

PRODUCCION DE ANTISUERO CONTRA *Acidovorax*
avenae pv. *citulli* Y SU DETECCION EN LA
COMARCA LAGUNERA

EDGAR OMAR RUEDA PUENTE

TESIS

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



BIBLIOTECA
EGIDIO G. REBONATO
BANCO DE TESIS
U.A.A.A.N.



Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.

DICIEMBRE DE 1998

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

PRODUCCION DE ANTISUERO CONTRA *Acidovorax avenae pv citrulli*
Y SU DETECCION EN LA COMARCA LAGUNERA.

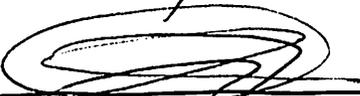
EDGAR OMAR RUEDA PUENTE

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

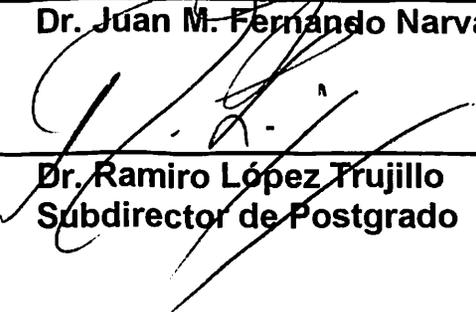
COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal: 
M.C Abiel Sánchez Arizpe

Asesor: 
M.C Jesús García Camargo

Asesor: 
M.C Alberto Flores Olivas

Asesor: 
Dr. Juan M. Fernando Narvárez Melo


Dr. Ramiro López Trujillo
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Diciembre de 1988.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", en especial al Departamento de Parasitología Agrícola por haber hecho realidad un deseo más de superación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme los recursos para lograr y llevar con buen fin mis estudios de Postgrado.

Al M.C. Abiel Sánchez Arizpe por su colaboración en este trabajo y disponibilidad en mi formación como Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola, por su muy valiosa amistad dentro y fuera de las aulas; así como por su profesionalismo calificado en todos los aspectos.

Al M.C. Jesús García Camargo por su valiosa amistad y colaboración desinteresada en este trabajo y en muchos otros que durante los estudios de Postgrado tuvimos la oportunidad de llevar a cabo.

Al Dr. Narvárez Melo por su valiosa participación y apoyo brindado en el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", en especial al Departamento de Parasitología Agrícola por haber hecho realidad un deseo más de superación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme los recursos para lograr y llevar con buen fin mis estudios de Postgrado.

Al M.C. Abiel Sánchez Arizpe por su colaboración en este trabajo y disponibilidad en mi formación como Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola, por su muy valiosa amistad dentro y fuera de las aulas; así como por su profesionalismo calificado en todos los aspectos.

Al M.C. Jesús García Camargo por su valiosa amistad y colaboración desinteresada en este trabajo y en muchos otros que durante los estudios de Postgrado tuvimos la oportunidad de llevar a cabo.

Al Dr. Narvárez Melo por su valiosa participación y apoyo brindado en el desarrollo del presente trabajo.

Al M.C Flores Olivas por disponibilidad y apoyo en la realización de este trabajo así como por su amistad.

Al Dr. Jerónimo Landeros, Dr. Manuel Rosas, Dr. Randhawa y Dr. Sotula por su desinteresada colaboración en la realización del presente trabajo.

A la Sra. Rosalinda Nieto, por su valiosa amistad.

A mis compañeros, amigos Profesores y estudiantes de la Maestría:
Julieta Retiz, Claudia Ramos, Jaime Gómez, Hector Vega, Gustavo Adolfo, Hector Hdez., Bernardo Gómez, Jaime Olguin, Raúl Santibáñez, Sergio Rodríguez, Elizabeth Galindo y Sergio René Sánchez.

DEDICATORIA

A Dios:

A quién más sino El, quien permite estar en el presente y la realización de cada uno de los deseos que anhelamos en el caminar de la vida.

Por El y para El.

Gracias Señor Nuestro.

A mis Padres:

Gilberto Rueda de León.

Ejemplo vital del todo un Amigo, Compañero y sobre todo

Un Gran Padre.

Bertha Gloria Puente de Rueda.

A Tí que has dado parte de tu vida por uno y has sabido ser ejemplo de Una Gran Madre.

A Ti, que has fincado Una Gran familia.

A mis hermanos:

Dulce María,

Priscila Berenice,

Gloria Cecilia,

Indra Aracely,

Jorge Erick.

Deseándoles lo mejor de la vida

A mis Abuelos y Tios:

Darío Rueda

Leonor Jackes (+)

Ismael Rueda (+)

Javier Rueda (+)

Guadalupe Zapata y Familia

Margarita Zapata y Familia

Luz María Zapata y Familia

Ambrosio Zapata y Familia

COMPENDIO

**PRODUCCION DE ANTISUERO CONTRA *Acidovorax avenae* pv *citrulli* Y
SU DETECCION EN LA COMARCA LAGUNERA**

POR

EDGAR OMAR RUEDA PUENTE

MAESTRÍA

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. NOVIEMBRE DE 1998

M.C. Abiel Sánchez Arizpe - Asesor-

Palabras claves: *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*, Anticuerpo.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila; en el periodo de junio de 1997 a diciembre de 1998, cuyo objetivo fue, la producción de antisuero contra *Acidovorax avenae* pv *citrulli* y su detección en la Comarca Lagunera mediante la obtención de muestras vegetativas de semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto de sandía.

Se determinó que mediante pruebas de patogenicidad y el método de detección ELISA el microorganismo para la producción de antisuero fue *Acidovorax avenae pv citrulli*. Se incrementó suficiente inóculo y se probaron tres esquemas de inmunización de los cuales sólo uno dio como resultado un alto contenido de anticuerpos. Por otro lado se colectaron muestras vegetativas de semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto de sandía en la Comarca lagunera, lográndose muestrear 105 ha. Después se analizaron las muestras para detectar *A.a. pv citrulli* mediante medios específicos de Randhawa, método ELISA y antisuero producido y por último confirmándose con pruebas de patogenicidad, resultando negativa la presencia de *A. a. pv. citrulli* en la Comarca lagunera.

ABSTRACT

**PRODUCTION OF ANTIBODY FOR *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* AND ITS
DETECTION ON COMARCA LAGUNERA**

BY

EDGAR OMAR RUEDA PUENTE

MASTER OF SCIENCE

**AGRICULTURAL
PARASITOLOGY**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. NOVIEMBRE 1998.

M.C. Abiel Sánchez Arizpe -Advisor-

Keys words: *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*, antibody.

This research work was carried out in the laboratory at the Department of Parasitology of the Universidad Agraria Antonio Narro in Saltillo, Coahuila; from June 1995 to December 1996. The objective was the production of antibodies from the bacterium *Acidovorax avenae* pv *citrulli* and its detection at the Comarca Lagunera, from watermelon seed, seedling, developed leaves and fruit samples.

Using pathogenicity tests and the ELISA detection method, the microorganism used for antibody production was identified as *Acidivorax avenae* pv *citrulli*. The

inoculum was produced, and three immunization methods were tested; only one out of the three methods gave as result a large amount of antibodies. On the other hand, we collected samples of seed, seedling, leaves and fruits of watermelon at the Comarca Lagunera, from an area of 105 ha. Samples were analized to detect *A.a pv citrulli* using differential media from Randhawa, the ELISA method and the produced antibodies; pathogenicity tests were conducted; the bacterium *A. a pv citrulli* was not detected at the Comarca Lagunera.

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.	Pág.
2.1. Características de <i>Acidovorax avenae</i> . Género-especie.....	38
Cuadro No.	
2.2. Características de <i>Acidovorax avenae pv. citrulli</i> . Género-especie-patovar.....	39
Cuadro No.	
3.1. Esquema de inmunización número 1.....	53
Cuadro No.	
3.2. Esquema de inmunización número 2.....	53
Cuadro No.	
3.3. Esquema de inmunización número 3.....	54
Cuadro No.	
3.4. Prueba de titulación.....	56
Cuadro No.	
3.5. Superficie cultivable de sandía en la Comarca Lagunera.....	60
Cuadro No.	
4.1. Esquema de inmunización número 3.....	72
Cuadro No.	
4.2. Presencia de <i>Acidovorax avenae pv. citrulli</i> en semilla donada por productores de la Comarca Lagunera.....	75

Cuadro No.	Pág.
4.3. Comunidades ejidales y hectareaje muestreado en la Comarca Lagunera de plántula, hoja y fruto, para detección de <i>Acidovorax avenae pv. citrulli</i>.....	79

Cuadro No.	
4.4. Presencia de <i>Acidovorax avenae pv. citrulli</i> en plántula, hoja y frutos muestreados en lotes de la Comarca Lagunera.....	80

INDICE DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	7
Identificación de bacterias fitopatógenas.....	11
Serología.....	13
Determinantes antigénicos.....	16
Reacción Antígeno-Anticuerpo.....	19
Inmunización y producción de anticuerpos.....	21
Vías de inmunización.....	23
Producción de antisuero.....	23
Técnicas de inmunización.....	24
Pruebas de precipitación.....	25
Prueba del anillo de interfase.....	25
Prueba de precipitación líquida en tubos.....	26
Prueba de microprecipitación.....	26
Pruebas de difusión en gel.....	26
Inmunodifusión simple.....	27
Inmunodifusión doble.....	27
Inmunoelectroforésis.....	29
Pruebas de aglutinación.....	29
Aglutinación pasiva.....	30
Prueba de látex.....	30
Prueba de neutralización.....	30
Pruebas inmunológicas con marcadores.....	31
Inmonofluorescencia.....	31
Radioinmonología.....	31
ELISA.....	32
Inmunomicroscopía electrónica.....	32
Cronología de la mancha bacteriana del fruto.....	34
Ubicación taxonómica del agente causal de la mancha bacteriana del fruto de sandía.....	36
Etiología.....	37
Sintomatología.....	40
Epifitología.....	42
Hospederos.....	43
Manejo.....	43
Control legal.....	44
Control cultural.....	44
Control químico.....	45
Control genético.....	46
MATERIALES Y METODOS.....	47

Producción de Antisero para <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i>	47
Preparación del antígeno.....	48
Pruebas de patogenicidad.....	48
Confirmación de <i>A.a.</i> pv. <i>citrulli</i> mediante la técnica	
ELISA.....	49
Incremento del Microorganismo <i>A. a.</i> pv. <i>citrulli</i>	49
Preparación del Animal de Sangre Caliente.....	50
Obtención de suero normal.....	50
Plan de Inmunización.....	52
Titulación.....	54
Inyección del recuerdo.....	56
Almacenamiento del antisero.....	57
La Región Laguna.....	57
Características del clima.....	58
Obtención de semilla de sandía de importación que se siembra	
en la Región Lagunera.....	61
Obtención de la semilla.....	61
Muestreo en la Comarca Lagunera.....	61
Conservación de muestras.....	63
Detección de <i>A.a.</i> pv. <i>citrulli</i> en semilla, plántula, hoja y fruto de	
sandía sobre medios específicos.....	63
Análisis de semilla en medios específicos.....	63
Análisis de plántula, hoja y fruto en medios de cultivo	
específicos.....	65
Detección de <i>A.a.</i> pv. <i>citrulli</i> en semilla, plántula, hoja, y fruto con	
el Antisero producido.....	65
Aglutinación en portaobjeto.....	66
Detección de <i>A.a.</i> pv. <i>citrulli</i> en semilla, plántula, hoja y fruto por	
la técnica ELISA.....	66
Semilla.....	66
Plántula, hoja y fruto.....	67
Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas con los diferentes	
métodos de detección (Medios específicos, ELISA y Antisero	
producido).....	67
RESULTADOS Y DISCUSION.....	69
Producción de Antisero para <i>A.a.</i> pv. <i>citrulli</i>	69
Obtención de la cepa bacteriana.....	69
Confirmación del patógeno.....	69
Producción de antisero.....	72
Detección de la mancha bacteriana del fruto en la Comarca	
Lagunera.....	74
Obtención de semilla de importación dirigida a la Comarca	
Lagunera.....	74
Diagnóstico fitopatológico de semilla mediante la	
técnica Randhawa.....	74
Diagnóstico fitopatológico de semilla mediante la	
técnica ELISA.....	75

Diagnóstico fitopatológico de semilla mediante el antisuero producido.....	77
Muestreo de plántula, hojas y frutos en lotes de sandía de la Comarca Lagunera.....	78
Análisis fitopatológicos de órganos vegetativos muestreados en la Comarca Lagunera.....	80
Pruebas de patogenicidad a bacterias obtenidas como positivas para <i>A. a. pv. citrulli</i> mediante los tres diferentes métodos de detección.....	82
CONCLUSIONES.....	83
RESUMEN.....	84
LITERATURA CITADA.....	87

COMPENDIO

**PRODUCCION DE ANTISUERO CONTRA *Acidovorax avenae pv citrulli* Y
SU DETECCION EN LA COMARCA LAGUNERA**

POR

EDGAR OMAR RUEDA PUENTE

MAESTRÍA

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. NOVIEMBRE DE 1998

M.C. Abiel Sánchez Arizpe - Asesor-

Palabras claves: *Acidovorax avenae pv. citrulli*, Anticuerpo.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila; en el periodo de junio de 1995 a diciembre de 1996, cuyo objetivo fue, la producción de antisuero contra *Acidovorax avenae pv citrulli* y su detección en la Comarca Lagunera mediante la obtención de muestras vegetativas de semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto de sandía.

