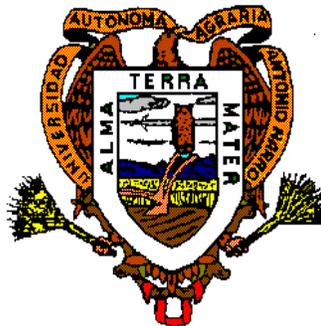


**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

DIVISION DE AGRONOMIA



**Identificación de los Agentes Causales del Pie Negro en
el Cultivo del Tabaco (Nicotiana tabacum L)**

Por:

MARIA GUADALUPE GONZALEZ HERNANDEZ

T E S I S

**Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Título de:**

Ingeniero Agrónomo Parasitólogo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Marzo del 2000

**A Dios le pedí fuerzas
para grandes logros
Me hizo débil
para aprender humildemente a obedecer**

**Pedí salud
para hacer cosas grandes
Me dio enfermedad
para poder hacer cosas buenas**

**Pedí riqueza
para poder ser feliz
Me dio pobreza
para poder ser sabio**

**Pedí poder
para obtener alabanzas
Me dio debilidad
para sentir la necesidad de Dios**

**Pedí todo
para poder disfrutar de la vida
Me concedió vida
para disfrutar de todo**

**No recibí nada
de lo que pedí
Pero si todo lo que necesitaba**

**A pesar de mí mismo
las peticiones que no hice
Me fueron concedidas.....**



Anónimo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
DIVISION DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**Identificación de los Agentes Causales del Pie Negro en el Cultivo del
Tabaco (Nicotiana tabacum L)**

Por:

MARIA GUADALUPE GONZALEZ HERNANDEZ

TESIS

**QUE SOMETE A CONSIDERACION DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:**

INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

APROBADO

M.C. MA. ELIZABETH GALINDO CEPEDA

M.C. JESUS GARCIA CAMARGO

M.C. MAGDALENA VALDEZ V.

M.C. REYNALDO ALONSO VELASCO.

MARZO DEL 2000

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
HIPOTESIS	3
REVISION DE LITERATURA	4
Origen y Distribución.....	4
Principales Países Productores de Tabaco	6
Clasificación Taxonómica	6
Clasificación Botánica	8
Raíz.....	8
Tallo.....	9
Hojas.....	9
Inflorescencia.....	10
Fruto.....	11
Semilla.....	11
Calidad y Composición Química del Tabaco.....	12
Condiciones Climáticas Y Edáficas	13

Condiciones Climáticas.....	13
Condiciones Edáficas.....	15
Patógenos Asociados al Cultivo.....	16
Clasificación Taxonómica.....	16
Características Morfológicas de los Zigomycetes.....	16
Características de la Familia <i>Choanephoraceae</i>	17
Características de la Especie <i>Choanephora cucurbitarum</i>	17
Especies Conocidas del Genero <i>Choanephora</i>	19
Control.....	19
<i>Xanthomonas campestris</i>- Pudrición negra.....	20
Características Morfológicas.....	20
Desarrollo de la Enfermedad.....	20
Síntomas.....	21
Control.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	22
Reactivos.....	23
Material Vegetativo.....	23
Sustrato.....	23
METODOLOGIA.....	24
Diluciones.....	26
Pruebas de Patogenicidad.....	27

Postulados de Koch.....	27
Determinación de la Concentración.....	28
RESULTADOS.....	29
<i>Choanephora</i>	30
<i>Xanthomonas campestris</i>	31
Otros Microorganismos.....	32
<i>Phytophthora sp</i>	32
<i>Phythium sp</i>	32
<i>Torula alli</i>	33
<i>Aspergillus niger</i>	33
<i>Hyalodendrom</i>	33
DISCUSION.....	34
CONCLUSIONES.....	36
APENDICE.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	38

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

J. Pilar González C.

Que gracias a su apoyo y esfuerzo hizo realidad sus sueños en mí, lo cual sin su ayuda no hubiera sido posible mi carrera como profesionista.

María Guadalupe Hernández M.

Que gracias a sus consejos forjo en mí motivos para seguir estudiando y por todos los sacrificios que ella paso para que así yo acabara con mi carrera.

A MI HERMANO:

Sergio

Para que también realice sus sueños como estudiante.

A MIS ABUELITOS:

Francisco (†)
María Asunción (†)

Filiberto (†)
María del Refugio

Por todos sus esfuerzos y sacrificios que realizaron para sacar a sus familias adelante y por esos grandes padres que tengo.

A mis tíos y tías:

Los cuales me dieron un gran ejemplo de trabajo, honestidad, dedicación y esfuerzo.

A mi tía Mary la cual me mostro gran afecto durante mi estancia con ella, ya que me brindo compañía y confianza.

A mis primos y primas, pero especialmente a Denisse y Eugenio los cuales son unos grandes niños.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a DIOS que me dio unos padres los cuales me brindaron una carrera.

A MI ALMA MATER:

Por que gracias a esta gran Institución he obtenido una valiosa carrera; por esas grandes oportunidades que me brindaste y por todo el tiempo que estuve aquí.....
MIL GRACIAS

M.C. MA. ELIZABETH GALINDO CEPEDA:

Por sus grandes consejos en este trabajo, por su grata compañía, y por todos los momentos los cuales fueron muy agradables.

M.C. MA. MAGDALENA RODRIGUEZ VALDEZ:

Por su colaboración en la revisión de este trabajo y por las anotaciones que eran convenientes en el mismo.

ING. M.C. JESUS GARCIA CAMARGO:

Por su paciencia para realizar la revisión del mismo.

A MIS MAESTROS DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA:

Los cuales gracias a su paciencia y dedicación reafirmaron en mi la curiosidad por saber más y realizar todo con honestidad.

ii

INTRODUCCION

Una de las características de México en la historia es que es un importante productor de tabaco (*Nicotiana tabacum*) este cultivo ocupa un lugar preponderante en la economía y política de las zonas dedicadas a la explotación.

