión, fuerza y superación. DIOS te bendiga por siempre.

A mi padre Filiberto Salazar y hermanos: Luz Elena, Norma Delia, Jaime, José Francisco, Juan Antonio, Vicente Alejandro y Héctor Manuel. Gracias por siempre apoyarme.

A mi padrino Sr. Librado Villegas, por ser un gran amigo.

COMPENDIO

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*
EN SEMILLA DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill)

POR

JORGE LUIS SALAZAR GONZÁLEZ

MAESTRÍA EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
Buenavista, Saltillo, Coahuila. Noviembre de 1997.

M. C. Abiel Sánchez Arizpe -Asesor-

Palabras Clave: Diagnóstico, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*,
semillas, tomate.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el mejor método para la detección de la bacteria *X. c.* pv. *vesicatoria* en semilla de tomate. Esta investigación se realizó en laboratorios e invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, las variedades analizadas fueron la Hayslip, Homestead 61, Río Grande y Winner, 12 gramos de semillas de cada variedad

se colocaron en un buffer fosfato 0.05 M, a 4°C durante toda una noche y posteriormente se realizaron diluciones seriadas del filtrado de la semilla y el buffer. Se sembró 0.1 ml, de cada dilución (solución madre, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) para el recobro de la bacteria en los métodos Tween B, CKTM y TBCK, bajo un arreglo bifactorial tres por cuatro en un diseño completamente al azar con tres repeticiones. No hubo diferencias entre métodos en cuanto a detección de la bacteria en UFC/g, pero sí entre variedades, encontrándose como las más contaminadas por esta bacteria la Hayslip y Río Grande. En lo que se refiere al tiempo de aparición de las UFC en cada uno de los métodos, el mejor fue el Tween B el cual registró un promedio en la aparición de las UFC de 84 Horas, no encontrándose diferencias entre variedades en su capacidad de germinación. La identificación de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas, siembra en medios diferenciales, medios semiselectivos y pruebas de patogenicidad, los síntomas aparecieron de 12 a 14 días después de las inoculaciones en los frutos.

ABSTRACT

METHODS FOR THE DETECTION OF *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* IN TOMATO (*Lycopersicon esculentum* Mill) SEED

By

JORGE LUIS SALAZAR GONZÁLEZ

MASTER OF SCIENCE
AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
Buenavista, Saltillo. Coahuila. November, 1997.

M. C. Abiel Sánchez Arizpe - Advisor -

Key words: Diagnostic, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, tomato, seed.

In order to determine the best method for the detection of the bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato seed, research work was carried out at the laboratory and greenhouse of Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro in Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. The varieties studied were Hayslip, Homestead 61, Río Grande and Winner, 12 grammes of seed were set in one phosphate buffer 0.05 M, during all night to 4°C, and then seriates dilutions in the filter of seed and buffer were carried out, 0.1 ml, of each

dilution (mother solution, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) was sown in order to bacteria recovery in the three methods Tween B, CKTM and TBCK, under a bifactorial three by four completely random, design with three replications. There was not differences between methods in detection of the bacteria in colony forming units per gram (CFU/g), but there was differences between varieties, the most contaminated varieties by the bacteria were Hayslip and Río Grande. In relation to time forming of CFU in each method, the best method was Tween B, this registered an average of 84 hours, of the CFU display. Germination capacity was similar for the three varieties in the germination test. Identification of strains was carried out by biochemical tests, differentiating media and semiselective and pathogenicity tests. The fruit symptoms, showed up 12 to 14 days after the inoculations.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Principales Patógenos Transmitidos en Semilla de Tomate.....	4
Hongos.....	4
Bacterias.....	5
Virus.....	6
Principales Agentes Cuarentenados para el Cultivo del Tomate.....	6
Ubicación Taxonómica del Agente Causal de la Mancha Bacteriana del Tomate (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>).....	7
Etiología.....	7
Epifitiología.....	8
Sintomatología.....	11
Distribución.....	12
Control de la Mancha Bacteriana.....	12
Medios Semi-selectivos, Serología y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el Diagnóstico e Identificación de <i>X. c. pv. vesicatoria</i>	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Localización del Sitio Experimental.....	18
Material Experimental.....	18
Prueba de Germinación.....	19
Métodos de Detección de la Bacteria.....	19
Identificación de la Bacteria.....	21
Pruebas de Patogenicidad.....	21
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	35
RESUMEN.....	36
LITERATURA CITADA.....	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
4.1	Análisis de Varianza de la Variable Capacidad de Germinación de Semilla de Diferentes Variedades de Tomate, en Estudio de Detección de la Bacteria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> . UAAAN, 1997..	25
4.2	Comparación de Medias de la Capacidad de Germinación para Semilla de Diferentes Variedades de Tomate, en Estudio de Detección de la Bacteria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> . UAAAN, 1997.	25
4.3	Análisis de Varianza para los Factores en Estudio de Detección de la Bacteria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , en Semilla de Variedades de Tomate. UAAAN, 1997.....	27
4.4	Comparación de Medias de la Variable UFC/g de Semilla en Diferentes Métodos para Detección de la Bacteria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> en Semilla de Tomate. UAAAN, 1997.....	27
4.5	Comparación de Medias de la Variable UFC/g de Semilla para Diferentes Variedades en Estudio de Detección de la Bacteria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> en Semilla de Tomate. UAAAN, 1997.....	28
4.6	Análisis de Varianza para la Variable Tiempo (hrs) de Aparición de las UFC/g de Semilla en Métodos para Detección de la Bacteria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> en Semilla de Tomate. UAAAN, 1997.....	29
4.7	Comparación de Medias para la Variable Tiempo (hrs) de Aparición de las UFC/g de Semilla en Métodos para Detección de la Bacteria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> en Semilla de Tomate. UAAAN, 1997.....	29
4.8	Resultados de las Pruebas Bioquímicas, Medios Diferenciales y Semiselectivos en la Identificación de las Cepas de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> Detectadas en Semilla de Cuatro Variedades Comerciales de Tomate. UAAAN, 1997.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
4.1	Síntomas de la Mancha Bacteriana en Tomate Causados por la Bacteria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	30

INTRODUCCIÓN

Con la apertura del tratado de libre comercio, las exportaciones de los cultivos hortícolas han ido en aumento, de la misma manera la importación de semilla mejorada utilizada para la siembra. El cultivo del tomate ocupa el segundo lugar a nivel nacional desde el punto de vista de superficie sembrada y el primero por su valor de producción; esta hortaliza ocupa un lugar preponderante en el desarrollo económico y social en la agricultura a nivel mundial, ya que demanda alrededor de 140 jornales por hectárea (Valadez, 1994).

En México Bringas (1995), reportó que para 1994, en el país se sembró una superficie de 81,184 ha, siendo los principales estados productores: Baja California, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Veracruz y Yucatán.