INTRODUCCION

La Economía agrícola a nivel mundial en los últimos años se ha visto afectada, esto es debido en gran parte a problemas fitosanitarios causados por agentes de diversa índole, en los cuales figuran principalmente hongos, bacterias, nemátodos, malezas e insectos.

Al presentarse un cambio radical dentro del comercio internacional, con el movimiento de material vegetativo y siembras de estos productos vegetales, las plagas están dispersándose por todo el mundo, volviéndose un problema un tanto más complejo, debido a la rapidez con que en la actualidad se transportan, a las grandes cantidades de material vegetal que se movilizan y a que en algunos casos pueden ser portadores de agentes nocivos.

Todos los aspectos negativos antes citados, han originado pérdidas y grandes trastornos en algunas regiones a la agricultura nacional, aún cuando se hayan hecho esfuerzos, en primera instancia para medir su introducción y en segunda para impedir su dispersión a partir de fuentes de inóculo primario, por lo que es conveniente contar con las medidas necesarias para evitar el

ingreso primeramente y en segunda el control y dispersión de estos agentes biológicos nocivos a las plantas.

Acidovorax avenae pv. *citrulli* es una bacteria que produce la putrefacción del fruto de la sandía, ésta apareció por primera vez en los Estados Unidos de América en 1989 en los campos de sandía comercial de Florida, la cual se presentó posteriormente en Carolina del Sur, Carolina del Norte, Maryland, Delaware e Indiana, Alabama, Arkansas, California, Iowa, Mississippi, Missouri, Oklahoma, Texas y Georgia a partir de 1992; causando pérdidas de un 90% de fruta comercializable. Sin embargo, tal enfermedad no radica únicamente en el daño producido al fruto, sino que también tiene la capacidad de diseminarse por semilla, de ahí la importancia de que si algún país importa semilla de sandía de esas áreas debe de tener métodos de diagnóstico con una sensibilidad capaz de detectar al organismo (Fahy y Persley, 1983; Hopkins, *et al*, 1992).

En la República Mexicana el cultivo de sandía *Citrullus vulgaris*, la superficie ha aumentado considerablemente en los últimos años, y debido a que México no produce su propia semilla obliga a que los productores a adquirir semilla de origen extranjero, principalmente de Estados Unidos, ya que las variedades y/o híbridos adquiridos producen frutos que rinden las características preferidas por el consumidor, originando además, que los

grandes volúmenes de semilla que ingresan al país sea una puerta de entrada para *Acidovorax avenae pv. citrulli* y otros más de importancia cuarentenaria.

México como todo país dicta sus leyes, reglamentos, cuarentenas y otras disposiciones basándose en el principio que cada gobierno tiene el derecho y la responsabilidad de no sólo proteger la salud de su pueblo, sino también la de los múltiples cultivos que proveen alimento y abrigo para sus conciudadanos.

La Dirección General de Sanidad Vegetal, autoridad encargada de vigilar la importación de productos y subproductos de origen vegetal por parte del Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario realiza un diagnóstico fitosanitario a muestras vegetativas de importación.

Para el agente causal de la Mancha Bacteriana del Fruto de Sandía *Acidovorax avenae pv. citrulli* la caracterización del patógeno lo lleva mediante el Método Convencional "Pruebas Bioquímicas", el cual en la actualidad comparado con el Serológico "Antígeno-Anticuerpo" no presenta los requisitos de un método de diagnóstico para fines cuarentenarios como son sensibilidad y repetibilidad principalmente, no obstante, aún cuando también realice el serológico este le es incosteable debido a lo caro que resulta el adquirir este tipo de antisueros en casas comerciales.

Por lo que resulta, pues, de gran importancia la producción de un antisuero contra *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*.

Por otra parte la importancia de la sandía en México radica en los remunerativos del cultivo, debido a la gran aceptación que tiene el fruto en el mercado por su excelente calidad con que se produce. Además de ser una cucurbita de importancia tanto alimenticia económica y social es una fuente inagotable de recursos, pudiendo ser aprovechada su pulpa, principalmente por ser jugosa carnosas y refrescantes, así como también para extraer aceite de su semilla y/o utilizarse para alimentar ganado bovino, porcino y caballar (Reche, 1988).

El cultivo a nivel nacional ocupa una superficie promedio de 42,000 ha de las cuales 28,000 son producidas en áreas en condiciones de riego y las sobrantes 14,000 bajo condiciones de temporal, con un rendimiento medio de 20 ton/ha y 15 ton/ha respectivamente y una producción total media de 510,000 ton/ha (INEGI, 1992).

Los principales estados productores a nivel nacional son: Sinaloa, Sonora, Jalisco, Nayarit, Coahuila, Durango, Michoacán, Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca y Yucatán, de los cuales los primeros cuatro son zonas cuya producción es destinada enteramente a la exportación debido a que la época de cosecha de dichos estados es diferente a la de los estados productores de sandía de los Estados Unidos de

Norteamérica, dando oportunidad a la exportación del producto (INEGI, 1993; Sastre, 1992)

La Comarca Lagunera, región comprendida de la parte noreste del Estado de Durango y suroeste del Estado de Coahuila a pesar de no estar dentro de los estados exportadores, es una de las principales áreas productoras de sandía, debido a su alto potencial de rendimiento. La Región Lagunera cuenta con una superficie no mayor de 2,500 ha. dirigida al cultivo de sandía, lo que origina que sea un fuerte consumidor de semilla importada.

En dicha región se ha presentado últimamente entre los productores de sandía, con relación al organismo bacteriano causal de la enfermedad. "Mancha bacteriana del fruto" *Acidovorax avenae pv. citrulli*, una serie de conjeturas y/o especulaciones respecto a su presencia en esa área.

De ahí, la gran importancia, de realizar un estudio en el área productora de la Comarca Lagunera, y demostrar que estos terrenos están libres del problema.

Debido a estos dos principales motivos antes mencionados, la presente investigación, lleva por objetivos:

Producción de antisuero para la bacteria *Acidovorax avenae pv. citrulli*.

Determinar la presencia de la "mancha bacteriana del fruto" *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en la Comarca Lagunera.

REVISION DE LITERATURA

Mientras el hombre fue nómada probablemente las enfermedades de plantas lo afectaron muy poco, pero cuando inició su cultivo, él mismo proporcionó los cambios ecológicos que favorecieron fuertemente a los organismos fitopatógenos, ya que el cultivo de un gran número de plantas del mismo tipo en poblaciones con alta densidad dan lugar a condiciones ideales para la rápida diseminación de una enfermedad, lo mismo que sembrar repetidamente el cultivo origina el incremento de las poblaciones de patógenos e igualmente el mejoramiento de plantas para dar mayor rendimiento ha producido en ocasiones cultivos más susceptibles a enfermedades. (Mendoza y Pinto, 1983).

Gallegos (1978), menciona que las enfermedades causadas por organismos fitopatógenos fueron tomadas en consideración por el hombre, cuando se dio cuenta de que su subsistencia podía ser amenazada por la presencia de ellas. Se cree que los primeros reportes que hablan de las enfermedades datan de los años 4000 a.C. a 17 d. C.; sin embargo, las causas eran atribuidas a las divinidades, y no fue hasta el año 1650, cuando Robert Hooke crea el primer microscopio compuesto, mejorándolo en 1675 Antonio van Leewenhoeck a 270 aumentos, de ahí cuando se empieza con el estudio de los parásitos de plantas reconociéndose más adelante como organismos causantes de enfermedades a los hongos, bacterias, virus y

nemátodos (Salle, 1948; Walter y Macbee, 1965). Esto repercutió, pues, en el estudio de la constitución y descripción de los patógenos causantes de enfermedades, lo cual es el paso inicial para poder atacar un problema de cualquier origen (Montes, 1992).

Algunos patógenos no tendrían posibilidades de diseminarse ampliamente si no fuera por la intervención del hombre, de igual manera muchas enfermedades estarían confinadas a barreras geográficas de no ser por el constante intercambio comercial que hasta hace algunos años se ha extendido por casi todos los países productores del mundo. El hombre en su característica propia de transformar su medio provoca desequilibrio en la naturaleza, en el caso de las enfermedades de los vegetales las modifica cualitativa y cuantitativamente, pero a su vez, busca primeramente impedir la presencia de organismos fitopatógenos y/o posteriormente solucionar cada nuevo problema que se le va presentando (Montes, 1992).

Debido a la forma en que pueden diseminarse y sobre todo a la capacidad de establecerse, la mayoría de los países han dictado leyes, reglamentos, cuarentenas aunadas a la modificación y creación de métodos de detección basándose en el principio que, cada gobierno tiene el derecho y la responsabilidad no solo de proteger la salud de su pueblo, sino también la de los múltiples cultivos que son afectados por agentes de diversa índole tales como insectos, hongos, malezas, virus, micoplasmas y bacterias (D.G.S.V., 1980).

Neergaard (1977), menciona que los métodos de detección o pruebas de sanidad que se le realizan a los diferentes órganos vegetales es un estudio referido a la ausencia o presencia de organismos causantes de enfermedad, como hongos bacterias y virus, así como algunas plagas tales como nemátodos e insectos, incluyendo también la condición fisiológica como deficiencia de algún elemento nutritivo. Así mismo, cita que para su detección hay diferentes métodos que varían en: sensibilidad, reproductibilidad, entrenamiento y equipo; cada una de estas características son requisitos que deben tener los métodos de diagnóstico.

El mismo autor indica que el método a usar depende de:

- El patógeno o condición a investigar
- Tipo de órgano
- Propósito de la prueba
- Importancia del patógeno y su potencial para causar enfermedad

El mismo autor menciona que lo anterior está relacionado con el concepto que se tenga fitosanitariamente del patógeno a detectar y el tipo de prueba a utilizar, con la finalidad de:

- a) Detectar infecciones durante cuarentena

Por ejemplo en introducciones en diferentes órganos vegetales para excluir un patógeno en particular, para exportar productos vegetales libres de un determinado patógeno, para cumplir las demandas y exigencias del país importador.

b) Cumplir con los esquemas de certificación

Para el mejoramiento de lotes de producción de semillas en cuanto a su eliminación de patógenos.

c) Evaluar la condición sanitaria de la semilla para conocer su valor de siembra.

Esto es comprobable a una prueba de germinación, ya que la condición sanitaria de alguna manera indicará el potencial de emergencia, establecimiento de plantas y condición general del cultivo.

d) Decidir si es necesario el tratamiento químico de la semilla.

Esto permite saber si el órgano (semilla, esqueje, tubérculos, bulbos, etc.) puede ser sembrado sin ningún tratamiento químico, si puede ser usado con un tratamiento prescrito o si definitivamente no puede ser usado para siembra.

e) Para aclaración de problemas de emergencia

Cuando se han tenido problemas de emergencia una causa puede ser la sanidad de equis órgano y aparte de evaluar su condición fisiológica

buscando la causa de la falla es necesario conocer la sanidad de ese órgano como posible causa de falla de emergencia (Neergaard, 1977).

*

Identificación de Bacterias Fitopatógenas

Los cultivos agrícolas a nivel nacional se han visto afectados por una gran diversidad de factores biológicos y agentes causantes de enfermedades como hongos, virus, nemátodos y bacterias. (Torres, 1980).

Calderón (1986), indica que las bacterias son consideradas uno de los organismos mas perjudiciales debido a los grandes estragos que han provocado a la agricultura a nivel mundial, tales como *Pseudomonas solanacearum* comúnmente conocida como "marchitez bacteriana del tomate" causó pérdidas hasta de 9.4 millones de dólares en 1976 en E.U.A. , *Xanthomonas campestris pv. malvacearum* "mancha bacteriana del algodón" 15 millones de dólares en el mismo año.

No obstante con el conocimiento de que además de ser fitopatógenas son utilizadas en la industria como por ejemplo en la petrolera, en la textil en la texturización de cosméticos entre otras.

Kiraly (1974), indica que, sin embargo, las bacterias fitopatógenas en el campo de la identificación y caracterización ha surgido una serie de problemas y controversias debido a que entre ellas existe una relación tan estrecha que la

mayoría de las veces no pueden ser diferenciadas entre sí llevando a cabo los métodos tradicionales para su identificación.

Manovsky (1982), menciona que siempre es interesante observar que cualquier sistema de clasificación para un grupo se reviste de una marcada artificialidad, ya que no pasa de ser una tentativa del hombre para agrupar o disponer de manera ordenada y sistemática un conjunto de elementos que de por sí son versátiles, mutables y heterogéneos en cuanto a innumerables características. Sin embargo, cuando se trata de la identificación de un organismo bacteriano, el estudio de sus caracteres anatómicos morfológicos es insuficiente, por lo que es necesario recurrir a un conjunto complejo de aspectos como morfología de la colonia, micromorfología, características de crecimiento, pruebas bioquímicas, pruebas de inhibición, utilización de compuestos como fuente de energía y crecimiento (Starr, 1982; Austin, 1992).

No obstante aun cuando se tengan bien conocidos los elementos que constituyen a las bacterias, la caracterización se torna difícil puesto que el caracterizador está sujeto a variación y errores. Por ejemplo, aspectos como variaciones biológicas, equivocaciones cometidas en la realización de pruebas o interpretación de sus resultados, aparición de un nuevo elemento aun no descrito en el conjunto, dificultan aun más la identificación de estos organismos (Manovsky, 1982). Neergaard (1977), menciona que además de lo anterior, para trabajos rutinarios no es conveniente su uso por dedicársele demasiado tiempo.

Es por lo anterior que se ha inventado tal diferenciación por medio de otras técnicas como la serología por medio de la cual el diagnóstico es más rápido y preciso siendo una condición necesaria sobre todo para los programas de erradicación y control cuando se impone el aumento de la productividad en la esfera agropecuaria (Peralta y Frías, 1987).

