

44
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL AGENTE CAUSAL DE LA
BACTERIOSIS DEL LIMON MEXICANO EN TECOMAN, COLIMA.

T E S I S

Que para obtener el
titulo

de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

M A R G A R I T A P E D R O Z A
R U I Z

DIRECTOR: Q.F.B. AURORA ORTEGON AVILA

CUAUTITLAN, IZCALLI, EDO. DE MEXICO 1986.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Pag.
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	2
3. ANTECEDENTES	3
4. GENERALIDADES	7
4.1. HISTORIA DEL "CANCER DE LOS CITRICOS"	9
4.2. SINTOMATOLOGIA DEL "CANCER DE LOS CITRICOS" ..	9
4.3. AGENTE CAUSAL	10
4.4. DISEMINACION	13
4.5. PENETRACION Y ETAPAS DE INFESTACION	13
4.6. CONDICIONES PREDISONENTES	14
4.7. SOBREVIVENCIA DEL PATOGENO	15
4.8. CONTROL	15
4.9. INTERACCION DE <u>Xanthomonas campestris</u> CON <u>Er</u> <u>winia herbicola</u>	17
5. METODOLOGIA	23
5.1. DIAGRAMA DE TRABAJO	23
5.2. TOMA DE MUESTRAS	24
5.3. AISLAMIENTO	24
5.3.1. METODO DE RAYADO DIRECTO	24
5.3.2. METODO POR MACERADO CON DILUCIONES ..	28
5.3.3. METODO DE AGUA ESTERIL CON DILUCIONES	28
5.4. PURIFICACION	28
5.5. PRUEBAS BIOQUIMICAS	29
5.6. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	30
5.6.1. AJUSTE DE CONCENTRACION	30
5.6.2. INOCULACION	30
5.7. REAISLAMIENTO	31
5.8. PRUEBAS BIOQUIMICAS	31
5.9. REINOCULACION	31
5.10. PRUEBAS SEROLOGICAS	31
5.10.1. OBTENCION DE SUEROS	32

5.10.2.	PRUEBAS DE AGLUTINACION EN TUBO ...	33
5.10.3.	PRUEBAS DE AGLUTINACION CON HETEROLOGOS	33
5.10.4.	COMPARACION DEL AGENTE CAUSAL DE LA BACTERIOSIS CON LOS SUEROS OBTENIDOS DE LAS RAZAS "A" , "B" Y "C" DE <u>Xanthomonas campestris</u> p.v. <u>citri</u> ..	33
6.	RESULTADOS Y DISCUSION	35
6.1.	AISLAMIENTO	35
6.2.	PURIFICACION	35
6.3.	PRUEBAS BIOQUIMICAS	35
6.4.	PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	40
6.5.	REAISLAMIENTO	40
6.6.	PRUEBAS BIOQUIMICAS	44
6.7.	REINOCULACION	44
6.8.	PRUEBAS SEROLOGICAS	44
6.8.1.	PRUEBAS DE AGLUTINACION EN TUBO	44
6.8.2.	PRUEBAS DE AGLUTINACION CON HETEROLOGOS	48
6.8.3.	COMPARACION DEL AGENTE CAUSAL DE LA BACTERIOSIS CON LOS SUEROS OBTENIDOS DE LAS RAZAS "A" , "B" Y "C" DE <u>Xanthomonas campestris</u> p.v. <u>citri</u>	48
7.	CONCLUSIONES	51
8.	LITERATURA CITADA	52
9.	APENDICES	62
APENDICE A.	REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO	62
APENDICE B.	TECNICAS	73
APENDICE C.	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS	78
10.	RESUMEN	83

INDICE DE TABLAS

	Pag.
TABLA 1: PATOGENICIDAD DE LAS TRES RAZAS DE <u>Xanthomonas campestris</u> p.v. <u>citri</u> SOBRE CINCO ESPECIES DE CITRICOS	12
TABLA 2: PRUEBAS DE AGLUTINACION EN TUBO	34
TABLA 3: CARACTERISTICAS CULTURALES, MORFOLOGICAS Y GRAM DE LAS BACTERIAS AISLADAS EN LOS MUESTREOS REALIZADOS DE MATERIAL VEGETATIVO DE LIMON MEXICANO EN TECOMAN, COLIMA .	36
TABLA 4: CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE MATERIAL VEGETATIVO DE LIMON MEXICANO DE TECOMAN, COLIMA	38
TABLA 5: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	42
TABLA 6: CARACTERISTICAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE HOJAS INOCULADAS	43
TABLA 7: CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS BACTERIAS REAISLADAS	45
TABLA 8: TITULACION DE ANTICUERPOS POR AGLUTINACION EN TUBO	47
TABLA 9: PRUEBAS DE AGLUTINACION CON HETEROLOGOS .	49
TABLA 10: PRUEBAS DE AGLUTINACION EN TUBO ENTRE LOS SUEROS DE LAS RAZAS "A", "B" Y "C" DE <u>Xanthomonas campestris</u> p.v. <u>citri</u> Y EL AGENTE CAUSAL DE LA BACTERIOSIS DE LIMON MEXICANO DE TECOMAN, COLINA	50
TABLA 11: CURVA PATRON DE $BaCl_2$ Y H_2SO_4	74
TABLA 12: CARACTERISTICAS DEL GENERO <u>Xanthomonas</u> .	79
TABLA 13: CARACTERISTICAS DEL GENERO <u>Erwinia</u>	81

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1: A. SINTOMAS DE BACTERIOSIS EN HOJAS DE LIMON MEXICANO	4
B. FRUTOS DE LIMON MEXICANO LIBRES DE SINTOMAS DE BACTERIOSIS.....	5
FIGURA 2: SINTOMAS DEL "CANCER DE LOS CITRICOS" ...	11
FIGURA 3: COMPLEJOS INMUNITARIOS FORMADOS.....	22
FIGURA 4: ESTADO DE COLIMA	25
FIGURA 5: UBICACION DE LAS HUERTAS MUESTREADAS EN EL MUNICIPIO DE TECOMAN, COLIMA	26
FIGURA 6: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	41
FIGURA 7: A. INOCULACION EN LA VENA CENTRAL DE LA OREJA DE UN CONEJO	76
B. SANGRADO DE LA VENA MARGINAL DE LA OREJA DE UN CONEJO	76

1. INTRODUCCION

En el año de 1981, se detectó en Tecomán, Colima una enfermedad bacteriana que afecta al limón mexicano, y cuyos síntomas son parecidos a los producidos por el llamado "cáncer de los cítricos", lo que ocasionó el cierre de las exportaciones de este y demás cítricos hacia los Estados Unidos, debido a que existen severas restricciones cuarentenarias por ser un lugar donde dicha enfermedad se ha erradicado.

Siendo el estado de Colima el principal productor del limón en el país y debido a que su economía está basada fundamentalmente en la agricultura, este problema afecta principalmente a los productores del estado y a todas las familias que de alguna manera dependen de este cultivo.

Ya que este problema tiene repercusiones nacionales como internacionales, se hace necesario la identificación del patógeno, para que con esto se puedan derivar alternativas encaminadas al control y/o erradicación de la enfermedad.

Para llegar a la identificación del agente causal de la bacteriosis se hará uso de pruebas morfológicas, bioquímicas, de patogenicidad y serológicas, estas últimas comparando por pruebas de aglutinación a este patógeno con el organismo responsable de producir el "cáncer de los cítricos".

2. OBJETIVOS

- Generales:

- a) Identificación del agente causal de la bacteriosis del limón mexicano procedente de Tecoman, Colima.

- Específicos:

- a) Aislar al organismo causal de la bacteriosis a partir de material vegetativo.
- b) Identificar al agente causal por pruebas morfológicas, bioquímicas, de patogenicidad y serológicas.
- c) Determinar si el agente causal es o no el mismo que produce el "cáncer de los cítricos".

3. ANTECEDENTES

En octubre de 1981, un agricultor de Tecomán, Colima, detectó en su huerta ubicada en Tecuanillo, una enfermedad sobre los árboles de limón, quien consideró se trataba de un ataque de antracnosis. En diciembre del mismo año, el productor notificó los daños a la Dirección General de Sanidad Vegetal y al Campo Agrícola Experimental de Tecomán. Para esta fecha la enfermedad estaba afectando una superficie de 300 has. de la huerta y huertas vecinas.

El mismo productor notificó en marzo de 1982 la gravedad del problema a el Fideicomiso de Frutas Tropicales en Tecomán, recolectándose material vegetativo para efectuar el primer aislamiento del patógeno, habiéndose obtenido un cultivo bacteriano, por lo que se procedió a la aplicación de oxitetraciclinas en los árboles afectados, observándose poca mejoría después de las aplicaciones del antibiótico.

A solicitud del productor; investigadores del Centro de Investigación de Cítricos de la Universidad de California en Riverside, hicieron un reconocimiento de la enfermedad conocida entonces como "mancha de las hojas y marchitamiento de brotes terminales que ocurre en el limonero". Esta enfermedad se caracteriza por dañar hojas y ramas jóvenes, provocando lesiones que se inician en forma de manchas translúcidas y aceitosas, que adquieren un color castaño, el tejido se necrosa y a través del tiempo se forma una pústula con bordes elevados y centro hundido rodeada por un halo clorótico. Las lesiones viejas se vuelven corchosas y duras. Cuando la lesión es severa se presenta tanto por el haz como por el envés. El tamaño de las lesiones varía aproximadamente entre 0.2 mm. y 1 cm. de diámetro, y pueden encontrarse 30 o más pústulas por hoja. Las hojas afectadas posteriormente se caen y con infecciones severas todo el brote muere y no produce frutos (Fig. 1).



Fig. 1A: Síntomas de bacteriosis en hojas de limón mexicano

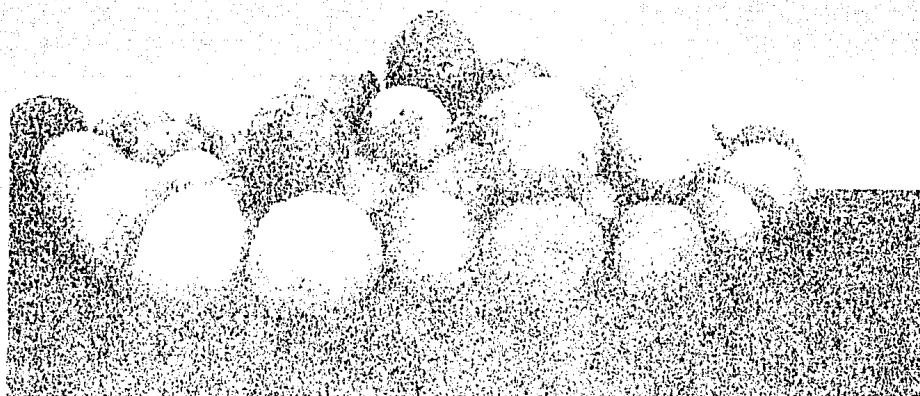


Fig. 1B: Frutos de limón mexicano libres de síntomas de bacteriosis.

De acuerdo a los síntomas descritos , se encuentra una gran similitud con el llamado "cáncer de los cítricos", producida por Xanthomonas campestris p.v. citri, enfermedad que ha sido erradicada en países como Estados Unidos, por lo que este país cerró su frontera a la importación de los cítricos mexicanos, argumentando que los frutos podían ser portadores del agente causal. Ante tal problemática, organismos como el Colegio de Postgraduados de Chapíngo, la Dirección General de Sanidad Vegetal, el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y la Comisión Nacional de Fruticultura, han realizado diversos estudios encaminados a conocer la identidad del patógeno.

Debido a la facilidad de dispersión de la enfermedad, se tomaron medidas cuarentenarias en el estado de Colima, con el propósito de evitar que la enfermedad se diseminara a otras zonas citrícolas del país.

4. GENERALIDADES

El limón mexicano también conocido como West Indian Lime, cuyo nombre científico es Citrus aurantifolia Swingle, pertenece a la familia de las Rutáceas, al género Citrus y a la especie aurantifolia; botánicamente es una lima ácida, variedad mexicana que prospera bien en climas tropicales y subtropicales, suelos profundos y de fácil drenaje (11,29).

El árbol es vigoroso de tamaño regular y con numerosas espigas. Su follaje es denso, de pequeñas hojas lanceoladas, ligeramente en punta con peciolo definido. Los botones son pequeños y la floración ocurre todo el año pero principalmente en la primavera y verano tardío. Es un árbol muy sensible al frío. (60).

El fruto es pequeño, redondo, ovalado o un poco elíptico (60); la base, por lo general es redondeada pero algunas veces con un pico o punta pequeña, el ápice también es redondo pero con una pequeña protuberancia. La cáscara es de textura moderadamente granulosa y correosa, de color amarillo verdoso al madurar. El endocarpo está formado por 10 a 21 segmentos (gajos), su eje es muy pequeño y usualmente sólido. Su pulpa es de color amarillo verdoso, de fibra, suave, jugosa y muy ácida, con aroma característico.

En la producción mundial de cítricos México ocupa el sexto lugar después de Estados Unidos, Brasil, Japón, España e India.

Después de la naranja el limón es el cítrico más importante en México en cuanto a superficie cultivada y producción. Sus características de alta acidez, aroma del jugo y aceites esenciales, así como su sabor más fuerte, como consecuencia de las condiciones edafológicas y climáticas en las que se desarrolla el cultivo, la hacen de gran aceptación en el mercado (29).

Para 1981 la exportación del limón mexicano como fruta fresca se estimó en 14 mil tns. con un valor de 39 mill. de pesos y para 1982 fue de 5,582 tns. que corresponden a 32.5 mill. de pesos *.