Este cultivo se ve afectado por varios agentes patógenos, pero la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* está considerada como la más peligrosa en el cultivo del tomate (Gitaitis, et al., 1992), ya que tan sólo el

uno por ciento de semilla contaminada bajo condiciones favorables es suficiente para causar una epifitía; siendo esta una bacteria transmitida por semilla se corre el riesgo de introducir al país cepas más virulentas (Randhawa, 1996), ya que para el caso específico de esta bacteria está clasificada en dos grupos A y B de los cuales el grupo A ya está presente en México. Esta bacteria es de los principales patógenos cuarentenados para el cultivo del tomate y a nivel nacional no se cuenta con metodologías estandarizadas para el diagnóstico de este patógeno. Existen varios métodos (McGuire, *et al.*, 1986), (Sijam, *et al.*, 1991), utilizados para el diagnóstico en semillas de tomate y chile; otras técnicas como el método serológico ELISA, el anticuerpo que se encuentra en el mercado no logra detectar este patógeno cuando éste viene portado en semilla, además se ha reportado la utilización de cuatro anticuerpos monoclonales para la identificación de esta bacteria, por lo que no hay garantía que con el anticuerpo existente en el mercado se pueda diagnosticar la variabilidad de cepas de este patógeno.

Dada la importancia que representa el cultivo del tomate a nivel nacional, el riesgo que se corre de introducir al país cepas más patogénicas de esta bacteria al estar importando semilla y a la necesidad de evaluar métodos para su detección en semilla se planteó el siguiente objetivo:

Objetivo

- a) Determinación del mejor método para la detección de la bacteria *X. c. pv. vesicatoria* en semilla de tomate.

Hipótesis

- a) El mejor método para la detección de la bacteria *X. c. pv. vesicatoria* en semilla de tomate será el Tween B.

REVISIÓN DE LITERATURA

Principales Patógenos Transmitidos en Semilla de Tomate

Las semillas han jugado y continúan jugando un papel vital en el desarrollo de las sociedades modernas, fuera de la calidad de las semillas, lo más importante de una sociedad es la sobrevivencia, que es la producción de alimentos. Las semillas frecuentemente son transportadas de un lugar a otro para propósitos de mejoramiento y en forma directa para la producción (Schaad, 1992). Durante estos movimientos, nuevas áreas de cultivo pueden verse afectadas por la introducción de patógenos no presentes, que resulta en serios problemas de introducción de nuevas enfermedades (Neergaard, 1979).

Los principales patógenos transmitidos en semilla de tomate reportados por Agarwal y Sinclair (1987), son los siguientes:

Hongos:

Alternaria solani

Alternaria tenuis

Cladosporium herbarum

Didymella lycopersici

Didymella rabiei (*Ascochyta rabiei*)

Diplodia gossypina (*Botryodiplodia theobromae*)

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*

Glomerella cingulata

Phytophthora infestans

Phytophthora nicotianae var. *parasitica*

Pythium aphanidermatum

Rhizoctonia solani

Verticillium dahliae

Bacterias:

Corynebacterium michiganensis pv. *michiganensis* (*Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis*).

Corynebacterium michiganensis pv. *sepedonicum* (*Clavibacter michiganensis* pv. *sepedonicum*).

Pseudomonas solanacearum

Pseudomonas syringae pv. *tomato*

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*

Virus:

Virus del Mosaico Arabis

Virus del Mosaico del Pepino

Virus del Mosaico del Tabaco

Virus del Anillo Negro del Tomate

Virus de la Mancha Anular del Tomate

Virus del Estriado del Tabaco

Principales Agentes Cuarentenados Para el Cultivo del Tomate

En la actualidad la gran mayoría de los países cuentan con una economía muy activa, en la cual se incluye el intercambio comercial de gran variedad de productos agrícolas, llevando implícito la posibilidad del traslado o movilización de organismos exóticos que pueden desarrollarse como epifitias en diferentes lugares ocasionando daños directos o indirectos a los cultivos.

Un país libre de patógenos ya sean virus, hongos, nematodos y bacterias, considera a estos como cuarentenarios y su entrada al territorio le ocasionaría pérdidas en su economía. Para prevenir su entrada se requiere de inspecciones en los puntos de ingreso; así como de la identificación y diagnóstico de las bacterias fitopatógenas de importancia para México, en este caso para el cultivo del tomate son: *Corynebacterium michiganensis* pv.

michiganensis, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (López, 1996).

Ubicación Taxonómica del Agente Causal de la Mancha Bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) del Tomate

Según Goto (1992), la clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino : Procaryotae
División: Gracilicutes
Clase: Proteobacteria
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Xanthomonas*
Especie: *campestris*
Patovar: *vesicatoria*

Etiología

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* es el agente causal de la mancha bacteriana del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y del chile (*Capsicum annum* L.) (Leite, et al., 1995). En la descripción original del agente causal en Pretoria en el sur de África por Doige (1921), lo nombraron

como *Bacterium vesicatorium* indicando que este patógeno era capaz de hidrolizar el uno por ciento de almidón después de los 14 días, sin embargo, más tarde Gardner y Kendrick (1921), reportaron que la mancha bacteriana en Indiola era causada por *Bacterium exitosum*. Es una bacteria de forma bacilar, Gram negativa, con un sólo flagelo polar, aerobia, mide 0.4 a 0.7 micras de ancho por 0.7 a 1.8 micras de largo (Krieg y Holt, 1984). En agar produce colonias amarillas y mucoides, licuefacción de la gelatina variable, digestión de proteína, hidrólisis de asculina positiva, crece a 35°C, produce ácido pero no gas de la oxidación de glucosa, manosa y arabinosa (Rodríguez, 1991), (Schaad, 1994). Hidrólisis de almidón y degradación del pectato negativos (Bouzar, *et al.*, 1994a), producción de ureasa negativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, reducción de nitritos a nitratos negativa (Gitaitis, *et al.*, 1987).

Epifitología

Las cepas de *X. c. pv. vesicatoria* requieren de temperaturas cálidas y alta humedad, y bajo estas condiciones pueden causar daños severos que resulta en una reducción de la producción (Jones, *et al.*, 1986), (Gitaitis, *et al.*, 1992), además cuando persisten estas condiciones se dificulta el control de esta enfermedad (Jones, *et al.*, 1991). Cuando la enfermedad es severa se llegan a tener pérdidas hasta del 52 por ciento en frutos (Jones, *et al.*, 1986). *X. c. pv. vesicatoria* crece bien en condiciones in Vitro a 35°C (Schaad, 1994),

pero bajo condiciones de campo las temperaturas óptimas para el desarrollo de la enfermedad fluctúan entre los 23 a 28°C (Pohronezny, *et al.*, 1992). Vakili (1967), señala que cuando llueve, las películas de agua sobre la epidermis de las hojas facilitan el movimiento e introducción de la bacteria sobre el tejido expuesto, además menciona que la bacteria penetra por estomas y al penetrar destruye células (Crossan y Morehart, 1964). Pero Vakili (1967), en su trabajo reporta que la penetración a través de heridas es más importante que por los estomas, en el caso de los frutos la mejor forma de penetración es por heridas (Agrios, 1995). También el fenómeno de gutación en las hojas juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad (Cox, *et al.*, 1956). Las bacterias son diseminadas por el viento, lluvia, o por contacto (Agrios, 1995). Alta fertilización con nitrógeno, potasio y magnesio, favorecen al desarrollo de la enfermedad (McGuire, *et al.*, 1991), (Woltz y Jones, 1979).