La Serología

Austin (1992), menciona que la serología se usó por primera vez en la medicina humana y veterinaria como un método de diagnóstico, y a su alta especialidad y gran sensibilidad ha hecho que supere a muchas de las técnicas de diagnósticos empleadas con anterioridad, extendiéndose rápidamente a diversos campos de la patología vegetal, incluyendo la bacteriología, micología y virología, entre otras (Peralta y Frías, 1987). Repercutiendo pues, que este método sea altamente preferido por laboratorios cuarentenarios, así como también para la certificación de material vegetativo (Austin, 1992).

Para poder llevar acabo las pruebas serológicas es necesario contar o preparar el antisuero de la bacteria a investigar. Esto funciona básicamente por los siguientes lineamientos y preceptos.

Una de las líneas de investigación en serología y que determina una separación de la pregunta original acerca de la resistencia (inmunidad) a enfermedades, comienza con el descubrimiento de que la inmunización causada por bacterias y toxinas es solo parte del principio general y que el mismo mecanismo entra en juego cuando materiales inocuos tales como células o proteínas derivadas de especies ajenas son inoculadas en animales (CIP, 1980).

Pelczar (1981), menciona que inmunidad es cuando un vertebrado se ha recuperado de una enfermedad anteriormente recibiendo también el nombre de inmunidad adquirida.

Hernández (1994), menciona que la base de inmunidad adquirida reside en la capacidad de los sistemas inmunológicos de los vertebrados para distinguir células o sustancias de su propio organismo con las de otro origen. Estas sustancias que son extrañas para el individuo en las cuales se incluyen células de otros animales, virus, toxinas, toxoides, bacterias y vacunas cuando son o se introducen en un cuerpo extraño son conocidas como antígenos, las cuales van a inducir la producción de anticuerpos. El antígeno debe tener la particularidad de comportarse como inmunógeno, la cual va a estar dada primeramente por que debe ser extraña y compuesta de proteínas y polisacáridos. Ya que estas sustancias naturales estimulan la producción de anticuerpos; lo contrario ocurre con los oligosacáridos, lípidos y ácidos nucleicos, sin embargo, cuando se combinan con proteínas inducen la producción de anticuerpos.

La defensa de un organismo está en función de las células de la sangre: leucocitos o glóbulos blancos. Existen diferentes tipos de leucocitos entre los cuales los más representativos son según CIP,:

Monocitos.- Representan de 0-8 del total de leucocitos, miden de 15 a 18 nm.

son los llamados macrófagos que se encargan de fagocitar grandes moléculas.

Linfocitos.- Representan entre el 30 y 35 por ciento de leucocitos miden de 8-9 nm. intervienen en las reacciones de antígeno anticuerpo.

Eosinófilos.- Representan 0-8 por ciento de los leucocitos miden de 12-13 nm intervienen en reacciones antígeno anticuerpo (sobre todo en alergias).

Goto (1992), indica que para incrementar la respuesta inmunogénica se hace uso de sustancias denominadas adyuvantes. Estas sustancias inducen la formación de anticuerpos pudiéndose utilizar cuando la capacidad antigénica del antígeno es débil y/o cuando la cantidad de antígeno es poca. Las sustancias más utilizadas son: fosfato de calcio, geles inorgánicos hidróxido de aluminio, bentonita, albúmina de suero metiolado y adyuvante incompleto de Freund.

Hampton *et al.* (1990), reportan que el sistema inmunológico comprende 2 tipos de manifestaciones:

1. Inmunidad humoral
2. Inmunidad celular

El linfocito es la célula primaria involucrada en este tipo de respuesta.. Se ha podido identificar dos tipos de linfocitos.

Linfocitos T= Son responsables de la inmunidad celular (inmunidad antitumoral, reactividad cutánea, defensa celular contra hongos.)

Linfocitos B= Son responsables de la inmunidad humoral que se expresan en la producción de proteínas plasmáticas específicas circulantes llamadas anticuerpos o inmunoglobulinas.

Determinantes Antigénicos.

Para la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas va a estar dada, con la unión del antígeno con la superficie del linfocito ya que cualquier sustancia que actúa como antígeno presenta en su superficie un cierto número de sitios de reacción. Según el número de sitios de reacción (Epitipos o Paratipos) del antígeno determinará la especialidad de las reacciones antígeno-anticuerpo (Hampton, *et al.*, 1990).

Goto (1992), menciona que el anticuerpo es una proteína específica producida por vertebrados en respuesta de un antígeno.

El suero que contiene anticuerpos es llamado antisuero; los anticuerpos son proteínas séricas denominadas globulinas. Sin embargo, debido a que no todas las globulinas del suero son anticuerpos, es por ello que a los anticuerpos se les denomina inmunoglobulinas (Ig) (Pelczar, *et al.*, 1977).

CIP, (1980), menciona que hay cinco clases de inmunoglobulinas.

IgG= La fracción principal de anticuerpos, comprende al 80 por ciento de las inmunoglobulinas, su peso molecular fluctúa entre 150000 y 160000; contiene de 2-4 por ciento carbohidratos.

Tiene la movilidad electroforética más baja de las inmunoglobulinas. Tiene un estado físico monómero.

IgA= .Tiene un peso molecular entre 180,000 y 400,000. Difiere de la IgG en que tiene un contenido superior de carbohidratos (5-10 por ciento). La IgA se encuentra en altas concentraciones en la sangre, en las secreciones del calostro, saliva, lágrimas y en las secreciones de los bronquios y del tubo digestivo. La IgA no atraviesa la placenta. Tiene la característica de ser monómero polímero y dímero.

YgN= Es la proteína más grande. Contiene 576 aminoácidos y tiene un peso molecular de 950,000. Es el primer anticuerpo en un animal o ser humano recién nacido. Promueve la fagocitosis de microorganismos por los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. No atraviesan la placenta tiene un estado físico polímero.

IgD= Ninguna actividad de anticuerpo es atribuido a la IgD, su papel dentro del esquema general de las inmunoglobulinas es aún desconocido. Sin embargo, Pelczar (1981), indica que debido a su bajo nivel de 1 por ciento del total de inmunoglobulinas se desconocía su función, pero se le atribuye regular la síntesis de otras inmunoglobulinas. No cruza placenta y se le encuentra en linfocitos del recién nacido.

IgE= Está presente en el suero en concentraciones muy bajas. Su peso es de 190,000. Es la responsable de reacciones alérgicas.

Hampton *et al.*, (1990), indican que la molécula del anticuerpo esta formada básicamente por cadenas polipeptídicas que conforman la unidad básica dos cadenas pesadas (H) idénticas con un peso molecular de 53,000 a 75,000 y dos cadenas ligeras (L) con un peso molecular de 23,000 que se encuentran unidas por puentes disulfuro.

Existen dos regiones en la molécula del anticuerpo:

1.- Fracción común (Fc): constituida por una porción de cadenas pesadas (P.m 50,000).

2.- Fracción variable (Fab) constituida por la otra mitad de las cadenas pesadas y por las cadenas ligeras con un peso molecular de 100,000. Esta fracción es la que determina la especificidad de los anticuerpos.

Reacción Antígeno-Anticuerpo

Goto (1992), menciona que la reacción se va dar cuando el antígeno se une con su respectivo anticuerpo mediante enlaces covalentes expresándose la relación denominada "candado-cerradura".

Kiraly (1974), indica que la reacción antígeno-anticuerpo está dada por dos fases:

1. Aglutinación
2. Precipitación

Aglutinación: Es cuando la bacteria es mezclada con el antisuero que contiene anticuerpos y la bacteria es desdoblada en la suspensión. Una vez que ocurre el desdoblamiento se puede observar una agregación a la cual se le denomina título. Un título alto significa que el antisuero es rico en anticuerpo lo cual está dada cuando el antisuero aglutina a una división no menor de 1:256. Por el

contrario, si la aglutinación ocurre por debajo de 1:256 es indicativo la exposición previa como responsable de la presencia de anticuerpos.

Precipitación: está dada cuando el antígeno se une con su respectivo antígeno mediante enlaces covalentes, a lo que ocurre con una llave y su cerradura. El grado de asociación del antígeno con el anticuerpo depende de las características de cada molécula y es determinado por la suma de los efectos de la interacción entre ellas. Si la afinidad y la avidéz son altas, las moléculas se unirán más rápidamente y la disociación será muy lenta. El antisuero que da reacciones de precipitación más fuerte tiene mayor avidéz que otro que reacciona hasta la misma dilución mostrando reacciones pobres.

El CIP (1980), indica que la mayor o menor afinidad del antisuero se encuentra influenciada por:

1. La temperatura a la que se realiza la reacción. A mayor temperatura se produce mayor reacción, sin embargo, hay que considerar que a temperaturas mayores de 40°C la proteína se desnaturaliza.
2. La concentración de sales: el bajo contenido de sales favorece la unión de reactantes.
3. El pH. Puede producir cambios en la afinidad antígeno-anticuerpo.

4. La concentración de los reactantes para la formación de precipitados.

Inmunización y Producción de Anticuerpos.

Elliot (1987), menciona que los animales comúnmente utilizados para la producción de antisueros son los conejos y ratones debido a la fácil manipulación, pero también se pueden utilizar caballos, cabras, ovejas, monos, y gallinas; la elección de la especie se hace en base al volumen requerido de antisuero.

El CIP (1980), esquematiza el proceso de inmunización de la siguiente manera:

1. Cuando las partículas ingresan al organismo, algunas de ellas son consumidas por las células macrófagas.
2. Algunos de los millones de linfocitos T de ayuda que se encuentran normalmente circulando por el sistema sanguíneo son activados para identificar al nuevo enemigo, en este caso una bacteria. Esta célula se activa uniéndose al macrófago que ha atrapado la partícula. Esta unión se produce cuando el linfocito T reconoce en el macrófago un marcador propio (rectángulo) y uno correspondiente al antígeno (triángulo).

3. El linfocito T de ayuda así activado, se multiplica y éste a su vez estimula la multiplicación de los linfocitos T eliminadores y de los linfocitos B.
4. Cuando los linfocitos B se han multiplicado (alrededor de un millón de líneas diferentes), el linfocito T de ayuda le indica que inicie la producción de una gran cantidad de anticuerpos que circulan por el torrente sanguíneo.
5. En el caso de los virus que causan infección en ese organismo, algunas partículas ingresan a las células para iniciar su propia multiplicación. Los linfocitos T eliminadores producen daño químico en la membrana de las células infectadas, de esta manera se interrumpe la replicación viral.
6. Algunos anticuerpos que se han sintetizado neutralizan a las partículas virales restantes.
7. Cuando la infección se detiene, el linfocito T supresor suspende todas las actividades del sistema inmunológico, evitando de esta manera se produzcan reacciones descontroladas.
8. Los linfocitos T y B de memoria, almacenan la información sobre las partículas antigénicas, permanecen en el sistema sanguíneo y linfático. De esta manera quedan listos para movilizarse e iniciar la reacción inmunológica., si las mismas partículas antigénicas invaden el organismo.

Vías de Inmunización:

Tomando algunas consideraciones como la desinfección del área a introducir la aguja, aguja estéril, conocimiento de la concentración, y sobre todo que el antígeno este lo mejor purificado con la finalidad de que en los resultados obtengamos reacciones falsas positivas; las rutas de inyección pueden ser subcutánea, intramuscular e intravenosa (Elliot, 1987).

Producción de Antisuero

La producción de anticuerpos se incrementa durante los días subsiguientes a la fecha de la primera inmunización hasta alcanzar una concentración máxima, que puede mantenerse por algunos días. Si se inyecta una nueva dosis del antígeno la síntesis de anticuerpos se incrementa rápidamente, alcanzando una concentración superior a la producida con la primera dosis del antígeno. Los anticuerpos se encuentran en el suero sanguíneo de los animales inmunizados y este suero se denomina antisuero. (Kiraly, 1974).

El mismo autor indica que después de la colección de la sangre, ésta se deja en reposo para separar el suero de los otros componentes de la sangre. El suero se puede centrifugar (5,000 rpm x 15 min) para remover los residuos que no se han separado para después almacenarse en las diferentes siguientes formas:

A) En congelación (-20°C a -70°C).

B) En forma liofilizada o en forma líquida a 4°C mezclada con un antiséptico; lo anterior con la finalidad de el suero (compuesto de anticuerpos denominadas inmonoglobulinas) pueda permanecer activo por muchos años.

Técnicas de Inmunización

El Ministerio de Agricultura de España (1991), menciona que las pruebas serológicas se han utilizado ampliamente para el diagnóstico de enfermedades. Al abrirse paso la era de la moderna inmunología, en la década de los sesenta, los métodos serológicos de laboratorio se han hecho altamente especializados y sofisticados. Así mismo indica que la introducción de las técnicas inmunológicas más nuevas ha ampliado el campo de la serología mucho más allá de los procedimientos convencionales utilizados en el ensayo de anticuerpos frente a microorganismos conocidos, o viceversa.

No obstante la innovación de diferentes técnicas de reacción antígeno-anticuerpo, en la fitobacteriología las comúnmente usadas son: Aglutinación en Portaobjetos o Prueba de anillo, Aglutinación en tubo, Difusión en agar y la técnica serológica ELISA.

El CIP (1980) y Roitt *et al.*, (1986), reportan cómo se lleva a cabo cada una de las diferentes técnicas inmunoserológicas, de la siguiente manera.

A) Pruebas de precipitación.