Desde el momento mismo que los españoles desembarcaron en América descubrieron la curiosa costumbre en los nativos de aspirar el humo de un rollo de hojas que constantemente traían en la boca, costumbre que de inmediato se aficionaron por lo que adquirió una gran importancia y aceptación de todas las culturas que lo conocían y esto se reflejo en una distribución bastante rápida en el mundo; a través de los conquistadores de América. (Pérez y Castillo 1989)

En México tenemos como principales zonas productoras de tabaco, los estados de Nayarit que sobresale entre ellas que dedica una actividad del 88.5 % de su

población agrícola, sigue en importancia Veracruz con el 4.3 %, Chiapas con el 2.9 %, Jalisco con el 2.6 %, Sonora con el 1.1 % y Sinaloa con el 0.6 %.

(A.R.I.C 1995) .

En el municipio de Compostela Nayarit, (zona productora de tabaco), tiene una amplia actividad agrícola y la mayoría de los productores se dedican a la producción de tabaco, que es un cultivo bastante redituable, considerando el gran apoyo que recibe de la cigarrera (TADESA), que es la empresa encargada de supervisar, asesorar y sobre todo, de financiar todo el cultivo del agricultor, recuperando su inversión a través de la entrega de la cosecha ante un previo contrato contraído por ambas partes al inicio del cultivo.

Este cultivo se ve afectado en su rendimiento por diferentes enfermedades tales como el moho azul (*Peronospora tabacina*), el virus jaspeado del tabaco, pie negro (*Choanephora sp*), pero todavía es más grave cuando por descuido o efecto de las condiciones climáticas adversas se nos llega a dañar un plantero por el damping – off (secadera de plantas) que si no se llega a dar la atención debida y oportuna se puede perder la totalidad de la producción de plántula.

(Campos 1992)

Aun cuando no existe en México un termino adecuado que designe esta enfermedad en muchas regiones se llama ahogamiento, secadera o muerte rápida de plántulas. La enfermedad es ocasionada principalmente por hongos del suelo

perteneciente a los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium*, entre los principales; cuando esta enfermedad ataca se observan al principio fallas en la población reciente al extraer del suelo las semillas germinadas o plantulas marchitas se observa la pudrición de la semilla, de los embriones y del cuello, es decir, de la parte del tallo mas cercana a la superficie del suelo, presentándose en esta zona un estrangulamiento y la pudrición de tejidos. (Montes 1997)

Objetivo

- ✓ Identificar los agentes que causan el pie negro en plantulas del cultivo del tabaco.

- ✓ Identificar el agente causante del pie negro plantas del cultivo del tabaco

- ✓ Identificar los posibles microorganismos que se encuentran en el sustrato orgánico que se utiliza para la obtención de plántulas.

Hipótesis

- Se identificaran como agentes causales de la pudrición negra tanto en planta como en plantula a los hongos como: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*

- Al menos se aislara a la bacteria *Xanthomonas campestris* como agente causal del pie negro.

REVISION DE LITERATURA

Origen y Distribución

El tabaco es originario de América del Sur, tanto de las zonas tropicales y subtropicales; Como en estas regiones existen climas húmedos y secos, hay especies y variedades de tabaco que exigen ambientes húmedos y climas secos, según su procedencia. (Montes 1997)

El tabaco fue descubierto en 1492 a la llegada de Colón, a la tierra de los indios Arahucos, en las Antillas. La palabra tabaco procede de la voz Caribe tobacco, que se emplea para designar el tubo o pipa en la que fumaban los indígenas.

El mismo autor menciona que los aztecas, lo conocían con el nombre de “Yatl”, y lo utilizaban como narcótico, medicinal y hasta embriagante, este era uno de los tributos del imperio Azteca.

Los españoles y portugueses en el siglo XVI dispersaron las plantas de tabaco en otras tierras de América como Brasil, Cuba, Santo Domingo; llegando a Europa a mediados del mismo siglo. El mayor éxito del tabaco fue durante los siglos XVII y XVIII, y se convirtió en la gran moda y una panacea para más de una docena de enfermedades, por otra parte también fue y es utilizado como insecticida natural.

(Montes 1997)

Al generalizarse el hábito de fumar aumentó el comercio y exportación del tabaco, por lo que rápidamente se extendió este cultivo en Europa, Asia y África; Por lo cual los gobiernos empezaron a intervenir al grado de buscar el establecimiento con el fin de evitar las importaciones y de esta manera al cultivarlo enriquecer sus honorarios con impuestos. (Garner 1951)

En 1519 Hernán Cortés y sus acompañantes describen también el cultivo y consumo del tabaco en algunas partes de lo que actualmente son los Estados Unidos, México y América Central. (Pérez y Castillo 1989)

Cuando el almirante del mar del océano Don Cristóbal Colón consumió la proeza de desembarcar en la isla de Guanahani, a la que se le dio el nombre de San Salvador, descubriendo el mundo nuevo, él y los 119 que lo acompañaron, pudieron mirar un espectáculo nunca antes contemplado ya que los nativos de la isla sorbían fuego y arrojaban humo por la boca y nariz, como si tuvieran un incendio interior. (Zamora 1959)

El cultivo del tabaco en México, principio alrededor de 1536, extendiéndose después a Centro América . (CIBA GEYGI 1989)

Principales Países Productores de Tabaco

Países	Años	
	1988	1989
China	2,627	2,776
Estados Unidos	621	670
Brasil	419	462
India	359	445
Turquía	213	205
Italia	184	190
Indonesia	159	156
Zimbabwe	124	135
Grecia	135	128
Bulgaria	110	118
México (18º lugar)	49	69

Producción en miles de toneladas.

