

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**HISTOLOGÍA E HISTOQUÍMICA DEL NOPAL (*Opuntia spp*)
CON LA INOCULACIÓN DE LA CEPA CAE-01 Y
*Erwinia carotovora pv. carotovora***



DIRECCION ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**



PRESENTA:

ADRIANA ROSALIA GIJÓN HERNÁNDEZ

CHAPINGO, MÉXICO, AGOSTO DE 1999

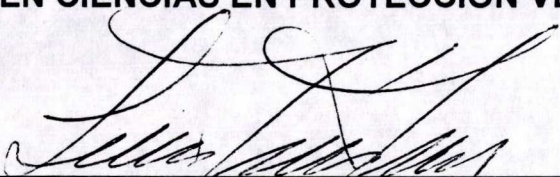


HISTOLOGÍA E HISTOQUÍMICA DEL NOPAL (*Opuntia* spp) CON LA INOCULACIÓN DE LA CEPA CAE-01 Y *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*.

Tesis realizada por **GIJÓN HERNÁNDEZ ADRIANA ROSALIA**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

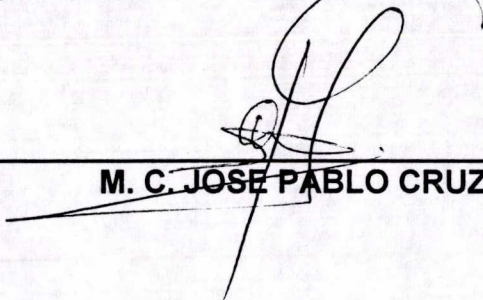
DIRECTOR:


M. C. Ma DE LOURDES RODRÍGUEZ MEJÍA

ASESOR:


DRA. ELIZABETH CÁRDENAS SORIANO

ASESOR:


M. C. JOSÉ PABLO CRUZ HERNÁNDEZ

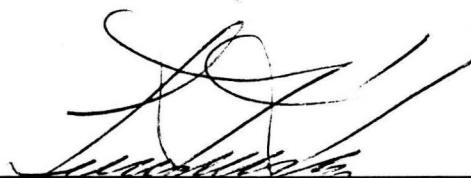
34437

Chapingo, México, Agosto de 1999.

HISTOLOGÍA E HISTOQUÍMICA DEL NOPAL (*Opuntia* spp) CON LA INOCULACIÓN DE LA CEPA CAE-01 Y *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*.

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **ADRIANA ROSALÍA GIJÓN HERNÁNDEZ**, autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en **PROTECCIÓN VEGETAL**, estuvo constituido por:

PRESIDENTE:



M. C. Ma DE LOURDES RODRÍGUEZ MEJÍA

ASESOR:



DRA. ELIZABETH CÁRDENAS SORIANO

ASESOR:



M. C. JOSÉ PABLO CRUZ HERNÁNDEZ

Chapingo, México, Agosto de 1999.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en particular al Departamento de Parasitología Agrícola que me dio la oportunidad de realizar mis estudios profesionales y de postgrado.

A la **M.C. Ma de Lourdes Rodríguez Mejía** por su acertada dirección en la realización de la presente investigación y por todo su apoyo, así como sus consejos y enseñanzas que han ayudado a mi formación y vida profesional.

A la **DRA. Elizabeth Cárdenas Soriano**, por todo su apoyo que me brindo y sus valiosas sugerencias y acertadas correcciones para esta investigación.

Al **M.C. José Pablo Cruz Hernández** por su apoyo y aportación para el mejoramiento de la presente investigación.

Al **SR. Leonides Rosas** por su amistad y apoyo incondicional que siempre me ha brindado.

Al **M. C. Juventino Cuevas Ojeda** por su amistad y apoyo que me ha dado durante todo este tiempo.

Al **CIESTAMM** de la Universidad Autónoma Chapingo por su ayuda para la realización del presente trabajo.

A mis amigos: **Dimas Mejía Sánchez, Francisco Pavón Gaitán, Héctor Mota y Luciano Martínez Bolaños**, por su amistad y por todos los momentos de alegría que compartimos durante esta etapa de nuestras vidas.

A todos los profesores de la maestría en Protección Vegetal, por compartir sus conocimientos y amistad, en especial a **M. C. Andrés Bolaños, M. C. Emilio Castillo y DR. Guillermo Mondragón** por el apoyo que me brindaron durante mis estudios de maestría.

A mis amigas: **Olga Gutiérrez Guzmán, Ivette Martínez Solano y Herminia Villanueva**, por la amistad que nos une a pesar de la distancia.

A **Rosalinda Flores Camacho, Guadalupe Valdovinos y Francisco Duran**, por el apoyo y amistad que me han brindado.