La precipitación de los antígenos y de los anticuerpos se produce cuando estas dos sustancias reaccionan entre sí formando una estructura en forma de enrejado, que al excluir las moléculas de agua (reacción hidrofóbica) precipita. Para que la estructura de enrejado se forme es necesario que la concentración de los reactantes sea proporcional. Es decir por cada molécula de antígeno se requiere un número determinado de anticuerpos. En general los anticuerpos actúan como moléculas bivalentes y los antígenos como moléculas multivalentes.

Cuando hay un exceso de anticuerpos éstos se comportan como moléculas monovalentes que reaccionan sólo con una partícula del antígeno y no es posible la formación de la estructura de enrejado. Cuando hay un exceso de antígenos, tampoco se forma la estructura de enrejado porque actúan sólo como moléculas monovalentes. En ambos casos, la reacción antígeno-anticuerpo no puede ser observada.

1.- Prueba del anillo de interfase :

Se utilizan antígenos y anticuerpos en solución sobre un volumen determinado de los anticuerpos, se coloca una cantidad proporcional de la muestra que contiene el antígeno. La precipitación se produce en la interfase y el plano de precipitación de la dilución de un anillo.

2.- Prueba de precipitación líquida en tubos:

Utilizada principalmente para determinar el título de los antisueros y la concentración del antígeno; es una prueba cuantitativa. En esta prueba varias diluciones (dobles) del suero y del antígeno se mezclan e incuban en dos pequeños tubos de prueba para la formación de precipitados. Los diversos grados de precipitación permite, determinar la concentración de los reactantes.

3.- Prueba de microprecipitación:

En esta prueba gotas individuales de cada uno de los reactantes se colocan en la base interna de una placa petri. La placa se coloca en agitación para permitir la mezcla del anticuerpo con los antígenos, además se le da un período de incubación para la formación del precipitado. La reacción puede ser observada con ayuda de un microscopio estereoscópico.

B) Pruebas de Difusión en Gel.

Son pruebas de precipitación que se realizan utilizando generalmente geles de agar o agarosa. La ventaja de este tipo de pruebas es que la mezcla del antígeno con su correspondiente anticuerpo pueden ser físicamente separados debido a sus diferentes coeficientes de difusión en gel. De manera que estas pruebas pueden

proporcionar información sobre la homogeneidad y pureza de los reactantes, así como el tamaño en relación entre los antígenos.

1.- Inmunodifusión simple :

Se basa en el uso de anticuerpos inmovilizados en una matriz de agar o agarosa fundida en un baño de agua a 50°C y pre-enfriada para su uso y dispuestas en tubos de 10 ml. o más pequeños.

El antígeno se puede difundir a través del agar, apareciendo entonces una zona o banda de migra a través del tubo hasta que la concentración de ambos reactantes está en estado óptimo. En este punto se produce la precipitación. Algunos de los factores que afectan la migración de las bandas son la concentración del antígeno, el coeficiente de difusión, que depende del peso molecular y del tamaño de la molécula de antígeno. Podemos observar que a menor tamaño y peso molecular el coeficiente de difusión será mayor. La distancia de migración de la banda de difusión también depende del tiempo, tipo, calidad y concentración del anticuerpo.

2.- Inmunodifusión doble :

a) Sistema de dimensión simple: En esta prueba entre las soluciones de antígeno y de anticuerpo se coloca una zona neutral de agar. Se aplican los mismos

principios de la técnica de difusión de Oudin, con la única diferencia de que ambos reactantes son difundibles. Cuando ambos reactantes se encuentran, se forma una línea de precipitación. La posición y grosor de la banda permite calcular la concentración de cualquiera de los reactantes.

b) Sistema de doble dimensión. Se preparan placas o láminas portaobjetos recubiertas con agar neutro (0.7-1.5 por ciento) solidificado, se desarrollan moldes o patrones de hoyos dependiendo de los objetivos de la prueba y se colocan el antígeno y el anticuerpo en hoyos separados.

Reacción de identidad: La difusión de las líneas de precipitación se produce cuando los dos antígenos son idénticos, se forma una barrera compacta: barrera inmuno-específica.

Reacción de no identidad: En este caso la difusión varía y los arcos de precipitación no actúan como barreras para los antígenos que no están relacionados y se entrecruzan.

Reacción de doble identidad parcial: En este caso se produce una doble identidad parcial entre antígenos (Los dos antígenos son casi iguales con diferencia en sólo algún determinante antigénico).

Reacción de identidad parcial: Es cuando observamos la formación de una "espuela" que indica identidad parcial entre los antígenos.

3.-Inmunoelectroforesis :

Esta técnica es una de las herramientas analíticas más importantes para resolver mezclas complejas de antígenos. Se basa en la movilidad electroforética y la especificidad antigénica. La mezcla de antígenos es primero separada en sus componentes por electroforesis en un gel de agar. Luego en un canal o día de migración electroforética, se coloca el antisuero lo que permite el desarrollo de líneas de precipitación. Se utilizan generalmente buffers alcalinos de pH entre 7.5 y 8.5, pues bajo estas condiciones las proteínas se cargan negativamente y se mueven hacia el ánodo. Una de las aplicaciones incluye la caracterización de los virus, la diferenciación de razas o subespecies.

C) Pruebas de Aglutinación.

La principal diferencia entre las pruebas de precipitación y de aglutinación es que en este último caso el antígeno es muchas veces más grande que el anticuerpo, y es por esta razón, que muy pocas moléculas de anticuerpo son necesarias para formar una agrupación visible de las partículas. Los fundamentos de la reacción son similares a las pruebas de precipitación.

1. Aglutinación pasiva (Indirecta o reversa):

Se basa en el uso de sustancias que actúan como transportadoras inertes de antígenos o anticuerpos. El tamaño de estas sustancias (esferas de látex, bentonita) es varias veces superior al de los reactantes. De esta manera es posible usar antígenos solubles (partículas virales) en pruebas de aglutinación.

2. Prueba de látex:

Se basa en el uso de esferas de poliestireno (1.1 μm) recubiertas de moléculas de inmuno-globulinas. La sensibilidad de ésta técnica es 10 a 100 veces mayor que las pruebas clásicas de microprecipitación, para la detección de los virus de plantas; la reacción puede ser observada a simple vista.

3. Prueba de neutralización:

La interacción de antígenos biológicamente activos con anticuerpos homólogos producen en algunos casos la pérdida de la actividad biológica del antígeno. Esta reacción se denomina en general neutralización, su sensibilidad depende fundamentalmente de la actividad del antisuero y es necesario que el antígeno tenga actividad biológicamente detectable.

Estas pruebas hacen uso de anticuerpos y antígenos marcados con sustancias que tienen actividad propia y amplifican el poder de la prueba e incrementan su sensibilidad. Generalmente a mayor actividad del marcador, más rápidamente puede ser detectado la reacción antígeno-anticuerpo.

1. Inmunofluorescencia (IFA):

Se basa en el uso de sustancias que transforman la luz de rango ultravioleta (200 a 400 nm) en radiaciones de mayor longitud de onda y que con la ayuda de un microscopio modificado (microscopio de fluorescencia) hace posible ver la luz emitida por la sustancia fluorescente (fluoresceine-isocianato (FITC)).

2. Radioinmunología:

Se basa en el uso de sustancias radiactivas (P^{32} , I^{125}) como marcadores de las inmunoglobulinas. Su presencia se determina al reaccionar frente al material fotográfico.

3. Enzima inmuno ensayo(ELISA):

Se basa en la propiedad de algunos antígenos y anticuerpos de ser absorbidos a un medio sólido que les permita construir una secuencia ordenada de

3. Enzima inmuno ensayo(ELISA):

Se basa en la propiedad de algunos antígenos y anticuerpos de ser absorbidos a un medio sólido que les permita construir una secuencia ordenada de material biológico tal como anticuerpo, antígeno, anticuerpo conjugado con enzima y ser visualizada por la reacción de color que se produce al agregar el sustrato específico para la enzima que se encuentre conjugada al anticuerpo y que permite una adecuada cuantificación del antígeno.

Inmunomicroscopía Electrónica (iem).

Es utilizada para la detección del antígeno en suspensión o en secciones ultrafinas del tejido infectado por virus. Cuando el virus está en la suspensión, la reacción positiva puede ser reconocida con ayuda del microscopio electrónico:

1.- Agregación de partículas virales:

Se prepara una mezcla de antisuero específico en dilución adecuada para la detección del virus supuestamente presente en la suspensión del tejido. Como resultado de la agregación de partículas se forman complejos que pueden ser visualizados en el microscopio electrónico. Esta técnica es especialmente útil si la concentración de virus es muy baja para ser observada directamente. Si existiera un

Se basa en la inmovilización de las partículas virales en la placa y posterior recubrimiento con anticuerpos específicos.

3.- Captura de antígenos:

Se realiza de manera inversa al método anterior, es decir, la placa se encuentra previamente recubierto con anticuerpos específicos.

Cronología de la Mancha Bacteriana del Fruto

Acidovorax avenae* pv. *citrulli

Latin y Hopkins, (1995), indican que el primer acontecimiento claramente descrito de la enfermedad conocida como mancha bacteriana del fruto fue publicado en 1969, por Crall y Scheneck. En ese reporte, los autores observaron la enfermedad en una estación experimental en Leesburg, Florida durante dos años, en el artículo incluían fotografías con síntomas típicos de la enfermedad, pero la etiología no estaba determinada, no obstante, los autores reportaron que la mancha bacteriana estaba asociada con la mancha bacteriana de la hoja, ya que en algunos experimentos, fueron observados los síntomas. En 1963, Mullin y Schgenck mencionan que la mancha bacteriana de la hoja fue observada en campos comerciales, pero el patógeno estaba identificado como *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* y éste no era la causa de la mancha bacteriana del fruto.

Webb y Goth aislaron la bacteria la cual producía colonias blancas sobre Papa Dextrosa Agar; sin embargo, no identificaron al patógeno, por lo que el patógeno observado en Leesburg en aquellos años quedó inconcluso.

Los mismos autores mencionan, que Goth y Webb publicaron un artículo en 1975, en el cual indicaron haber trabajado nuevamente con el microorganismo

bacteriano, concluyendo que esta bacteria pertenece al género *Pseudomonas* y es negativa a la fluorescencia sobre KB además de que podía ser transmitida por semilla, sin embargo esto último quedó inconcluso.

Diez años después de lo que Crall y Schenck habían publicado, otra descripción fue publicada en el Plant Disease en Queensland, Australia, en 1978, reafirmando que el patógeno pertenece al género *Pseudomonas*, originando que en el mismo año, Schaad , *et al.*, en la Estación Experimental de Introducción de plantas en Georgia nombraran científicamente al agente causal de la mancha bacteriana del fruto como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*. Apartir de ahí, la mancha bacteriana del fruto fue asociado con el género antes descrito. Posteriormente Wall y colaboradores mediante un trabajo realizado con el mismo microorganismo bacteriano, concluyeron que la bacteria es un patógeno diseminado por semilla. Más adelante, Wall presentó en 1979 en al Annual Meeting la presencia por primera vez de la mancha bacteriana del fruto en campos comerciales de Florida, Sur de Carolina e Indiana. Posteriormente, Somodi y colaboradores en 1991, describen las características bioquímicas de el patógeno, originando que, en 1992 Willems y colaboradores reclasificaran al organismo como *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*.(Latin y Hopkins, 1995).

A partir de la reclasificación, con el paso del tiempo, los estudios con respecto a la mancha bacteriana del fruto han continuado, además de estar apareciendo en diferentes lotes comerciales en donde no se encontraba.

Ubicación Taxonómica del Agente Causal de la "Mancha Bacteriana del Fruto de Sandía"

Para Gotto (1992), la clasificación taxonómica de la especie *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* es la siguiente:

Reino	Procariote
División	Gracillicutes
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Acidovorax</i>
Especie	<i>avenae</i>
Patovar	<i>citrulli</i>

Esta especie con el tiempo ha logrado constituirse por diferentes especies y patovares. Gotto, (1992), Latin y Hopkins (1995) e Index, (1960), mencionan que las subespecies que están dentro de la clasificación del género *Acidovorax* son las siguientes:

Acidovorax avenae* pv. *citrulli

=*Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*

=*Pseudomonas avenae* pv. *citrulli*

Acidovorax avenae* pv. *avenae

Acidovorax avenae* pv. *clateyae

Acidovorax phacilis

Acidovorax konjaci

=*Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* (Goto, 1983).

=*Pseudomonas conjac*

=*Bacterium conjac*

=*Phytomonas conjac*

=*Xanthomonas conjac*

Etiología.

La bacteria *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* causante de la "mancha bacteriana del fruto" en sandía *Citrullus lanatus*, las características que tiene según Bradbury (1986) y Gotto (1992); son las siguientes:

Cuadro 2.1 Características de *Acidovorax avenae*. Género-especie.

CARACTERISTICA	RESULTADO
Tinción de Gram	Negativa
Pigmentación fluorescente	Negativo
Presencia de flagelos	1 polar
Crecimiento	Aeróbica estricta
Reducción de nitratos	Negativo
Crec. En dihidrolasa de arginina	Negativo
Hipersensibilidad en tabaco	Negativo
Crec. a 4°C	Negativo
Crec. a 41°C	Positivo
Prueba de oxidasa	Positivo
Prueba de 2-cetogluconato	Positivo
Crec. en glucosa	Negativo
Sucrosa	Negativo
B-alanina	Positivo
Citrato	Positivo
Etanol	Positivo
Etanolamina	Positivo
Fructosa	Positivo
1-Leucina	Positivo
n-propanol	Positivo
D-serina	Positivo

Bradbury (1986), menciona que las características para caracterizar la bacteria hasta patovar, son las siguientes:

Cuadro 2.2. Características de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*. Género-especie-patovar.