1989, World Tobacco Situation, U.S. Dep. Agric. Foreign Agric. Serv. Circ. Ser FT 12-89. 59 pp (Shew. y Lucas 1998)

Clasificación Taxonómica

Larrea (1978) nos proporciona la siguiente clasificación:

REINO ----- Plantae

DIVISION ----- Espermatofita

SUBDIVISION ----- Angiospermae

CLASE ----- Dicotiledoneas
ORDEN ----- Tubifloraceas
FAMILIA ----- Solanaceas
GENERO ----- *Nicotiana*
ESPECIE ----- *tabaco*

El genero *Nicotiana* fue clasificado por Linneo en 1753 incluyendo a solo dos especies *N. tabacum* y *N. rustica*. Existen muchas especies de tabaco en los cuales solo *tabacum* y *rustica* tiene importancia económica. La especie *tabacum* es la más cultivada y de ella existen diferentes variedades e híbridos. La especie *rustica* se cultiva principalmente en países de clima frío. (Campos 1992)

El tabaco pertenece a la familia de las solanaceas que comprende 85 géneros y más de dos mil especies muy difundidas por América, Africa, Australia y en menor grado Europa y Asia. (Chavez 1987)

Uno de los géneros que comprende la familia es el *Nicotiana*, el cual está clasificado en tres subgéneros, catorce secciones y sesenta y cinco especies; de estas, la que mayor interés presenta es la *Nicotiana tabacum*, a la pertenecen casi todas las variedades de tabacos cultivados en el mundo. (Zamora 1987)

Clasificación Botánica

En su crecimiento normal como la planta anual el tabaco es potencialmente un vegetal perenne, leñoso y parecido a un arbusto. (Akehurts 1973)

Según estudios es una planta herbácea, el sistema radical, fibroso y poco profundo a menudo ofrece un anclaje muy precario, pero voluminosa parte aérea de la planta; el tallo grueso; hojas aovadas, agudas, enteras, pubescentes, generalmente sentadas y muy grandes. (Akehurts 1973)

La inflorescencia terminal compleja, cáliz globuloso, corola en tubo ensanchado arriba, compuesta de cinco lóbulos regulares, cuya coloración varia de rojo a blanco, cinco estambres desiguales insertos sobre la corola. Ovario bilocular rodeado de un nectario anular. El fruto es una cápsula recubierta por el cáliz persistente conteniendo numerosas semillas reniformes, cuya superficie presenta relieves muy sinuosos. (Mela 1971)

Raíz

El tabaco tiene una raíz pivotante que generalmente pierde en las labores de transplante, por ello, desarrolla un sistema radicular fibroso, con mayor porcentaje de raicillas en los primeros 30 cm de suelo. El sistema radical, fibroso y poco profundo, a menudo ofrece un anclaje muy precario para la voluminosa parte aérea de la planta. (Tafoya 1989)

Tallo

El tallo es cilíndrico, herbáceo y suave en la parte superior de la planta, con abundante tejido secundario o madera en el inferior. El tallo y el follaje están cubiertos de una pubescencia viscosa, formada por pelos o tricomas de varias formas. Los más notables son los glandulares, que tienen una base larga y termina en una esferita de la que sale una sustancia pegajosa. Hay otros más cortos, sésiles y esféricos y otros ramificados. (León 1987)

El tallo, es fuerte, erecto, pubescente, pegajoso, ramificado cerca de su ápice y alcanza 2 m ó más de altura en su madurez; las ramas que se originan en la base cerca del suelo le pueden dar una apariencia arbustiva. (CIBA GEIGY 1989)

Hojas

Se ha reafirmado que las hojas son lanceoladas, alternas pecioladas y de gran tamaño. (García 1959)

Existe una variación en cuanto a la forma de la hoja y su tamaño, se presenta una uniformidad de distribución, forma y tamaño dentro de los tipos cultivados. Entre los primeros tipos la forma y el tamaño pueden variar considerablemente, pero no la distribución. Las características susceptibles de variar incluyen:

- Forma de la hoja.
- Angulo de la hoja con el tallo.
- Forma de la punta con la hoja.
- Unión de la hoja con el tallo: Peciolada o sésil.
- Estructura de esta unión.
- Asimetría de la hoja.

En el cultivo del tabaco *Nicotiana tabacum* las formas de las hojas son oblongolanceoladas son las más comunes y las hojas acostumbran a brotar del tallo principal. (Montes 1997)

Inflorescencia

Las flores son de 4 a 5 cm de largo, de pedicelo corto, bracteadas y se originan en racimos paniculados de flores múltiples, el cáliz es largo, con cinco segmentos lanceolados desiguales y ápices agudos, la corola es en forma de embudo y lanífero en su exterior, el limbo tiene cinco lóbulos y es de color rosado o rojo con cinco estambres. (Pérez y Castillo 1989)

La inflorescencia es un racimo terminal de hasta 150 flores. La longitud de la corola y el color varia dependiendo de la especie. Corola con cinco pétalos fusionados en un tubo alargado, terminando en cinco lóbulos que se abren en su extremo superior. Posee aproximadamente 4 % de polinización cruzada hecha por los insectos. (Pohelman 1986)

Se menciona que el fruto es una cápsula con dos cavidades que contienen de 2000 a 6000 semillas con dehiscencia septicida la semilla es ortótropa sumamente pequeña de color obscuro. (ETA INRA 1977)

Fruto

El fruto es una cápsula ovoide de dos divisiones de aproximadamente 2 cm de largo, que encierran numerosas semillas pequeñísimas, como polvo.