El cultivo del limón mexicano ha contribuido al establecimiento de una agroindustria nacional debido a que se produce durante una gran parte del año, resiste el manejo rudo, es un fruto no climatérico que puede almacenarse por períodos prolongados. Todos sus componentes son industrializables y es posible obtener de ellos una gran variedad de productos para las industrias alimenticias, químicas y farmacéuticas (11). Además representa el sostén económico de numerosas familias que trabajan en el campo y en la industria; al mismo tiempo que sostiene actividades tales como la venta de insumos para la producción y empaque, maquinaria agrícola e industrial, transporte, etc.

A nivel nacional el estado de Colima produce aproximadamente el 60 % del total de la fruta de limón mexicano y los municipios de Tecomán y Armería son dentro del estado los de mayor importancia a este respecto.

Entre las enfermedades más importantes de limón mexicano dentro del estado de Colima se encuentran, la gomosis ocasionada por Phytophthora parasítica, Dast. y la antrachosis producida por Gloesporium limetticolum, Claus. y ahora lo es también la bacteriosis.

Dada la aparente relación que existe entre la bacteriosis y el "cáncer de los cítricos", es conveniente hacer una revisión de esta enfermedad.

*Estadísticas Básicas de la Fruticultura Nacional, CONAFRUT Subdirección Comercial.

4.1. HISTORIA DEL CANCER DE LOS CITRICOS.

Basándose en fósiles de cítricos, Fawcett señala que el "cáncer de los cítricos" se originó aproximadamente a mediados del siglo XIX en el sureste de Asia, especulando que la enfermedad fue diseminada por las islas del Pacífico entre ellas Japón. (72).

Bergier (72) afirma que el cáncer fue introducido por vez primera a los Estados Unidos en 1910 a través de plántulas provenientes del Japón. En 1915, Hasse descubre que el agente de la enfermedad es una bacteria y es Dowson quien la clasifica dentro del género Xanthomonas, por lo que el agente causal del "cáncer de los cítricos" es la X. campestris p.v. citri (Hasse) Dowson.

4.2. SINTOMATOLOGIA DEL "CANCER DE LOS CITRICOS"

La enfermedad se presenta tanto en hojas y ramas jóvenes como en frutos.

En las hojas los primeros síntomas aparecen como manchas acuosas translúcidas, de pequeño diámetro. En condiciones favorables puede aparecer a los siete días después de la penetración del patógeno; al poco tiempo estos puntos se tornan de color castaño claro y con tendencia a presentarse como pústulas corchosas que pueden observarse a simple vista a los 14 días, las que generalmente se resquebrajan formando un cráter. En torno a estas pústulas se forma un halo amarillento que resalta en el verde oscuro del limbo de las hojas.

Las hojas jóvenes de aproximadamente dos semanas son más susceptibles a la infección que las hojas maduras, ya que éstas son resistentes a la penetración del patógeno a través de estomas, pero no así por heridas. El período de susceptibilidad de ramitas aun no se ha determinado, pero por observación, es posible que sea similar al "

de las hojas .

En ramitas y frutos las lesiones son semejantes a las que aparecen en las hojas, con excepción del halo clorótico que no se presenta en los frutos donde los cráteres son más profundos, pero sin llegar al albedo y por lo tanto las características orgánolépticas del jugo y su cantidad no se alteran. Aunque las lesiones no penetran profundamente, pueden permitir la entrada a los hongos de la descomposición. Varias lesiones pueden coalescer, formando una masa costrosa de forma irregular(61).

Si la infección ocurre en la etapa de crecimiento del fruto este puede deformarse. El período de susceptibilidad a la enfermedad es mayor en los frutos y el daño ocasionado es más severo. Algunas veces cientos de lesiones pueden encontrarse en la misma hoja, fruto o ramita (Fig 2)(33).

El "cáncer de los cítricos" es responsable de la defoliación, muerte descendente, caída prematura de frutos y manchas notables en los mismos, por lo que la producción disminuye grandemente en los árboles afectados.

El "cáncer de los cítricos" afecta grandemente a la mayoría de las variedades cítricas (Tabla 1)(72).

4.3. AGENTE CAUSAL

Se conocen tres diferentes razas de Xanthomonas campestris n. p.v. citri que se diferencian principalmente por el grado de virulencia que presentan y el rango de hospederas susceptibles a las mismas(Tabla 1). La más agresiva de estas es la conocida como raza "A", nativa de Asia; la raza "B" se presenta en Argentina, Uruguay y Paraguay. La tercera raza fue aislada en Limón mexicano en Brasil y es



Fig. 2: Síntomas del "cáncer de los cítricos".

TABLA 1 : PATOGENICIDAD RELATIVA DE LAS TRES RAZAS DE *Xanthomonas campestris* p.v. *citri* SOBRE CINCO ESPECIES DE CITRICOS.*

Especie Cítrica	Nombre común	Razas de <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>citri</i>		
		A	B	C
<i>C. sinensis</i>	Naranja dulce	+++	+	-
<i>C. paradisi</i>	Toronja	++++	+	-
<i>C. limon</i>	Limón	+++	+++	-
<i>C. reticulata</i>	Mandarina	++++	++++	++++

+++ Reacción muy patógena.

*Stall, R.E. and C.P. Seymour. 1983. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. Plant Disease 67 (5) : 581-585.

patógena sólo sobre esta especie, la cual fue designada por Namekata como X. citri f. sp. aurantifolia y que en la actualidad se conoce como raza "C" (20, 61, 72).

4.4. DISEMINACION.

El patógeno del "cáncer de los cítricos" es muy infeccioso y puede ser diseminado a cortas distancias por la lluvia, insectos, aves y viento. La velocidad del viento es un factor decisivo en la penetración del patógeno directamente por estomas; pero también su diseminación se efectúa por la acción del hombre al realizar las labores culturales en los huertos. Las máquinas cosechadoras, los cajones, escaleras, chalecos e incluso la ropa del cosechador, la fruta contaminada o partes de la planta, son elementos que contribuyen a esparcir dicha enfermedad (72).

4.5. PENETRACION Y ETAPAS DE INFESTACION.

La penetración puede ocurrir por heridas o bien por aberturas naturales como lenticelas en ramas y estomas en hojas. La bacteria llega a través de una película de agua al borde de un estoma; bajo condiciones ecológicas adecuadas se reproduce rápidamente y penetra a través del estoma, si éste tiene una forma y tamaño adecuado, lo que depende de la edad de la hoja, ya que en las hojas más viejas los estomas se estrechan evitando así la entrada del patógeno por orificios naturales, pero no así por heridas. Cuando las bacterias penetran ocupan el espacio subestomático. Al continuar la reproducción bacteriana, toda la masa de microorganismos se introduce a los espacios intercelulares. El primer síntoma que se evidencia, es la aparición de una zona acuosa, transparente alrededor del estoma. La acción posterior de la bacteria es la liberación de enzimas que digieren la pared celular, lo que se manifiesta como una mancha. Entonces, el

tejido vegetal se defiende tratando de aislar el efecto tóxico del resto de los tejidos produciendo súber o corcho, que es una sustancia semejante a la cutina. La parte central de la pústula no se suberifica, por ello se forma un cráter en el centro. Se presenta una exudación de goma resina donde van mezcladas millones de bacterias que comprenden una verdadera fuente de inóculo(64).

Cuando el contenido de nitrógeno es alto en la planta huésped, la facilidad de penetración es mayor, debido a que este elemento tiende a alargar el período vegetativo y a retardar la maduración. Las plantas son jugosas y suculentas; la posibilidad de infestación es elevada porque la humedad procedente de las lluvias y el rocío permanecen mucho tiempo en las plantas, en tanto que el período de susceptibilidad hacia los patógenos se alarga a causa de la prolongación del ciclo vegetativo. Además, las paredes celulares del interior de la planta tienden a ser delgadas y son fácilmente penetrables o destruidas por los patógenos que crecen mejor en tejidos tiernos(64).

4.6. CONDICIONES PREDISPONENTES.

Los siguientes factores desempeñan un papel importantísimo en el desarrollo de la enfermedad

- Temperatura:

Mínima 20 °C

Óptima 28-30 °C

Máxima 35 °C

- Humedad libre sobre la superficie de los tejidos susceptibles durante 20 min. o más.

- Tejido en activo crecimiento.

Tomando en cuenta que la bacteria puede penetrar fácilmente a través de heridas, todo factor que contribuya a la producción de heridas constituye una condición predisponente; como es el granizo y el viento que provocan el roce de los tejidos, lesiones de espigas y levantamiento de la arena que actúa como abrasivo.

Los veranos lluviosos y cálidos son favorables para que la bacteria se multiplique velozmente en hojas tiernas, mientras que en invierno permanece en los brotes en forma latente(72).

4.7. SOBREVIVENCIA DEL PATOGENO.

La bacteria conserva su viabilidad y patogenicidad in vitro en un medio adecuado a 6-8 °C durante 8 a 10 meses.

En hojas caídas infectadas, sobrevive hasta 6 meses; en ramitas enfermas más de 6 meses y en los tejidos exteriores de la corteza puede permanecer latente durante los meses de invierno y luego activarse, en condiciones elevadas de temperatura, humedad y tejido en pleno crecimiento. En cuanto a la persistencia en el suelo, los datos son muy variables, según los diversos autores; dependiendo del tipo de suelo, su esterilidad, etc. En general se puede establecer que varía entre 28 a 70 días. En suelos de pH elevado la sobrevivencia es mayor. En suelos donde se llevo a cabo la erradicación se puede aislar la bacteria después de muchos años(72).

4.8. CONTROL.

Luego de la detección del cáncer en los Estados Unidos hacia el año de 1914, se emprendió una campaña de inspección en busca de brotes de la enfermedad. Los árboles afectados se asperjaron con una mezcla de queroseno y petróleo y se quemaron incluyendo aquellos que se encontraban en una área de 50 a 100 mts. del foco de -

infección, además de la defoliación de los árboles 100 mts. más arriba. La ropa, zapatos y herramienta de los trabajadores era desinfectada y lavada después de estar en una zona contaminada. Se establecieron normas cuarentenarias a nivel nacional e internacional - con el fin de no permitir la entrada de la fruta o partes de plantas provenientes de países donde la enfermedad estuviera presente (72).

En Estados Unidos se declaró erradicado el "cáncer de los cítricos" hacia 1933, desde entonces se han tomado medidas para evitar que la enfermedad vuelva a entrar a este país.

Con las mismas técnicas establecidas por los Estados Unidos, Sud Africa, Australia y Nueva Zelanda también han logrado erradicar el cáncer (20).

En países donde la enfermedad esta muy difundida y donde por razones económicas o comerciales no se puede erradicar, se aconseja una serie de medidas culturales de carácter general: uso de compuestos químicos, como el calcio Bordeleés, que asperjado en ciertas épocas del año, protege a los brotes tiernos de la infección; barreras rompevientos; estaciones de diagnóstico, que consisten en estaciones meteorológicas cuyo propósito es determinar el momento propicio para la aspersión química (48); eliminar por la poda todos los órganos afectados; controlar insectos; utilizar variedades resistentes, etc.

A continuación se mencionan los países donde se encuentra presente el "cáncer de los cítricos":

Sud América:	Paraguay
Argentina	Uruguay
Brasil	

Africa:	Sri Lanka
Zaire	China
Islas Comoro	Hong Kong
Costa de Marfil	Indochina
Madagascar	Japón
Mauritania	Islas Liu Kiu
Islas Reunion	Malsia
Islas Seychelles	India
	Nepal
Oceania:	Pakistán
Islas Carolina	Islas Filipinas
Guam	Taiwan
Islas Fidji	Thailandia
Islas Marianas	Korea
Papua	Bután
	Camboya
Asia:	Singapur
Afganistan	Vietnam
Islas Adaman	

4.9. INTERACCION DE Xanthomonas campestris CON Erwinia herbicola

En algunas enfermedades se ha podido comprobar que el agente causal se encuentra asociado a diversos saprófitos ya sea bacterias u hongos.

Un hecho comunmente observado al realizar aislamientos de Xanthomonas campestris p.v. citri es la aparición de colonias bacterianas asociadas al patógeno. Estas colonias aparecen con más o menos frecuencia según la procedencia del material enfermo. De acuerdo a las pruebas de identificación que se han hecho de la bacteria asociada a X.c. p.v. citri, ésta se encuentra clasificada dentro del género Erwinia (50).

Las colonias de Erwinia herbicola son semejantes a las de X. campestris, de color amarillo, pero su crecimiento es más acelerado que el de ésta.

Con el objeto de conocer si existe alguna interacción entre ambas bacterias, se han hecho varios experimentos. Los resultados revelaron que cuando Xanthomonas se introduce sola, produce un alto grado de infección; si se inocula sola y horas después se introduce la Erwinia el grado de infección disminuye grandemente; de igual manera sucede si ambas bacterias se hacen crecer juntas antes de inocularse(23).

E. herbicola por si sola, no es capaz de producir síntoma alguno según Fállico (18), sin embargo, Goto (50) menciona que ésta bajo las mismas condiciones, desarrolla aunque con cierta dificultad, síntomas parecidos a los originados por X.citri.

Tal parece que E. herbicola al reproducirse en forma más rápida que Xanthomonas, consume en parte los nutrientes presentes limitando así el crecimiento de esta última, o bien que el metabolismo de E. herbicola produce un pH impropio para el crecimiento de Xanthomonas, de ahí que el grado de infección se vea disminuido.(21, 23).

La identificación rápida y exacta del organismo causal es un prerrequisito para el control apropiado de cualquier enfermedad.

En la identificación de un patógeno por cualquier vía, el primer paso es el aislamiento. Para aislar bacterias de material enfermo existen diversos procedimientos, sin embargo, debe elegirse para cada caso particular el que ofrezca mayor sencillez y eficacia. En

Argentina Stall (70) y en Japón Namekata (51) utilizan en forma eficaz el método de macerado con diluciones en el aislamiento del agente causal del "cáncer de los cítricos"; por otro lado Goth (21) hace uso del método de punción sobre cajas con agar para los mismos fines.