CARACTERISTICA	RESULTADO
Poly b-hidroxitirato	Negativo
Dihidrolasa de arginina	Negativo
Licuefacción de gelatina	Lento, retardado
Oxidación de gluconato	Positivo
Ureasa	Positivo retardado
Deaminasa fenil alanina	Negativo
Hipersensibilidad en tabaco	Negativo
Hipersensibilidad en Konjaci	Negativo
Hipersensibilidad en sandía	Positivo
Utilización de:	
Acetato l-leucina	Positivo
Propianato	Positivo
L-arabinosa	Positivo
D-galactosa	Positivo
Isoleucina, malonate	Negativo
D-manitol	Negativo
D-ribosa	Positivo

Sintomatología

La sintomatología es apenas un criterio visual auxiliar, ya que esta manifestación ocurre frecuentemente en forma semejante a la causada por otras especies bacterianas, la incitada por hongos o inclusive virus. Pero de manera general, los síntomas de origen bacteriano, en contraste con los inducidos por virus y hongos en el tejido atacado se presenta una apariencia húmeda o grasosa y en las partes afectadas frecuentemente se desarrollan exudados, denominado zoglea compuesta a su vez por células bacterianas y sus productos del metabolismo (Calderón, 1986; Rodríguez, 1991.)

Hopkins, *et al.* (1992), menciona, que con respecto al agente causal de la Mancha Bacteriana del Fruto los primeros síntomas en la planta de sandía, aparecen como la absorción de agua oscura, en la superficie más baja de los cotiledones y hojas, seguidos por lesiones necróticas, frecuentemente con halos cloróticos. En las plantas jóvenes, las lesiones pueden ocurrir en el hipocotilo, resultando el colapso y muerte de la planta. Los síntomas en el follaje pueden desarrollarse a través de la estación de sandía; pero en muchos casos, no son muy distintivos o notorios, y pueden ser fácilmente confundidos con otras enfermedades, o pasar desapercibidos por el agricultor; sin embargo se pueden diferenciar mediante lesiones ligeramente de tono color café, que a menudo se esparcen a través de las venas medulares de la hoja. Las lesiones de la hoja, no usualmente terminan en la defoliación, pero son importantes como focos o depósitos de

bacterias, que provocan la infección del fruto. La bacteria sobre las lesiones de las hojas, en condiciones de alta humedad y temperatura se puede extender e infectar la fruta en desarrollo. En las dos a tres semanas de edad, las frutas son más susceptibles a la invasión bacteriana ya que los frutos maduros están cubiertos con una capa de cera, que empuja el estoma y previene la entrada de la bacteria en la fruta.

La bacteria entra a la fruta a través de pequeñas aberturas (estomas), y una pequeña lesión en la absorción de agua, se desarrolla de 3 a 7 días más tarde. Los síntomas en la superficie de la fruta, comienzan como pequeñas áreas de apariencia grasosa, con problemas en el proceso de absorción de agua, de unos cuantos milímetros de diámetro, dichas manifestaciones aumentan rápidamente a un color verde oscuro, y se amplían a varios centímetros de diámetro, teniendo márgenes irregulares. (Somodi y Jones, 1991). En unos cuantos días, estas lesiones pueden expandirse rápidamente, hasta cubrir por entero la superficie superior de la fruta, dejando solamente la porción que hace contacto con el suelo, sin síntomas.

Una vez que la capa de cera se forma, las sandías maduras pueden ser invadidas, por la mancha bacteriana en fruto, principalmente por heridas. Inicialmente, las lesiones se tornan de color café, después un agrietamiento con una supuración blanca bacteriana, o un exudado efervescente, que a menudo pueden ser vistos sobre la fruta (Hopkins *et al.*, 1992),

Epifitiología.

Fahy y Persley, (1983), reportan que el desarrollo de las enfermedades son el resultado de la interacción del parásito, del huésped y del medio ambiente y para que se manifieste una enfermedad, es necesario que además de la presencia del patógeno, las condiciones ambientales sean favorables y la hospedera susceptible. Por esta razón, para combatir cualquier enfermedad es imprescindible conocer con detalle estos tres factores.

Hopkins, *et al.*, (1994), mencionan que la mancha bacteriana en el fruto, puede ser introducida en un campo por semilla infectada que sea cosechada de frutos enfermos, la propia sandía, transplantes infectados (algunos de estos transplantes, pueden transportar la bacteria, sin mostrar síntomas), o por dispersión natural de huéspedes alternados.

Latin y Rane, (1990), indican que la mancha bacteriana del fruto parece estar favorecida por condiciones ambientales cálidas y húmedas. El desarrollo del síntoma de la enfermedad y su distribución en el follaje y fruto, es más rápido durante períodos en los cuales el clima es cálido y soleado, con borrascas de lluvia y rayos, por las tardes. Con clima favorable, la bacteria puede esparcirse. Cuando una escasa y primera infección se sitúa en un campo puede resultar en un 100 por ciento de infección, para el tiempo de la cosecha. Bajo ciertas condiciones, los síntomas en el follaje podrían no ser muy notorios, y el agricultor podría no darse cuenta de que

hay un problema, hasta que los síntomas en la fruta, tornan la cosecha no comercializable. Sin embargo, los síntomas, durante climas fríos y lluviosos, no parecen desarrollarse también.

Hospederos.

Hasta los últimos años la gama de hospedantes de la bacteria *Acidovorax avenae pv. citrulli* se sabe que es muy reducida, conociéndose únicamente como hospedero natural a *Citrullus lanatus*, sin embargo, por inoculación artificial se ha logrado observar su infectividad en otras especies de la familia cucurbitáceas, tales como: *Cucumis melo*, *Cucumis sativus* y *Cucurbita pepo* (Bradbury, 1986).

Hopkins, *et al.*, (1992), reportan que las cucurbitáceas silvestres, son también potenciales huéspedes externos que necesitan ser considerados.

Profilaxia.

Las bacterias al igual que otros agentes causantes de enfermedades en plantas, son difíciles de combatir y, donde la bacteria *Acidovorax avenae pv. citrulli* se encuentra, debe ponerse especial empeño en prevenir su propagación, por lo que es necesario conocer con precisión su distribución. Es por esto que hay que llevar a cabo diferentes medidas de control ya que este organismo tiene la capacidad de propagarse a los campos cultivables por medio de estructuras, principalmente

semilla. Al mismo tiempo indica que para tener éxito es requerible combinar medidas de prevención y control para evitar primeramente su introducción, y lo anterior va a ser logrado mediante el esfuerzo conjunto de la colaboración de importadores, transportistas y autoridades federales, etc.

1.-Control legal.

El control legal está basado en el principio de exclusión que tiende a evitar primeramente la introducción de organismos no existentes en el país (López, 1982).

La Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, por medio de la Dirección General de Sanidad Vegetal, uno de los primeros medios que pone en práctica es el legal, por ser este un método inmediato y preventivo de la introducción de este organismo. Este método es llevado a cabo realizando diagnósticos fitosanitarios a la semilla que se introduce al país procedente de áreas infestadas (S.A.R.H., 1992).

2.-Control cultural.

Hopkins, *et al.*, (1992), indican que los agricultores que transplantan, deben cuidadosamente inspeccionar sus plantas y segregarse cualquier superficie conteniendo plantas con síntomas sospechosos. Las prácticas culturales en la casa o sitios de transplante deben ser diseñadas, para minimizar la manipulación de

plantas, estar conducidas también a descontaminar las manos, bancas, recipientes, y herramientas después del contacto con plantas, y destruir material de plantas descartadas. Los escombros incluyendo las sandías seleccionadas, de un campo que tuvo mancha bacteriana en fruto, deben enterrarse y/o ser destruidas, así como también eliminar las cucurbitáceas silvestres y otras cucurbitáceas cercanas a casas de transplante y campos de producción.

3.-Control químico.

S.A.R.H. (1994), menciona que el uso de sustancias químicas ha tomado un lugar muy importante para combatir organismos fitopatógenos, y su uso tan común se debe a su control efectivo. García (1962), indica que para el control de enfermedades bacterianas no ha sido económicamente recomendable, ya que son difíciles de controlar. Por lo que es recomendable recurrir con anticipación a una serie de medidas preventivas.

Sowell y Schaad (1979), recomiendan en semilla infectada por la bacteria *Acidovorax avenae pv. citrulli* el tratamiento con estreptomina y/o hipoclorito de sodio a razón de 1 mg/ml y 5 mg/ml respectivamente puede ser eficiente, pues dicho tratamiento logró reducir la incidencia de infección en plántulas en un 43 por ciento.

Hopkins, *et al.*, (1992), también recomiendan las aplicaciones de fungicidas que contienen cobre, ya que reducen la incidencia de los síntomas de la mancha

bacteriana; sin embargo, hay que considerar que altas concentraciones de cobre pueden impedir el desarrollo vegetativo de la sandía.

4.-Control genético.

Calderón (1986), menciona que las enfermedades bacterianas en plantas son difíciles de controlar, y uno de los problemas con que se encuentra el genetista en el desarrollo de variedades resistentes es que es excesivamente lento y complicado al incorporar genes deseados a una planta.

Wrage (1995), menciona que con respecto a este patógeno el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica está dirigiendo fuertes sumas de dinero para la creación de germoplasma resistente a este microorganismo.

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio de investigación se realizó en 2 fases. La primera consistió en la producción de antisuero para *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* y la segunda en la obtención de semilla de importación, un muestreo de plántulas, hoja desarrollada y fruto de sandía en la Comarca Lagunera. y su posterior análisis fitopatológico para la detección de la mancha bacteriana del fruto en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Producción de Antisuero para *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*

Para llevar a cabo la producción de antisuero para *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* y debido a que este microorganismo es de importancia cuarentenaria una de las primeras actividades que se realizaron fue obtener por parte de la Dirección General de Sanidad Vegetal la cepa bacteriana, de tal manera que una vez que se obtuvo, en el Departamento de Parasitología de la Universidad Antonio Narro, se procedió a lo siguiente:

Inmersión en suspensión bacteriana.

Para el caso de la mancha bacteriana del fruto, las pruebas de patogenicidad se realizaron en semilla, plántula y fruto. En la primera, embebiendo 20 semillas en una suspensión bacteriana de 10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y sembrando las semillas en vasos conteniendo de sustrato estéril. Las plántulas fueron inoculadas con la ayuda de un cotonete en los cotiledones a la misma concentración antes mencionada y en fruto fue punzando e inoculando una suspensión bacteriana de 10^8 UFC del microorganismo. Cabe indicar que para cada una de las pruebas fue considerado un testigo. Posteriormente, los órganos se ubicaron en cámaras húmedas a una temperatura de 35-41°C. En un periodo de cuatro a siete días.

Confirmación de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* mediante la técnica ELISA.

Otra forma de confirmar el microorganismo fue mediante la técnica serológica ELISA siguiendo el protocolo general de identificación de bacterias por ELISA.

Incremento del Microorganismo *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*

Sowell y Schaad (1979), indican que antes de inyectar al organismo de sangre caliente se debe hacer crecer suficiente inóculo bacteriano en medio sólido para fines prácticos de la metodología. Para el agente causal de la mancha

bacteriana del fruto se utilizaron medios específicos T125 y MS-153 (Randhawa; 1995), y así poder preparar suficientes tubos con suspensión bacteriana de 10 a la 8 UFC./ml en solución salina al 85 por ciento, ayudándose de una hematocímetro, (Kiraly, 1974). Una vez obtenida, las suspensiones bacterianas en tubos, se almacenaron en refrigeración a 4°C, hasta su utilización, así como también para estabilizar la bacteria y evitar un shock en el animal.

Preparación del Animal de Sangre Caliente

Para el desarrollo de la investigación se usaron conejos, preparándolos de la siguiente forma, como lo indica (Bokx, 1980; Valdés, 1995):

- Conejos con un peso de 3 Kg.
- Una edad de 9-24 meses.
- Raza Nueva Zelanda.
- Y evitando que las hembras estén embarazadas.

Obtención de suero normal.

Para la producción de antisuero, una primera fase es la obtención de suero normal, con la finalidad de que esta sirva como testigo con relación a el suero producido; y, para llevar a cabo este paso, el conejo debió haber estado en ayunas no menos de 24 horas para evitar la lipemia.

Villarreal (1980), menciona que para obtener el suero normal, es necesario que el animal esté calmado para dilatar la vena marginal de una de las orejas, de tal forma que sea bastante visible, y esto se logra con pequeños golpecitos en el lugar donde se encuentra la vena. Otra de las recomendaciones es que antes de hacer el corte se desinfecte el área de incisión con algodón y alcohol, al igual que rasurar el área misma, lo que se hizo previamente antes de obtener suero normal.

Ya dilatada la vena, se procedió a realizar una pequeña incisión con una navaja desinfectada. Se colectaron 15 ml en un tubo de ensaye, (el cual contiene un gel separador de suero y coagulo), procurando no golpear la sangre en las paredes del tubo y así evitar una posible hemolisis. Cuando se extrajo la cantidad disponible, para detener la hemorragia, se presionó con un algodón el área pinchada y se selló con un algodón disuelto en alcohol.

Una vez obtenida la sangre normal en los tubos, se procedió a realizar lo siguiente: Para asegurarnos de que el suero no tuviera eritrocitos los tubos se centrifugaron durante 15 minutos 5000 rpm., posteriormente el suero normal se concentró en un tubo previamente esterilizado adicionándole una gota de mertiolate para conservarlo estéril y en congelamiento. (LABCONC, 1975)

Plan de Inmunización .