Leben (1963), señala que *X. c. pv. vesicatoria* puede tener una fase residente sobre las hojas de tomate no infectadas, con multiplicación pero sin causar síntomas, esto concuerda con los resultados obtenidos por Timmer, *et al.*, (1987), donde señalan que las *Xanthomonas* son capaz de multiplicarse y sobrevivir por varias semanas sobre la superficie de hospederos en la ausencia de la enfermedad, pero que también pueden sobrevivir y multiplicarse en plantas no hospederas bajo ciertas condiciones.

La bacteria puede sobrevivir en el campo en residuos de cultivo, aunque también puede sobrevivir en la rizosfera de plantas muertas (Gardner y Kendrick, 1923); ellos mencionan que el patógeno inverna en el suelo o en remanentes de plantas enfermas; también notaron que el patógeno sobrevive por 16.5 meses en semilla, aunque estudios más recientes realizados por Bashan, *et al.*, (1982), señalan que *X. c. pv. vesicatoria* sobrevive en semilla por diez años y que cuando estas semillas son sembradas las plántulas desarrollan síntomas visibles o bien no producir síntomas, esta bacteria también fue aislada del interior de semillas de chile (Lewis y Brown, 1961). La sobrevivencia de las bacterias fitopatógenas en semillas de hortalizas tiene una importancia económica significativa para las compañías productoras de semilla y agricultores. La diseminación de semillas infectadas a las parcelas, sin conocer su historial de no enfermedad resulta en un daño innecesario (Crossan y Murehart, 1964), (Neergaard, 1979), y es la mejor fuente de inóculo a través de la semilla (Gardner y Kendrick, 1923), (Crossan y Morehart, 1964). En Florida el uno por ciento de semilla infectada con *X. c. pv. vesicatoria* es suficiente para causar una epifitía (Cox, 1966). Cuando las plántulas son infectadas con *X. c. pv. vesicatoria* y éstas son llevadas a campos comerciales pueden ocasionar serias erupciones de mancha bacteriana (Morton, 1964). Otros autores como Diachum y Valteau (1946), reportaron que *X. c. pv. vesicatoria* sobrevive en asociación no patogénica en raíces de trigo.

Krupka y Crossan (1956), mencionan que *X. c. pv. vesicatoria* puede sobrevivir por más de 11 meses en tejido de hojas infectadas y en el suelo, aunque Peterson (1963), señala que esta bacteria no sobrevive en suelo por más de dos semanas.

Jones, *et al.*, (1986), reportan a *Solanum americanum*; *Physalis pubescens* L., *Ambrosia artemisifolia* L., *Eupatorium capillifolium* Watl., *Eclipta alba* L., *Trifolium repens* L., como malezas que son relativamente no importantes en la epidemiología de la mancha bacteriana. Además mencionan que los métodos usados en las operaciones comerciales de extracción de semilla incluye la fermentación o extracción ácida, este método reduce el grado de contaminación por la pulpa del fruto; por esta razón el nivel de transmisión de *X. c. pv. vesicatoria* en la semilla es extremadamente bajo.

Sintomatología

Esta enfermedad es caracterizada por lesiones necróticas sobre las hojas, tallos y frutos (Peterson, 1963), (Leite, *et al.*, 1995). Produce daños considerables, pero la característica más importante es su efecto sobre los frutos. Los síntomas de esta enfermedad en las hojas se reflejan en forma de pequeñas manchas (de 2 a 3 mm) irregulares y de color gris púrpura que presentan un halo amarillo estrecho con la parte central de color negro y con

frecuencia muestran un exudado y puede ser dificultoso diferenciar de manchas en las hojas causadas por otras bacterias fitopatógenas o algún desorden fisiológico (Agrios, 1995); (Gitaitis, *et al.*, 1992). Cuando son numerosas esas manchas producen defoliación o hacen que las hojas de las plantas queden rasgadas. La infección de los verticilos florales a menudo causa un considerable desprendimiento de las inflorescencias. En los frutos verdes aparecen pequeñas manchas aguanosas que sobresalen ligeramente, tienen halos blanco-verduscos y se extienden hasta alcanzar un diámetro aproximado de 3 a 6 mm. Poco después los halos desaparecen y las manchas cambian de color pardo a negro, se hunden ligeramente y su superficie se vuelve áspera y costrosa, de ahí que la epidermis del fruto se repliegue (Agrios, 1995).

Distribución

Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en el Norte y Sur de América, Europa, África, Asia y Australia (Neergaard, 1979).

Control de la Mancha Bacteriana

Gitaitis, *et al.* (1992), señalan que el control de la mancha bacteriana por químicos es muy difícil y que ningún bactericida es completamente efectivo

y es necesario darle un nivel de cero tolerancia. La Estreptomicina y Cobres como bactericidas fueron usados para reducir la incidencia de la mancha bacteriana pero la resistencia a estos es común (Marco y Stall, 1983); a mediados de los 60's una combinación de Cobre con Mancozeb resultó ser más efectiva que el Cobre sólo (Gitaitis, *et al.*, 1992). Una tercera raza de *X. c. pv. vesicatoria* en tomate fue reportada por Jones, *et al.*, (1995), y en Chile Kousik y Ritchie (1995), reportaron las razas cuatro y cinco en el sureste de los Estados Unidos. Sin embargo, Stall y Thayer (1962), reportaron que la Estreptomicina pierde su efectividad con el desarrollo de nuevas cepas resistentes al antibiótico. En lo que corresponde a control genético cruzamientos con la línea Hawaii 7998 son prometedores para el futuro ya que la reacción de hipersensibilidad en esta línea es controlada por más de un gen (Wang, *et al.*, 1994). Si la semilla va contaminada es recomendable una rotación de cultivos (Crossan y Morehart, 1964).

Medios Semi-selectivos, Serología y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el Diagnóstico e Identificación de *X. c. pv. vesicatoria*

McGuire, *et al.* (1986), desarrollaron una técnica para la detección de *X. c. pv. vesicatoria* proveniente en semilla tratada o no tratada y partes de la planta. Este medio fue denominado Tween B y se caracteriza por que aparece una zona circular alrededor de la colonia bacteriana formada por

cristales blancos que son las sales de calcio de los ácidos grasos que son separadas por el Tween por la acción de enzimas lipolíticas. Además estos autores señalan que mediante esta técnica se puede recobrar la bacteria en semilla comercial a concentraciones de tres unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo, con un alto nivel de eficiencia. Otros investigadores como Sijam, *et al.* (1991), desarrollaron un medio designado CKTM para el aislamiento e identificación de *X. c. pv. vesicatoria* proveniente en semilla, en este medio la bacteria se distingue fácilmente de cepas de otros patovares de *X. campestris* por la formación de un anillo claro alrededor de la colonia, estos mismos autores mencionan que este anillo aparece de uno a dos días después de que aparecen las colonias bacterianas. Este medio se caracteriza por que reduce grandemente la contaminación de microflora, de lo contrario el crecimiento de microorganismos saprófitos dificultaría la detección de la bacteria fitopatógena. También Peterson (1963), utilizó tres medios selectivos para el aislamiento de *X. c. pv. vesicatoria* de suelo y plantas enfermas de tomate y menciona que estos medios inhibieron el 90 al 99 por ciento de los microorganismos saprófitos que crecen en medios no selectivos y que la inhibición de estos microorganismos fue por la aplicación de oxina y detergentes aplicados al medio, el mismo autor señala que *X. c. pv. vesicatoria* es inhibida cuando los microorganismos de suelo están presentes, en los tres medios empleados ninguno fue considerado superior a los otros. Bashan, *et al.*

(1982), recobraron *X. c. pv. vesicatoria* en semilla de chile usando un medio enriquecido con hojas.