A **Virginia Moreno Sánchez** por el apoyo que me ha brindado en todo momento. Gracias.

Al Sr. **Macario Cruz** y al **Ing. Claudio flores** por el apoyo que siempre nos han brindado.

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre **Juan Gijón Méndez** a quien siempre llevo en mi corazón y recuerdo con mucho amor.

A mi madre **Justina Hernández Santiago** por todo el amor que me ha dado durante toda mi vida, el cual me ha motivado a seguir superándome día con día y por la confianza y el apoyo que siempre me ha brindado y doy gracias a dios por haberme dado una madre tan maravillosa como tu, te amo.

A mis hermanos: **Asunción, Héctor, virgilio, Juan, Magdalena, Hugo, Alejandro, Fidel y Luis**, por su cariño y apoyo que siempre me han dado, por los momentos de alegría que hemos compartido y por que ustedes forman parte muy importante en mi vida.

A mis sobrinos: **Karla, Ingrid, Juan, Omar, Carlitos, Isaías, Alicia, Berenice y Nadia**, por todos los momentos de felicidad que paso con ustedes, y porque son una fuente de inspiración en mi vida.

A la familia **Acosta Rodríguez** por su valiosa amistad, por todo el apoyo que siempre me han brindado, por motivarme siempre a seguir luchando para alcanzar mis metas, por su comprensión, pero sobre todo por su cariño, el cual significa mucho en mi vida, y me ha ayudado a superar las etapas difíciles por las que he pasado, los quiero mucho y siempre ocuparan un lugar muy especial en mi corazón.

A mis cuñadas: **Rosa y Janette**, por el apoyo y el cariño que me han brindado y por los momentos de alegría que hemos compartido.

A mi cuñado **Alejandro**, por la gran amistad que tenemos.

A mi gran amiga **Ma de Lourdes Rodríguez Mejía**, por la amistad tan maravillosa que tenemos, por el apoyo incondicional que me has brindado, ya que sin el no hubiera logrado concluir esta etapa tan importante en mi vida. Gracias por la paciencia que me has tenido y por comprenderme y deseo que nuestra amistad perdure por mucho tiempo, ya que tener tu amistad es un tesoro el cual valoro más que todo el oro del mundo.

A mi madrina **Ma Eugenia vergara Muñoz**, por que sigues ocupando un lugar muy importante en mi vida y quiero que sepas que siempre estaré contigo, en cualquier circunstancia y que cuentas con mi apoyo y mi cariño.

DATOS BIOGRÁFICOS

ADRIANA ROSALIA GIJÓN HERNÁNDEZ, nació en Raudales Malpaso, Chiapas, el 01 de Junio de 1970. Realizó sus estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo, donde obtuvo el título de **INGENIERO AGRÓNOMO ESPECIALISTA EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA**. EN Agosto de 1996, inició los estudios de **MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL** en la Universidad Autónoma Chapingo. En Junio de 1999 ingreso a la empresa Grupo integral de Servicios Fitosanitario Ena S.A de C.V, como signatario de laboratorio de diagnóstico fitosanitario en las áreas de bacteriología y entomología.

CONTENIDO

	Páginas
INDICE DE CUADROS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Origen de la familia Cactaceae	3
2.2. Distribución geográfica de la familia Cactaceae	4
2.3. Clasificación de las Cactaceas	4
2.4. Descripción del género <i>Opuntia</i>	5
2.4.1. Anatomía del género <i>Opuntia</i>	5
2.5. Importancia del nopal tunero	7
2.6. Importancia del nopal verdura	10
2.7. Ecología del nopal en México	12
2.8. Sistema de producción del nopal	13
2.8.1. Preparación del terreno	13
2.8.2. Selección y tratamiento del propágulo	14
2.8.3. Siembra	15
2.8.4. Poda	16

2.8.5. Cosecha	16
2.8.6. Plagas	17
2.8.7. Enfermedades	18
2.8.7.1. Síntomas de la pudrición bacteriana	18
2.8.7.2. Control	20
2.9. Mecanismos de resistencia	22
2.9.1. Barreras mecánicas inducidas	22
2.10. Histología	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Fase de campo	25
3.1.1. Diseño experimental	26
3.1.2. Tratamientos	26
3.1.3. Siembra	26
3.1.4. Variable respuesta	27
3.2. Fase de laboratorio	28
3.2.1. Estudio histológico	28
3.3 Estudio histoquímico	30
3.3.1. Detección de lignina	30
3.3.2. Detección de sustancias pécticas	31
3.3.3. Detección de suberina	31