Con respecto a medios de cultivo se ha hecho uso de medios tan simples como el agar nutritivo (70) hasta medios como el Wakimoto (51) y el YS (67) cuya composición es más rica y compleja.

Las pruebas bioquímicas, fisiológicas y de patogenicidad representan diferentes alternativas en la identificación de un patógeno, cada una con una gran gama de modalidades. Así por ejemplo, existen muchas pruebas bioquímicas, sencillas o complicadas cuyo fin principal es descubrir las capacidades metabólicas de un microorganismo. Como pruebas fisiológicas se puede citar la utilización de fagos (31,39,53). En cuanto a pruebas de patogenicidad se refiere, existen las de infiltración (53,72), aspersion (36), por herida, etc que tienen como objetivo la penetración del patógeno en forma indirecta o directa y que se basa en los postulados de Kooch, donde el organismo sospechoso debe ser capaz de reproducir los síntomas al ser inoculado en forma pura, y volverse a recuperar. No obstante, las pruebas bioquímicas y fisiológicas que son rutinariamente usadas para identificar bacterias fitopatógenas no son enteramente satisfactorias. Las pruebas suelen ser complicadas, difíciles de interpretar, y requieren semanas a meses para completarse. Además, no todos los cultivos del mismo organismo dan los mismos resultados (6).

El uso de la serología para identificar bacterias es casi tan antiguo como la ciencia misma de la fitopatología. Muchas bacterias de importancia médica son comúnmente identificadas por pruebas serológicas. La habilidad de los bacteriólogos médicos para proveer

una rápida y segura identificación de bacterias de importancia médica implica un potencial similar para la identificación de bacterias fitopatógenas.

La serología es la ciencia de las reacciones, preparaciones y uso de sueros. Los estudios de las reacciones Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) constituyen el método de la serología. Carpenter (7) define a un antígeno como una sustancia que produce una respuesta inmune específica cuando se introduce en un animal. La respuesta puede constituir la producción de anticuerpos, la inmunidad mediada por células, o tolerancia inmunológica (66).

El antisuero es el principal reactivo de la serología y posee una gran versatilidad y alta especificidad. El antisuero es producido por los animales mediante el sistema linfoide, reconociendo a un antígeno como una sustancia extraña y que implica una amenaza biológica; las proteínas manufacturadas, inmunoglobulinas (Ig) reaccionan selectivamente con el cuerpo extraño. Estas proteínas están contenidas en los fluidos corporales y son conocidas colectivamente como anticuerpos (Acs).

El primer reporte acerca del uso de la serología para la identificación de una bacteria fitopatógena fue publicado en 1918 cuando Jensen demostró que una cepa de Agrobacterium tumefaciens de Dinamarca podía diferenciarse de la cepa de A. tumefaciens de los Estados Unidos por pruebas de aglutinación (66).

Cuando los antígenos se asocian con partículas que son demasiado grandes (bacterias, eritrocitos, partículas de latex, etc) para formar soluciones o suspensiones coloidales en los medios acuosos, pueden quedar suspendidos en una solución salina y mezclarse con antisueros específicos provocando una agrupación de dichas partículas antigénicas, este fenómeno se denomina aglutinación. La aglutinación puede observarse a simple vista o con ayuda del microscopio.

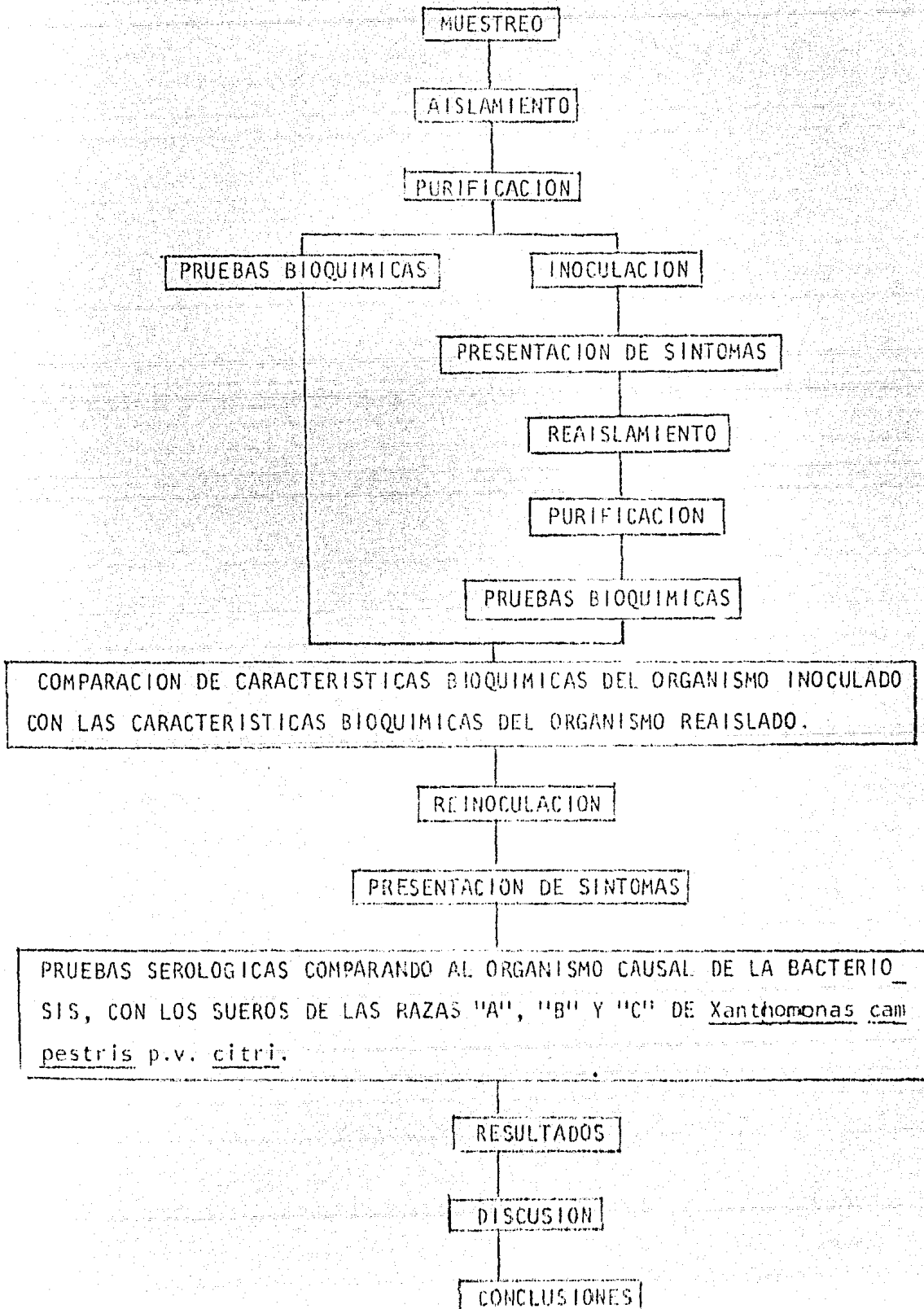
Una reacción de aglutinación es producida por medio de anticuerpos multivalentes que se combinan con partículas de antígeno formando complejos Ag-Ac (Fig. 3).

Las pruebas de aglutinación requieren de un pH y concentración de sales adecuados para que sean estables los complejos Ag-Ac, además, debe existir una proporción adecuada de ambos reactivos para que ocurra la óptima combinación.

En general las pruebas de aglutinación son fáciles de practicar, bastante reproducibles y sensibles.

5. METODOLOGIA

5.1. DIAGRAMA DE TRABAJO.



5.2. TOMA DE MUESTRAS.

Se determinó al municipio de Tecomán en el estado de Colima (Fig 4), como zona de muestreo, debido a que la bacteriosis se encontraba distribuida en una gran parte de su superficie al inicio de este proyecto.

Se tomaron muestras en tres diferentes fechas; junio, septiembre y enero.

Las muestras consistieron en hojas y ramas de aproximadamente 20 cm., que presentaban síntomas característicos de bacteriosis, tomadas de árboles dentro de huertas con distinto grado de ataque: severo, moderado y ligero. Estas se envolvieron en papel húmedo y a continuación se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas convenientemente. Todas las muestras recolectadas se depositaron en cajas de plástico para su transporte a la ciudad de México.

Las huertas muestreadas aparecen en la Fig. 5.

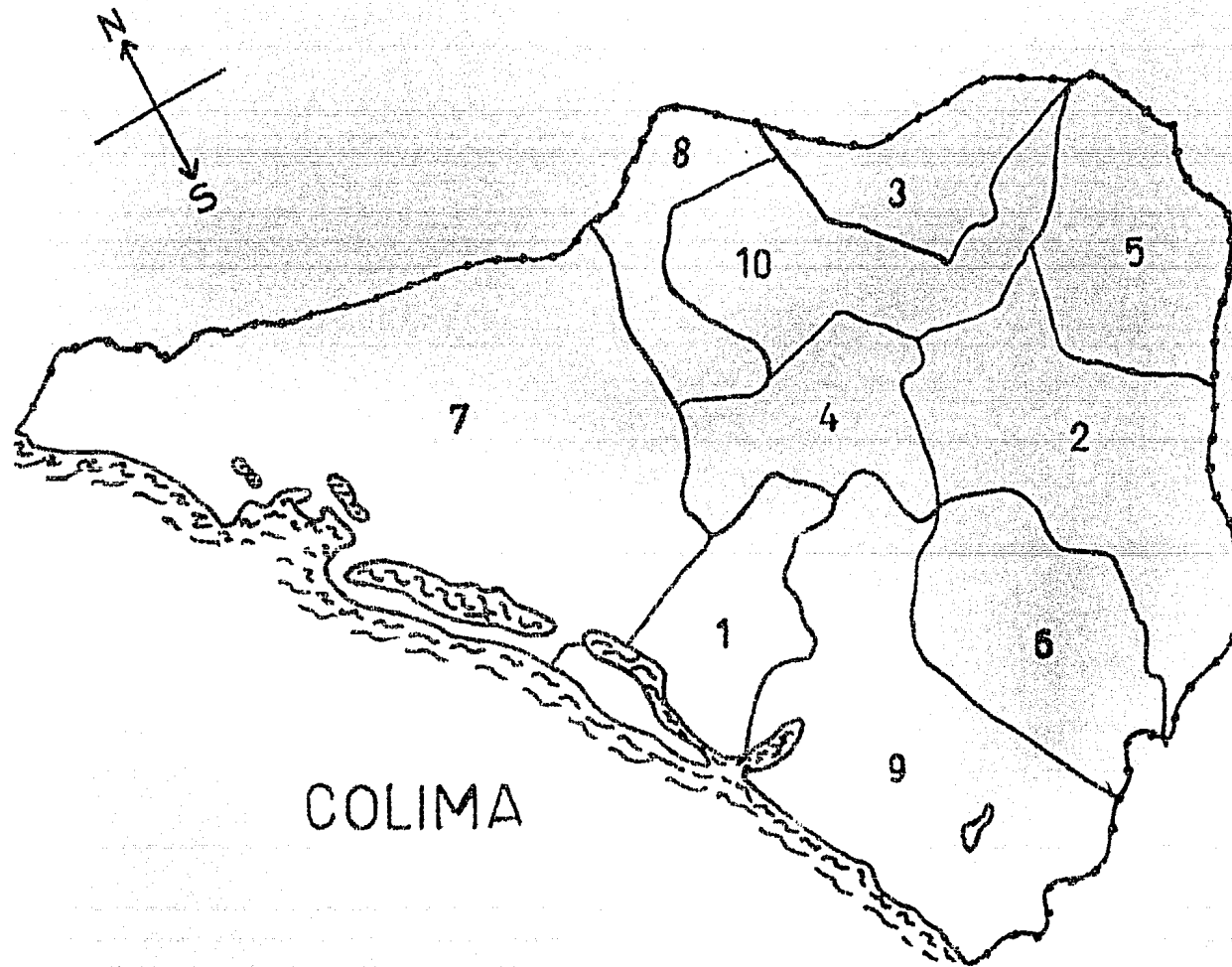
5.3. AISLAMIENTO.

Las hojas y ramas se lavaron perfectamente con agua corriente para eliminar tierra y polvo. Una vez limpias se observaron en el microscopio estereoscópico, seleccionando las lesiones más frescas, las que se recortaron abarcando una pequeña parte de tejido sano. Para el aislamiento se utilizaron tres diferentes métodos:

5.3.1. METODO DE RAYADO DIRECTO.

Las lesiones se rayan con ayuda de una aguja de disección estéril sembrando directamente sobre el medio con la misma aguja.

FIG. 4 ESTADO DE COLIMA.



MUNICIPIOS.

1. ARMERIA.
2. COLIMA.
3. COMALA.
4. COQUIMATLAN.
5. CUAUHEMOC.
6. IXTLAHUACAN.
7. MANZANILLO.
8. MINATITLAN.
9. TECOMAN.
10. VILLA DE ALVAREZ.

FIG.5 UBICACION DE LAS HUERTAS MUESTREADADAS EN EL MUNICIPIO DE TECOMAN, COLIMA.