Chun y Alvarez (1983), realizaron un medio semi-selectivo al que nombraron SM para el aislamiento de *X. campestris pv. campestris* proveniente en suelo o en tejido de plantas y mencionan que este medio es útil para el aislamiento de otros patovares de *X. campestris* que para el caso de *X. c. pv. vesicatoria* no crece en este medio.

Schaad y White (1974), desarrollaron un medio para el aislamiento de *X. c. pv. campestris* de suelo. Este medio denominado SX agar fue basado en el principio de la digestión del almidón por esta bacteria; ellos trabajaron con *X. phaseoli*, *X. poinsettiae*, *X. malvacearum*, *X. juglandis*, *X. translucens*, *X. pelargonii* y *X. vesicatoria*. El diagnóstico se caracteriza por que *X. c. pv. campestris* forma una zona clara alrededor de la colonia al hidrolizar el almidón contenido en el medio que para el caso de *X. c. pv. vesicatoria* no logra hidrolizar el almidón, este medio es utilizado para la identificación a nivel patovar de *X. c. pv. vesicatoria* (Schaad, 1994).

Schaad y Kendrick (1975), formularon un método cualitativo para la detección de *X. c. pv. campestris* en semillas de crucíferas nombrándolo como medio NSCA, en este medio las colonias bacterianas toman una coloración gris

a púrpura hidrolizando el almidón. En otro estudio realizado por Poplawsky y Chun (1995), utilizando el medio FS encontraron una pigmentación atípica en las colonias bacterianas de *X. c. pv. campestris* al analizar semilla comercial de crucíferas. En la actualidad este medio NSCA al igual que el SX agar son utilizados para la identificación de *X. c. pv. vesicatoria* a nivel patovar (Schaad, 1994).

Otro medio semi-selectivo fue desarrollado por Clafin, *et al.* (1987), llamado MXP para el aislamiento de *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*, también basado en el principio de la hidrólisis del almidón. Este medio es eficiente cuando esta bacteria viene portada en semilla, en planta y suelo. También es utilizado para la identificación a nivel patovar del grupo de las *X. campestris* (Schaad, 1994).

Otros métodos que han sido empleados para el diagnóstico de *X. c. pv. vesicatoria* es la serología mediante el uso de anticuerpos policlonales y monoclonales (Morton, 1965), (Charudattan, *et al.*, 1973), (Schaad, 1976) y Bouzar, *et al.*, 1994b). Sin embargo, hay una gran heterogeneidad en las *Xanthomonas* y es mejor para este caso el uso de anticuerpos monoclonales en la identificación específica de estos patógenos de plantas. Los anticuerpos policlonales desarrollados para cepas de *X. c. pv. vesicatoria* reaccionan con otros patovares de *X. campestris* (O'Brien, *et al.*, 1967). También las cepas de

X. c. pv. vesicatoria son serológicamente diversas (Charudattan, *et al.*, 1973), (Schaad, 1976) y Bouzar, *et al.*, (1994b), y en la actualidad no se han obtenido anticuerpos monoclonales que reaccionen con todas las cepas de este patógeno (Bouzar, *et al.*, 1994b) ni de otros fitopatógenos como es el caso de *X. c. pv. campestris* que tiene una gran diversidad genética en sus cepas (Alvarez, *et al.*, 1994).

En los últimos años la detección de *X. c. pv. vesicatoria* se está llevando a cabo por la amplificación del DNA de la bacteria mediante la técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); por este método el número de células que pueden ser detectadas en un lavado de semillas de chile o tomate es de 10^2 a 10^3 UFC/ml (Leite, *et al.*, 1995). Sin embargo, es tanta ya la variabilidad genética en esta bacteria que ha sido clasificada en dos grupos (Grupo A y B) mediante pruebas bioquímicas, fisiológicas y serológicas (Bouzar, *et al.*, 1994b) y también mediante la técnica del PCR (Jones, *et al.*, 1993), conociéndose que el grupo A ya está presente en México (Bouzar, *et al.*, 1994b).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Sitio Experimental

El presente trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro durante los meses enero-julio de 1997, en el laboratorio de Fitopatología e invernadero de la misma, ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Material Experimental

Se trabajó con semilla de cuatro variedades comerciales de tomate (Hayslip, Homestead 61, Río Grande y Winner), las cuales venían envasadas y se encuentran disponibles a la venta, para evaluar las pruebas de germinación y sanidad refiriéndonos con esta última a la detección de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Prueba de Germinación

Primeramente se determinó la capacidad de germinación de las muestras de semilla a evaluar, esto para conocer su condición como lotes comerciales. Para ello se utilizaron cuatro repeticiones de 100 semillas por cada una de las variedades. Las charolas donde se pusieron las semillas a germinar, se les colocaron cuatro capas de papel filtro, el cual se humedeció e inmediatamente se colocaron las 100 semillas en cada repetición y estas fueron cubiertas con clean-pack y colocadas en una incubadora a una temperatura a 25°C durante diez días, se evaluó la capacidad de germinación en base al número de semillas con germinación normal, es decir aquellas que desarrollaron todas sus estructuras esenciales hasta el nivel aceptable para ser consideradas plántulas normales. El diseño utilizado para el análisis fue un completamente al azar de cuatro tratamientos con cuatro repeticiones analizado mediante el paquete estadístico SAS.

Métodos de Detección de la Bacteria

Para lo que fue el primer objetivo determinar el mejor método de detección para la bacteria *X. c. pv. vesicatoria* se utilizaron los métodos Tween B (McGuire, *et al.*, 1986), CKTM (Sijam, *et al.*, 1991) y un tercer método denominado TBCK que resultó de la combinación de ambos, sólo que a este

no se le proporcionó bacitracina. La metodología consistió en utilizar 12 gramos de semilla (aproximadamente 5,000 semillas) de cada una de las variedades previamente lavadas durante 30 minutos a agua corriente, con el propósito de eliminar el tratamiento a la semilla con fungicida, inmediatamente después se agregó tres mililitros de un buffer fosfato 0.05 M (1 000 ml de agua destilada estéril, 7.0 g de K_2HPO_4 , 1.3 g de KH_2PO_4 , 0.1 ml de Tween 20 y ajustar el pH a 7.2), por gramo de semilla y se incubó durante 12 horas a 4°C. Acto seguido se obtuvo el filtrado (separación de la semilla y el buffer), y se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución madre, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , colocando 0.1 ml de cada una de las diluciones con tres repeticiones en cada una de las cajas petri que contenían los medios Tween B, CKTM y TBCK y se incubó a 27°C en un lapso de tiempo de cuatro a siete días realizando inspecciones diarias hasta observar las unidades formadoras de colonia (UFC) desarrolladas con las características propias de esta bacteria en cada uno de los métodos empleados. Se registró, el número de UFC por gramo de semilla para cada una de las variedades y métodos, analizando los datos bajo un diseño bifactorial tres por cuatro con tres repeticiones en un arreglo completamente al azar, asimismo, se registró el tiempo (en horas) en que aparecieron las UFC en cada uno de los métodos y los datos fueron analizados bajo un diseño completamente al azar de tres tratamientos con cuatro repeticiones en el paquete estadístico SAS.