(Ochse et al. 1982)

Se menciona que es un fruto en cápsula con cubierta, con el cáliz persistente conteniendo numerosas semillas reniformes cuya superficie presenta relieves muy sinuosos. Cápsula ovoide, de dos divisiones y a veces cuatro. (Mela 1971)

Semilla

Cada planta de tabaco produce de 20 a 30 gr. de semilla, lo que significa muchos miles de semilla a sembrar, dado por su tamaño tan infinitesimal. Tan pequeñas son que miden 0.5 mm de diámetro y que en cada gramo entra aproximadamente 12000 semillas. (Tocagni 1983)

Aparte de ser inmensa productora de semilla de tabaco, son de vida larga y si se almacenan en condiciones apropiadas en un lugar frío y seco, pueden mantener su viabilidad por 15 ó 20 años. (Poehlman 1986)

Las semillas que las semillas son diminutas, aplanadas, de perfil ovoide y menos de un milímetro de largo. Su superficie es reticulada y de color castaño oscuro. Puede mantener su viabilidad por muchos años, cuando se almacenan adecuadamente. (SEP 1987)

Calidad y Composición Química del Tabaco

Los tabacos considerados de buen cuerpo tienen un alto contenido de azúcares, relativamente alto en nitrógeno total y en extracto de éter de petróleo y más bien bajo en ácidos y ceniza. (Akehurst 1973)

Se llegó a la conclusión de que hay que distinguir claramente entre la composición química del tabaco fermentado y la del humo mismo. Esta es la que al fumar afecta a las propiedades que aprecia el fumador. Se dice que la base en que

trabaja los laboratorios para analizar, y definir la calidad del tabaco son la composición química y la estructura física de la hoja y de los componentes químicos del humo que produce al arder. (Chavez 1987)

El contenido de nicotina y otros alcaloides es lo que caracteriza y diferencia el tabaco de otros productos vegetales. (Llanos 1974)

Condiciones Climáticas y Edáficas

Se menciona que el tabaco a pesar de que es una planta, de origen tropical se cultiva intensamente bajo las más variadas condiciones de clima y suelo.

(ETA INRA 1977)

Condiciones climáticas

Temperatura

Las temperaturas óptimas para el desarrollo del tabaco están entre 18 y 28 grados centígrados. Las temperaturas extremas para un crecimiento activo son 14 y 38 grados centígrados. (Montes 1997)

La temperatura ideal es de 24 a 27°c si es baja, los procesos metabólicos son lentos y las hojas no alcanzan el estado de maduración necesario para conseguir un buen aroma. (SEP 1987)

El rango óptimo es de 18 a 28°C, mencionando que una temperatura elevada favorece la germinación y el desarrollo de la planta así mismo estimula la absorción de los nutrientes del suelo. En cambio la temperatura baja provocaría la muerte de las yemas y disminuiría la actividad del torrente circulatorio hasta la parálisis absoluta, ocasionando la muerte. (ETA INRA 1977)

Humedad

La humedad y la precipitación influyen directamente en la calidad del tabaco. En efecto una fuerte humedad del ambiente da como resultado hojas livianas y finas.

Precipitaciones elevadas combinadas con una temperatura media elevada, dan hojas con poca nervadura.

Las zonas de gran sequedad y con fuerte luz inducen tabacos de hojas pequeñas, muy ricas en goma y nicotina. (I ICA 1989)

Se menciona que la humedad relativa a medida que disminuye se incrementa tanto la evaporación del suelo como la transpiración de la planta, disminuyendo así las reservas contenidas en la tierra e incrementándose el movimiento de la savia y por consiguiente el desarrollo vascular y la lignificación. (Mela 1971)

Condiciones edáficas

Las condiciones del suelo determinan el tipo y uso de hojas producidas son preferibles los suelos francos y franco arcilloso, profundos, fértiles, sueltos y que no se encharquen. (Tafoya 1989)

Se dice que entre los factores edáficos conviene considerar además de la textura física, el estado de agregación de las partículas, la composición química de la tierra y su microbiología.

La presencia de sales sodicas ocasionan fragilidad en las hojas y mala combustión. El tabaco exige suelos con alto contenido de potasio. El pH más apropiado es de neutro a ligeramente ácido para los tabacos de hoja clara y de neutro a ligeramente alcalino para tabaco de tipo oscuro. (Llanos 1984)

La humedad media del suelo más conveniente para el crecimiento de la planta es del 15 % y la temperatura mínima en la zona del suelo a nivel radicular es de 9°C, con el óptimo entre 24 y 35 °C. (Haartmann 1981)

Patógenos Asociados al Cultivo

Entre los principales patógenos que afectan al cultivo del tabaco se encuentran *Erwinia*, *Pythium*, *Fusarium*_etc.

Clasificación taxonómica

De acuerdo a Agrios 1989 ubica a el hongo *Choanephora* en las siguientes taxas:

Subdivisión Zygomycotina
Clase Zygomycetes
Orden Mucorales
Genero *Choanephora*

Características de la clase Zygomycetes

Los zygomycetes tienen micelio cenocítico desarrollado, la mayoría de los hongos son terrestres, algunos son saprofitos, otros son parásitos facultativos o débiles de plantas, hasta parásitos especializados de animales y parásitos obligados de algunos hongos. (Agrios 1989)

Los miembros de este orden tienen reproducción sexual por la unión de gametangios con la formación de una espore sexual de paredes gruesas llamadas cigosporas. Por lo general los gametangios son multinucleados y casi idénticos en

forma y tamaño, pueden provenir dos micelios distintos, lo cual quiere decir que hay especies heterotálicas. (De la Garza 1996)

Características de la familia *Choanephoraceae*

Los esporangios son producidos por algunas especies pero no por otras; los esporangiosporas o conidios, se encuentran en las terminales capitadas de las ramas de esporangioforo o conidioforo. La clasificación de acuerdo a Romero en 1988 es la siguiente:

A. Esporangio acompañado por esporangioforos o conidios.

- Esporangioforos presentes, conidios ausentes; esporangiosporas con estrías longitudinales *Blakeslea*
- Esporangioforos ausentes, conidios presentes; esporangiosporas sin estrías, conidios con estrías *Choanephora*

AA. Esporangios y esporangioforos ausentes; conidios presentes y

equinulados, no estriados*Cunninghamella*

Características de la especie *Choanephora cucurbitarum* (Currey 1873)

Las fructificaciones son de dos tipos: esporangios ocasionados sin columelas y cabezuelas pseudoconidiales sobre esporoforos dicótomos. Esporangiosporas lisas, con apéndices arbustivos en sus extremos y estriaciones longitudinales.

