

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

Abiel Sánchez Arizpe¹, Ma. Elizabeth Galindo Cepeda¹, Leticia Bustamante García¹, Jorge
Luis Salazar González²

¹ Profesores investigadores del Departamento de Parasitología y del Centro de
Capacitación de Tecnología de Semillas de la Universidad Autónoma
Agraria Antonio Narro.

² Tesista de posgrado de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

RESUMEN

El cultivo del tomate ocupa el segundo lugar nacional desde el punto de vista de superficie sembrada y el primero por su valor de producción. A este cultivo lo afectan varios agentes patógenos, entre los que está la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, considerada la más peligrosa. Al importar semilla de tomate, se corre el riesgo de introducir al país cepas más patogénicas, ya que este microorganismo se transmite por esta vía.

El objetivo de este trabajo fue determinar el mejor método para la detección de la bacteria *X. c. pv. vesicatoria* en semilla de tomate. Esta investigación se realizó en laboratorios e invernadero de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, donde se analizaron semillas de lotes comerciales de las variedades Hayslip,

Homestead 61, Río Grande y Winner. Se colocaron 12 gramos de semillas de cada variedad en un buffer fosfato 0.05 M, a 4°C, durante toda una noche, y posteriormente se realizaron diluciones seriadas del filtrado de la semilla y del buffer. Se sembró 0.1 ml, de cada dilución (solución madre, 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) para la recuperación de la bacteria en los métodos Tween B, CKTM y TBCK, bajo un arreglo bifactorial tres por cuatro, en un diseño completamente al azar con tres repeticiones. No se encontraron diferencias entre métodos en cuanto a detección de la bacteria en UFC/g, pero sí entre variedades, de las cuales las más contaminadas por esta bacteria fueron la Hayslip y la Río Grande. En lo que se refiere al tiempo de aparición de las UFC en cada uno de los métodos, el mejor fue el Tween B, que registró un promedio en la aparición de las UFC de 84 horas. Respecto a la

capacidad de germinación, no se encontraron diferencias entre variedades. La identificación de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas, siembra en medios diferenciales, medios semiselectivos y pruebas de patogenicidad; los síntomas aparecieron de 12 a 14 días después de las inoculaciones en los frutos, y el aislamiento de la bacteria correspondió nuevamente a la aislada inicialmente.

Palabras clave: diagnóstico, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, tomate, semilla.

ABSTRACT

The culture of tomato occupies the second place in México according to the surface seeded and first per the production value. This culture is affected by several pathogenic agents among which *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*,, is considered the most dangerous. When importing tomato seed, chances are that some pathogenic stocks are introduced to the country, since this microorganism is transmitted by this route.

The aim of this work was to determine the best method for the detection of bacterium *X. c.* pv. *vesicatoria* in tomato seed. This research was made in laboratories and greenhouses of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, where seeds of commercial lots of the varieties Hayslip, Homestead 61, Rio Grande and Winner were analyzed. 12 grams of seed of each variety were placed in a phosphate buffer 0,05 M, to 4°C, during all night, and later serial dilutions of the filtrate of the seed and the buffer were made. 0,1 mililiter was seeded, of each dilution (mother solution, 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3})

for the recovery of the bacteria in the methods Tween B, CKTM and TBCK, under a bifactorial adjustment three by four, in a completely at random design with three replications. There were no differences between methods as far as detection of the bacteria in UFC/g was concerned, but they were found between varieties, of which the most contaminated by this bacteria were the Hayslip and the Rio Grande. As far as time of appearance of the UFC is concerned in each of the methods, the best one was the Tween B, that registered an average in the appearance of the UFC of 84 hours. With respect to the germination capacity, there were no differences between varieties. The identification of the stocks was made by means of biochemical tests, semiselective sowing in differential environments, and tests of pathogenicity ; the symptoms appeared of 12 to 14 days after the inoculations in the fruits, and the isolation of the bacteria corresponded again to the one isolated initially.