3.3.4. Detección de proteínas	31
3.3.5. Reacción de Buiret	32
3.3.6. Reacción Xantoproteica para tirosina, triptofano y fenilalanina.	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Fase de campo	33
4.1.1. Primera evaluación	33
4.1.2. Cuarta evaluación	34
4.2. Histología de cladodios sanos	38
4.3. Histología de cladodios inoculados con <i>E. c. pv. carotovora</i>	41
4.4. Histología de cladodio inoculado con la cepa antagónica CAE-01	43
4.5. Histología de cladodio inoculado con la cepa antagónica CAE-01 y <i>E. c. pv. carotovora</i>	45
5. CONCLUSIONES	47
6. LITERATURA CITADA	48
7. APÉNDICE	54
7.1. Datos referentes a temperatura y humedad relativa registrados durante el experimento.	54
7.2. Preparación de colorantes y reactivos	58
7.2.1. Fijador de Craff III	58
7.2.2. Adhesivo de Haupt	58
7.2.3. Safranina	58

7.2.4. verde fijo alcoholico	59
7.2.5. Rojo de rutenio	59
7.2.6. Negro de Sudán B	59
7.2.7. Azul de bromofenol	59
7.2.8. Floroglucina -ácido clorhídrico	59

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Principales variedades cultivadas de nopal tunero.	8
Cuadro 2. Superficies cultivadas y cosechadas de nopal tunero volumen de producción por D.D.R. y Estados de la región Centro - Norte de México.	9
Cuadro 3. Entidad federativa, superficie, rendimiento medio y producción de nopal verdura 1996.	11
Cuadro 4. Comparación de medias de Tukey para el porciento de eficacia de la cepa antagonica CAE-01 en la primera evaluación.	37
Cuadro 5. Comparación de medias de Tukey para el porciento de eficacia de la cepa antagonica CAE-01 en la cuarta evaluación.	37
Cuadro 6. Promedio de temperaturas, durante el periodo de evaluación de la cepa CAE-01 para el control de la pudrición blanda del nopal, en Chapingo, México. 1997-1998.	54
Cudro 7. Promedio de humedad relativa, durante el periodo de evaluación de la cepa CAE-01 para el control de la pudrición blanda del nopal, en Chapingo, México, 1997-1998.	55
Cuadro 8. Promedio de Temperatura diaria del mes de junio para la evaluación de la cepa CAE-01 para el control de la pudrición blanda del nopal, en Chapingo, México, 1997-1998.	56
Cuadro 9. Promedio de humedad relativa diaria del mes de junio para la evaluación de la cepa CAE-01 en el control de la pudrición blanda del nopal, en Chapingo , México. 1997-1998.	59

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Respuesta del nopal a la inoculación de la cepa patógena y antagónica	37
Figura 2. Representa una sección transversal de un cladodio sano	40
Figura 3. Sección transversal de cladodio inoculado con <i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	42
Figura 4. Sección transversal de cladodio inoculado con la cepa antagónica CAE-01	44
Figura 5. Sección transversal de cladodio inoculado con la cepa antagónica CAE-01 y <i>E. c. pv. carotovora</i>	46

RESUMEN

En el campo experimental San Martín de la Universidad Autónoma Chapingo, se evaluó el efecto de la bacteria antagónica CAE-01 por inyección en tallos de nopal (*Opuntia* spp) de las variedades Picochulo, Burrón, Naranjón y V1 como medida de protección contra la pudrición blanda inducida por *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*. El estudio se complementó con la determinación de los cambios histológicos e histoquímicos que se presentan en los cladodios tratados con la cepa antagónica y que no permitieron el desarrollo de la infección de *E. c.* pv. *carotovora*. Se encontró que la inoculación de los propágulos con la cepa antagónica evitó el desarrollo de la enfermedad en los nuevos brotes, con una eficacia de hasta el 100 % en la variedad Naranjón. Esta protección aparentemente se debió a que el agente de control biológico indujo cambios estructurales alrededor del punto de infección, provocando que unas capas de células parenquimatosas se colapsaran y formaran una barrera mecánica la cual posiblemente bloqueó el desplazamiento de nutrientes hacia el patógeno e impidió el desarrollo de la enfermedad.

Palabras clave: Histopatología, pudrición blanda, control biológico.

ABSTRACT

At San Martín experimental field, located at Chapingo University, an experiment was made to evaluate the CAE-01 antagonistic bacteria application to nopal propagation material. And also if it protects the next generation against soft rotting created by *Erwinia carotovora* var. *carotovora*. So it was used a random experimental block design, that contained four repetitions. Using Picochulo, Burrón, Naranjón and V1 cultivar. A complementary study was made to find histological and histochemical changes that are showed in the cladodios used for the experiment with the antagonistic strain. This does not let the development of *E .c. pv. carotovora* infection. It was found that the propagation material inoculated with the antagonistic strain avoided the disease development in the new cladodios, with a 100 % accuracy with the Naranjón species. This apparent protection happened because the biological control agent induced structural changes all around the infection area. This produced the collapsing of some layers of parenchymatous cells that created a mechanical barrier. This may have stopped the nutrients displacement for the pathogen, so it avoided the diseased development.