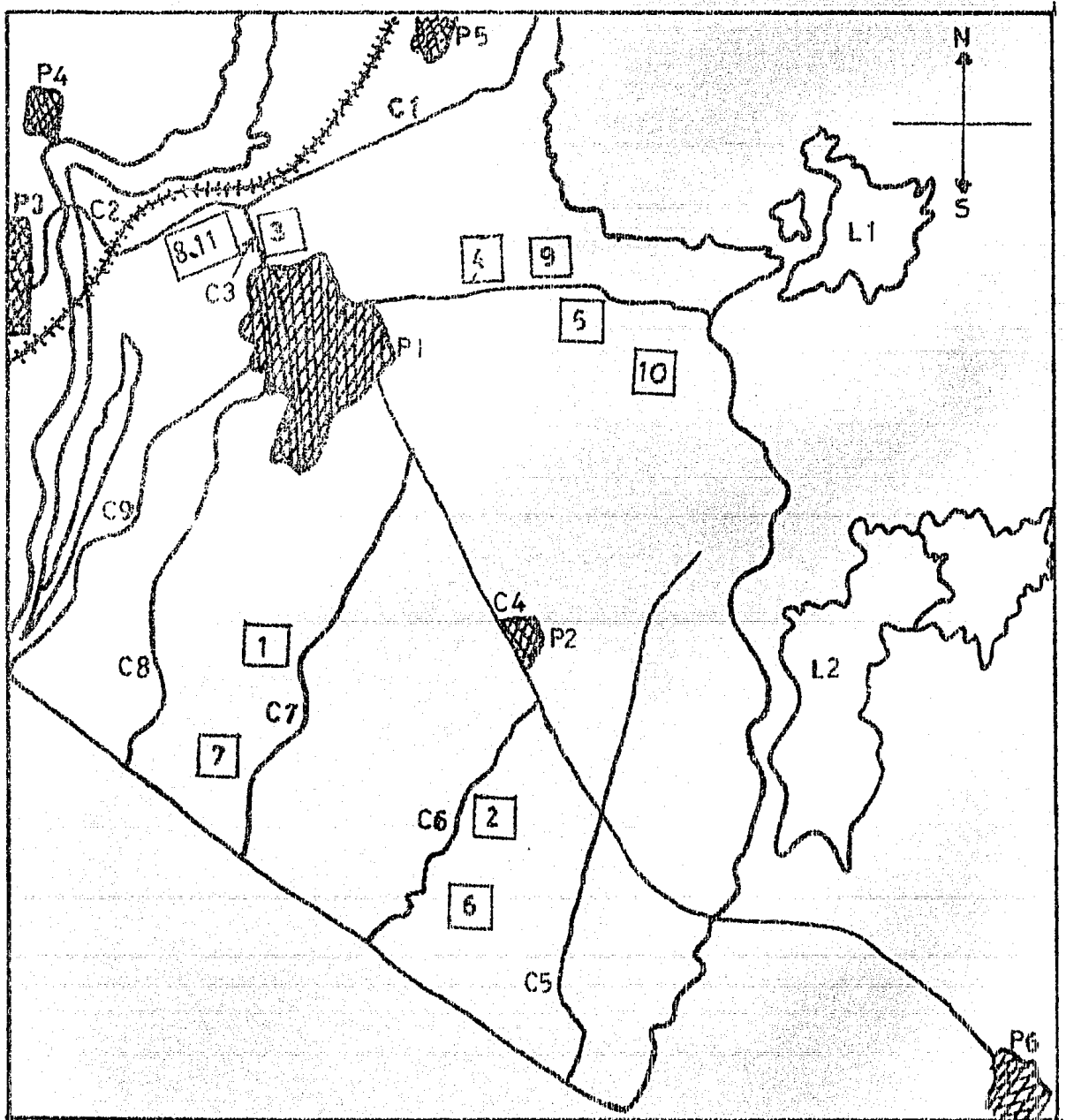


FIG.5 SIGNIFICADO DE LA NOMENCLATURA.
CARRETERAS.

- C₁ = CARRETERA A COLIMA.
- C₂ = CARRETERA A MANZANILLO.
- C₃ = CARRETERA A TECOMAN.
- C₄ = CARRETERA A CERRO DE ORTEGA.
- C₅ = CARRETERA AL CHUPADERO.
- C₆ = CARRETERA A CERRO DE AGUILAR.
- C₇ = CARRETERA A TECUANILLO.
- C₈ = CARRETERA A BOCA DE PASCUALES.
- C₉ = CARRETERA AL REAL.

POBLADOS.

- P₁ = POBLADO DEL MUNICIPIO DE TECOMAN.
- P₂ = POBLADO DEL EJIDO COFRADIA DE MORELOS.
- P₃ = POBLADO DEL MUNICIPIO DE ARMERIA.
- P₄ = POBLADO DE COFRADIA DE JUAREZ.
- P₅ = POBLADO DE CALERAS.
- P₆ = POBLADO DE CERRO DE ORTEGA.

LIMITES NATURALES.

- L₁ = LAGUNA DE ALCUZAHUE.
- L₂ = LAGUNA DE AMERIA.
- R - RIO ARMERIA

NOTA: DE LA HUERTA 1 A LA 3 PERTENECEN AL
PRIMER MUESTREO DE LA 4 A LA 8 AL SEGU
DO Y DE LA 9 A LA 11 AL TERCERO.

HUERTAS: [1], [2], [3], ... [11]

5.3.2. METODO POR MACERADO CON DILUCIONES.

En un mortero estéril se colocaron varias lesiones, se añadió agua estéril y se maceró perfectamente; posteriormente se hicieron diluciones con agua destilada estéril 1:10, en forma sucesiva hasta obtener diluciones del orden de 10^{-1} a 10^{-6} y se sembró un ml. tanto en forma directa como de cada dilución, esparciendo con asa.

5.3.3. METODO DE AGUA ESTERIL CON DILUCIONES.

En tubo con agua destilada estéril y piedras de ebullición se pusieron algunas lesiones, agitando por varios minutos con el fin de liberar al organismo, después se diluyó con agua destilada estéril desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . Depositándose en forma directa un ml. sobre el medio y un ml. de cada dilución esparciendo con asa.

Para el método de rayado directo se probó la desinfección previa de las muestras con hipoclorito de sodio al 1% por un min., o sin desinfección alguna. Para los métodos de macerado y agua estéril la desinfección se hizo con alcohol etílico al 70 %.

El medio utilizado para las primeras muestras fue el agar carbonato de sodio, dextrosa, extracto de levadura (YGC), y el agar Wakimoto (Apéndice A) para las segundas y terceras muestras. Todas las cajas se incubaron a 28°C durante 24-48 hrs.

5.4. PURIFICACION.

La purificación de colonias se hizo en los agares Wakimoto y Extracto de levadura dextrosa (YS).

Una vez que las colonias presentaban forma y tinción de Gram (Apéndice B) uniformes, se seleccionaron las Gram (-) para realizar

pruebas bioquímicas por un lado y de patogenicidad por el otro.

Debido a que en los resultados de las pruebas de patogenicidad, sólo produjeron lesiones características de bacteriosis las bacterias con Gram (-), color de colonia amarillo y O/F oxidativo; para las muestras del segundo y tercer períodos de muestreo, se consideraron estas características en la selección de bacterias para realizar las pruebas bioquímicas y de patogenicidad.

5.5. PRUEBAS BIOQUIMICAS.

Las pruebas bioquímicas que se realizaron se enlistan a continuación:

- 1) Producción de Indol
- 2) Producción de ácido sulfhídrico
- 3) Reducción de nitratos
- 4) Hidrólisis de almidón
- 5) Digestión de caseína
- 6) Digestión de gelatina
- 7) Hidrólisis de aesculina
- 8) Lisina
- 9) Catalasa
- 10) Utilización de citratos
- 11) Producción de pioscianina en medio A de King
- 12) Producción de fluoresceína en medio-B de King
- 13) Leche tornasol
- 14) Crecimiento en medio Mc. Conkey
- 15) Urea
- 16) Oxidación-fermentación
- 17) Crecimiento en caldo YS a diferentes concentraciones de NaCl.

a) 1%

b) 2%

c) 3%

- d) 4%
 - e) 5%
 - f) 6%
 - g) 7%
 - h) 8%
- 18) Crecimiento en caldo YS a diferentes pHs.
- a) pH = 4
 - b) pH = 6
- 19) Crecimiento en caldo YS a diferentes temperaturas
- a) T = 4°C
 - b) T = 41°C
- 20) Mucosidad en agar glucosa
- 21) Color de colonia en agar glucosa
- 22) Producción de ácido a partir de diferentes carbohidratos
- a) glucosa
 - b) manosa
 - c) lactosa
 - d) manitol
 - e) etanol
 - f) glicerol
 - g) aspargina
 - h) trehalosa
 - i) arabinosa
 - j) galactosa
 - k) fructuosa

5.6. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.

5.6.1. AJUSTE DE CONCENTRACION.

La concentración bacteriana se ajustó espectrofotométricamente (Espectrofotómetro Coleman, Junior II Modelo 6/20) a 620 nm con agua destilada estéril a una concentración de 6×10^8 cels/ml con base a una curva de calibración de $BaCl_2$ y H_2SO_4 (Apéndice B).

5.6.2. INOCULACION

Dicha concentración se inoculó en hojas de dos a tres semanas de edad con jeringas desechables y agujas odontológicas sobre la vena principal por el envés de la hoja. De la misma manera se inoculó a igual concentración, bacterias inactivadas por calentamiento, como un control negativo, así como agua destilada estéril.

Las hojas inoculadas se observaron diariamente hasta la aparición de síntomas.

5.7. REAISLAMIENTO.

Las hojas que presentaron síntomas se lavaron con agua corriente y se observaron en el microscopio estereoscópico para seleccionar las lesiones más frescas. Posteriormente las lesiones se desinfectaron con alcohol al 70% y se recortaron.

Para el reaislamiento se siguió el método de macerado sin diluciones, sembrando en cajas con agar Wakimoto.

Una vez que las bacterias estaban puras se les hizo tinción de Gram y prueba de O/F.

Las bacterias con un Gram (-) y O/F oxidativo se sometieron a pruebas bioquímicas.

5.8. PRUEBAS BIOQUIMICAS.

Las pruebas bioquímicas que se realizaron fueron las mismas que se realizaron a las bacterias inoculadas.

5.9. REINOCULACION

Cuando los resultados de las pruebas bioquímicas coincidieron con los de las bacterias inoculadas, se procedió a inocular estas bacterias siguiendo el mismo método de las pruebas de patogenicidad.

5.10. PRUEBAS SEROLÓGICAS.

Con el fin de tener un criterio más amplio en la identificación del agente causal de la bacteriosis en limón mexicano proveniente de Tecomán, Colima, se hicieron pruebas serológicas comparando a la bacteria aislada con las razas "A", "B" y "C" de Xanthomonas cam-

pestris p.v. citri por medio de los sueros producidos por éstas - proporcionados por el Dr. E.L. Civerolo del Depto de Agricultura - de los Estados Unidos.

5.10.1. OBTENCION DE SUEROS.

Las bacterias que produjeron síntomas en las pruebas de patogenicidad fueron crecidas en caldo YS por 24 hrs., con agitación constante a 28°C, para posteriormente incubarse con un volumen igual de solución salina-formol al 1.25% a temperatura ambiente durante 48 hrs. Se probó la esterilidad y la suspensión de células muertas fue lavada tres veces, centrifugando a 2,000 r.p.m./20 min desechando el sobrenadante y resuspendiendo cada vez en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH de 7.2. La concentración bacteriana se ajustó a 6×10^8 cels/ml de la misma manera que se hizo para las pruebas de patogenicidad, pero utilizando esta vez como diluyente PBS. Posteriormente, la suspensión bacteriana se distribuyó en viales y se conservó a 4°C.

Para la inmunización se utilizaron conejos hembra de Nueva Zelanda entre 2 y 3 Kg, los cuales se sangraron con el fin de usar este suero como control (Presuero, Apéndice B).

La suspensión bacteriana con una concentración de 6×10^8 cel/ml se diluyó a la mitad con PBS, inoculando 0.5 ml por vía intravenosa en los conejos, utilizando dos conejos por bacteria (Apéndice B). Una semana después de la inoculación intravenosa se inoculó por vía intramuscular 0.5 ml de una emulsión formada por una parte de suspensión bacteriana cuya concentración es de 6×10^8 cels/ml y una parte de adyuvante incompleto de Freund (Apéndices A y B).

Se realizaron repeticiones intramusculares en forma semanal -

hasta cumplir un total de 5 inoculaciones, incluyendo la inoculación intravenosa; 7 días después de la última inoculación se sangró a los conejos y se obtuvo el título de anticuerpos por pruebas de aglutinación en tubo.

5.10.2. PRUEBAS DE AGLUTINACION EN TUBO.

Se hicieron diluciones dobles del suero a probar con solución salina fisiológica (SSF) desde 1/10 hasta 1/1,310,720) y se mezclaron con su antígeno homólogo; al mismo tiempo se corrieron varios controles, uno formado por el suero con SSF; otro por la bacteria con SSF y por último el presuero con la bacteria (Tabla 2.)

5.10.3. PRUEBAS DE AGLUTINACION CON HETEROLOGOS.

Con el propósito de verificar si se estaba trabajando con una misma bacteria o con una gama de bacterias, todas las bacterias que produjeron síntomas similares a los de campo se enfrentaron por pruebas de aglutinación en tubo con los sueros obtenidos.

Una vez que se obtuvieron estos resultados, se realizó la comparación del agente causal de la bacteriosis con las razas "A", "B" y "C" de Xanthomonas campestris p.v. citri, a partir de los sueros obtenidos con estas bacterias.

5.10.4. COMPARACION DEL AGENTE CAUSAL DE LA BACTERIOSIS CON LOS SUEROS OBTENIDOS DE LAS RAZAS "A", "B" Y "C" DE Xanthomonas campestris p.v. citri.

Esta comparación se hizo por pruebas de aglutinación en tubo, utilizando como controles el presuero de cada antisuero (control-) y el suero obtenido con el agente causal de la bacteriosis.