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

INTRODUCCIÓN

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

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

Al cultivo del tomate lo afectan varios agentes patógenos, pero la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* está considerada como la más peligrosa (Gitaitis, *et al.*, 1992), ya que tan sólo el uno por ciento de semilla contaminada, en condiciones favorables, puede causar una epifitía; al ser ésta una bacteria que transmite la semilla, se corre el riesgo de introducir al país cepas más virulentas (Randhawa, 1996). Esta bacteria está clasificada en dos grupos: A y B, de los cuales el A ya existe en México, y es uno de los principales patógenos en cuarentena para el cultivo del tomate; sin embargo, en el país no se cuenta con metodologías estandarizadas para el diagnóstico de este patógeno. Existen varios métodos (McGuire, *et al.*, 1986), (Sijam, *et al.*, 1991) que se utilizan para el diagnóstico en semillas de tomate y chile; con otras técnicas, como el método serológico ELISA, el anticuerpo que se encuentra en el mercado no logra detectar este patógeno cuando viene en la semilla; además, se ha reportado la utilización de cuatro anticuerpos monoclonales para la identificación de esta bacteria, por lo que no hay garantía que con el anticuerpo existente en el mercado se pueda diagnosticar la variabilidad de cepas de este patógeno.

Dada la importancia que representa el cultivo del tomate en el país, el riesgo que representa introducir cepas más patogénicas de esta bacteria al importar semilla, y debido a la necesidad de evaluar métodos para detectarla en semilla, se planteó el siguiente objetivo:

a) Determinar el mejor método para la detección de la bacteria *X. c. pv. vesicatoria* en semilla de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del sitio experimental. El presente trabajo fue realizado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro durante los meses enero-julio de 1997, en el laboratorio de fitopatología y en un invernadero, que se ubican en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Material experimental. Se trabajó con semilla de cuatro variedades comerciales de tomate: Hayslip, Homestead 61, Río Grande y Winner, las cuales estaban envasadas y disponibles a la venta; a cada una se le evaluaron las pruebas de germinación y sanidad, en este último punto, respecto a la detección de la bacteria *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*.

Prueba de germinación. Primero se determinó la capacidad de germinación de las muestras de semilla a evaluar, con el propósito de conocer su condición como lotes comerciales, para lo cual se utilizaron cuatro repeticiones de 100 semillas por cada una de las variedades. Las charolas donde se pusieron las semillas a germinar, se les colocaron cuatro capas de papel filtro, que se humedecieron para colocarles inmediatamente las 100 semillas de cada repetición, las cuales se cubrieron con "clean-pack" y se pusieron en una incubadora, a una temperatura de 25°C, durante diez días. Se evaluó la capacidad de germinación con base al número de semillas que germinaron normalmente, es decir, aquéllas

que desarrollaron todas sus estructuras esenciales a un nivel aceptable, para ser consideradas plántulas normales. El diseño utilizado para el análisis fue completamente al azar, de cuatro tratamientos con cuatro repeticiones y se analizó mediante el paquete estadístico SAS.

Métodos de detección de la bacteria. Para determinar el mejor método de detección de la bacteria *X. c. pv. vesicatoria* se utilizaron los métodos Tween B (McGuire, *et al.*, 1986), CKTM (Sijam, *et al.*, 1991), y un tercer método denominado TBCK que resultó de la combinación de ambos, sólo que a éste no se le proporcionó bacitracina. La metodología consistió en utilizar 12 gramos de semilla (aproximadamente 5,000 semillas) de cada una de las variedades previamente lavadas durante 30 minutos a agua corriente, con el propósito de eliminar el fungicida de la semilla, inmediatamente después se agregaron tres mililitros de un buffer fosfato 0.05 M (1 000 ml de agua destilada estéril, 7.0 g de K_2HPO_4 , 1.3 g de KH_2PO_4 , 0.1 ml de Tween 20 y se ajustó el pH a 7.2) por gramo de semilla, y se incubó durante 12 horas a 4°C; luego se obtuvo el filtrado (separación de la semilla y el buffer), se realizaron diluciones seriadas a partir de la solución madre (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), y se colocó 0.1 ml de cada una de las diluciones, con tres repeticiones, en cada una de las cajas petri que contenían los medios Tween B, CKTM y TBCK y se incubaron a 27°C durante un lapso de cuatro a siete días; en cada uno de los métodos empleados se realizaron inspecciones diarias, hasta observar las unidades formadoras de colonia (UFC) desarrolladas con las características propias de esta bacteria. Se registró el número de UFC por gramo de semilla para cada una de las variedades y métodos, y se analizaron los datos bajo un diseño bifactorial tres por cuatro, con tres repeticiones, en un arreglo completamente al azar; asimismo, se registró el tiempo (en horas) en que aparecieron