(Gilman 1973)

Las colonias son de color blanco a blanco grisáceo, con esporulación en zonas concéntricas, más tarde estériles. Esporangioforos simples, ensanchados gradualmente en su parte superior, a menudo doblados o circundados por debajo del esporangio hialino, oscureciéndose apicalmente, hasta 30 micras de diámetro. Esporangios esféricos o ligeramente aplanados, al principio blancos y finalmente negros, hasta 156 (120) micras de diámetro conteniendo pocas o muchas esporangias; pared esporangial persistente, coloreada, frangmentándose desde el ápice hasta la base en dos partes iguales.

El mismo autor menciona que las columelas son piriformes a globosas, con un cuello pequeño hasta 120 X 108 micras, por lo general más pequeño. Esporangiosporas con estrías.

Conidióforos hasta 30 micras de diámetro, 5 terminando en un vesícula primaria de la cual emergen vesículas secundarias sobre pedicelos cortos; vesículas secundarias produciendo pseudoconidios, los cuales son cafés, ovoide con estrías longitudinales y papila en uno de los extremos, 15 X 18 X 9 X 11.5

Clamidosporas presentes en algunas cepas, globosas a elipsoides-oblongas, algunas veces en cadenas; zigosporas entre suspensores iguales, café obscuras, 50-90 micras con glóbulo grande de aceite y paredes lisas. (Gilman 1963)

Especies más conocidas del genero *Choanephora* según Romero (1988)

- *Ch. Infundibulifera*: descubierta por Cunningham en la India, la cual ataca flores de *Hibiscus* (okra) y por Thaxter (1914) sobre flores del mismo hospedante en las Islas Occidentales y Sudamérica.
- *Ch. Simsoni*: Cunningham (1895) fue quien la colecto en India sobre *Ipomea* Y *Zinnia*.
- *Ch. cucurbitarum*: Thaxter (1903) lo observo en flores marchitas de *Hibicus*, *Cucumis*, *Gossypium*, *Capsicum* y *Cucurbita*.
- *Ch. persicaria*: descubierta por Eddy (1925), son especies muy parecida a la anterior, recientemente descubierta como la causante de un tipo de pudrición en durazno.

*** Control**

Actualmente los productos que se utilizan para controlar esta enfermedad a nivel de invernadero son:

- Sulfato de cobre
- Sulfato de estreptomicina

Comunicación personal con Ing. Jorge Luis Salazar

***Xanthomonas campestris* – Pudrición negra**

Características morfológicas:

Las bacterias tienen forma de bastones rectos, con dimensiones de 0.5 a 1.0 X 1.2 a 3 μm . Se desplazan por medio de un flagelo polar. Cuando se desarrolla en un medio de agar, a menudo son de un color amarillo. La mayoría de ellas crecen muy lentamente. Todas las especies son fitopatógenas y se encuentran solo en asociación con plantas o con órganos de estas. (Agrios 1989)

Desarrollo de la enfermedad:

Las bacterias de la pudrición negra invernan en los restos de plantas infectadas y en las semillas. En caso de que entren en contacto de alguna forma con los cotiledones de las hojas jóvenes, los infectan a través de los estomas, hidátodos o heridas y se propagan a través de ellos, intercelularmente, hasta que llegan a los extremos abiertos de los vasos externos, a los que invaden.

Dichas bacterias se reproducen posteriormente en los vasos y se propagan por ellos a través de toda la planta, llegando incluso a las semillas. Sin embargo, al mismo tiempo se produce la desintegración del xilema en determinadas zonas, de ahí que las bacterias se propagan por los espacios intercelulares del parenquima circundante. (De la Garza 1996)

En las infecciones de las hojas, las bacterias llegan a la superficie de ellas a través de hidátodos o heridas y son diseminadas posteriormente con el viento y las gotas de lluvia, o son llevadas por el equipo agrícola a otras hojas a las que

invaden a través de hidátodos heridas causadas por insectos. Cuando el clima es cálido húmedo, la infección se desarrolla con rapidez y los síntomas visibles de ella pueden aparecer al cabo de unas horas. (Agrios 1989)

Síntomas

La infección produce achaparramiento, crecimiento desigual y caída de hojas de la parte inferior de la planta. Los primeros síntomas aparecen en el campo en forma de grandes manchas cloróticas, con frecuencia en forma de V en los bordes de las hojas que avanza hasta la costilla de las hoja, mientras se produce ennegrecimiento de algunas nervaduras y venillas que se encuentran comprendidas dentro del área clorótica.

La zona afectada posteriormente se empardece y se seca, al mismo tiempo el manchado de las nervaduras avanza hasta el tallo y desde ahí hasta las demás hojas y raíces de la planta. (Agrios 1989)

Control

El control de la pudrición negra es difícil y depende del uso de semillas y transplantes libres de bacterias. Cultivados en suelos en los que dicha enfermedad no apareció en los dos o tres años anteriores.