El proceso de inmunización es considerado como la aplicación del antígeno mediante una serie de inyecciones para producir antisuero; la forma en que se produjo antisuero para *A.a.pv. citrulli* fue llevando a cabo cuatro esquemas de inmunización, lo anterior debido a que no todos los animales reaccionan de igual manera. Los esquemas se enlistan a continuación. Cabe indicar que en cada esquema se probaron dos conejos, a excepción del esquema tres en el que se utilizaron tres conejos.

Cuadro 3.1. Esquema de inmunización No.1.

DIA	VOLUMEN DE LA VACUNA A INYECTAR MI	VIA DE LA INYECCION
1	1	INTRAMUSCULAR
7	1	INTRAMUSCULAR
14	2	INTRAMUSCULAR

Cuadro 3.2. Esquema de inmunización No.2.

DIA	VOLUMEN DE LA VACUNA A INYECTAR MI	VIA DE LA INYECCION
1	0.1	INTRAMUSCULAR
3	0.3	INTRAMUSCULAR
7	0.3	INTRAMUSCULAR
10	1.0	INTRAMUSCULAR
15	2.0	INTRAMUSCULAR

Cuadro 3.3. Esquema de inmunización No.3.

DIA	VOLUMEN DE LA VACUNA A INYECTAR MI	VIA DE LA INYECCION
1	0.1	INTRAVENOSA
3	0.3	INTRAVENOSA
6	0.5	INTRAVENOSA
10	1.0	INTRAMUSCULAR
15	2.0	INTRAMUSCULAR
20	2.0	INTRAVENOSA

Para llevar a cabo las inyecciones, estas se realizaron mediante la técnica de López (1995); la cual indica emplear jeringas de 2-5 ml con una aguja tamaño 21 * 32 estériles y limpias y de preferencia agudas o filosas para que penetren fácilmente.

Titulación.

La prueba de titulación se realiza para tener conocimiento de que tan rico es el antisuero en anticuerpos. El procedimiento fue de la siguiente manera, (Kiraly, 1974);

Se realizó una extracción de sangre después de seis días de la última administración de la serie de inyecciones, tomando en cuenta los mismos pasos que se llevaron en la obtención de sangre normal.

Ayunar el conejo por 12 horas

Desinfectar y rasurar el área de incisión

Dar una serie de golpecitos para dilatar la vena

Realizar la incisión en la vena marginal

Evitar hemolisis al momento de extraer el suero.

Sellar área pinchada.

Centrifugar la sangre a 5000 rpm/ 15 min y separar el plasma para obtener el antisuero.

Por otra parte se prepararon 10 tubos con solución salina al 85 por ciento, adicionándoles el antígeno y el antisuero de la siguiente forma:

Cuadro 3.4. Prueba de titulación.

TUBO	SOL.SAL ML	DILUCION ANTISUERO ML	DILUCION	ANTIGENO	DILUCION FINAL
1	0.9	0.1	1:10	0.5	1:20
2	0.5	0.5 T-1	1:20	0.5	1:40
3	0.5	0.5 T-2	1:40	0.5	1:80
4	0.5	0.5 T-3	1:80	0.5	1:160
5	0.5	0.5 T-4	1:160	0.5	1:320
6	0.5	0.5 T-5	1:320	0.5	1:640
7	0.5	0.5 T-6	1:640	0.5	1:1280
8	0.5	0.5 T-7	1:1280	0.5	1:2560
9	0.5	0.5 T-8	1:2560	0.5	1:5120
10	0.5	0.5 T-9	1:3120	0.5	1:6240

NOTA: Si la titulación del suero resulta superior a 640 ó 1280 (sexto, séptimo tubo), significa que el antisuero producido es rico en anticuerpos.

otra parte mientras la sangre fluía, se sostenía la oreja con la vena hacia abajo para que la sangre cayera en un tubo con gel separador de suero y coágulo.

Finalmente, cuando se extrajo lo suficiente, se apretó con firmeza el área pinchada con algodón, para que la herida sellase sin ningún problema. Se realizó la separación del plasma del suero centrifugando los tubos a 5000rpm/15 min para almacenarlo.

Almacenamiento del antisuero.

Una de las formas de mantener viables por largo tiempo los antisueros es manteniéndolos en congelamiento. Por lo que una vez obtenido por separado el antisuero, este se concentró en tubos de ensaye a razón de 2 ml/ tubo, ya que si se almacena en cantidades grandes, al momento de su uso, el frecuente descongelamiento y posterior congelamiento resultaría destructivo.

La Región Laguna

La Región Lagunera se localiza en la parte central de la porción norte de los Estados Unidos Mexicanos, situada en la parte sudoeste del estado de Coahuila y noreste del estado de Durango. Está ubicada entre los meridianos 102° 00' y 104° 47' W de longitud oeste y los paralelos 24° 22' y 26° 53' de latitud norte, con una altura de 1,139 msnm. (Sastre, 1992).

Maeda (1992), indica que la Región Lagunera es una de los más importantes áreas de desarrollo, no solo de Coahuila y Durango sino del país, es una de las regiones en que ha sido dividida la entidad, en función de las características de desarrollo económico y social de cada una de ellas.

La Comarca, importante zona productora agrícola, está integrado por:

Municipios de Durango:

Lerdo, Gómez Palacio, Mapimí, Nazas, Rodeo, Tlahualilo, Simón Bolívar, San Juan de Guadalupe, San Luis del Cordero y San Pedro del Gallo.

Municipios de Coahuila:

Matamoros, San Pedro, Torreón, Viesca y Francisco I Madero.

Características del Clima.

El clima de la comarca lagunera es árido y muy seco (estepario-desertico), es cálido tanto en primavera como en verano, con invierno fresco. La temperatura máxima media es de 29°-32° C, una mínima media de 10°C y una media de 22° C. La precipitación pluvial es escasa, encontrándose la atmósfera desprovista de humedad. La precipitación media anual varía entre 77.6 mm y 434 mm. El periodo máximo de precipitación queda comprendido entre los meses de agosto y

septiembre, por lo que generalmente es nula en la mayor parte época de demanda de agua, sin embargo, esta área desde la década de los 40's hasta la fecha, con el reparto agrario en la Laguna, el empleo de recursos federales para la utilización de fertilizantes, insecticidas, semillas mejoradas y sobre todo la construcción de las presas Francisco Zarco y Lázaro Cardenas para el aprovechamiento de las aguas de los ríos de la región, la perforación de pozos y una extensa red de canales, han permitido el florecimiento de la agricultura e incrementado el nivel de vida en el campo lagunero.

En la Comarca Lagunera debido a sus condiciones antes mencionados, ha favorecido la adaptación y el establecimiento de diversos cultivos hortícolas entre los cuales, la sandía es uno de los más importantes.

De los Municipios que comprenden la Región Laguna y que dirigen gran superficie para la producción de sandía (INEGI, 1992), son los siguientes:

Cuadro 3.5. Superficie cultivable de sandía en la Comarca Lagunera.

ESTADO DURANGO	AÑO 1991 Hectáreas	AÑO 1992 Hectáreas
Gómez Palacio	87	80
Mapimi	105	98
Nazas	46	38
Tlahualilo	450	425
Total	648	641
ESTADO COAHUILA	AÑO 1991 Hectáreas	AÑO 1992 Hectáreas
Viesca	350	335
Matamoros	210	198
San Pedro	158	155
Torreón	105	102
Fco. I Madero	72	72
Total	895	862

Con respecto al segundo objetivo que consiste en determinar la presencia de la Mancha bacteriana del fruto en la Comarca Lagunera, la forma en que se llevó a cabo, fue de la siguiente manera:

Obtención de Semilla de Sandía de Importación que se Siembra en la Región Lagunera.

Obtención de la Semilla:

La obtención de la semilla fue mediante la colaboración de la Confederación Nacional de Productores Hortícolas (CNPH) Región Laguna; donde cada uno de los productores facilitaron una cantidad entre 50-80 semillas para un posterior análisis en laboratorio.

Muestreo en la Comarca Lagunera.

Para el muestreo de lotes se tomó en cuenta el método llevado a cabo en el Muestreo Nacional de Papa por parte de Dirección General de Sanidad Vegetal, (S.A.R.H., 1994), ya que por este método se logra detectar la presencia o no de enfermedades de Importancia Cuarentenaria en el cultivo.

El muestreo se realizó en tres etapas fenológicas del cultivo: una en estado plántula , hoja desarrollada y en etapa de fructificación.

1.-El muestreo se realizó en los diferentes municipios productores de sandía, donde solamente se muestreó el 10 porciento del total de superficie cultivable dirigida al cultivo de sandía.

2.-Conocida la superficie que sería muestreada en cada municipio, se dividió entre 5 ha que sería considerada como "parcela hipotética" a muestrear. El número resultante indicó la cantidad de predios que serían muestreados.

3.-Conforme al padrón de productores de sandía por la Confederación Nacional de Productores Hortícolas Región Laguna (CNPHD) se hizo un sorteo para realizar el muestreo en la cantidad de lotes que hayan resultado anteriormente.

De los lotes que resultaron positivos en el sorteo, el muestreo fué de la siguiente manera:

4.-El lote se dividió en cinco puntos, siempre y cuando éste tuviera una superficie mayor de 5 ha; de lo contrario si la superficie fué menor de 5 ha el lote se dividió en dos puntos.

5.-Cada punto equivale a 1 ha En cada punto =(1 ha) se trazó una " línea diagonal imaginaria" de esquina a esquina, y en esa "recta trazada" se realizó la toma de muestras de la siguiente forma:

6.-Se realizaron tomas de 10 muestras por punto

7.-Terminado el muestreo en el primer punto, se repitió el mismo procedimiento en los puntos restantes hasta completar 5 ó 2 considerando el punto número cuatro.

Conservación de muestras

Cada una de las muestras colectadas se envolvieron con papel secante húmedo previamente identificadas y se ubicaron en una hielera para ser trasladadas al Depto. de Parasitología para un posterior análisis.

Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en Semilla, Plántula, Hoja desarrollada y Fruto de Sandía sobre Medios Específicos.

EL análisis de los diferentes órganos vegetativos se realizó de la siguiente manera:

Análisis de Semilla en Medios de Cultivos Específicos:

El análisis de la semilla consistió tomando en cuenta la técnica de Randhawa, (1996):

- 1.- Se pesó por separado cada una de las muestras de semilla obtenidas por cada productor.
- 2.- Debido a que la semilla presentaba un tratamiento químico, esta se lavó en agua corriente, durante 30 minutos.

- 3.- Posteriormente cada una de las muestras se ubicaron en charolas de plástico, A cada gramo de semilla de sandia se adhirieron dos ml de solución amortiguadora fosfatasa con un pH de 7. Tomando en cuenta que las charolas fueran hondas y amplias, con la finalidad de que la semilla no se amontonara, respirara y liberara eficientemente la bacteria.
- 4.- Las charolas se incubaron durante 12 horas en refrigeración a 4°C.
- 5.- Después, se tomaron 10 ml de la suspensión amortiguadora (suspensión madre) de cada una de las charolas por separado.
- 6.- Se realizaron cuatro diluciones de la suspensión madre (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}).
- 7.- De la última dilución se tomó punto un mililitro y se sembró en medio de cultivo específico MS153 por el método de dispersión por varilla.
- 8.- Se incubaron las cajas durante siete días a una temperatura de 34°C. Es importante mencionar que la coloración del medio originalmente es verde. En caso de que haya presencia de *Acidovorax avenae pv. citrulli* en el medio de cultivo ocurre un cambio de color de verde a azul, así como también las colonias bacterianas de la bacteria estudiada, son primeramente de color verde cambiando en el transcurso de los siete días a un color azul-verdoso.
- 9.- De las colonias esporuladas se les realizó una Prueba de Oxidasa.
- 10.- De las colonias positivas se sembraron en medio de cultivo específico T-125 por la técnica de estría en cuadrante.
- 11.- Posteriormente se incubaron los medios a una temperatura de 35°C durante 7 días con las características de que las colonias bacterianas de *Acidovorax avenae pv. citrulli* sobre este medio presentan una zona de hidrólisis.

12.- De las colonias bacterianas positivas, se sembraron en medio de cultivo BDK con las características de que las colonias bacterianas de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* no presentan fluorescencia.

Análisis de Plántula, Hoja desarrollada y Fruto en Medios de Cultivos Específicos:

Para llevar a cabo el análisis, se tomó en cuenta la técnica de Randhawa, (1996):

- 1.-Una vez presentes las muestras vegetativas, éstas, primeramente pasaron por un proceso de cortes promedio de 0.5 a 1 cm de diámetro. Los cortes se almacenaron en soluciones salinas al 85% (suspensiones madres) previamente identificados.
- 2.- Se realizaron cuatro diluciones de la suspensión madre con cortes vegetativos a (10^{-1} , 10^2 , 10^{-3} y 10^{-4}) . Posteriormente se siguieron los mismos pasos que en la detección del microorganismo en semilla (siete al doce)

Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*

en Semilla, Plántula, Hoja desarrollada y Fruto con el Antisuero Producido

La técnica que se utilizó, fué Aglutinación en portaobjeto, (Kiraly, 1974).

Aglutinación en Portaobjeto

Esta técnica consistió en poner en un portaobjetos cóncavo, 0.1ml de antisuero, disolver posteriormente una gota del antígeno. Los resultados a obtener mediante esta técnica son:

Prueba positiva: Aglutinación presente

Prueba negativa: No aglutinación

Detección de *Acidovorax avenae* pv. *Citrulli*

en Semilla, Plántula, Hoja desarrollada y Fruto por la Técnica ELISA.