Key words: Histopathology, soft rot, biological control.

1. INTRODUCCION

El nopal es una cactácea que ha desempeñado un papel histórico en el desarrollo de diversas culturas, las cuales lo han utilizado como fuente de alimento, medicina, en la industria y como forraje (Bautista, 1981 y Piña, 1977). Actualmente, México ocupa el primer lugar en términos de superficie cultivada, producción y consumo de tuna y nopal verdura. La mayor parte de la superficie cultivada se localiza en los estados donde se encuentran las zonas semiáridas del centro del país, siendo los principales productores; Zacatecas (14,000 ha), Edo. de México (8,622 ha), Hidalgo (7,000), San Luis Potosí (3,918 ha), Guanajuato (3,059 ha), Puebla (3,000 ha), Jalisco (2,008 ha) y Aguascalientes (1,888 ha) (Gallegos y Méndez, 1997). Sin embargo, la producción de este cultivo se ve afectada por diversas plagas y enfermedades, entre las que destaca la pudrición bacteriana inducida por *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, la cual se encuentra distribuida en todas las regiones productoras de nopal, con una incidencia que varía desde un 10 hasta 100 % en el caso del Estado de México donde llega a ser un factor limitante en la explotación del cultivo (Osorio y Soto, 1994), debido principalmente a que no existe material resistente ni productos químicos curativos para el manejo de esta enfermedad. Estudios recientes, efectuados por Rodríguez y Mejía (1995) hacen referencia a la inhibición *in vitro* de *E. c.* pv. *carotovora*, utilizando la cepa antagónica CAE-01; así mismo, Gijón (1996), reporta que la inoculación *in vitro* de cladodios de nopal con esta cepa, los protege de la infección de dicho patógeno, lo cual posiblemente se deba a la producción de una bacteriocina de la bacteria

antagónica (Mejía, 1995); lo anterior, indicó la necesidad de continuar investigando sobre estos aspectos.

1.1. Objetivos

- 1.- Evaluar en campo si la inoculación del material propagativo de nopal con la cepa antagónica CAE-01, protege a los nuevos brotes, contra la infección de *E. c. pv. carotovora*, en las variedades Naranjona , Picochulo, Burrón y V1.
- 2.- Estudiar los cambios histológicos e histoquímicos, que se presentan en los cladodios que se inocularon con la cepa antagónica, que no permiten el desarrollo de la pudrición inducida por dicho patógeno.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen de la familia Cactaceae

La familia Cactaceae es originaria del Continente Americano; sin embargo, no se puede establecer exactamente la época de su aparición y origen debido a la ausencia de restos fósiles (Bravo, 1978), pero se considera que este grupo es relativamente joven desde el punto de vista evolutivo y se cree que las cactáceas derivaron de las Portulacaceas (Muñoz, 1995). Otros investigadores suponen que existen dos centros de diversidad en el continente americano, uno al norte, localizado en México y otro al Sur que comprende a Perú, Bolivia y Sur de Argentina (Cullman *et al* citado por Muñoz, 1995). Por otra parte (Bravo, 1978) señala que los géneros mexicanos comprendidos taxonómicamente en las subfamilias *Pereskioideae*, *Opuntioideae* y *Cereoideae* tuvieron su origen en formas ancestrales del Caribe que emigraron hacia el noroeste, siendo las especies del género *Pereskia* las más primitivas, diferenciándose durante su trayecto en los géneros actuales que crecen en la mayoría de los tipos de vegetación de México.

2.2. Distribución geográfica de la familia Cactaceae.

La familia cactaceae se encuentra distribuida en el continente Americano desde Canadá hasta América del Sur y esta representada en los distintos tipos de vegetación, encontrándose el mayor número de géneros y especies en climas áridos y semiáridos.

En el ámbito mundial, México se considera como el país que alberga la mayor cantidad de especies de *Opuntia* con aproximadamente 300 (Bravo, 1978 y Muñoz, 1995).