Identificación de la Bacteria

Una vez que se desarrollaron las UFC se aislaron 12 cepas con características de esta bacteria (colonias amarillas y mucoides) en medio de cultivo Agar Nutritivo (AN), luego se les realizó tinción de Gram y fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas, medios diferenciales, semiselectivos y pruebas de patogenicidad (tinción de Gram negativa, colonias amarillas y mucoides en medio YDC, crecimiento a 35°C, licuefacción de la gelatina, digestión de proteína, producción de ureasa, producción de ácido a partir de glucosa, arabinosa y manosa, degradación de pectato en CVP, crecimiento en medios TB, SX agar, XCS, MD-5, KB y XTS), (Schaad, 1994), crecimiento en medio D-1, D-3, y D-4 (Kado y Heskett, 1970), catalasa y oxidasa (Gitaitis, *et al.*, 1987).

Pruebas de Patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron con inyecciones al fruto de acuerdo a la técnica de Stall, *et al.*, (1972). Para la producción de la planta la siembra se realizó en charolas previamente desinfectadas, utilizando como sustrato Peat Moss (esterilizado) en enero de 1997. Y las inoculaciones se realizaron en frutos verdes adheridos a la planta, estos frutos tenían entre 4 y 5 cm de diámetro ecuatorial, para las inoculaciones se utilizó un cultivo

bacteriano de 48 horas de edad, crecido en medio AN, utilizando una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC/ml (Schaad, 1994) y a los testigos únicamente agua destilada estéril e inyectada a los frutos. Una vez que aparecieron los síntomas en los frutos la bacteria fue reaislada en medio AN e identificada mediante el procedimiento señalado anteriormente.

RESULTADOS

Los resultados se presentan primeramente para el ensayo de germinación en los lotes de semilla evaluados. Para esto se tomó en cuenta la capacidad de germinación de las muestras de semilla medidas por el número de semillas con germinación normal, es decir, aquellas que desarrollaron todas sus estructuras, esenciales hasta el nivel aceptable para ser consideradas plántulas normales.

En seguida se presentan los resultados de los métodos de detección en los cuales se tomó en cuenta el número de unidades formadoras de colonia por gramo de semilla (UFC/g), considerando las características propias de esta bacteria en cada uno de los métodos empleados.

En tercer término se presentan los resultados del tiempo (hrs) en que aparecieron las UFC/g de semilla, tomando en cuenta el tiempo transcurrido desde que se sembró en las placas hasta la aparición de las UFC.

Finalmente se presentan los resultados para la identificación de las cepas detectadas mediante los tres métodos en base a pruebas bioquímicas, medios diferenciales, medios semiselectivos y pruebas de patogenicidad.

Así para los resultados de germinación que se presenta en el Cuadro 4.1, no se encontró diferencia significativa entre variedades, el coeficiente de variación (CV) se encuentra dentro de los rangos aceptables ya que para este caso fue de 4.69 por ciento. Lo mismo se observa en la prueba de rango múltiple (Tukey al 0.05 y 0.01 por ciento) donde las diferencias numéricas entre las variedades se observan en el Cuadro 4.2. Estos valores de germinación son aceptables ya que la variedad Winner la cual tiene el valor más bajo de germinación (91.5 por ciento de germinación normal) está muy por encima de valores mínimos aceptables (80 por ciento), lo que indica que la semilla por sus condiciones de almacenamiento (envasado en envase hermético y tratamiento con fungicida) no tendrá fácilmente interferencia con microorganismos de almacén que pudieran bajar drásticamente la germinación, comprobándose así su aptitud y disponibilidad como semilla para siembra. Estos resultados de germinación demuestran que la semilla usada en este experimento se usará con toda confianza al tener una calidad aceptable de germinación que es el principal criterio para comercialización de lotes de semilla y con estos valores se espera o asegura un buen funcionamiento de la misma.

Cuadro 4.1. Análisis de Varianza de la Variable Capacidad de Germinación de Semilla de Diferentes Variedades de Tomate, en Estudio de Detección de la Bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. UAAAN, 1997.

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft
				0.05	0.01
Variedades	3	10.00	3.33	0.18 NS	8.74 27.05
Error	12	226.00	18.83		
Total	15				

Coeficiente de Variación = 4.69 por ciento.

Cuadro 4.2. Comparación de Medias de la Capacidad de Germinación para Semilla de Diferentes Variedades de Tomate, en Estudio de Detección de la Bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. UAAAN, 1997.

Variedad	Prueba de Rango Múltiple	
	Tukey 0.05	Tukey 0.01
Homestead 61	93.5 A	93.5 A
Hayslip	93.0 A	93.0 A
Río Grande	92.0 A	92.0 A
Winner	91.5 A	91.5 A

En lo que respecta a la evaluación de los métodos de detección de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* como se observa en el análisis de varianza (Cuadro 4.3), no hubo diferencia significativa entre éstos en cuanto a detección de la bacteria en Unidades Formadoras de Colonia por gramo de semilla (UFC/g), al considerar para cada variedad, no obstante entre variedades la diferencia fue altamente significativa en cuanto a UFC/g de semilla de *X. c.* pv. *vesicatoria*, no encontrándose diferencia en la interacción métodos por variedades. El coeficiente de variación (16.79 por ciento) se encuentra entre los rangos aceptables para este tipo de prueba. Al comparar los valores medios de UFC/g de semilla detectadas en los tres métodos en la prueba de rango múltiple (Tukey 0.05 y 0.01) no se observan diferencias entre métodos (Cuadro 4.4), pero si se encontraron entre variedades ya que las más contaminadas con la bacteria *X. c.* pv. *vesicatoria* fueron la Hayslip con 1172 UFC/g en promedio y la de Río Grande con 1700 UFC/g, observándose valores más bajos para la Homestead 61 con 155.33 UFC/g y la Winner con 155.33 UFC/g como se observa en el (Cuadro 4.5). Cabe mencionar que si durante el proceso de extracción de la semilla ésta es contaminada por otros microorganismos saprófitos de rápido crecimiento, pueden enmascarar la presencia de *X. c.* pv. *vesicatoria* en cualquiera de estos métodos ya que esta bacteria es de crecimiento más lento y por ello la importancia del uso de los detergentes en los medios para inhibir la presencia de estos microorganismos.

Cuadro 4.3. Análisis de Varianza para los Factores en Estudio de Detección de la Bacteria *Xanthomas campestris* pv. *vesicatoria*, en Semilla de Variedades de Tomate. UAAAN, 1997.