TABLA 2: PRUEBA DE AGLUTINACION EN TUBO

# de tubo	SSF (ml)	suero (ml)	Pact 3×10^8 (ml)	Pre-suero (ml)	Concentración:
1	0.9	0.1	0.5		1/10
2	0.5	0.5 del tubo 1	0.5		1/20
3	0.5	0.5 del tubo 2	0.5		1/40
4	0.5	0.5 del tubo 3	0.5		1/80
5	0.5	0.5 del tubo 4	0.5		1/160
6	0.5	0.5 del tubo 5	0.5		1/320
7	0.5	0.5 del tubo 6	0.5		1/640
8	0.5	0.5 del tubo 7	0.5		1/1,280
9	0.5	0.5 del tubo 8	0.5		1/2,560
10	0.5	0.5 del tubo 9	0.5		1/5,120
11	0.5	0.5 del tubo 10	0.5		1/10,240
12	0.5	0.5 del tubo 11	0.5		1/20,480
13	0.5	0.5 del tubo 12	0.5		1/40,960
14	0.5	0.5 del tubo 13	0.5		1/81,920
15	0.5	0.5 del tubo 14	0.5		1/163,840
16	0.5	0.5 del tubo 15	0.5		1/327,680
17	0.5	0.5 del tubo 16			1/655,360
Cs	0.5	0.5			
Cb	0.5		0.5		
Cp	0.5			0.5	

SS= Solución salina fisiológica

Cs= Control del suero

Cb= Control de bacteria

Cp= Control del presuero

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. AISLAMIENTO.

De los tres métodos de aislamiento que se probaron, se obtuvo mejores resultados con el método de macerado, desinfectando las muestras con alcohol al 70% y sembrando en los medios de Wakimoto y YS.

6.2. PURIFICACION.

Los resultados de la tinción de Gram y las características culturales de las bacterias aisladas de material vegetativo de los tres períodos de muestreo, se presentan en la Tabla 3, anexándose también el resultado de la prueba de O/F.

Ya que se eliminaron las bacterias con un Gram (+) y O/F fermentativo, esto último para el caso de las muestras finales, las pruebas bioquímicas y de patogenicidad se realizaron con las bacterias 1,2,4, 7,8,10,18, y19.

6.3. PRUEBAS BIOQUIMICAS.

Las características bioquímicas de las bacterias con las que se trabajó, se enmarcan en la Tabla 4.

Descartando a la bacteria número 8, todas las demás coinciden con las características bioquímicas reportadas para Xanthomonas campestris, a excepción de las pruebas de : reducción de nitratos, hidrólisis de caseína, hidrólisis de gelatina y crecimiento en Mc. Conkey; sin embargo de acuerdo con Messina (47) esto no representa una diferencia clara y puede interpretarse como simples variaciones, ya que estos resultados pueden diferir de acuerdo a la raza de que se trate, al número de pases en medios artificiales, a la composición del medio de cultivo, a la edad del cultivo, etc. (66).

TABLA 3: CARACTERISTICAS CULTURALES; MORFOLOGICAS Y GRAM DE LAS BACTERIAS AISLADAS EN LOS MUESTREOS REALIZADOS DE MATERIAL VEGETATIVO DE LIMON MEXICANO EN TECOMAN COLIMA

Bacteria #	Color de col. en YGC	Color de col. en Wakimoto	Gram	Morfología celular	Ox/Fer
1*	amarillo	amarillo	-	bacilar	ox
2*	amarillo	amarillo	-	bacilar	ox
3	amarillo	amarillo	+	bacilar	
4*	amarillo	amarillo	-	bacilar	ox
5	blanco	blanco	+	bacilar	
6	amarillo	amarillo	+	bacilar	
7*	amarillo	amarillo	-	bacilar	ox
8*	naranja	naranja	-	bacilar	fer
9	amarillo	amarillo	+	bacilar	
10*	amarillo	amarillo	-	bacilar	ox
11	amarillo	amarillo	+	bacilar	
12	blanco	blanco	+	bacilar	
13	amarillo	amarillo	+	bacilar	
14	amarillo	amarillo	+	bacilar	
15	amarillo	amarillo	+	bacilar	fer
16	amarillo	amarillo	-	bacilar	fer
17	amarillo	amarillo	-	bacilar	fer
18*	amarillo	amarillo	-	bacilar	ox
19*	amarillo	amarillo	-	bacilar	ox

continua.

Nota: Las bacterias de la 1 a la 11 fueron obtenidas del primer muestreo; de la 12 a la 17 del segundo muestreo; de la 18 a la 19 del tercer.

*Bacterias con las que se realizaron las pruebas bioquímicas y de patogenicidad.

TABLA 4: CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE MATERIAL VEGETATIVO DE LIMON MEXICANO DE TECOMAN COLIMA:

Pruebas Bioquímicas	Número de bacteria									Xc
	1	2	4	7	8	10	18	19	X	
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	+	-	-	-	-	var
Hidrólisis de Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	var
Hidrólisis de caseína	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Hidrólisis de aesculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilización de citratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+
Oxidación -fermentación	ox	ox	ox	ox	fer	ox	ox	ox	ox	ox
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leche tornasol	p-r	p-r	p-r	p-r	p-r	p-r	p-r	p-r	p-r	var
Crecimiento en Mc. Conkey	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Mucosidad en agar glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Color de col. en A. glucosa	a	a	a	a	n	a	a	a	a	a
Crecimiento en caldo YS con NaCl a :										
1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

continua.

TABLA 4: CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE MATERIAL VEGETATIVO DE LIMÓN MEXICANO DE TECOMÁN COLIMA.

(CONTINUACION)

Prueba Bioquímica	Número de bacteria									
	1	2	4	7	8	10	18	19	X	Xc
Crecimiento en caldo YS a diferentes pHs:										
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Crecimiento en caldo YS a diferentes temperaturas										
4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
41°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Producción de ácido a partir de:										
glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
lactosa	+	+	+	+	+	+	-	-		var
manitol	+	+	+	+	+	+	+	+		var
etanol	+	+	+	+	+	+	+	+		
glicerol	+	+	+	+	+	+	+	+		var
asparagina	-	-	-	-	-	-	-	-		-
galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+		+
fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+		+
trehalosa	+	+	+	+	+	+	+	+		+
arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+		+
sacarosa							-	-		+

Las características bioquímicas para Xanthomonas campestris son las reportadas por Buchanan(6) y Messina (47).

X= Xanthomonas

a= amarillo

p-r= peptonización

Xc= campestris

n= naranja

reducción.

var= variable

6.4. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.

Las bacterias inoculadas que produjeron síntomas característicos de bacteriosis en mayor o menor grado, entre los 5 a 15 días después de la inoculación ; fueron las bacterias 1,2,7,y 19 (Fig 6, Tabla 5)

Notamos en la Tabla 5 que no todas las bacterias fueron capaces de producir los síntomas característicos de campo a pesar de que eran las mismas, de acuerdo con los resultados de las pruebas bioquímicas, tampoco la bacteria 8 produjo lesiones y cuyas características bioquímicas eran diferentes (Tabla 4). Esto puede explicarse considerando que el desarrollo de una enfermedad cualquiera que ésta sea, depende de las condiciones medioambientales, del estado fisiológico de la planta huésped y de la virulencia del patógeno, la cual puede verse afectada por la raza involucrada, el número de aislamientos en medios artificiales y la edad de la colonia, características del propio medio de cultivo, etc. (64).

6.5. REAISLAMIENTO.

Las bacterias reaisladas de lesiones desarrolladas en hojas inoculadas, presentan las características que se muestran en la Tabla 6. Observamos en esta Tabla la aparición de más de una bacteria diferente a las inoculadas. Esto puede ser debido a que al producirse una herida en el tejido vegetal, esto constituye una vía de entrada para organismos oportunistas o secundarios (64).

Ya que en todos los reaislamientos se presentaron bacterias con Gram (-), forma bacilar y O/F oxidativo, que corresponden a las características de las bacterias inoculadas, se descartó a aquellas bacterias con características distintas a las mencionadas; por lo tanto las pruebas bioquímicas se realizaron con las bacterias 1b - (que se tomará como 1), 2c (que se tomará como 2), 7 y 19.

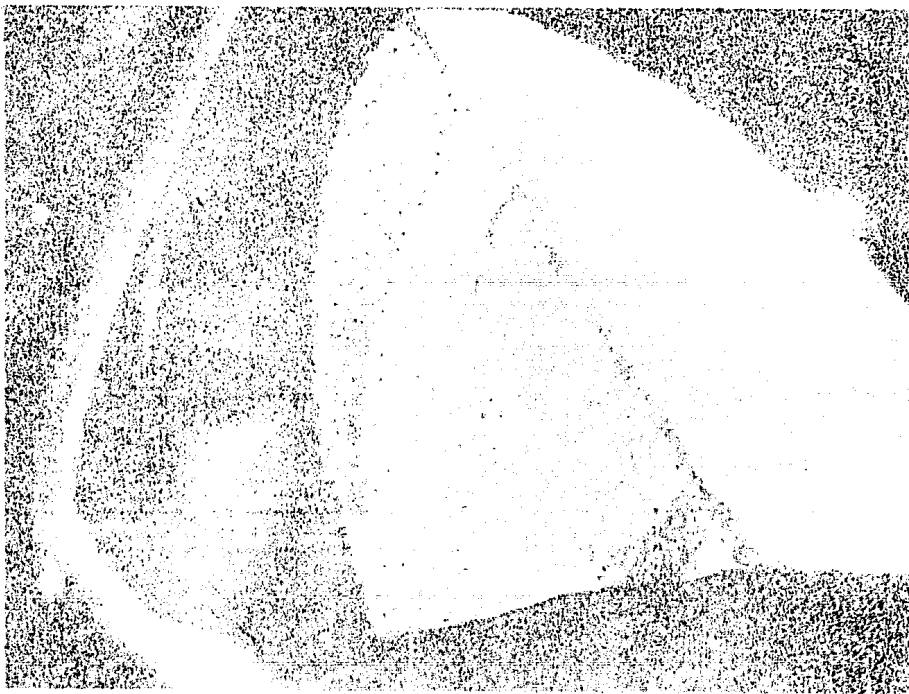


FIG. 6: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD.

TABLA 5: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

	Bacteria número							
	1	2	4	7	8	10	12	19
Presentación de síntomas	+	+	-	+	-	-	-	+

TABLA 6: CARACTERISTICAS DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE HOJAS INOCULADAS

Bacteria número	Color de colonia en Wakimoto	Gram	Morfología celular	O/F
1a	amarillo	+	bacilar	
2a	amarillo	+	bacilar	
1b*	amarillo	-	bacilar	ox
2b	amarillo	-	bacilar	fer
2c*	amarillo	-	bacilar	ox
7*	amarillo	-	bacilar	ox
19*	amarillo	-	bacilar	ox

*Bacterias con las que se hicieron las pruebas bioquímicas

Las bacterias 1a y 1b proceden de hojas inoculadas con la bacteria 1; la 2a, 2b y 2c de hojas inoculadas con la bacteria 2, etc.

6.6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas con las bacterias reaisladas se enumeran en la Tabla 7. Estos resultados son prácticamente los mismos que los de las bacterias inoculadas.

6.7. REINOCULACION.

Para la reinoculación se usaron las bacterias 1,2,7, y 19 - obteniéndose en todos los casos, síntomas característicos de bacteriosis en campo entre los 5 a 15 días después de la inoculación.

6.8. PRUEBAS SEROLÓGICAS.

Los antisueros se obtuvieron a partir de las bacterias 1,2, y 19, inoculando dos conejos con la bacteria 1, dos con la 2 y uno con la 19.

6.8.1. PRUEBAS DE AGLUTINACION EN TUBO.

Los títulos de los sueros obtenidos con las bacterias capaces de producir síntomas de bacteriosis se muestran en la Tabla 8.

Es evidente que el conejo inoculado con la bacteria 19 respondió muy bien a la estimulación dada por este antígeno, produciendo un suero con un título de anticuerpos muy elevado en comparación con los otros conejos, cuyos sueros presentaron un título menor (Tabla 8). Esto es porque cada individuo de la misma especie responde en forma individual ante la presencia de un determinado antígeno.

TABLA 7: CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS BACTERIAS REAISLADAS.

Prueba Bioquímica	Bacteria número				
	1	2	7	19	X, Xc
Gram	-	-	-	-	-
Producción de indol	-	-	-	-	-
Producción de ácido sulfhídrico	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	var
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	+
Hidrólisis de aesculina	+	+	+	+	+
Utilización de citratos	+	+	+	+	+
Lisina	-	-	-	-	-
Oxidación-fermentación	OX	OX	OX	OX	OX
Urea	-	-	-	-	-
Leche tornasol	per	per	per	per	var
Crecimiento en Mc. Conkey	+	+	+	-	-
Mucosidad en agar glucosa	+	+	+	+	+
Color de colonia en Agar glucosa	a	a	a	a	a
Crecimiento en caldo YS con NaCl al:					
1%	+	+	+	+	+
2%	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+
5%	+	+	-	+	+
6%	+	+	+	+	+
7%	+	+	+	+	+
8%	+	+	+	+	+
Crecimiento en caldo Ys a diferentes pHs:					
4	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+

TABLA 7: CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS BACTERIAS REAISLADAS.

Prueba Bioquímica	bacteria número				
	1	2	7	19	Xc
Gram	-	-	-	-	-
Producción de indol	-	-	-	-	-
Producción de ácido sulfhídrico	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	-	var
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	+
Hidrólisis de aesculina	+	+	+	+	+
Utilización de citratos	+	+	+	+	+
Lisina	-	-	-	-	-
Oxidación-fermentación	ox	ox	ox	ox	ox
Urea	-	-	-	-	-
Leche tornasol	p-r	p-r	p-r	p-r	var
Crecimiento en Mc. Conkey	+	+	+	+	-
Mucosidad en agar glucosa	+	+	+	+	+
Color de colonia en Agar glucosa	a	a	a	a	a
Crecimiento en caldo YS con NaCl al:					
1%	+	+	+	+	+
2%	+	+	+	+	+
3%	+	+	+	+	+
4%	+	+	+	+	+
5%	+	+	+	+	+
6%	-	+	+	+	+
7%	+	+	+	+	+
8%	+	+	-	+	-
Crecimiento en caldo TGA diferentes pH:					
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+

TABLA 7: CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS BACTERIAS REAISLADAS.
(CONTINUACION).