2.3. Clasificación de las Cactáceas

Bravo (1978), clasifica a las cactaceas en base a sus características anatómicas, y punto de vista evolutivo como:

Cactales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Opuntioidea

Tribu: Opuntieae

Género: *Opuntia*

Subgénero: *Opuntia*

2.4. Descripción del género *Opuntia*

El género *Opuntia* se caracterizan por ser plantas, arbustivas o rastreras, con tronco bien definido o ramas desde la base. Estas pueden ser postradas o extendidas con cladodios aplanados y carnosos. Las flores generalmente son hermafroditas con perianto regular, los segmentos exteriores son verdes más o menos coloridos, gradualmente en transición con los segmentos interiores del perianto que son de color amarillo, anaranjado y rojo hasta purpúreo. Los estambres y el estilo son más cortos que los pétalos, los estambres son numerosos y el estilo termina en varios lóbulos estigmáticos, su ovario es ínfero y presenta areolas provistas de gloquidios. El fruto es una baya carnosa seca o jugosa, esférica u ovoide, con múltiples semillas aplanadas, duras, de color claro y provistas de un arilo grueso; sus frutos son comestibles en particular los de las especies *O. lindheimeri*, *O. streptacantha* y *O. fiscus-indica* (Bravo, 1978).

2.4.1. Anatomía del género *Opuntia*

La anatomía del nopal está influenciada fuertemente por el ambiente donde se desarrolla. El agua por ser el principal factor limitante, es el que tiene mayor efecto, por lo cual dentro de la evolución de estas especies se han generado modificaciones que le permiten sobrevivir en ambientes áridos y semiáridos (Muñoz, 1995).

La epidermis tiene una gruesa película de cutina; el grosor de la cutícula es de 7-9 μm , pero esto depende de factores internos y externos; contiene una baja densidad estomatal, que es variable en cada especie. La hipodermis consiste en una capa individual subepidermal de células, muchas de las cuales contienen cristales de oxalato de calcio (drusas). Las capas del colénquima que puede o no existir, forman una banda compacta dentro de los espacios intercelulares, donde se encuentran intercalados por los canales subestomatales; el colénquima es grueso y da consistencia y solidez al tallo. El parénquima fotosintético está inmediatamente abajo del tejido colenquimatoso con cloroplastos abundantes. Debajo se encuentra el parénquima colector que forma una zona bastante amplia con células grandes y esferoidales, turgentes por la gran cantidad de agua y diversos polisacáridos que almacenan (Osorio, 1989).

Los haces vasculares integran un cilindro reticulado y aplanado. Los vasos son cortos de diámetro variable y tienen puntuaciones intervasculares alternas y perforaciones simples. (Osorio, 1989 y Muñoz, 1995).

2.5. Importancia de nopal tunero

El nopal tunero, en la actualidad es una importante especie de frutal que se explota bajo marcos definidos de plantación en varios estados de la República Mexicana. Se estima que las plantaciones ocupan una superficie superior a las 60, 000 ha en nopaleras cultivadas y de solar con 28 variedades, de las cuales 16 reúnen las características deseables para consumo en fresco en el mercado nacional e internacional (Cuadro 1), el área geográfica localizada en el Altiplano Potosino-Zacatecano y sus inmediaciones con los estados de Jalisco, Guanajuato y Aguas Calientes, es la más importante en la producción de nopal tunero del Centro – Norte de México (Cuadro 2).

Las principales ciudades consumidoras de tuna son: México, Guadalajara, León, Celaya, Monterrey, Saltillo, Ciudad Juárez, Ciudad Victoria, Reynosa, Tampico, Chihuahua, Nuevo Laredo, Zacatecas, San Luis Potosí, y Aguascalientes (CODAGEM ,1982).

Cuadro 1. Principales variedades cultivadas de nopal tunero.

VARIEDAD	COLOR DE PULPA	ZONA DE PRODUCCION
Villanueva	Blanca	Mpio. Acatzingo, Puebla.
Alfajayucan	Blanca	Región Pirámides, Estado de México e Hidalgo.
Burrona	Blanca	Zacatecas y Jalisco.
Cristalina	Blanca	Zacatecas, Jalisco y Aguascalientes.
Reyna	Blanca	Guanajuato y Zacatecas.
Gavia	Blanca	Matehuala, San Luis Potosí.
Esmeralda	Blanca	Guanajuato y Querétaro.
Rojo liso o rojo pelón	Roja	Guanajuato, Zacatecas, Jalisco y S.L.P.
Rubí Reyna	Roja	Zacatecas y San Luis Potosí.
Copena Torreoja	Roja	Jalisco, Zacatecas y Aguascalientes.
Morada	Roja	Aguascalientes.
Amarilla Monteza	Amarilla	Zacatecas y Jalisco.
Miquihuana	Amarilla	Tamaulipas y San Luis Potosí.
Amarilla huesona	Amarilla	Zacatecas y Jalisco.
Picochulo	Anaranjada	Zacatecas, Jalisco y Aguascalientes.
Cardón	Roja	Zacatecas, Durango, Jalisco, S.L.P, Aguascalientes, Guanajuato y Querétaro.

Fuente: Gallegos y Méndez, 1997.