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft	
					0.05	0.01
Métodos	2	76528.6	38264.3	2.15NS	19.45	99.46
Variedades	3	16015492.0	5338497.3	300.2**	8.64	26.60
Mét*Var	6	162391.3	27065.2	1.5NS	3.84	7.31
Error	24	42.6738.0	17780.7			
Coeficiente de Variación = 16.76 por ciento						

Cuadro 4.4. Comparación de Medias de la Variable UFC/g de Semilla en Diferentes Métodos para Detección de la Bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en Semilla de Tomate. UAAAN, 1997.

Método	Prueba de Rango Múltiple (promedio de UFC/g de semilla).	
	Tukey 0.05	Tukey 0.01
Tween B	830.17 A	830.17 A
CKTM	826.33 A	826.33 A
TBCK	730.50 A	730.50 A

Cuadro 4.5. Comparación de Medias de la Variable UFC/g de Semilla para Diferentes Variedades en Estudio de Detección de la Bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en Semilla de Tomate. UAAAN, 1997.

Variedad	Prueba de Rango Múltiple (promedio de UFC/g de semilla).	
	Tukey 0.05	Tukey 0.01
Río Grande	1700.00 A	1700.00 A
Hayslip	1172.00 B	1172.00 B
Homestead 61	155.33 C	155.33 C
Winner	155.33 C	155.33 C

Uno de los objetivos de los métodos de detección es emitir un dictamen en el menor tiempo posible. Así el tiempo necesario para el diagnóstico, en los métodos evaluados en este estudio se presenta en el (Cuadro 4.6). Aquí se puede observar que el coeficiente de variación (9.9 por ciento) se encuentra en un rango aceptable y que hubo una diferencia altamente significativa en cuanto al tiempo (horas) entre métodos, destacando el método Tween B, en el que el tiempo promedio en que aparecen las UFC fue de 84 horas como se puede apreciar en el Cuadro 4.7. Asimismo al realizar las pruebas de rango múltiple (Tukey al 0.05 y 0.01 por ciento) se observan diferencias entre métodos, en este estudio el método señalado anteriormente

resultó ser el mejor, menos tiempo en la aparición de las UFC y menor contaminación con microorganismos saprófitos.

Cuadro 4.6. Análisis de Varianza para la Variable Tiempo (hrs) de Aparición de las UFC/g de Semilla en Métodos para Detección de la Bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en Semilla de Tomate. UAAAN, 1997.

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft	
					0.05	0.01
Métodos	2	18528.0	9264.0	52.64**	19.38	27.35
Error	9	1584.0	176.0			
Total	11	20112.0				
Coeficiente de Variación = 9.9 por ciento						

Cuadro 4.7. Comparación de Medias para la Variable Tiempo (hrs) de Aparición de las UFC/g de Semilla en Métodos para Detección de la Bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en Semilla de Tomate. UAAAN, 1997.

Método	Prueba de Rango Múltiple (promedio en Horas)	
	Tukey 0.05	Tukey 0.01
TBCK	180.0 A	180.0 A
CKTM	138.0 B	138.0 B
Tween B	84.0 C	84.0 C

El Cuadro 4.8 muestra la identificación de las cepas aisladas de los métodos en estudio mediante pruebas bioquímicas, medios diferenciales y medios semiselectivos. Los resultados obtenidos corresponden a los reportados para esta bacteria, mismos que se corroboraron con pruebas de patogenicidad.

En relación a las pruebas de patogenicidad los síntomas (Figura 4.1) característicos de la mancha bacteriana aparecieron de 12 a 14 días después de las inoculaciones, reaislándose la bacteria de los frutos a los 35 y 60 días después de que estos fueron inoculados, estas bacterias reaisladas dieron los mismos resultados en las pruebas bioquímicas, medios diferenciales y semiselectivos que las bacterias inoculadas.



Figura 4.1. Síntomas de la mancha bacteriana en tomate causados por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Cuadro 4.8. Resultados de las Pruebas Bioquímicas, Medios Diferenciales y Semiselectivos en la Identificación de las Cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Detectadas en Semilla de Cuatro Variedades Comerciales de Tomate. UAAAN, 1997.

Prueba	Reacción	Resultado
Tinción de Gram	-	-
Colonias amarillas y mucoides en YDC	+	+
Crecimiento a 35°C	+	+
Licuefacción de la gelatina	v	v
Digestión de proteína	+	+
Producción de ureasa	-	-
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
Producción de ácido a partir de:		
Arabinosa	+	+
Glucosa	+	+
Manosa	+	+
Degradación de pectato CVP	-	-
Crecimiento en King de B	+	+
Crecimiento en D1	-	-
Crecimiento en D3	-	-
Crecimiento en D4	-	-
Crecimiento en SX agar	-	-
Crecimiento en XTS	+	+
Crecimiento en XCS	+	+
Crecimiento en MD-5	v	+
Crecimiento en Tween B	+	+

DISCUSIÓN

Indudablemente la introducción de cepas más virulentas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* al país va a ser inevitable, aunque Bouzar *et al.*, (1994b), reportan que tan sólo el grupo A está presente en México y al estar importando el 100 por ciento de la semilla de tomate es probable que en pocos años el grupo B se encuentre causando serios problemas en las regiones productoras a nivel nacional. En Florida, Cox (1966), menciona que tan sólo una semilla contaminada de cada 100 es suficiente para causar una epifitía. En México la mayoría de las regiones productoras presentan condiciones favorables para el desarrollo de esta enfermedad, de ahí la importancia de desarrollar técnicas para su detección para poder evitar daños innecesarios así como la introducción al país de cepas más virulentas.

Muchas bacterias fitopatógenas pueden ser identificadas por el uso de medios de cultivo artificiales. Distinguiendo características por la incorporación a los medios de productos químicos y antibióticos seleccionados. El medio Tween B es usado en la identificación de *X. c.* pv. *vesicatoria*, en este medio el bromuro de potasio (KBr) aumenta la pigmentación de la colonia

amarilla y el Tween 80 en conjunción con el CaCl_2 demuestran lipólisis, otras bacterias contaminantes que no logran morir con los detergentes y tienen actividad lipolítica pueden inhibir o enmascarar la presencia de *X. c. pv. vesicatoria* si ésta viene presente en la semilla, estos resultados coinciden con los obtenidos por McGuire *et al.*, (1986), quienes señalan que otros contaminantes pueden ser fácilmente distinguidos por el color de sus colonias. En estos tres métodos las colonias eran diferentes en pigmentación, resultados similares encontraron Poplawsky y Chun (1995), al trabajar en semillas de crucíferas con *X. c. pv. campestris*, donde mencionan que las colonias presentaban pigmentación atípica en un mismo medio de cultivo. En los tres métodos evaluados no se encontró diferencia entre éstos en cuanto a detección en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) resultados muy parecidos encontró Peterson (1963), al evaluar tres medios para el aislamiento de *X. c. pv. vesicatoria* de suelo donde logró reducir el 90 al 99 por ciento de los microorganismos que crecen en medios no selectivos.