Así la rotación de cultivo es necesaria. El tratamiento de semillas con agua caliente (a 50°C durante 30 minutos), asegura que las semillas estén libres de bacterias. (Agrios 1989)

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizo en el Laboratorio de Fitopatología, que pertenece al Departamento de Parasitología, el cual se ubica en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se utilizaron los siguientes materiales los cuales fueron facilitados por el mismo laboratorio:

- Cajas Petri de vidrio (10 cm) y plástico (9 cm)
- Mechero de alcohol y gas
- Pipetas (1mm y 10 mm)
- Matraces (1000 ml, 500 ml, 250 ml) y tubos de ensayo (15 cm y 10 cm)
- Asas y agujas.
- Porta y cubre objetos.
- Jeringas (2, 5, 10 ml)
- Cámara de flujo laminar.
- Cámara de transferencia.
- Papel estroza estéril.
- Agua destilada estéril.
- Alcohol
- Vasos de poliuretano del # 6
- Lampara

Reactivos

- Agar nutritivo (AN), Czapek, Papa dextrosa agar (PDA), Medios diferenciales (YDC, KB, D1, D3)
- Cristal violeta.
- Lugol.
- Safranina.
- Lactofenol.
- Hipoclorito de sodio al 3% y 4%
- Agua destilada.
- Alcohol-acetona

Material vegetativo

- Plantas y plántulas de tabaco *Nicotiana tabacum* L. Variedad RG 1444

Sustrato

- Sustrato vegetal (Peet moss) esterilizado y sin esterilizar.

METODOLOGIA

El material enfermo se colecto en Compostela, Nayarit, en los diferentes viveros para la producción de plántula de tabaco, así como de plantas enfermas en campo, el material se traslado al laboratorio de Parasitología hasta el momento de su procesamiento para la identificación de hongos y bacterias

Aislamiento de microorganismos del tejido vegetal:

- Se cortaron partes de la planta afectada en pequeños trozos de tallo y hoja.
- Después se enjuagaron con agua corriente, posteriormente se desinfectaran con hipoclorito de sodio al 3 % durante tres minutos en hoja y 4 minutos en tallo y por ultimo se lavaron con agua destilada durante el mismo tiempo que el anterior por dos ocasiones.
- Luego se colocaron sobre papel estroza estéril para que se secaran.
- Ya secas se siembran en cajas petri las cuales contienen ya el agar nutritivo y se sellan con Kleen-pack y se tuvieron a temperatura ambiente. Las observaciones se hicieron diariamente.

Identificación de hongos

Cuando los hongos tienen un crecimiento favorable se procede a realizar las laminillas de la siguiente forma: Se toma una pequeña muestra con una aguja y se coloca sobre el porta objetos, el cual deberá tener una gota de lactofenol y

después se le coloca el cubre objetos y se observa al microscopio. (Brock 1978)
Y con la ayuda de las claves de Barnett y Hunter en 1998 se procedió a su identificación.

Para la identificación de las bacterias se hizo de la siguiente manera:

- Se realizaron siembras de Peet moss sobre cajas petri las cuales contenían agar nutritivo. A las 24 horas de crecimiento colonial bacteriano, se sembró por diluciones y se realizó la tinción de Gram como se describe a continuación:
- Se toma una pequeña muestra de la bacteria y se coloca sobre el porta objeto sobre una gota de agua destilada, se procede a fijarla con calor bajo para obtener el frotis.
- Luego se pone una gota de cristal violeta durante un minuto y se enjuaga.
- Después de enjuagado se pone una gota de lugol durante $\frac{1}{2}$ minuto y se enjuaga.
- Se lava con alcohol - acetona y se le coloca un gota de safranina durante un minuto y se enjuaga.
- Se espera a que se seque y se observa al microscopio.
- De acuerdo a los resultados si las bacterias son fitopatógenas se siembran en medios diferenciales: KB, YDC, D1, D3 propuestos por Schaad (1995) para la identificación de los géneros.

Diluciones

Para poder realizar las diluciones se tubo que hacer antes una siembra de Peet-moss en agar nutritivo para hacer posible el crecimiento de bacterias y así lograr tener material para las diluciones.

Cuando las bacterias presentaron un cierto crecimiento se realizo la purificación de cada bacteria.

Cuando se presento crecimiento de la bacteria la cual ya habia estado purificada se toma una pequeña muestra de cada bacteria, las cuales difieren en color. Después de lo antes mencionado se realizo lo siguiente:

- Se realizan las diluciones en serie transfiriendo 1ml de las suspenciones de bacterias de un tubo a otro.
- Se vierten 0.5ml de cada dilución en cajas Petri.
- Y se esperaron los resultados.

Pruebas Rápidas de Patogenicidad

Estas pruebas se realizan de la siguiente forma:

- Se esterilizan cajas petri de vidrio, pipetas y tubo de ensaye con agua estéril.
- Se colocaron rodajas de papa y cebolla dentro de las cajas petri las cuales tendrán papel filtro para mantener la humedad.
- Se realizo una dilución con las bacterias que ya han sido observadas como fitopatógenas en agua estéril.
- Se agrego 0.1 ml de dicha solución en las rodajas.
- Se espera a que presente los síntomas representativos.

Postulados de Koch

La inoculación de los hongos y bacterias en las plantulas fue de la siguiente forma:

- Se tomo una muestra de cada una de las bacterias y hongos y se hará una dilución en 10 ml en tubo de ensaye, y se agita bien.
- Después se toma un ml de la muestra anterior en una jeringa y se inoculara a la plantula de la siguiente forma: por punción, esqueje y a nivel de raíz de cada uno de los patógenos.