Cuadro 2. Superficies cultivadas y cosechadas de nopal tunero y volumen de producción por D.D. R. y Estados de la región Centro - Norte de México (1992).

D.D. R y Estado	Superficie (ha)		Producción (Ton)
	Establecida	Cosechada	
Ojo Caliente, Zac.	12142	11842	64802
Zacatecas, Zac.	1072	987	1298
Río Grande, Zac	80	80	32
Jeréz, Zac.	173	123	253
Jalpa , Zac.	33	23	192
Suma de Zacatecas	13500	13055	66477
Matehuala, S.L.P.	3807	-	14290
Salinas, S.L.P.	111	-	-
Suma de S. L.P.	3918	-	12290
Dolores Hidalgo, Gto.	2216	2216	2154
San Luis de la Paz, Gto.	843	648	1648
Suma de Guanajuato	3059	2864	3802
Lagos de Morenos, Jal.	2008	1325	11344
Pabellón, Ags.	1888	1281	2363
TOTAL	24393	18525	98276
Región Centro-Norte			

Fuente: Flores y Gallegos, 1994.

2.6. Importancia del nopal verdura

En la producción de nopal verdura en México, participan 18 estados, con un total de 10,500 ha, y una producción de 575,575 toneladas (Cuadro 3), y una sola entidad, el Distrito Federal, participa con el 71.14 % de la superficie, y el 78.2 % de la producción total (SAGAR, 1996 citado por Flores, 1997). Sin embargo, únicamente Morelos y Sonora obtienen buenos rendimientos con 70 y 80 toneladas por hectárea.

Los productos y subproductos del nopal son muy solicitados en los mercados internacionales, principalmente Estados Unidos, Japón y países europeos (Salgado, 1984).

Cuadro 3. Entidad federativa, superficie, rendimiento medio y producción de nopal verdura.1996.

Entidad	Superficie (ha)	Rendimiento ton/ha	Producción ton
Distrito Federal	7,500	60.0	450,000
Morelos	450	70.0	31,500
Puebla	400	40.0	16,000
San Luis Potosí	350	30.0	10,500
Michoacán	320	35.0	10,500
Tamaulipas	300	30.0	9,000
Guanajuato	280	35.0	9,800
México	200	30.0	6,000
Baja California	150	60.0	9,000
Jalisco	120	60.0	7,200
Oaxaca	100	60.0	6,000
Aguascalientes	80	30.0	2,400
Zacatecas	75	30.0	2,250
Hidalgo	60	40.0	2,400
Tlaxcala	45	25.0	1,125
Querétaro	35	20.0	700
Durango	15	20.0	300
Sonora	10	80.0	800
Otros	10	10.0	100
Sumas	10,500	54.8	575,575

Fuente: SAGAR,1996, citado por Flores, 1997.

2.7. Ecología del nopal en México

El nopal se desarrolla en temperaturas que oscilan entre los 6°C hasta los 27 °C, estando la óptima entre 18°C y 20 °C temperaturas inferiores a 10 °C causan daños, principalmente en plantas jóvenes. Con respecto a la altitud, se menciona que se puede encontrar desde cero hasta 2675 metros sobre el nivel del mar, sin embargo, algunos autores mencionan que el nopal se desarrolla mejor entre 800 y 2500 metros de altitud en lugares donde la precipitación media anual oscila entre 116 y 1805 mm, aunque puede llegar a desarrollarse en condiciones de mayor aridez (Castañeda y Osorio, 1991).

Los suelos donde el nopal se desarrolla mejor son los arenosos calcáreos, sueltos, poco profundos y de preferencia con pH alcalino y puede crecer en terrenos pedregosos, tepetatosos y muy someros. En general, para el óptimo desarrollo de las nopaleras son convenientes los suelos de textura arenosa y arena arcillosa, siempre que sea calcárea y con alto contenido de sales. Por el contrario, su desarrollo es pobre en suelos compactos y húmedos (Velázquez, 1962).

2.8. Sistema de producción del nopal

2.8.1. Preparación del terreno

De acuerdo con las condiciones del terreno y los recursos que se tengan donde se va a efectuar la plantación, se debe preparar previamente mediante el empleo de alguno de los dos sistemas que a continuación se indican.

1.- Cuando los suelos son profundos se pueden usar tractores y proceder de la siguiente forma: al ir en un sentido, los discos voltearán la tierra hacia un lado y al regreso la tierra se acumulará hacia el otro lado para formar una zanja profunda, de cuatro metros se formará un marco real, para un módulo de producción de 625 plantas por hectárea.