Para la detección del microorganismo estudiado, con respecto a la técnica serológica ELISA, se consideró el protocolo general que se sigue a nivel general para detección de bacterias. AGDIA.

Semilla:

La detección de la bacteria en semilla fue tomando una alícuota de la suspensión amortiguadora fosfatasa al 7 pH (suspensión madre) que se tomó de las charolas(técnica; Randhawa, 1996), así como también de las colonias bacterianas positivas de los medios específicos.

Plántula, hoja desarrollada y fruto:

La detección en éstos órganos fue directamente de la solución salina al 85 por ciento conteniendo cortes vegetativos (suspensión madre). Así como también de las colonias bacterianas positivas de los medios específicos.

Pruebas de Patogenicidad a Bacterias Positivas con los Diferentes Métodos de Detección (Medios Específicos, ELISA y Antisuero Producido)

No obstante que se detecten organismos causantes de enfermedades por una gran variedad de métodos de detección, siempre es bueno reafirmar con un apartado más a el patógeno estudiado, y esto se puede llevar a cabo por pruebas de patogenicidad.

Para la reafirmación de las bacterias *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* que resultaron ser positivas en los anteriores métodos de detección, las pruebas de patogenicidad fueron llevando a cabo la técnica de Randhawa, (1996)

1.- Se inocularon plántulas de sandía de 25-35 días de edad, con la ayuda de cotonetes. Posteriormente se taparon con bolsas de polietileno para mantener una alta humedad relativa e incubaron a una temperatura de 35°C - 41°C durante cinco a siete días hasta observar síntomas típicos de la bacteria en estudio; conjuntamente

con un testigo positivo de la bacteria *A.a.pv. citrulli* y un testigo negativo con pura agua destilada estéril.

RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo a la metodología anteriormente citada, los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Producción de Antisuero para *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*

Obtención de la Cepa Bacteriana.

Con respecto al primer objetivo que consistió en la producción de anticuerpo, uno de los primeros pasos fue obtener la cepa bacteriana *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (antígeno) por parte de la Dirección General de Sanidad Vegetal, la cual fué donada en dos medios específicos bacterianos que llevan por nombre T125 y MS153 ya que por información bibliográfica y comunicaciones personales con autoridades en Sanidad Vegetal este microorganismo es de Importancia Cuarentenaria, lo que significa que la presencia de este patógeno en la República Mexicana es nula.

Confirmación del Patógeno.

Una vez obtenido el microorganismo, en el laboratorio de fitopatología del Departamento de Parasitología de la U.A.A.N., el patógeno fué confirmado

mediante pruebas de patogenicidad, y la técnica serológica ELISA, donde en la primera, se obtuvo que los síntomas resultantes de la inoculación coinciden ser similares a los que menciona (Hopkins, 1992 y Randhawa, 1996), los cuales son los siguientes:

Para semilla, resultó, que de las 20 semillas una vez embebidas en una suspensión bacteriana de 10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), 14 no germinaron, y las que lograron germinar, entre los 7 y 15 días bajo condiciones favorables de la enfermedad, presentaban una acuosidad en tallo y una marchitez, los cotiledones mostraban manchas irregulares de aspecto más oscuro y grasoso con relación al área sana y, finalmente, una muerte de la plántula.

Cabe indicar, que en las semillas que no lograron germinar, presentaban la testa acuosa, blanda y abierta con presencia del epicotilo.

En plántula, también se utilizó el mismo número que en semillas, de las cuales los síntomas fueron: primeramente manchas irregulares, en un principio claras y posteriormente oscuras y de aspecto grasiento, y al cabo de siete a 10 días la muerte.

Para el caso de fruto, se utilizaron tres frutos con su respectivo testigo, donde los inoculados, mostraban en un principio exudados bacterianos, posteriormente manchas grasosas que con el paso del tiempo fueron coalesciendo y

agrietando la superficie del fruto. A los frutos, se les realizó un corte transversal, en los cuales se observó un avance de la enfermedad hacia el interior, la cual, se puede manejar como una de las formas en que la bacteria puede infectar la semilla para posteriormente ésta ser distribuida para venta y a su vez ser diseminado el microorganismo.

Cabe aclarar que otra de las finalidades de la confirmación de la bacteria mediante Pruebas de Patogenicidad, era el de familiarizarse con los síntomas, ya que sería de gran utilidad con respecto al segundo objetivo que consistió en muestreo y detección de la bacteria en la Comarca Lagunera

Otra de las técnicas que se utilizaron para confirmar el microorganismo fue usando la técnica serológica ELISA, donde se obtuvo un resultado positivo para la cepa donada por la D.G.S.V. así como también para las suspensiones bacterianas obtenidas de las Pruebas de Patogenicidad antes mencionadas.

Después de haber confirmado el microorganismo, se procedió a incrementar suficiente inóculo, resemebrando colonias bacterianas de la cepa donada en medios específicos T125 y MS153 de Randhawa, 1996, con la finalidad de producir antisuero para *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*.

Producción de Antisuero.

Para la producción de antisuero para *A.a. pv. citrulli*, se utilizaron conejos raza Nueva Zelanda con un peso entre 600 grs a 2 Kg, los cuales fueron mantenidos en jaulas apropiadas y alimentados con alimento concentrado comúnmente conocido como conejina (Valdes, 1995).

Debido a que no todos los animales de sangre caliente reaccionan igual a un antígeno ya que la capacidad de resistencia varía en cada uno de ellos, se llevaron a cabo tres esquemas de inmunización, de los cuales sólo un esquema resultó ser eficiente para producir un alto contenido de anticuerpos, el cual corresponde al esquema número tres de la metodología planteada, ya que una vez que se realizó la prueba de título antes de la inyección del recuerdo, la aglutinación y precipitación fué observada en el séptimo tubo, lo que no ocurrió con los conejos tratados con los otros esquemas. Cabe indicar también, que la aglutinación fué reafirmada realizando lecturas bajo el microscopio compuesto, la cual consistió en poner una gota de cada una de las diluciones por separado en portaobjetos para después observar una microagluinación con la ayuda de un microscopio compuesto (Bokx, 1980).

Cuadro 4.1. Esquema de inmunización 3.

DIA	VOLUMEN DE LA VACUNA A INYECTAR MI	VIA DE LA INYECCION
1	0.1	INTRAVENOSA
3	0.3	INTRAVENOSA
6	0.5	INTRAVENOSA
10	1.0	INTRAMUSCULAR
15	2.0	INTRAMUSCULAR
20	2.0	INTRAVENOSA

Posteriormente a los conejos bajo tratamiento con este esquema, después de la inyección del recuerdo, la aglutinación fue observada hasta el noveno tubo lo que indica un alto contenido de anticuerpos.

Después de conocer el título, se procedió a obtener de los mismos conejos, 20 ml de sangre cada tercer día durante una semana. El antisero fue posteriormente almacenado en tubos de ensaye previamente esterilizados en cantidades de dos ml Estos fueron sellados y almacenados en congelamiento hasta su posterior uso.

Una vez que el antisuero se produjo, se probó mediante la técnica de aglutinación en portaobjeto a las suspensiones bacterianas obtenidas de las pruebas de patogenicidad que se realizaron para la confirmación del patógeno, las cuales resultaron ser positivas.

Detección de la Mancha Bacteriana del Fruto en la Comarca lagunera.

Con respecto a el objetivo dos, que consistió en la detección de la mancha bacteriana del fruto en semilla de importación dirigida a la Comarca Lagunera, y un muestreo en lotes de sandía de la misma área, los resultados fueron los siguientes:

Obtención de semilla de Importación dirigida a la Comarca Lagunera.

Se obtuvo por parte de los productores una donación entre 50 y 80 semillas. El número de muestras que se lograron, fueron 24 en total, de las cuales algunas de ellas incluían a más de un productor. Cabe indicar que se colectaron cuatro diferentes variedades de dos casas comerciales, de las cuales una variedad se siembra en un 85-90 por ciento más con relación a las otras tres.

Diagnóstico fitopatológico de semilla mediante técnica Randhawa.

Posteriormente, una vez obtenida la semilla, en el laboratorio de Parasitología de la U.A.A.A.N., los resultados del diagnóstico en semilla, por medio de la

Técnica de Randhawa, ELISA y Anticuerpo producido, se pueden observar en el Cuadro 9, obteniendo que bajo la técnica de Randhawa, la semilla viene infectada por *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*, únicamente en semilla obtenida por productores pertenecientes a los municipios de Gómez Palacio y Tlahualilo, Dgo., lo anterior debido a las características que presentaban las colonias, los medios específicos, el selectivo y la reacción en la Prueba de Oxidasa; lo mismo ocurrió en la semilla obtenida de Matamoros y Viesca, Coah. pero con la diferencia de que las colonias al probarlas con la prueba de oxidasa, no daban una reacción positiva al cabo de 10-15 segundos como lo menciona Randhawa, 1996, lo que fué un indicativo para considerar negativa la presencia del microorganismo en semilla de productores pertenecientes a los dos últimos municipios anteriormente citados. Cuadro 4.2.

Diagnóstico fitopatológico de semilla mediante técnica ELISA.

Con respecto a la técnica ELISA los resultados fueron, que mediante esta técnica, la semilla obtenida del municipio de Gómez Palacio, Dgo. resultó ser únicamente positiva a la presencia del microorganismo en estudio. Con la característica de que las muestras en las placas no mostraban un resultado positivo visual, pero al comparar los valores obtenidos de las muestras procesadas con respecto a

Cuadro 4.2. Presencia de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla donada por productores de la Comarca Lagunera.

Municipio	Ejido	Técnica Randhawa, 1996.				ELISA	Antisuero producido
		T125	MS153	BDK	P.OX.		
Gómez Palacio, Dgo	6 de Octubre, Providencia y Lázaro cardenas	+	+	+	+	+	+
Tlahalilo, Dgo.	Lucero, Pompella, Jauja y Horizonte	+	+	+	+	-	+
Matamoros Coah.	Matamoros y Cong. Hgo.	+	+	+	-	-	+
Viesca	Lázaro, Cardenas	+	+	+	-	-	-

+ =Prueba positiva

- =Prueba negativa

T125 y MS153 = Medios de cultivo específicos para *A.a.pv. citrulli*

BDK =Medio de cultivo selectivo de la serie Schaad.

P.OX. =Prueba de Oxidasa

a el testigo, las muestras pertenecientes a este municipio resultaron ser positivas para el patógeno.

El criterio que se utilizó para decidir si las muestras estaban infectadas o no, fué considerando las reglas indicadas por el Centro Nacional de Referencia de Diagnostico Fitosanitario de la D.G.S.V., la cual consiste en:

Sacar una media de tres valores testigos negativos (Buffer) y multiplicar el resultado por dos. A partir de el valor del resultado obtenido de esta operación (Valor de decisión), las muestras fueron consideradas como positivas.

$$VD = \frac{T-1 + T-2 + T-3}{3} * 2$$

VD= Valor de decisión

T-1= Testigo negativo 1

T-2= Testigo negativo 2

T-3= Testigo negativo 3

Diagnóstico fitopatológico de semilla mediante antisuero producido.

Con respecto a la técnica de aglutinación y microaglutinación en portaobjeto con el antisuero producido, los resultados fueron positivos para *A.a.pv. citrulli* en

muestras de semilla obtenidas de productores de todos los Municipios muestreados, con excepción del Municipio de Viesca, Coah.

Como se puede observar, en el cuadro anterior los resultados varían llevando a cabo las tres técnicas de diagnóstico, y es precisamente la ELISA la que varía marcadamente con respecto a las otras técnicas; esto pudo haber sido probablemente al criterio tomado para considerar una muestra positiva a partir del valor de decisión, ya que hubo valores de muestras procesadas por debajo pero muy cercanos al valor de decisión, de ahí pues la importancia de la diferencia de resultados y definir si esas muestras presentaban o no células bacterianas pertenecientes a *A.a. pv.citrulli*.

Muestreo de Plantula, Hojas desarrollada y Fruto en Lotes de Sandía de la Comarca Lagunera.

Por otra parte, debido a la situación política y social que vive la Comarca Lagunera con respecto al agua de riego y el establecimiento de zonas compactas, repercutió que la superficie de sandía descendiera de una superficie de 1203 ha que se sembraron en 1992 a 430 ha en 1996, lo que originó que el área considerada de muestreo para este estudio, disminuyera marcadamente. Sin embargo, aún cuando la metodología planteada marcara un 10 por ciento de lotes a muestrear, en algunos lotes fue necesario muestrear más de lo indicado debido a la petición que hacían el o los productores.

En el cuadro 10, se muestran los Municipios con sus respectivos comunidades ejidales y número de hectáreas que fueron muestreadas para detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*.

Cuadro 4.3. Comunidades ejidales y hectareaje muestreado en la Comarca Lagunera de plántula, hoja y fruto, para detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*.

Municipio	Ejido	Total de ha	Número de ha
Gómez Palacio, Dgo	6 de Octubre, Providencia y Lázaro cardenas	49	10
Tlahalilo, Dgo.	Lucero, Pompella, Jauja y Horizonte	116	24
Matamoros Coah.	Matamoros y Congregación Hgo.	54	16

Análisis Fitopatológico de Organos Vegetativos Muestreados en la Comarca Lagunera.