las UFC en cada uno de los métodos y los datos se analizaron bajo un diseño completamente al azar de tres tratamientos con cuatro repeticiones, con el paquete estadístico SAS.

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

Pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad se realizaron inyectando al fruto, de acuerdo a la técnica de Stall, *et al.* (1972). Para la producción de la planta, la siembra se realizó en charolas previamente desinfectada y se utilizó un sustrato esterilizado Peat Moss, en enero de 1997. Las inoculaciones se aplicaron en frutos verdes, adheridos a la planta; estos frutos tenían entre 4 y 5 cm de diámetro ecuatorial. Para las inoculaciones se utilizó un cultivo bacteriano de 48 horas de edad, crecido en medio AN, y una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC/ml (Schaad, 1994); a los testigos se les aplicó únicamente agua destilada estéril que se inyectó a los frutos. Una vez que aparecieron los síntomas en los frutos, la bacteria se reaisló en medio AN y se identificó mediante el procedimiento señalado anteriormente.

RESULTADOS

Prueba de germinación. En la prueba de germinación no se encontró diferencia significativa entre variedades, lo mismo se observó en la prueba de rango múltiple (Tukey al 0.05 y 0.01), ya que el por ciento de germinación más bajo (91%) correspondió a la variedad Winner, que está muy por encima de valores mínimos aceptables (80 %), lo que indica que la semilla, por sus condiciones de almacenamiento, no tendrá fácilmente interferencia con microorganismos de almacén que pudieran bajar drásticamente su germinación, con lo que se comprueba su aptitud y disponibilidad como semilla para siembra.

Métodos de detección. En lo que respecta a la evaluación de los métodos de detección de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* no hubo diferencia significativa entre estos en cuanto a la detección de esta bacteria en Unidades Formadoras de Colonia por gramo de semilla (UFC/g). Al comparar los valores medios en una prueba de rango múltiple no se observaron diferencias entre métodos. Cabe mencionar que si durante el proceso de extracción de la semilla, ésta se contamina por otros microorganismos saprófitos de rápido crecimiento, pueden enmascarar la presencia de *X. c. pv. vesicatoria*, ya que esta bacteria es de crecimiento lento. Por tal motivo se usan detergentes y antibióticos en los medios, para así inhibir la presencia de estos microorganismos.

Tiempo de aparición de las UFC. En lo que corresponde al el tiempo promedio en aparecer las UFC en cada uno de los métodos, hubo una diferencia altamente significativa entre éstos; destacó el método Tween B, en el que el tiempo promedio de aparición de las UFC fue de 84 hrs. En este estudio, el método señalado anteriormente resultó ser el

mejor, debido al menor tiempo en que aparecieron las UFC y a la menor contaminación con microorganismos saprófitos.

Identificación de la bacteria. El cuadro 1 muestra la identificación de las cepas aisladas de los métodos en estudio mediante pruebas bioquímicas, medios diferenciales y medios semiselectivos. Los resultados obtenidos corresponden a los reportados para esta bacteria, mismos que se corroboraron con pruebas de patogenicidad.

Pruebas de patogenicidad. Con relación a las pruebas de patogenicidad, los síntomas característicos de la mancha bacteriana aparecieron de 12 a 14 días después de las inoculaciones; la bacteria de los frutos se reaisló a los 35 y 60 días después de que éstos fueron inoculados. Las bacterias reaisladas dieron los mismos resultados en las pruebas bioquímicas, medios diferenciales y semiselectivos, que las bacterias inoculadas.