2.- Si el agricultor cuenta con recursos económicos, emplearan bulldozer de cuatro metros y trazar con el ripper una sola hilera a una equidistancia de cuatro metros para formar así un modulo de producción semejante al anterior. Este sistema se usa en terrenos tepetatosos que tienen pendientes, por lo que las hileras se deberán trazar en sentido contrario al escurrimiento del agua pero siguiendo una cota de nivel para que las hileras queden en un mismo plano respecto a la pendiente. La equidistancia entre hileras y cepas debe ser de cuatro metros para formar el mismo módulo de producción (Granados y castañeda, 1991).

En general, siempre se debe procurar que el agua no arrastre el suelo en terrenos pendiente, para lo cual se deben trazar curvas de nivel. Una vez trazada la plantación, se procede a abrir cepas, ya sean redondas o cuadradas. Si se hacen en forma redonda se les dan 80 cm de diámetro y 60 cm de profundidad, como mínimo. Si la plantación se hace en terrenos salitrosos, se deberán trazar curvas de nivel para plantar en el lomo de la curva. Las cepas se deben abrir de preferencia, en la época de lluvias para que el terreno esté blando y se deben dejar abiertas para que se intempericen y capten agua cuando menos tres o cuatro meses antes de la plantación (Granados y Castañeda, 1991).

2.8.2. Selección y tratamiento del propágulo

Se utilizan como propágulos, pencas enteras para obtener plantas vigorosas y frutos al tercer año de haberse sembrado. También, cuando es muy costosa la transportación es posible emplear fracciones de pencas; sin embargo, esto no es aconsejable debido a que las plantas tienen un desarrollo muy lento y la fructificación se obtiene hasta cinco o seis años después de la siembra (Granados y Castañeda, 1991).

Los cladodios adultos y sanos, procedentes de nopaleras recias, deben estar secos y macizos, se tienen que cortar por la base para evitar que se pudran; se llevan a la sombra a fin de impedir una deshidratación completa y para que cicatrice la herida del corte (15-20 días), si el cladodio no ha adquirido alguna infección, está en condiciones de plantarse. Estos propágulos se pueden almacenar durante uno o dos años (Granados y Castañeda, 1991).

2.8.3. Siembra

La siembra se debe realizar durante la época del año en que las lluvias son nulas o escasas. En el terreno preparado, se plantan los propágulos separados por cuatro metros en el pie del lomo de los surcos o en las cepas, se agrega materia orgánica, comúnmente estiércol, esto se realiza en el momento de establecer la plantación y después se agrega cada dos o tres años. En la época de siembra la forma de agregar el estiércol, es revolviéndolo con el suelo del lugar donde se coloca el propágulo después sólo se agrega de manera superficial en el área que cubre el desarrollo de la planta.

En regiones con heladas frecuentes se debe tomar muy en cuenta la orientación con que se establezcan las raquetas y se debe procurar que el canto de éstas quede orientado en dirección a los vientos dominantes, para evitar el daño por heladas (CODAGEM, 1982).

2.8.4. Poda

La poda tiene como fin mantener joven la planta, evitar que haya demasiados cladodios en ella, y que no rebase una altura de 1.60 m para facilitar la cosecha, eliminar los cladodios que se entrecruzan para que no los dañe el aire y se produzcan heridas o tomen una dirección hacia el suelo, así mismo, esta practica evita que haya una sobreproducción de fruta y se propicia que ésta sea de mejor calidad y por lo tanto tenga mayor demanda (Castañeda y Osorio, 1991).

Se recomienda que después del tercer año y en el mes de septiembre se haga una poda ligera en las raquetas superiores para forzar a las plantas a desarrollar numerosos brotes.

La poda de formación en los nopales generalmente se hace a los cinco años de plantados y tiene por objeto cortar las raquetas mal colocadas o defectuosas, de manera que las plantas vayan adquiriendo la mejor estructura posible (Castañeda y Osorio, 1991).

2.8.5. Cosecha

La producción de tuna es anual; la cosecha del fruto comienza a partir de la primera quincena de agosto y tiene una duración de 45 a 50 días (Bautista, 1982).

Para el caso de nopal verdura, la cosecha se realiza durante todo el año, una o dos veces por semana, de acuerdo con el tamaño de la parcela, pero la época en que se efectúa con más frecuencia por ser más elevada la producción, es en abril y mayo (Granados y Castañeda, 1991).

2.8.6. Plagas

Entre las plagas insectiles que atacan a este se encuentran: Picudo de las espinas (*Cylindrocoptorus birradiatus*), Picudo barrenador (*Captophagus spinolae*), Gusano cebra (*Olycella nephelepsa*), Chinche gris (*Chelenidae tabulata*), Chinche roja (*Hesperolabops gelastop*), Trips del nopal (*Sericothrips*) y Grana cochinilla (*Dactylopus indicus*) (Borrego y Burgos, 1986).