Determinación de concentración de cada uno de los patógenos:

Para la obtención de estos resultados se realizó el conteo con la ayuda de hematócmetro y después se aplicó la siguiente fórmula:

☺ Número de celdas por milímetro cúbico:

Número de celdas contadas por milímetro X Dilución (si uso) X 10

☺ Número de celdas por milímetro:

Numero de celdas contadas por milímetro X Dilución (si uso) X 10 000

Los resultados fueron los siguientes:

✓ *Xanthomonas*: 6.6×10^6

✓ *Choanephora*: 8×10^5

◆ REFERENCIA: HAUSSER SCIENTIFIC COMPANY

RESULTADOS

Los hongos que fueron aislados de planta y plántula de tabaco con las técnicas antes descritas fueron los siguientes:

HONGOS	TIPO DE PARASITISMO
<i>Choanephora cucurbitarum</i>	Parásito facultativo
<i>Phytophthora sp</i>	Parásito obligado
<i>Pythium sp</i>	Parásito obligado
<i>Torula alli</i>	Saprófito
<i>Aspergillus niger</i>	Parásito facultativo
<i>Hyalodendrom sp</i>	Saprófito

BACTERIA	TIPO DE PARASITISMO
<i>Xanthomonas campestris</i>	Parásito obligado

El cultivo de tabaco ha sido actualmente atacado por el hongo *Choanephora spp* el origen de este problema tiene lugar en Compostela Nayarit, ya que desde hace dos temporadas se obtienen plantulas a nivel vivero y anteriormente la producción era en campo abierto y con una gran aplicación de fungicidas. La literatura cita que este hongo causa la pudrición blanda en calabaza y a su vez marchita la flor.

◆ Comunicación personal

Las plantas traídas del lugar antes mencionado, presentaban síntomas tanto en hoja como en tallo. En el tallo se presenta una pudrición, que tiene una apariencia aguanosa. La hoja a su vez presenta un amarillamiento y las nervaduras de las mismas tenían una coloración café; presentando esporulación. A nivel de laboratorio por medio de los Postulados de Koch en las plántulas de tabaco se presentaron los siguientes síntomas:

* Amarillamiento en las hojas.

* Los tallos presentaron una pudrición color café y a medida que el hongo se va desarrollando en la planta, esta decae y por ultimo muere.

Con esto se comprueba que este hongo *Choanephora*, ataca al tabaco, ya que los síntomas que se presentaron por primera vez la planta, de tabaco fueron posteriormente obtenidos por medio de los Postulados de Koch en plántulas de la planta antes dicha . Fig 1

◆ Ing. Jorge Luis Salazar.

La bacteria *Xanthomonas campestris* se conoce por todo el mundo y es bien sabido que a este patógeno ataca a cualquier edad que tenga la planta y principalmente daña a los órganos aéreos.

En las plantas se muestra manchas cloróticas, la cuales tiene la característica que están en forma de V en los borde de las hojas, esta lesión avanza hasta la costilla de la hoja. Las nervaduras se observan ennegrecidas.

El aislamiento de esta bacteria se obtuvo a partir del Peet-moss con el método ya antes mencionado, se purifico dicha bacteria y se inoculo a plántulas de tabaco, las cuales presentaron los siguientes síntomas:

- ✎ Manchas cloróticas en las hojas.
- ✎ Ennegrecimiento de las nervaduras, el cual se desplaza hacia el tallo.
- ✎ Pudrición total del tallo
- ✎ Daño en forma de V en las hojas

De esta forma se los síntomas antes descritos fueron similares a los ya mencionados, lo cual hace constatar que la bacteria *Xanthomonas campestris* esta presente en el sustrato orgánico y por lo cual este infecta a la plantula de tabaco desde el vivero.

Otros microorganismos

Phytophthora sp

Cuando se aislo por primera vez, este hongo presento micelio cenocitico y hialino. Este hongo inverna en forma de oosporas, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado.

Es un Oomyceto con micelio cenocitico, que produce esporangioforos de crecimiento indeterminado. (Agrios 1985)

Pythium sp

Este hongo se encuentra ampliamente distribuidos en los suelos y el agua de todo el mundo. Viven como organismos saprófitos sobre los restos de plantas y animales muertos, o bien como parásitos débiles atacando las raíces fibrosas de las plantas. (Agrios 1985)

Pythium pertenece a la clase Oomycetes, orden Peronosporales; tienen micelio blanquecino, delgado y sin septos.

El cigoto el cual es formado en la reproducción sexual se transforma en una oospora resistente a condiciones adversas y de esta forma los hongos invernan.

(De la Garza 1996)

Torula alli

Este hongo fue aislado de plántulas de tabaco y la literatura reporta que esta especie no tiene ninguna importancia fitoparásita ya que es saprófito común e invasor secundario. Este hongo se caracteriza por las cadenas simples o ramificadas de conidios oscuros, que se rompen con facilidad y que surgen mas o menos directamente de las hifas vegetativas. (CIMMYT)

Aspergillus niger

La especie de *Aspergillus* se reconoce por su producción de cabezas de esporas compactas y esféricas, este hongo actúa como parásito facultativo ya que vive en el suelo y produce grandes cantidades de esporas que son esparcidas por el viento muy fácilmente. (CIMMYT)

Hyalodendrom sp

El micelio es de color blanco, presenta pequeños racimos de conidias con abundantes cadenas. Este hongo se encuentra en el suelo como saprofito o parásito y es uno de los principales contaminantes en el laboratorio.

(Barnett y Hunter 1998)

DISCUSION

De acuerdo a los resultados en los trabajos de aislamiento y purificación se observaron conidias las cuales presentan una forma oval, estas a su vez presentan estrías. Estas conidias son hialinas; esto coincide con lo descrito por Romero en 1988 el cual menciona que el hongo *Choanephora* presenta esporangioforos, y hay presencia de conidios la cuales presentan estrías

En el aislamiento del hongo, las colonias presentaron un color blanco, y las conidias y los esporangios se presentan de un color hialino; Gilman en 1963 cita que las colonias de este hongo son blancas, con esporulación en zonas concéntricas, que mas tarde son estériles y menciona que el hongo que presenta estas características es *Choanephora*; en las siembras del patógeno se observaron estas características.

Agrios en 1995 cita que *Choanephora* ataca a los órganos florales marchitos y que a partir de ellas invade a toda la planta. Los síntomas que presentaron las plantas al ser inoculadas fueron pudrición en tallo y hoja, y esto le ocasiona a la planta la muerte.