Prueba Bioquímica	Bacteria número					
	1	2	7	19	X	Xc
Crecimiento en caldo YS a diferentes temperaturas:						
4°C	-	-	-	-	-	
41°C	-	-	-	-	-	
Producción de ácido a partir de:						
glucosa	+	+	+	+	+	
manosa	+	+	+	+	+	
lactosa	+	+	+	+		var
manitol	+	+	+	+		var
etanol	+	+	+	+		
glicerol	+	+	+	+		var
asparagina	-	-	-	-		-
galactosa	+	+	+	+		+
fructosa	+	+	+	+		+
trehalosa	+	+	+	+		+
arabinosa	+	+	+	+		+

Las características bioquímicas para Xanthomonas campestris son las reportadas por Buchanan (6) y Messina (47).

X= Xanthomonas

Xc= campestris

a= amarillo

p-r= peptonización-reducción

TABLA 8: TITULACION DE ANTICUERPOS POR AGLUTINACION EN TUBO.

Número de suero	Bacteria número		
	1	2	19
S1 ₁	1/320		
S1 ₂	1/1,280		
S2 ₁		1/640	
S2 ₂		1/1,280	
S19			1/327,640
P1 ₁	-		
P1 ₂	-		
P2 ₁		-	
P2 ₂		-	
P19			-

S= suero

P= presuero

6.8.2. PRUEBAS DE AGLUTINACION CON HETEROLOGOS.

Para estas pruebas se utilizaron los sueros cuyos títulos resultaron ser los más elevados, o sea el S1₂, S2₂ y S19. Los resultados obtenidos de estas pruebas aparecen en la Tabla 9.

Analizando los resultados de la Tabla 9, comprobamos que efectivamente se estaba trabajando con una sola bacteria y no con una gama de ellas.

Para las pruebas serológicas posteriores se utilizó el suero S19 por ser el que tenía el título de anticuerpos mayor.

6.8.3. COMPARACION DEL AGENTE CAUSAL DE LA BACTERIOSIS CON LOS SUE- ROS OBTENIDOS DE LAS RAZAS "A", "B" Y "C" DE Xanthomonas campestris P.V. citri.

Al hacer reaccionar al agente causal de la bacteriosis con los sueros obtenidos de las razas "A", "B" y "C", se obtuvo un resultado positivo en los tres casos, lo que denota la semejanza existente entre estos organismos (Tabla 10).

Es obvio que la prueba de aglutinación en tubo representa una técnica rápida y fácil para establecer el parecido antigénico entre los organismos enfrentados, pero de ninguna manera nos indica el grado de este parecido, ya que en un suero obtenido contra determinado organismo existen una serie de anticuerpos formados contra antígenos característicos de género, de especie, de pato var y de raza. Así pues, por medio de esta prueba no es posible saber a cuál de las tres razas se parece más el organismo presente en México, a menos que se hicieran modificaciones en la técnica, como sería el hecho de realizar una adsorción de anticuerpos con las tres razas, o bien llevando a cabo técnicas como la doble difusión, difusión radial, etc.

TABLA 9: PRUEBAS DE AGLUTINACION EN TUBO CON HETEROLOGOS

Número de suero	Número de Bacteria			
	1	2	7	19
S1	1/1,280	1/1,280	1/1,280	1/640
S2	1/1,280	1/1,280	1/640	1/1,280
S19	1/327,620	1/63,810	1/327,640	1/63,810
P1	-	-	-	-
P2	-	-	-	-
P19	-	-	-	-

S= suero

P=presuero

TABLA 10 : PRUEBA DE AGLUTINACION EN TUBO ENTRE LOS SUEROS DE LAS RAZAS "A", "B" Y "C" DE Xanthomonas campestris p.v. citri Y EL AGENTE CAUSAL DE LA BACTERIOSIS DE TECOMAN COLIMA.

Suero	Bacteria mexicana
S _A	aglutinación (+)
S _B	aglutinación (+)
S _C	aglutinación (+)
P _A	aglutinación (-)
P _B	aglutinación (-)
P _C	aglutinación (-)
P _M	aglutinación (-)
S _M	aglutinación (+)

S= suero

P= presuero

7. CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas morfológicas, bioquímicas y de patogenicidad, el organismo causal de la bacteriosis en limón mexicano de Tecomán, Colima, es una bacteria identificada como Xanthomonas campestris.

2. Con base en las pruebas serológicas hechas, este organismo es semejante al agente causal del "cáncer de los cítricos", pero considerando la sintomatología observada en campo, no se trata de ninguna de las tres razas identificadas hasta el momento.

3. La prueba de aglutinación realizada es una técnica fácil y rápida para obtener el parecido antigénico entre microorganismos enfrentados, pero insuficiente para establecer la magnitud de esta semejanza.

8. LITERATURA CITADA

- 1.- Allan, E. and A., Kelman. 1977. Immunofluorescent stain procedures for detection and identification of Erwinia carotova var. a troseptica. Phytopathology 57: 1305-1312.
- 2.- Bautista, G.R.C. Y G.A., Morilla. 1982. Inmunología Veterinaria, Manual de Laboratorio. Ediciones de Apoyo a la Investigación Agropecuaria en México A.C. 202 pag.
- 3.- Dulbeco, D.D., H.N., Einsen, S.H., Ginsberg, B.W., Wood and M.T. Macarty. 1980. Tratado de Microbiología. 2a Edición. Salvat Editores S.A. 1559 pag.
- 4.- Boyd, W.C. 1963. Fundamentos de Inmunología. Eudeba Editores. Universidad de Buenos Aires. 721 pag.
- 5.- Bralansky, R.H., L.W., Timmer and R.F., Lee. 1982. Detection and transmission of a Gram-negative, Xylem limited bacterium in harphooters from a citrus grove in Florida. Plant Disease 66:(7) 590-592.
- 6.- Buchanan, R.E. and N.E., Gibbons. 1974. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. 8a. Edición. Baltimore. Williams and Wilkins Company. 1268 pag.
- 7.- Carpenter, P.L. 1975. Immunology and Serology. 2a Edición Sanders Philadelphia. 346 pag.
- 8.- Charudattan, R., R.E., Stall and D.L., Batchlor. 1973. Serotypes of Xanthomonas vesicatoria unrelated to its pathotypes. Phytopathology 63: 1260-1265.

- 9.- Chun, W.C. and A.M., Alvarez. 1983. A starch-methionine medium for isolations of Xanthomonas campestris pv. campestris from plant debris in soil. Plant Disease 67(6)632-635.
- 10.- Civerolo, E.L. and F., Fan. 1982. Xanthomonas campestris pv. citri detection and identification by enzyme linked, immunoabsorbent assay. Plant Disease. 66 (3): 231-236.
- 11.- CONAFRUT. 1982. El limón mexicano. Boletín del mercado exterior frutícola, año II No. 07, SARH. 63 pag.
- 12.- Cuñat, P. E., Hernández, E., Primo y R., Viva. 1973. Virosis de los cítricos III. Técnicas serológicas para el virus de la tristeza de los cítricos. Revista de Agronomía y Tecnología de Alimentos. 13(2): 274-278.
- 13.- Cowan, S.T. y R.J., Stall. 1979. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. Compañía Editorial Continental. S.A. México 520 pag.
- 14.- Crowle, A.J. 1960. Interpretation of Immunodiffusion. Annual Review Microbiol. 14: 161-176.
- 15.- Dianece, J.C. and N.W., Schaad. 1982. Isolation and characterization of inner and outer membranes of Xanthomonas campestris pv. campestris. Phytopathology 72(10):1284-1289.
- 16.- Elrod, R.P., and A.C., Braun. 1947. Serological studies of the genus Xanthomonas. Department of Animal and Plant Pathology. The Rockefeller Institute for Medical Research Princeton, New Jersey. 53(1): 509-518.

- 17.- Elrod, R.P. and A.C., Braun . 1947. Serological studies of the genus Xanthomonas. II Xanthomonas translucens groups. Journal of Bacteriology 53: 529-534.
- 18.- Fállico de Alcaraz, L.M. 1979. Organismo bacteriano asociado con Xanthomonas citri (Hasse) Dowson y su efecto sobre la Antracnósis de los cítricos. Impreso por la
- 19.- FIDELIM. 1978. Problemas Fitosanitarios. Boletín Informativo - 1(1) 16 pag.
- 20.- Garnsey, S.M., E.P., Du Charme, J.W., Lightfield, C.P., Seymour and J.T. Griffiths. 1979. Preventive action to protect the U.S. Citrus Industry. 60 (1): 5,6,8,10 y 13
- 21.- Goth, K.W. 1965. Puncture method for isolating bacterial blights of bean. Phytopathology 55 (8): 930-931.
- 22.- Goto, M. 1969. Studies on citrus canker in Japan. Proceedings First International Citrus Symposium. 3: 1251-1252.
- 23.- Goto, M., Y., Taduchi and N., Okabe. 1979. Interaction between Xanthomonas citri and Erwinia herbicola in vitro and in vivo. - Ann. Phytopathology Soc. Japan 45: 618-624.
- 24.- Guthrie, J.W., D.M., Huber and H.J., Fenwick. 1965. Serological detection of halo blight. Plant Disease Reporter 49(4): 297-299
- 25.- Hildebrand, D.C. 1971. Pectate and Pectin gels for differentiation of Pseudomonas sp. and other bacterial plant pathogens. - Phytopathology. 61: 1430-1436.

- 26.- Hsich, S.P.Y. and I.W., Budenhagen. 1974. Suppressing effects of Erwinia herbicola on infection by Xanthomonas oryzae and on symptom development in rice. Phytopathology. 64: 1182-1185.
- 27.- Hsu, S. and R.S., Dickey. 1972. Interaction between Xanthomonas phaseoli, Xanthomonas vesicatoria, Xanthomonas campestris and Pseudomonas fluorescens in bean and tomato leaves. Phytopathology 62: 1120-1125.
- 28.- Jensen, C.O. 1918. Undersølgelser vedrørende nogle suulstilignende dannelser hos planter. Ser unlaboratorium. Meddelelser fra de kgl veterinær-og landbohøskoles aarsskrift. Copenhagen: Niesen and Lidiche. 143 pag.
- 29.- INIA. 1982. El cultivo del limón en el Estado de Colima. Folleto para productores No. 3, marzo 1982. SARH.
- 30.- Kado, C.I. and M.G., Hesketti. 1970. Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. Phytopathology 60 (1): 969-978.
- 31.- Katznelson, H. and M.D., Sutton. 1951. A rapid phage plaque count method for the detection of bacterial as applied to the demonstration of internally borne bacterial infection of seed. Department of Agricultura, Ottawa Canada. 22(1) : 689-701.
- 32.- Klotz, L.J. 1973. Color Handbook of citrus diseases. Citrus Research center and Agricultural Experiments. Station Riverside California. 121 pag.
- 33.- Knorr, L.C. 1973. Citrus diseases and disorder. The University Press of Florida Gainesville 163 pag.

- 34.- Koizumi, M. 1966. Method for inoculation of Xanthomonas citri.
Annals of Phytopathology Soc. Japan 32: 299-230.
- 35.- Kuhara, S. 1978. Present Epidemic Status Control of the Citrus
canker disease. Xanthomonas citri (Hassé) Dow. in Japan. Rev.
Plant Protec. Res. 11: 132-142.
- 36.- Kwopinski, J.B. 1965. Methods on serological research. Jonh Wi-
leyand Sons. Inc. New York-London-Sydney. 526 pag.
- 37.- Leben, C. and J.P., Slesman. 1982. Preservation of plant patho-
genic bacteria on silica gel. Plant Disease. 66(4): 327.
- 38.- Liew, K.W. and A.M., Alvarez. 1980. Phage typing and listype
distribution of Xanthomonas campestris. Phytopathology 71:274-
276.
- 39.- Liew, K.W. and A.M., Alvarez. 1981. Biological and Morfological
characterization of Xanthomonas campestris bacteriophages Phyto-
pathology 71: 269-272.
- 40.- Link, G.K. and A.D., Link. 1928. Further aglutination test --
with bacterial plant pathogens. 1. Bacterium campestris; Bacte-
rium phaseoli group; Bacterium medicaginis var. phaseolicola; -
Bacterium tumefaciens. Bot. Gaz. 85: 178-197.
- 41.- Link, G.K. and C.G., Sharp. 1927. Correlation of host and serol
gical specificity of Bacterium campestris, flaccumfasciens, Bac-
terium sojense. Bot. Gaz. 83: 145-160.

- 42.- Lourekovich, L. and Z., Klement. 1961. Species-specific antigens of Pseudomonas tabaci. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung 8: 303-310.
- 43.- Mac Fadin, J.F. 1980. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médico Panamericana. Buenos Aires. 301 pag.
- 44.- Manhata, I.C. and S.K. Addy. 1977. Serological specificity of Xanthomonas oryzae Insitant of bacterial blight or rice. Int. J. Sust. Bacterol 27: 383-385.
- 45.- Malin, E. M., D.A., Roth and E.L., Belden. 1983. Indirect Immunofluorescent staining for detection and identification of Xanthomonas campestris p.v. phaseoli in naturally infected bean seed. Plant Disease 67 (6): 645-647.
- 46.- Messina, M.A. 1977. Los métodos serológicos en el estudio de la bacteria que produce la cancrrosis cítrica en Argentina. Estación Experimental Agropecuaria Concordia. Serie Técnica No. 48:1-13.
- 47.- Messina, M.A. 1980. Viaje de intercambio científico al Japón - relacionado con cancrrosis y virus en citrus. Serie de informes especiales No. 2. Estación Experimental Agropecuaria Concordia 3:13.
- 48.- Miyakawa, T.A. and Yamaguchi. 1981. Citrus Disease in Japan. - Citrus Canker. Japan Plant Protection Association.
- 49.- Morton, D.J. 1965. Comparison of three serological procedures for identification of Xanthomonas vesicatoria in pepper leaves. - Phytopathology 55: 421-424.