Cuadro 1. Resultados de las Pruebas Bioquímicas, Medios Diferenciales y Semiselectivos en la identificación de las cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* detectadas en semilla de cuatro variedades comerciales de tomate. UAAAN, 1997.

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

DISCUSIÓN

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

Muchas bacterias fitopatógenas pueden identificarse por el uso de medios de cultivo artificiales. El medio Tween B se usa para la identificación de *X. c. pv. vesicatoria*; en este medio el bromuro de potasio (KBr) aumenta la pigmentación de la colonia amarilla y el Tween 80 en conjunción con el CaCl_2 demuestran lipólisis. Otras bacterias contaminantes que no logran morir con los detergentes y tienen actividad lipolítica pueden inhibir o enmascarar la presencia de *X. c. pv. vesicatoria* si ésta presente en la semilla; estos resultados coinciden con los obtenidos por McGuire *et al.* (1986), quienes señalan que otros contaminantes pueden ser fácilmente distinguidos por el color de sus colonias. En estos tres métodos, las colonias fueron diferentes en pigmentación, resultados similares encontraron Poplawsky y Chun (1995) al trabajar en semillas de crucíferas con *X. c. pv. campestris*, quienes mencionan que las colonias presentaban pigmentación atípica en un mismo medio de cultivo. En los tres

métodos evaluados no se encontraron diferencias en cuanto a la detección de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g); resultados muy parecidos encontró Peterson (1963), al evaluar tres medios para el aislamiento de *X. c. pv. vesicatoria* de suelo, donde logró reducir el 90 al 99 por ciento de los microorganismos que crecen en medios no selectivos.

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

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

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo el experimento y de acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el método más eficiente para la detección de la bacteria *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* en semilla de tomate, fue el Tween B.

LITERATURA CITADA

- Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Hodge, N. C., Minsavage, G. V., Benedict, A. A. and Alvarez A. M. 1994. Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Strains. Phytopathology 84: 663-671. United States of America.
- Bringas, G. L. 1995. Panorama del cultivo del tomate. Productores de hortalizas. Vol. X. pp 10-11.
- Cox, R. S. 1966. The role of bacterial spot in tomato production in south Florida. Plant Disease Reporter. 50: 699-700. United States of America.
- Gitaitis, R. D., Sasser, M. J., Beaver, R. W., McInnes, T. B., and Stall, R. E. 1987. Pectolytic Xanthomonads in mixed infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper transplants. Phytopathology 77: 611-615. United States of America.
- Gitaitis, R., McCarter, S., and Jones, J. 1992. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. Plant Disease 76: 651-656. United States of America.
- Kado, C. I., and Heskett, M. G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60:969-976. United States of America.
- McGuire, R. G., Jones, J. B., and Sasser, M. 1986. Tween Media for the semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. Plant Disease 70: 887-891. United States of America.

- Peterson, G. H. 1963. Survival of *Xanthomonas vesicatoria* in soil and diseased tomato plants. *Phytopathology* 53: 765-767. United States of America.
- Poplawsky, A. R. and Chun, W. 1995. Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with atypical pigmentation Isolated from commercial crucifer seeds. *Plant Disease* 79: 1021-1024. United States of America.
- Randhawa, P. 1996. Theory and principals seedborne bacteria and their detection. II Curso Internacional "Métodos para la detección de patógenos en semillas". 21-28 junio. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Schaad, N. W. 1994. Laboratory guide for Identification of plant pathogenic bacteria. 2nd Edition. APS Press. Minnesota, United States of América. 176 p.
- Sijam, K., Chang, C. J., and Gitaitis, R. D. 1991. An Agar Medium for the isolation and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from seed. *Phytopathology* 81: 831-834. United States of America.
- Stall, R. E., Hall, C. B., and Cook, A. A. 1972. Relationship of ammonia to necrosis of pepper leaf tissue during colonization by *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology* 62:882-886. United States of America.