La bacteria aislada se presento en forma de bastón, la cual es gram negativa estos datos se obtuvieron por medio de la Tinción de Gram y el genero *Xanthomonas* se obtuvo al existir un crecimiento en YDC el cual tenia una

coloración amarillo intenso y de consistencia mucilagenosa, esto concuerda con lo que cita Schaad 1995 y de la Garza 1996 que además mencionan que este pigmento es insoluble en agua. Además, en la prueba rápidas de patogenicidad se observa una pudrición de las rodajas de la cebolla y esto es lo que Sosa en 1997 señala que se debe observar al inocular bacterias de este genero.

En el caso de plántulas estas presentaron manchas clóroticas en forma de V en el borde de las hojas; esto lo reporta Agrios en 1995, quien además menciona que la bacteria causa pudrición la cual se va desplazando hacia el tallo hasta llegar a las raíces y ocasionar la muerte de la planta.

CONCLUSIONES

Basándose en los resultados obtenidos en el trabajo de aislamiento y purificación y de acuerdo a los objetivos establecidos en el presente trabajo, se concluye lo siguiente:

El agente causal que ocasiona la pudrición negra en plántula así como también en plantas de tabaco fue el siguiente hongo *Choanephora cucurbitarum*.

Se determino que en el sustrato se encuentran microorganismos, los cuales causan deterioro en las plantulas sanas del tabaco; siendo una bacteria, la cual pertenece al genero *Xanthomonas campestris*.

BIBLIOGRAFIA

Agrios, N. G. 1989 . Fitopatología. LIMUSA. 2ª. ed. México, D. F.

743 pag.

Asociación Rural de Interés Colectivo A.R.I.C. 1995 General Esteban Baca

Calderón, 32 pag

Akehurst , B. C. 1973 . El tabaco. LABOR. Barcelona, España.

682 pag

Barnett H.L., Barry B. Hunter.1998.Illustrated genera of imperfect fungi. Macmillan

Publisnig Company. 4TH ed. U.S.A. 218 pag

Brock T.D. 1978 Biología de los microorganismos. Omega.

Barcelona. 563 pag.

Campos C.S. 1992 El cultivo del tabaco Nicotiana tabacum L. en

Alamo , Veracruz. Monografía. UAAAN. Buenavista Saltillo Coahuila

México.86 pag

CIBA GEYGI 1989 . Manual de Protección de Plantas. 2ª ed. México D.F

CIMMYT. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de Laboratorio.

México. D.F. 84 pag.

Chaves, Z. A. 1987 .El Cultivo del Tabaco en el Estado de Nayarit. Monografía.

UAAAN. Buenavista Saltillo Coahuila. 73 pag

De la Garza, J.L. 1996. Fitopatología General. Universidad Autonoma de Nuevo

León. 515 pag.

ETA INRA , 1977 Normas Técnicas para el Cultivo del Tabaco Negro. 2ª ed.

Cuba. Editorial Ciencia y Técnica. 127pag

García, F.J. 1959 El Arroz, el Algodonero, el Tabaco. España. Edición

COSSAT, S.A. PP. 121- 168 p

Garner, W.W. 1951 . The Production of Tabaco. 2ND ed. U.S.A. Editorial.

The Maple Press Company. 520 pag.

Hartmann, R.E. 1981 . Propagación de Plantas; Principios y Practicas. México.

Editorial CECSA. 277 pag

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA 1989

Compendio de Agronomía Tropical. IICA. Costa Rica. 693 pag

Larrea, R.E. 1978 . Tabaco, Recursos Genéticos Disponibles a México. Sociedad Mexicana de Fitogenética. UACH.

León, J. 1987 . Botánica de los Cultivos Tropicales. IICA. San José Costa Rica.
441 pag

Llanos, C.M. 1984 . El Tabaco: Manual Técnico para el Cultivo y el Curado.
Editorial Mundi- Prensa. España. 307 pag

Mela, M.D. 1971. Cultivos de Regadío. AGROCIENCIA. Zaragoza. España. 605
Pag

Montes A. A., (1997) Producción de plantulas de tabaco *Nicotiana tabacum*
L. Cvr. (Burley), sobre tres diferentes sustratos y el control de Damping-
M. off bajo condiciones de invernadero. Tesis. UAAAN. Buenavista
Saltillo Coahuila México. 63 pag

Ochse , J.J. Soule J.R.; M.J. Drjkmán, M.J. 1982 . Cultivo Mejoramiento de
Plantas Tropicales Y Subtropicales. Limusa. México. 1455 pag

Pérez R.J. y Castillo Z.A.,1989 . El cultivo del tabaco en San Andrés Tuxtlas,
Veracruz. CIBA GEYGI. México. 81 pag

Pohelman, M.J. 1986. Mejoramiento Genético de las Cosechas. Primera Edición, Novena Reimpresión. Editorial. Limusa. México. D. F. 225-242 p.

Schaad, N.W. 1990. Laboratory guide for Identification of plant Pathogenic Bacteria. 2nd ed. APS PRESS. U.S.A. 164 pag.

SEP 1987 . Cultivos de Plantación. Trillas. México, D.F. 121 pag

Shew H. D. y Lucas G.B. 1998 Compendium of Tobacco Diseases. APS Press. 2ND ed USA. 68 pag

Romero C.S. 1988 Hongos Fitopatógenos. Imprenta Universitaria Chapingo, Primera reimpresión 1993, México D.F. 347 pag

Tafoya, R. E. 1989 . Estudio Sobre Virus del Mosaico del Tabaco. Monografía. U.A.A.A.N. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. 85 pag

Tocagni, H, 1983 . El Tabaco. 2^a ed. Argentina. Editorial Albatros 98 pag

Zamora, de la F 1959 . El tabaco y su Cultivo. SUMMA AGRIS. México. 318 pag