Por lo que respecta al diagnóstico de plántula, hoja y fruto muestreado en la Región Lagunera, para detección de la mancha bacteriana del fruto *Acidovorax avenae pv. citrulli*, por medio de las técnicas de Randhawa, ELISA y Antisuero producido, los resultados se observan en el cuadro 11, donde se puede ver que los tres Municipios muestreados resultan ser negativos a la presencia de este organismo bajo las técnicas llevadas a cabo. Cuadro 4.4.

Como se puede observar, al comparar los resultados obtenidos en el diagnóstico de semilla con los de plántula, hojas y fruto, indican que la semilla viene infectada por el agente causante de la mancha bacteriana del fruto *A.a. pv. citrulli*; sin embargo, por condiciones adversas al patógeno que presenta la Comarca lagunera como es la sequía principalmente, origina que el patógeno no tenga la capacidad de sobrevivir y por lo tanto no producir una infectibilidad en la planta de sandía, lo que da lugar a que al ser procesadas las muestras vegetativas con los diferentes métodos de detección para *A.a. pv. citrulli* resulten negativos.

Cuadro 4.4. Presencia de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en plántula, hojas y frutos muestreados en lotes de la Comarca Lagunera.

Municipio	Organo vegetal	Técnica de Randhawa				ELISA	Antisuero producido
		T125	MS153	BDK	P.OX.		
Gómez	Plántula	+	+	-	-	-	-
Palacio, Dgo	Hoja	+	+	-	-	-	-
	Fruto	+	+	-	-	-	-
	Plántula	+	+	-	-	-	-
Tlahalilo, Dgo.	Hoja	+	+	-	-	-	-
	Fruto	+	+	-	-	-	-
	Plántula	+	+	-	-	-	-
Matamoros Coah.	Hoja	+	+	-	-	-	-
	Fruto	+	+	-	-	-	-
	Plántula	+	+	-	-	-	-

+ =Prueba positiva

- =Prueba negativa

T125 y MS153 = Medios de cultivo específicos para *A.a.pv. citrulli*

BDK =Medio de cultivo selectivo de la serie Schaad.

P.OX. =Prueba de oxidasa

Pruebas de Patogenicidad a Bacterias Obtenidas como Positivas para *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* Mediante los Tres Diferentes Métodos de Detección.

Por lo que respecta a las pruebas de patogenicidad a bacterias positivas en los diferentes métodos de detección, solamente se llevaron a cabo en colonias bacterianas obtenidas mediante la Técnica de Randhawa, ya que al querer obtener crecimientos bacterianos de algunas muestras donde fue positivo para ELISA y Antisuero producido, fue muy difícil, esto se pudo deber principalmente a que esta bacteria tiene un tipo de nutrición muy específica, lo que origina que bacterias saprófitas le ganen el crecimiento, ya que el microorganismo se quiso obtener usando los diferentes medios tradicionales de la serie Schaad.

Los resultados obtenidos de estas colonias al ser inoculadas en plántulas de 25-30 días con un respectivo testigo positivo y negativo, bajo condiciones favorables de la enfermedad, resultaron ser que ninguna de las bacterias que se manejaron como positivas mediante la técnica de Randhawa, manifestaron los síntomas característicos de la bacteria *A.a. pv. citrulli* como sí ocurrió con el testigo positivo obtenido de la cepa donada por la D.G.S.V..

Sin embargo, cabe indicar que de las plantas inoculadas una de ellas manifestó los síntomas característicos de la bacteria, lo anterior debido probablemente a que la bacteria venía presente desde la semilla.

CONCLUSIONES

Debido a los resultados antes mencionados se concluye lo siguiente:

Sólo un esquema de los tratados fue conveniente para la producción de antisuero.

La presencia de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla de importación dirigida a la Comarca Lagunera, es positiva en semilla de importación bajo las tres técnicas de detección.

El aislamiento del microorganismo en estudio resultante positivo en semilla, para comprobarlo mediante las pruebas de patogenicidad se dificultó, probablemente a su complicado metabolismo de nutrición.

La presencia de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en las diferentes etapas vegetativas (plántula, hoja desarrollada y fruto) muestreadas en la Comarca Lagunera resultó negativo bajo las tres técnicas de detección.

RESUMEN

La economía agrícola a nivel mundial en los últimos años se ha visto afectada, debido en gran parte a problemas fitosanitarios, al presentarse un cambio radical dentro del comercio internacional, con el movimiento de material vegetativo, las plagas están dispersándose por todo el mundo; tal es el caso en Estados Unidos de América donde el microorganismo *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* produce la putrefacción del fruto de sandía teniendo la capacidad de diseminarse por semilla. La República Mexicana importa grandes cantidades de semilla de sandía de los Estados Unidos por lo que es necesario contar con métodos de diagnóstico con una sensibilidad capaz de detectar al organismo.

Por otro lado, la Comarca Lagunera, región que comprende parte de los estados de Durango y Coahuila e importante área productora de sandía, entre los agricultores se ha presentado una serie de conjeturas y/o especulaciones respecto a su presencia.

La presente investigación tuvo por objetivo la producción de antisuero para la bacteria *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* y determinar su presencia en la Comarca Lagunera.

Se obtuvo por parte de la Dirección General de Sanidad Vegetal el microorganismo bacteriano *Acidovax avenae* pv. *citrulli*; posteriormente, con la finalidad de que el microorganismo estuviera purificado, se confirmó por la técnica ELISA y pruebas de patogenicidad inoculando semillas, plántula y fruto de sandía. Se incrementó suficiente inóculo para producir su antisuero correspondiente; para ello se utilizaron tres esquemas de inmunización, resultando uno de ellos propicio para la producción de antisuero.

Por otra parte, en la Comarca Lagunera se obtuvo semilla de sandía por parte de los agricultores para su posterior detección del agente causal de la mancha bacterina del fruto; durante el desarrollo vegetativo de la sandía en dicha región, se muestrearon lotes considerando el método de Muestreo Nacional por parte de la Dirección general de Sanidad Vegetal. El muestreo se realizó en tres etapas: plántula, hoja desarrollada y fruto.

El análisis de las muestras vegetativas se llevó a cabo el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, el cual consistió considerando tres métodos de detección; Medios específicos de Randhawa, ELISA y Antisuero Producido. Para el caso de semilla se obtuvo que uno de los municipios de la Región Lagunera resultó positivo a la presencia del organismo en estudio; con respecto a plántula, hoja desarrollada y fruto el resultado fué negativo. Posteriormente a las muestras vegetativas resultantes positivas para *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* mediante los métodos de detección anteriormente citados, se

procedió a confirmar mediante pruebas de patogenicidad en plántulas de sandía, considerando un testigo positivo y uno negativo, del cual se obtuvo un resultado negativo.

LITERATURA CITADA

Austín, P. 1992. Taxonomía Bacteriana Moderna. LIMUSA. México, D.F.
p.78-81. México.

Bradbury J.F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. Cab
International Mycological Institute. Graet Britain. p. 144-146.

Bokx, J. 1980. Virosis de la Papa y de la Semilla de Papa.
Hemisferio Sur S.A. p. 95-113. . Argentina

Calderón, S. 1986. Fitopatología. Universidad Autónoma Chapingo
Chapingo, Méx. 84p. México.

Centro Internacional de la Papa (CIP). 1980. Serología. Departamento de
Serología. Laboratorio de Virología. Lima, Perú.

Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). 1980. La Importancia
del Control Legal en el Servicio de Inspección Fitosanitaria.
Reporte Interno. México, D.F. 6 p.

- Elliott, R. A. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Great Britain. p. 211.
- Fahy, P.C. and Persley G.J..1983. Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. Academic Press. Nueva York. p.124. U.S.A.
- Flores, O. A. 1994. Producción de Antisuero contra *Agrobacterium tumefaciens*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Buenavista, Saltillo, Coah.9 p.México.
- Gallegos, L. C.1978. Enfermedades de Cultivos en el Estado de Sinaloa. INIFAP. Culiacán, Sinaloa, Méx. p.1-2. México.
- García, C. F. 1962. Fitopatología. Escuela Particular de Agricultura. Cd. Juarez, Chihuahua. p.49. México.
- Goto, M.1992. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. Unites States of America. p. 37-51.U.S.A.
- Hampton, R., Valle, A. and De Boer. 1990. Serological methods for detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. United States of America. APS Press. p. 77. U.S.A.

- Hernández, M.B. 1994. Introducción a las Técnicas de Serodiagnostico.
D.G.S.V. Méx., D.F. p.19-21. México.
- Hopkins, D., Gay, D. and Cook, W..1992. Bacterial Fruit Blotch of
Watermelon. The Hybrid Vegetable Seed Company. 4 p.
U.S.A.
- Hopkins, D., Gay, D. and Cook, W..1994.Bacterial Fruit Blotch of
Watermelon. The Hibrid Vegetable Seed Company. 4 p.
U.S.A.
- USDA. 1960. Index of Plant Diseases in the Unitd States. Crops
research division agricultural research service
United States Departament of Agriculture.Washington, D.C.
U.S.A.
- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI).1992.
Aspectos de Producción Agrícola. 808 p. México.
- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI). 1993.
Aspectos de Producción Agrícola. 904 p. México.
- Kiraly, G. Z.. 1974. Methods in Plant Pathology.. Elsevier Scientific
Publ. Co. New York p. 170-180. U.S.A.

- Labconco Corporation. 1975. Instruction Manual Freeze Dry. Kansas City Kansas. 19 p. U.S.A.
- Latin, R. and Rane, K. 1990. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon in Indiana. *Plant Dis.* 74:331.
- Latin, R., and Hopkins, D. 1995. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon. *Plant Dis.* 78:761-765.
- López, A. G. 1982. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 43 p. México.
- López, N. G. 1995. Pruebas Serológicas e Inmunológicas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coah. 11 p. México
- Maeda, R.R. 1992. Caracterización de 14 Genotipos de Sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf. Tesis Profesional. U.A.A.A.N.U.L. Torreón, Coah., Méx. p.6-8.
- Manovsky, E.C. 1982. Identificación de Bacterias Fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 84 p. México.

Mendoza, C. Z. y Pinto, B. C. 1983. Principios de Fitopatología. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. p. 1-4. México.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1991. Diagnóstico de Bacterias, Hongos y Nemátodos Fitopatógenos. 1a. Madrid España. p.313-364. España.

Montes, B. R. 1992. Identificación de Hongos Fitopatógenos. Instituto Politécnico Nacional (IPN). Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Oaxaca, Oax. p.1-13. México.

Neergaard, P. 1977. Seed Pathology. Vol. 1. Halsted Press Book. New York p.793-797.U.S.A.

Pelczar, M., Roger, D. y Chan, E. 1977. Microbiología. Mc Graw -Hill. México, D.F. p.176. México.

Pelczar, M. J. 1981. Elementos de Microbiología. McGreaw-Hill. México, D.F. p. 427-430. México.

Peralta, E. y Frias, M. 1987. Manual Sobre la Técnica Inmuno Enzimática ELISA. Empest, Habana, Cuba. p. 70. Cuba.

Randhawa, P. 1995. Fruit Blotch Testing Protocol. Seed and Plant Lab.

Roseville CA. 5 p. U.S.A.

Randhawa, P. 1996. Fruit Blotch Testing Protocol. Seed and Plant Lab.

Roseville CA. 5 p. U.S.A.

Rodríguez, M. M. 1991. Manual de Bacterias Fitopatógenas. Universidad

Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 91 p. México.

Roitt, I., Brostoff, J. y Male, D. 1986. Inmunología. Medsi. 1a. edición.

Madrid España. 900 p. España.

Salle, A. J. 1948. Fundamental Principles of Bacteriology. Mc

Graw-Hill U.S.A. p. 1-55. U.S.A.

Sastre, F. 1992. Efectos de dos Reguladores del Crecimiento Vegetal de la

Sandía (*Citrullus lanatus*). Tesis Profesional. U. A.A.A.N.

Buenavista, Saltillo, Coah. p. 1-2. México.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1992. Servicio

General de Sanidad Vegetal. Dirección General

de Sanidad Vegetal. México, D.F. 31p.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH).1994. Catálogo Oficial de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICLOPLAFEST). México, D.F. p. 2-3.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1994. Manual de Muestreo y Procesamiento para la identificación de los Principales Patógenos de la Papa. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, D.F.16p. México.

Somodi, C. and Jones, J. 1991. Occurrence of a Bacterial Watermelon Fruit Blotch in Florida. *Plant Dis.* 75: 1053-1056

Soweell, G. and Schaad, N.1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* pv. *citrulli* on Watermelon seed Transmission and Resistance on Plant Introduction.*Plant Dis.Reptr.* 63:437-441.

Starr, P. M. 1982. *Pathogenic Bacteria.* Springer-Verlag. New York p. 701. U.S.A.

Torres, L. J. 1980. Bacterias Fitopatógnas. Tesis M.C.

Chapingo, México, Escuela Nacional de Agricultura, Colegio de Postgraduados. 65 p. México.

Valdés, D. R. 1995. Cría y Explotación del Conejo. Secretaría de Agricultura y

Recursos Hidraulicos. Secretaría de Fomento

Agropecuario de Coahuila. Saltillo, Coah. 1-3p. México.

Villarreal, G.L.A. 1980. Supervivencia (Dispersión y patogenicidad de *Erwinia carotovora* y su relación con *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorun*) Tesis M.C. Colegio de Postgraduados. S.A.R.H.. Montecillos, Méx. 92 p. México.

Walter, W.G. and MacBee, R.H. 1965. Microbiology General.

CONTINENTAL. México, D.F. p. 168. México.

Wrage, K. 1995. Update: Watermelon Fruit Blotch. Seed and Crops

Industry. p. 14-15. U.S.A.