- 50.- Namekata, T. 1971. Estudios comparativos entre Xanthomonas citri (Hesse) Dowson., agente causal do cancro citrico e una bacteria agente causal da cancrose do liminero galego. Congreso Brasileiro de Fruticultura, do Campinas Anais. Campinas, Soc. Bras. de Fruticultura. 1973 pag: 527-546.
- 51.- Namekata, T. and E., Balmer. 1977. Comparative studies on pathogenicity among causal agents of the three citrus canker. I Congreso Mundial de Citricultura 1973. Murcia Valencia, del 29 de abril al 10 de mayo de 1973.
- 52.- Nomé, S.T., B.C., Raju, A.C., Goheen, G. Nyland and D., Docombo 1980. Enzyme linked immunoabsorbent assay for Pierces disease - bacteria in plant tissues. *Phytopathology* 70: 746-749.
- 53.- Obata, T.F., Tsúboi and S., Wakimoto. 1969. Studies on the detection of Xanthomonas citri by phage technique and the surface sterilization on unshu orange for export to the United States.
- 54.- O'brien, L.M., D.J., Morton, W.J., Maning, and R.W., Scheetz . 1967. Serological differences between aparentely typical pepper and tomato isolates of Xanthomonas vesicatoria. *Nature* 215: 532-533.
- 55.- Ouchternoly, O. 1948. In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphteria bacteria. *Acta Pathology Microbiol* 25: 186-91.
- 56.- Pinto, C.B. 1981. *Virología Agrícola*. Universidad Autonoma de Chapingo, Méx. 175 pag.
- 57.- Pratt, R.M. 1983. Guia de Florida sobre insectos enfermedades y trastornos de la nutrición en las frutas cítricas. 4a. Reimpresión, Editorial Limusa, Méx. 199 pag.

- 58.- Primo, E.E., Hernández., J., Martínez, P., Cuñat, and U.R., Vila. 1971. Diagnóstico precoz de la tristeza del naranjo I. Separación y reacciones de partículas nucleoprotéicas. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 13(2): 274-278.
- 59.- Reuther, W. et. al. 1967. The Citrus Industry Vol. No. 4. A centennial Publication of the University California. pag.
- 60.- Reuther, W. et. al. 1967. The Citrus Industry Vol. 1. A centennial Publication of the University California 611 pag.
- 61.- Rosseti, V. 1977. Citrus canker in Latin America. A. Review -- Proc. Int. Soc. Citriculture.3: 918-924.
- 62.- Sands, D.C., M.N., Schort and D.C., Hildebrand. 1970. Taxonomy of Phytopathogenic Pseudomonas. Journal of Bacteriology 101(1) ; 9-23.
- 63.- SARH. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del Pacífico, Centro. Campo Agrícola Experimental Tecomán. Tecomán, Col., Méx. Folleto para Productores No. 3. Marzo 1982 pag.
- 64.- Sarasola, A.A. y M.A.S., Rocca. 1975. Fitopatología, Curso Moderno, Vol. III. Editoria Hemisferio Sur, Mex. Buenos Aires 222 pag.
- 65.- Shaad, N.W. 1978. Use of direct and indirect immunofluorescence test for identification of Xanthomonas campestris. Phytopathology 68(2): 249-252.

- 66.- Schaad, N.W. 1979. Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathology*. 17: 132-147.
- 67.- Schaad, N.W. 1980. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Bacteriology Committee of American Phytopathological Society St. Paul Minnesota 67 pag.
- 68.- Sharp, G.C. 1927. Virulence, serological, and other physiological studies of Bact. flaccufasciens, Bact. phaseoli and Bact. phaseoli sojense. *Bot. Gaz.* 83: 113,44.
- 69.- Smith van Howard. 1980. "Boat people". Increase citrus canker - danger. *The Citrus Industry* 1982. 63(5): 175-176.
- 70.- Stall, R.E., J.W., Miller, G.M., Marcó and B.L., Canteros de Echenique. 1981. Pathogenicity of three strains of citrus canker organism on grapefruit. *Proc. Fifth Conf. Plant. Bact. California*. 1981: 334-340.
- 71.- Stall, R.E., G.M., Marcó and B.L., Canteros de Echenique. 1982. Importance of mesophyll in mature-leaf reviridae to canker of citrus. *Phytopathology*. 72(8): 1097-1100.
- 72.- Stall, R.E. and C.P., Seymour. 1983. Canker and threat to citrus in the gulf coast states. *Plant Disease* 67(5): 581-585.
- 73.- Vawer, A., P.E., Bedwell and A. Borittetl. 1979. The enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Diatech Laboratories Inc.* - 125 pag.
- 74.- Walker, J.C. and M.D. Walker. 1960. *Plant Pathology*. 3a. Edición Mc. Grow-Hill Book Company. New York. 819 pag.

75.- Williams, S.C. 1967. Methods in Immunology and Immunochemistry
Vol. 1. Academic Press, New York-London 479 pag.

9. APENDICES

9.1. APENDICE A, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

(1) Medio YGC

Extracto de levadura	10 g
Dextrosa	20 g
CaCO ₃	15 g
Agua destilada	1 l

Disolver todos los reactivos excepto el CaCO₃ en la menor cantidad de agua posible. Aparte disolver el CaCO₃ en el agua restante y al final mezclar ambas soluciones y esterilizar a 121°C durante - 15 min.

Nota: antes de vaciar a caja agitar para resuspender el carbonato.

(2) Medio Wakimoto.

Papa	300 g
Sacarosa	15 g
Peptona	5 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2 g
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Las papas peladas, se cortan y pesan, después se ponen a cocer con el total del agua a utilizar. Una vez cocidas, se filtran y la infusión se mezcla con el resto de los componentes, añadiendo hasta el final el agar y calentando para disolver si es necesario.

Esterilizar a 121°C/15 min. El pH final es de 6.8.

(3) Medio D₃.

Sacarosa	10 g
Arabinosa	10 g
Caseína Hidrolizada	5 g
LiCl	7 g
Glicerina	3 g
NaCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
Dodecil sulfato de sodio	50 mg
Azul de bromotimol	60 mg
Fucsina ácida	100 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Todos los componentes se mezclan y el pH se ajusta a 8.2 con so
sa antes de esterilizar. Después de esterilizar el medio debe tener
un pH de 6.9-7.0 y un color verde.

(4) Medio D₅.

Celobiosa	10 g
K ₂ HPO ₄	3 g
NaH ₂ PO ₄	1 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Pesar todos los ingredientes y disolver en el agua. Esterilizar
a 121°C/15 min.

(5) Medio Basal O/F de Hugh-Leifson.

Peptona de caseína	2 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Agar	2.5 g
Azul de bromotimol	0.03 g
Agua destilada	1 l

Se disuelven todos los ingredientes en el agua destilada. Se deja reposar durante 5 min. Se calienta hasta obtener una solución. El azúcar a probar se adiciona al 1% antes de esterilizar en autoclave a 118°C durante 10 min.

(6) Medio de Leche Tornasol.

Dejar reposar leche fresca integral en el refrigerador durante toda la noche y separar la leche descremada por sifonación, teniendo cuidado de no asperjar la capa de crema. Tratar con vapor durante una hora y enfriar en el refrigerador. Filtrar y medir el filtrado. Agregar la cantidad de tornasol suficiente para obtener un color púrpura azulado y esterilizar a 115°C/10 min. o por vapor fluente durante 30 min. en cada uno de los tres días sucesivos. Después del calentamiento, este medio es incoloro, pero el color retorna con el enfriamiento.

Nota : Debe evitarse el sobrecalentamiento para prevenir la caramelización. La leche homogenizada no es adecuada.

(7) Medio Mac Conkey

Mezcla de sales biliares	5 g
Peptona	20 g

Laetosa	10 g
Agar	15 g
Púrpura de bromocresol	0.01 g

Disolver todos los componentes en un litro de agua destilada esterilizar a 121°C/15 min. pH final de 7.3 a 25°C.

(8) Agar hierro-lisina

Peptona de gelatina	5 g
Extracto de levadura	3 g
Dextrosa	1 g
L-lisina	10 g
Citrato de hierro y amonio	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	13.5 g
Agua destilada	1 l

Suspender en agua destilada. Hervir durante 1 min. Distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C por 12 min, pH final 6.7.

(9) Base para agar urea.

Peptona	1 g
D(+)- glucosa	1 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	2 g
Rojo de fenol	0.012 g
Agar	12 g

Se adicionan los componentes a 950 ml de agua destilada. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. Una vez estéril, se adicionan 50 ml de una solución de urea al 40% esterilizada por fil

tración, la solución se vacía en tubos estériles y se deja solidificar en forma inclinada.

(10) Medio para carbohidratos.

$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$	0.5 g
KH_2PO_4	0.5 g
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
Extracto de levadura	1 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l
Solución alcohólica de bromocresol	
a) 1.5 %	0.7 ml
Azúcar a probar	1 %

Todo se disuelve en el agua y se esteriliza en tubos a 118°C 10 min.

(11) Agar Citrato de Simmons

MgSO_4	0.2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1 g
KH_2PO_4	1 g
Citrato de sodio	5 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agua destilada	1 l
Agar	12 g

Todos los ingredientes se disuelven en el agua destilada -- por calentamiento. Esterilizar a 121°C/15 min. El pH final es de 6.9.

(12) Gelatina nutritiva

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1 l

Agregar la gelatina al agua y dejar durante 15 a 30 min, calentar para disolver la gelatina, agregar y disolver los otros -- constituyentes. Esterilizar a 115°C 20 min.

(13) Medio para probar diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

Caldo YS más concentración a probar.

(14) Medio para hidrólisis de almidón.

Extracto de carne	10 g
Peptona	10 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Almidón	10 g
Agua destilada	1 l

El almidón se disuelve en una porción de agua, y el resto de los ingredientes se disuelven por calentamiento en el resto -- del agua, al final se mezclan ambas soluciones y se esteriliza a 115°C durante 20 min.

(15) Medio para hidrólisis de caseína

Leche descremada	500 ml
Agar nutritivo de doble concentra	
ción	1 l

Se mezcla y esteriliza a 115°C durante 10 min..

(16) Medio para la detección de ácido sulfhídrico e indol.

Peptona	0.5 g
Agua destilada	1 l

Para la detección de ácido sulfhídrico se utilizan tiras de papel impregnadas con acetato de plomo y para indol tiras de ácido oxálico.

(17) Medio Agar glucosa.

Extracto de carne	3 g
Peptona de caseína	10 g
D (+) glucosa	10 g
NaCl	5 g
Agar	13 g
Agua destilada	1 l

Disolver y esterilizar a 121°C durante 15 min. pH final - después de esterilizar a 32°C. 7.2-7.4.

(18) Medio para hidrólisis de aesculina

Aesculina	1 g
Citrato férrico	0.5 g
Peptona	10 g
Agar	12.5 g
Agua destilada	1 l

Se disuelve la aesculina y la sal de fierro en el agua peptonada y se esteriliza a 115°C durante 10 min.

(19) Medio B de King.

Proteosa Peptona No. 3	20 g
K_2HPO_4	7.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7.5 g
Agar	15 g
Glicerol	10 ml
Agua destilada	1 l

Mezclar todos los reactivos exepcto el agar; ajustar el pH a 7. Agregar el agar. Esterilizar a 121°C por 15 min.

(20) Medio A de King.

Bacto peptona	20 g
Agar	15 g
Glicerol	10 g
K_2SO_4	1 g
$MgCl_2$	1.4 g
Agua destilada	1 l

Disolver todos los ingredientes menos el agar. Ajustar el pH a 7.2. Agregar el agar y esterilizar a 211°C 15 min.

(21) Medio de Tween 80.

Peptona	10 g
NaCl	5 g
$CaCl_2 \cdot H_2O$	0.1 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 l

Tween 80 10 ml

Disolver todos los ingredientes excepto el Tween con ayuda de calor, ajustar el pH a 7.4 y esterilizar a 121°C por 15 min. El tween se esteriliza a 121°C por 10 min. y se agrega a la solución anterior a una temperatura de 40 a 50°C.

(22) Caldo YS

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 l

Disolver, distribuir en tubos y esterilizar a 121°C durante 15 min.

(23) Caldo de nitratos

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
KNO_3	1 g
Agua destilada	1 l

Disolver, distribuir en tubos y esterilizar a 121°C durante 15 min, el pH final debe ser de 7.

(24) Solución salina amortiguadora de fosfatos.

NaH_2PO_4	2.5 g
KH_2PO_4	2.5 g
Na_2PO_4	4.25 g

Agua destilada 1 l

* Cuando se va a trabajar en frío se recomienda usar la sal de potasio.

(25) Solución de cristal violeta

Cristal violeta	0.5 g
Fenol	2.5 g
Etanol al 97%	20 ml
Glicerina	80 ml
Agua destilada	1 l

(26) Solución de safranina

Solución acuosa de safranina al 1%.

(27) Solución alcohol acetona

50 partes de alcohol al 97% y 50 partes de acetona

(28) Reactivos para la prueba de reducción de nitratos

Solución A:

0.8 % de ácido sulfanílico en ácido acético 5N; disolver -- con ligero calentamiento.