Las ventajas de estos métodos son la detección de células vivas, la bondad de estos métodos es que podemos saber que cantidad de inóculo podemos llevar al campo cuando utilizamos semilla contaminada por esta bacteria, las desventajas son que cuando la semilla durante su proceso de extracción se contamina con microorganismos saprófitos que no logran ser inhibidos por los antibióticos y detergentes utilizados en los medios, puede

enmascararse la presencia de esta bacteria, asimismo cuando la cantidad de inóculo es relativamente bajo el tamaño de muestra se incrementa y si se trata de híbridos que los precios fluctúan entre los 12,000 a 13,500 dólares por kilogramo de semilla, este tipo de métodos son fáciles de realizar y la limitante sería la experiencia que se tenga para trabajar con este tipo de microorganismos.

La selectividad de los medios fue proporcionada por el uso de Cyclohexamida, Bacitracina, Sulfato de Neomicina, Cefalexina, 5-fluorouracil y Tobramicina. La Cyclohexamida específicamente inhibe hongos, Cefalexina inhibe específicamente *Erwinia herbicola*, 5-Fluorouracil efectivamente elimina *Pseudomonas fluorescens* y la Tobramicina es muy efectiva para otras *Pseudomonas* que habitan tejidos de plantas.

Aunque estos medios no eliminan todos los contaminantes encontrados en las semillas, el beneficio de estos en la detección en semillas es significativo.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo el experimento y de acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que:

El método más eficiente para la detección de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en semilla de tomate fue el Tween B.

RESUMEN

El cultivo del tomate ocupa el segundo lugar a nivel nacional desde el punto de vista de superficie sembrada y el primero por su valor de producción. Este cultivo es afectado por varios agentes patógenos dentro de esta la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* está considerada como la más peligrosa en este cultivo y se corre el riesgo de introducir al país cepas más patogénicas al estar importando semilla ya que este microorganismo es transmitido por semilla.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el mejor método para la detección de la bacteria *X. c.* pv. *vesicatoria* en semilla de tomate. Esta investigación se realizó en laboratorios e invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, las variedades analizadas fueron la Hayslip, Homestead 61, Río Grande y Winner, de semilla de lotes comerciales, 12 gramos de semillas de cada variedad se colocaron en un buffer fosfato 0.05 M, a 4°C durante toda una noche y posteriormente se realizaron diluciones seriadas del filtrado de la semilla y el buffer. Se sembró 0.1 ml, de cada dilución (solución madre, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) para la recuperación de la bacteria en los métodos Tween B, CKTM y TBCK, bajo un arreglo bifactorial tres por cuatro

en un diseño completamente al azar con tres repeticiones. No se encontraron diferencias entre métodos en cuanto a detección de la bacteria en UFC/g, pero si entre variedades, encontrándose como las más contaminadas por esta bacteria la Hayslip y Río Grande. En lo que se refiere al tiempo de aparición de las UFC en cada uno de los métodos, el mejor fue el Tween B el cual registró un promedio en la aparición de las UFC de 84 Horas. No se encontraron diferencias entre variedades en cuanto a su capacidad de germinación. La identificación de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas, siembra en medios diferenciales, medios semiselectivos y pruebas de patogenicidad, los síntomas aparecieron de 12 a 14 días después de las inoculaciones en los frutos y el aislamiento de la bacteria correspondió nuevamente a la aislada inicialmente.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, V. K. and Sinclair, J. B. 1987. Principles of Seed Pathology. Vol. I. CRC Press, Inc. Boca raton, Florida, USA. pp 176.
- Agrios, G. N. 1995. M. Fitopatología. 2a. Edición. UTEHA. México, D. F. pp 552-553.
- Alvarez, A. M., Benedict, A. A. Mizumoto, C. T., Hunter, J. E., and Gabriel, D. W. 1994. Serological, Pathological, and Genetic Diversity Among Strains of *Xanthomonas campestris* Infecting Crucifers. *Phytopathology* 84: 1449-1457. United States of America.
- Bashan, Y., Okon, Y., and Henis, Y., 1982. Long-Term Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Tomato and Pepper Seeds. *Phytopathology* 72: 1143-1144. United States of America.
- Bouzar, N., Ahmed, N. E., Somodi, G. C., Jones, J. B. and Stall, R. E. 1994a. Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Strains from Tomato and Pepper Grown in Sudan. *Plant Disease* 78: 1219. United States of America.
- Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Hodge, N. C., Minsavage, G. V., Benedict, A. A. and Alvarez A. M. 1994b. Physiological, Chemical, Serological, and Pathogenic Analyses of a Worldwide Collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Strains. *Phytopathology* 84: 663-671. United States of America.
- Bringas, G. L. 1995. Panorama del Cultivo del Tomate. Productores de Hortalizas. Vol. X. pp 10-11.
- Charudattan, R., Stall, R. E., and Batchelor, D. L. 1973. Serotypes of *Xanthomonas vesicatoria* unrelated to its pathotypes. *Phytopathology* 63: 1260-1265. United States of America.

- Chun, W. W., and Alvarez, A. M. 1983. A Starch-Methionine for Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from Plant Debris in Soil. *Plant Disease* 67: 632-635. United States of America.
- Claflin, L. E., Vidaver, A. K., and Sasser, M. 1987. MXP, a Semi-Selective Medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Phytopathology* 77: 730-734. United States of America.
- Cox, R. S., Conover, R. A., and Sowell, G. 1956. Symptomatology of Bacterial Spot of Pepper and Tomato in Southern Florida. *Phytopathology* 46:582-584. United States of America.
- Cox, R. S. 1966. The Role of Bacterial Spot in Tomato Production in South Florida. *Plant Disease Reporter*. 50: 699-700. United States of America.
- Crossan, D. F., and Morehart, A. L. 1964. Isolation of *Xanthomonas vesicatoria* from Tissues of *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 54: 358-359. United States of America.
- Diachun, S., and Valleau, W. D. 1946. Growth and Overwintering of *Xanthomonas vesicatoria* in association with Wheat Roots. *Phytopathology* 36:277-280. United States of America.
- Doige, E. M. 1921. A Tomato Kanker. *Ann. Appl. Biol.* 7: 407-430. United States of America.
- Gardner, M. W., and Kendrick, J. B. 1921. Bacterial Spot of Tomato. *J. Agric. Res. (Washington, D. C.)*. 21: 123-156.
- Gardner, M. W., and Kendrick, J. B. 1923. Bacterial Spot of Tomato and Pepper. *Phytopathology* 13: 307-315. United States of America.
- Gitaitis, R. D., Sasser, M. J., Beaver, R. W., McInnes, T. B., and Stall, R. E. 1987. Pectolytic *Xanthomonads* in Mixed Infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and Pepper Transplants. *Phytopathology* 77: 611-615. United States of America.
- Gitaitis, R., McCarter, S., and Jones, J. 1992. Disease Control in Tomato Transplants produced in Georgia and Florida. *Plant Disease* 76: 651-656. United States of America.
- Goto, M. 1992. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press, Inc. San Diego, California, U.S.A. 343 pp.