Solución B:

0.6% de dimetil naftilamina en ácido acético 5N ó 0.5% de α -naftilamina en ácido acético 5N.

(29) Solución salina-formol al 1.25%

Se prepara una solución salina fisiológica con NaCl en una concentración de 0.15M y a esta se le añade formol en un porcenta-

je de 1.25.

(30) Solución de tornasol.

Tornasol granulado	250 g
Eranol al 40%	1 l

(31) Adyuvante incompleto de Freund

15% de lanolina

85% de nujol o aceite mineral.

Se disuelve la lanolina en Baño María y en caliente se mezcla con el nujol.

(32) Tiras de papel para la detección de ácido sulfhídrico.

Tiras de papel filtro de 5 a 10 mm. de ancho y 50 a 60 mm. de largo se impregnan con una solución saturada de acetato de plomo en caliente.

(33) Tiras de papel para la detección de indol

Tiras de papel filtro de 5 a 10 mm. de ancho y 50 a 60 mm. de largo se impregnan de una solución saturada de ácido oxálico en caliente.

9.2. APENDICE B, TECNICAS.

(1) Tinción de Gram.

- Con una asa se coloca una gota de agua destilada estéril - sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, sobre la gota se coloca una asada de un cultivo de 24 hrs. de edad, y se diluye, se fija con calor, pasando varias veces el portaobjetos sobre la flama del mechero.

- El porta se cubre con solución de cristal violeta por un - min.

- Lavar con agua corriente.

- Cubrir el portaobjetos con solución de lugol por espacio - de un min.

- Lavar con agua corriente.

- Decolorar con alcohol-acetona hasta observar que las gotas caen cristalinas e incoloras.

- Lavar con agua corriente.

- Aplicar solución de safranina el 1% por 30 seg y lavar -- con agua corriente.

- Dejar secar al aire y observar al microscópio.

(2) Curva patrón de $BaCl_2$ y H_2SO_4

Se preparan soluciones de $BaCl_2$ y H_2SO_4 ambas al 1% y se -- realizan diluciones de acuerdo con la Tabla 11., leyendo en espec--

TABLA 11: CURVA PATRON DE BaCl_2 Y H_2SO_4 .

Tubo #	ml de BaCl_2 al 0.1%	ml de H_2SO_4 al 0.1%	Aforar con agua a	# de bact/ml $\times 10^8$	Abs. D.O.
1	0.1	9.9	30 ml	1	0.029
2	0.1	9.9	15 ml	2	0.060
3	0.1	9.9		3	0.080
4	0.2	9.8		6	0.159
5	0.3	9.7		9	0.232
6	0.4	9.6		12	0.310
7	0.5	9.5		15	0.384
8	0.6	9.4		18	0.462
9	0.7	9.3		21	0.520

trofotómetro (Coleman, Junior II Modelo 6/20), a 620 nm.

(3) Obtención de suero (2).

Los conejos se pueden sangrar por punción intracardiaca o por medio del corte de la vena principal de la oreja. Para llevar a cabo el segundo método el animal primero se coloca en una caja de sujeción para conejos o se envuelve en una sábana o tela. Una de las orejas del conejo se humedece con jabón y agua, y se procede a rasurar la superficie superior del borde posterior, sobre la vena marginal es muy importante este paso, ya que la presencia de pelo conyeba a la coagulación más rápida. El área rasurada se seca con algodón, humedeciendo con xilol para resaltar la vena marginal (Fig.7). Inmediatamente después del corte, el recipiente para recolectar la sangre se coloca debajo del corte, permitiendo que la sangre escurra por las paredes del recipiente inclinado, con el fin de evitar la hemólisis.

Al mismo tiempo utilizando los dedos índice y pulgar, se hace presión en la base de la oreja para ocluir el retorno venoso. Si, posteriormente, la sangre comienza a fluir lentamente, hay que limpiar vigorosamente la incisión con algodón para remover la sangre coagulada. Esto restablecerá el flujo. Generalmente no es necesario hacer un segundo corte. En un solo sangrado se pueden obtener de 25 a 50 ml de sangre de un conejo, y cantidades similares se pueden colectar en intervalos de 4 semanas.

Una vez obtenida la sangre ésta se incuba a 37°C por 2 a 3 hrs. hasta obtener la separación del coágulo, que ha de separarse del vidrio con ayuda de un palillo, y luego de aproximadamente 24 hrs. a temperatura ambiente, se centrifuga a 2,000 rpm/20 min., y entonces el suero que debe ser cristalino se separa con cuidado usando pipeta Pasteur, almacenándose a 4°C dentro de viales en por-

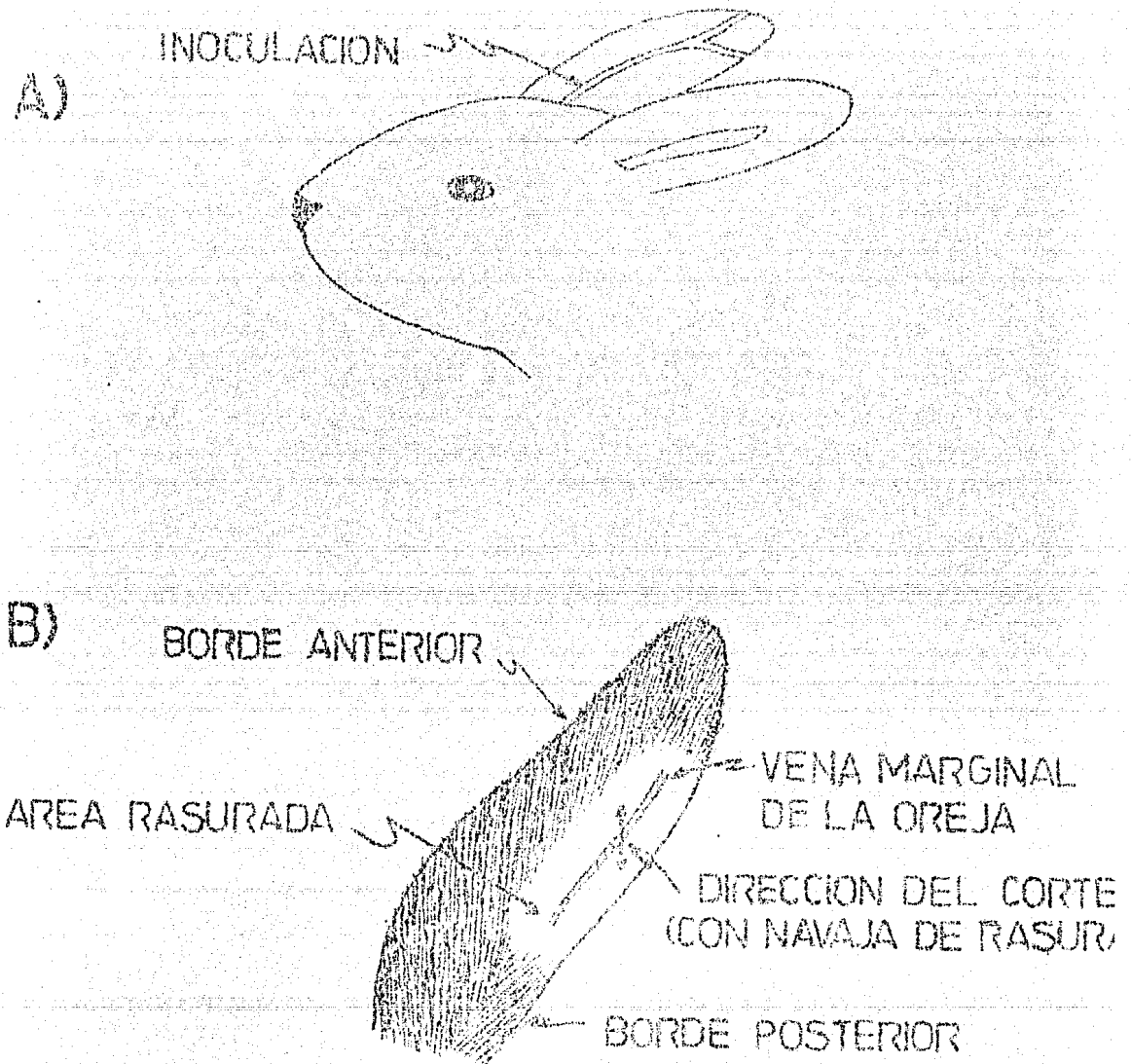


FIG. 7: A) INOCULACION EN LA VENA CENTRAL DE LA OREJA DE UN CONEJO.

B) SANGRADO DE LA VENA MARGINAL DE LA OREJA DE UN CONEJO.

ciones adecuadas para su posterior uso.

(4) Emulsión del Antígeno.

En un vaso de precipitados se colocan iguales cantidades de adyuvante y suspensión bacteriana con una jeringa (de 3,5,10 ó 20ml dependiendo del volumen a mezclar), sin aguja, se mezclan repetidamente el antígeno y el adyuvante, succionando y expeliendo sucesivamente. Conforme la mezcla se va emulsificando toma una apariencia lechosa y se hace espesa. Se continua formando la emulsión hasta que una gota de ésta, colocada sobre la superficie de un recipiente que contenga agua, permanezca intacta (no se desintegra) o al permanecer en reposo no se separa en dos fases, La emulsión se debe preparar exactamente antes de usarse.

9. 3. Apéndice C, características bioquímicas.

* Buchanan, R.E. and N.E., Gibbons. 1974. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, Octava edición. Baltimore. The Williams and Wilkins company. 364 pag

Schaad, N.W. 1980. Laboratory Guide for Identification of plant pathogenical, Society St. Paul Minesota. 67 pag.

TABLA 12: CARACTERISTICAS DEL GENERO Xanthomonas

XANTHOMONAS: XANTHUS (AMARILLO), MONAS (MONAD).

Color de colonia en medio YGC, Wakimoto, YS y otros	amarillo
Morfología celular	bacilar
Motilidad	(+) flagelo polar
Gram	(-)
Metabolismo	oxidativo
Oxidasa	(-)
Catalasa	(+)
Producción de ácido a partir de:	
ramnosa	(-)
inulina	(-)
adonitol	(-)
dulcitol	(-)
inucitol	(-)
glucosa	(+)
manosa	(+)
Leche tornasol	no produce ácido
Utilización de:	
acetato	(+)
citrato	(+)
malonato	(+)
propionato	(+)
succinato	(+)
benzoato	(-)
oxalato	(-)
gluconato	(+)
tarttrato	(-)

TABLA 12: CARACTERISTICAS DEL GENERO Xanthomonas (CONTINUACION)

Hidrólisis de Tween 80	la mayoría lo utiliza rápidamente
Reducción de Nitratos	(-)
Producción de ac. sulfhídrico	(+)
Indol	(-)
Crecimiento a 5°C	(-)
Crecimiento a 40°C	(-)

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 2a. Edición. Sanders Philadelphia. 346 pag.

TABLA 13: CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GENERO Xanthomonas.

	<u>X. campestris</u>	<u>X. fragariae</u>	<u>X. albilineans</u>	<u>X. axonopodis</u>	<u>X. ampelina</u>
Crecimiento a 35°C	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Hidrólisis de aesculina	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Crecimiento mucoide en A. glucosa	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Licuefacción de gelatina	(+)	(+)	var	(-)	(-)
Proteólisis de leche	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Producción de H ₂ S	(+)	(-)	(-)	(+)	var
Tolerancia de NaCl, %	1-8	.5-1	mayor de 0.5	1	1
Producción de ácido a partir					
arabinosa	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
glucosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
manosa	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
galactosa	(+)	(-)	var	(-)	(+)
trehalosa	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
celobiosa	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ureasa	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

TABLA 14: CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO Erwinias
 DERIVADO DEL NOMBRE ERWIN F. SMITH

Color de colonia en medio YGC, Wakimoto, YS y otros	amarillo
Morfología celular	bacilar
Motilidad	(+) flagelos peritricos
Producción de ácido a partir de:	
glucosa	(+)
fructuosa	(+)
galactosa	(+)
sacarosa	(+)
manosa	(+)
ribosa	(+)
adonitol	var
dulcitol	var
Utilización de:	
acetato	(+)
fumarato	(+)
gluconato	(+)
succinato	(+)
malonato	(+)
benzoato	(-)
oxalato	(-)
propionato	(-)
Descarboxilación de:	
ac. glutámico	(-)
arginina	(+)
licina	(+)
ornitina	(+)

10. RESUMEN

Una nueva enfermedad se detectó, en el estado de Colima en el año de 1981, sobre limón mexicano, la que por semejarse en su sintomatología al llamado "cáncer de los cítricos" ocasionó el cierre a las exportaciones de éste y demás cítricos hacia los Estados Unidos ya que existen severas restricciones cuarentenarias por haberse erradicado dicha enfermedad. El aislamiento e identificación del organismo causal de la bacteriosis en limón mexicano de Tecomán, Colima se realizó haciendo uso de diferentes técnicas de aislamiento, pruebas morfológicas, bioquímicas, de patogenicidad y serológicas, para estas últimas se realizó una comparación con sueros de referencia de las razas "A", "B" y "C" de Xanthomonas campestris p.v. citri agente causal del "cáncer de los cítricos".

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que el agente causal de la bacteriosis en limón mexicano, posee características semejantes al género Xanthomonas y la especie campestris además de reaccionar con los sueros de las razas "A", "B" y "C".

Esta publicación se imprimió
en la Subdirección de Inves-
tigación y Docencia. Constó
de 100 ejemplares.

Comisión Nacional de Fruticultura-S.A.R.H.
Subdirección de Investigación y Docencia
División de Investigación y Desarrollo --
Experimental.

Palo Alto, México, D.F. C.P. 11000

Apartado Postal 41 - 740 C.P. 05110

Teléfonos: 570-24-99 Ext. 167-168-169

570-17-79 Directo

570-16-79 Directo