- Jones, J. B., Pohronezny, K. L., Stall, R. E. and Jones, J. P. 1986. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on Tomato Crop Residues, Weeds, Seeds, and Volunteer Tomato Plants. *Phytopathology* 76: 430-434. United States of America.
- Jones, J. B., Woltz, S. S., Jones, J. P., and Portier, K. L. 1991. Populations Dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on Tomato Leaflets Treated with Copper Bactericides. *Phytopathology* 81: 714-719. United States of America.
- Jones, J. B. Minsavage, G. V., Stall, R. E., Kelly, R. O., and Bouzar, H. 1993. Genetic Analysis of a DNA Region Involved in Expression of Two Epitopes Associated with Lipopolysaccharide in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 83: 548-551. United States of America.
- Jones, J. B., Stall, R. E., Scott, J. W., Somodi, G. C. Bouzar, H., and Hodge, N. C. 1995. A Third Tomato Race of *Xanthomonas Campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease* 79: 395-398. United States of America.
- Kado, C. I., and Heskett, M. G. 1970. Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-976. United States of America.
- Kousik, C. S., and Ritchie, D. F. 1995. Isolation of Pepper Races 4 and 5 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Diseased Peppers in Southeastern U. S. Fields. *Plant Disease* 79:540. United States of America.
- Krieg, N. R., and Holt, J. G. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th Edition. Williams & Wilkins Co., Baltimore, United States of America. pp 199-209.
- Krupka, L. R., and Crossan, D. F. 1956. Overwintering and control of *Xanthomonas vesicatoria* (Abstr.) *Phytopathology* 46: 17-18. United States of America.
- Leben, C. 1963. Multiplication of *Xanthomonas vesicatoria* on Tomato Seedlings. *Phytopathology* 53: 778-781. United States of America.
- Leite, R. P., Jr., Jones, J. B., Somodi, G. C., Minsavage, G. V., and Stall, R. E. 1995. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Associated with Pepper and Tomato Seed By DNA Amplification. *Plant Disease* 79: 917-922. United States of America.

- Lewis, G. D., and Brown, D. H. 1961. Studies on the Overwintering of *Xanthomonas vesicatoria* in New Jersey. (Abstr.) *Phytopathology* 51: 577. United States of America.
- López, N. J. E. 1996. Bacterias de Importancia Cuarentenaria con su Rango de Hospedantes y su Principal Area de Inspección. Métodos de Diagnóstico de Bacterias de Importancia Cuarentenaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria "Dirección General de Sanidad Vegetal ". Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Capítulo V.
- Marco, G. M., and Stall, R. E. 1983. Control of Bacterial spot of Pepper initiated by Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in Sensitivity to Copper. *Plant Disease* 67: 779-781. United States of America.
- McGuire, R. G., Jones, J. B., and Sasser, M. 1986. Tween Media for the Semiselective Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Soil and Plant material. *Plant Disease* 70: 887-891. United States of America.
- McGuire, R. G., Jones, J. B., Stanley, D. C., and Csizinszky, A. A. 1991. Epiphytic Populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and Bacterial Spot of Tomato as Influenced by Nitrogen and Potassium Fertilization. *Phytopathology* 81: 656-660. United States of America.
- Morton, D. J. 1964. Detecting *Xanthomonas vesicatoria* in *Capsicum frutescens* Leaves by Bentonite Flocculation. *Phytopathology* 54: 1037. United States of America.
- Morton, D. J. 1965. Comparisons of Three Serological Procedures for Identifying *Xanthomonas vesicatoria* in Pepper Leaves. *Phytopathology* 55:421-424. United States of America.
- Neergaard, P. 1979. Seed Pathology. The MacMillan Press, London and Basingstoke, 146, 1187 p.
- O'Brien, L. M., Morton, D. J., Manning, W. J., and Scheetz, R. W. 1967. Serological Differences between Apparently Typical Pepper and Tomato Isolates of *Xanthomonas vesicatoria*. *Nature*. 215: 532-533 United States of America.
- Peterson, G. H. 1963. Survival of *Xanthomonas vesicatoria* in Soil and Diseased Tomato Plants. *Phytopathology* 53: 765-767. United States of America.

- Pohronezny, K., Stall, R. E., Canteros, B. I., Kegley, M., Datnoff, L. E., and Subramanya, R. 1992. Sudden Shift in the Prevalent Race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Pepper Fields in Southern Florida. *Plant Disease* 76:118-120. United States of America.
- Poplawsky, A. R. and Chun, W. 1995. Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with Atypical Pigmentation Isolated from Commercial Crucifer seeds. *Plant Disease* 79: 1021-1024. United States of America.
- Randhawa, P. 1996. Theory and Principals Seedborne Bacteria and their Detection. II Curso Internacional "Métodos Para la Detección de Patógenos en Semillas". 21-28 junio. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Rodríguez, M. M. L. 1991. Manual de Identificación de Bacterias Fitopatogenas. U. A. CH. 91 p. México.
- Schaad, N. W., and White, W. C. 1974. A Selective Medium for Soil Isolation and Enumeration of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology* 64: 876-880. United States of America.
- Schaad, N. W., and Kendrick, R. 1975. A Qualitative Method for Detecting *Xanthomonas campestris* in Crucifer Seed. *Phytopathology* 65: 1034-1036. United States of America.
- Schaad, N. W. 1976. Immunological comparison and characterization of Ribosomes of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology* 66: 770-776. United States of America.
- Schaad, N. W. 1992. Detection of Seedborne Bacterial Plant Pathogens. *Plant Disease* 66: 885-890. United States of America.
- Schaad, N. W. 1994. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd Edition. APS PRESS. Minnesota, USA. 176 p.
- Sijam, K., Chang, C. J., and Gitaitis, R. D. 1991. An Agar Medium for the Isolation and Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from Seed. *Phytopathology* 81: 831-834. United States of America.
- Stall, R. E., and Thayer, P. L. 1962. Streptomycin Resistance of the Bacterial Spot Pathogen and Control with Streptomycin. *Plant Disease Reporter*. 16: 389-392. United States of America.

- Stall, R. E., Hall, C. B., and Cook, A. A. 1972. Relationship of Ammonia to Necrosis of Pepper Leaf Tissue During Colonization by *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology* 62:882-886. United States of America.
- Timmer, L. W., Marois, J. J., and Achor, D. 1987. Growth and Survival of Xanthomonads Under Conditions Nonconducive to Disease Development. *Phytopathology* 77: 1341-1345. United States of America.
- Vakili, N. G. 1967. Importance of Wounds in Bacterial Spot (*Xanthomonas vesicatoria*) of Tomatoes in the Field. *Phytopathology* 57: 1099-1103. United States of America.
- Valadez, L. A. 1994. Producción de Hortalizas. 1a. Edición. UTEHA. pp.197-198. México, D. F.
- Wang, J. -F., Jones, J. B., Scott, J. W., and Stall, R. E. 1994. Several Genes in *Lycopersicon esculentum* Control Hypersensitivity to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 84:702-706. United States of America.
- Woltz, S. S., and Jones, J. P. 1979. Effects of Magnesium on Bacterial Spot of Pepper and Tomato and on the in Vitro Inhibition of *Xanthomonas vesicatoria* by Streptomycin. *Plant Disease* 63: 182-184. United States of America.