2.8.7. Enfermedades

Actualmente se conoce de la presencia de 10 enfermedades que afectan al nopal, entre las que se encuentran: la Mancha negra (*Macrophomina* sp)(Canales, 1983, Figueroa, 1984 y Osorio y Soto, 1994); Mal del oro (*Alternaria* sp y *Hansfordia* sp) (Osorio y Soto, 1994); Pudrición café (*Phytophthora nicotianae* (Cacciola y Magnano, 1988); Proliferación de yemas y engrosamiento del cladodio (Osorio y Soto,1994); antracnosis (*Colletotrichum* sp); Chamusco (*Mycosphaerella* sp)(García, 1979); carcoma, por carencia de elementos en el suelo (Lozano, 1958) y Pudriciones blandas, en las que se han involucrado a *Pseudomonas viridiflava* (Campos,1996) y *Erwinia carotovora* (García, 1979, Fucikovsky y James, 1981, Osorio y Soto, 1994, y Gijón, 1996).

La pudrición inducida por *E. carotovora*, se considera como una de las enfermedades más importantes de este cultivo ya que se ha encontrado en todas las regiones productoras de nopal, causando perdidas que oscilan entre el 10 y 100 %, tanto en el cultivo en pie y durante el almacenamiento del material propagativo, tuna y nopal verdura.

2.8.7.1. Síntomas de la pudrición bacteriana

Al principio, en los tejidos aparece una pequeña lesión de apariencia acuosa que se extiende con rapidez en diámetro y profundidad. La zona afectada se ablanda y suaviza (Cortés, 1990). Su superficie puede quedar manchada y algo hendida o bien puede arrugarse. Por lo general, los bordes de las lesiones están bien definidos al principio, pero más tarde se hacen difusas.

Los tejidos de la zona afectada adquieren un color oscuro y se vuelven mucilaginosos, desintegrándose hasta formar una masa blanda de células. Sin embargo, es más frecuente que la epidermis se rompa y exude un líquido mucilaginoso que escurre hasta el suelo, que al contacto con el aire, se vuelve de café oscuro y se acompaña de un olor desagradable (Osorio y Soto, 1994 y Gijón, 1996).

La enfermedad puede aparecer primeramente en el campo, en plantas desarrolladas a partir de tallos previamente infectados, aunque también el inoculo puede provenir del suelo (Lucas *et al*, 1985, Goto, 1992 y Bradbury, 1986). Por lo general, estas infecciones se producen a través de heridas, y su diseminación posterior es facilitada considerablemente por insectos, los cuales permiten el avance de la infección en forma bastante eficiente tanto en el almacenamiento como en el campo (Bradbury, 1986, Sánchez, 1988). Cuando la bacteria penetra por las heridas, se alimenta y propaga inicialmente en los líquidos liberados por las células degradadas, lo que permite su rápida multiplicación, y la producción de enzimas pectolíticas y celulolíticas, degradan las sustancias pécticas de la lamina media y pared celular, produciendo la maceración de los tejidos. Como resultado de la acción de éstas y otras enzimas, el agua de los protoplastos celulares se difunde a los espacios intercelulares; las células se plasmolizan, colapsan y mueren, dejando disponibles al patógeno sustancias nutritivas que le permiten continuar

avanzando y propagándose en los espacios intercelulares y sus enzimas avanzan delante de ellos preparando los tejidos para que puedan ser invadidos.

Los factores de temperatura y humedad ambiental juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad, ya que están íntimamente relacionados con la multiplicación de la bacteria (Bradbury, 1986), la cual tiene una temperatura óptima de 22°C, pero se puede desarrollar desde los 5°C hasta los 37°C y su punto letal térmico es a los 50 °C (Agrios, 1985). Por otra parte Boothroyd and Roberts (1975), señalan que la temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad es de los 24 – 27 °C. Villareal (1985) menciona que esta bacteria cuando esta asociada a pequeñas partículas de material vegetal puede permanecer viable por largos periodos aún bajo condiciones extremas de 65 % de humedad relativa y temperatura de 20 °C.

2.8.7.2. Control

Los estudios sobre métodos de control para esta enfermedad son escasos, en la actualidad su manejo es a través de prácticas culturales, mediante el saneamiento de la huerta, poniendo especial énfasis en las podas sanitarias, las cuales se deben realizar periódicamente durante todo el año. Por otra parte se recomienda seleccionar material propagativo libre del patógeno. Con lo que respecta al control químico se recomienda la aplicación de Agrimicín cada 18-20 días (Osorio y Soto, 1994).

Rodríguez y Mejía (1995), señalaron que la cepa bacteriana CAE-01, fue capaz de inhibir *in vitro* el desarrollo de bacterias fitopatógenas, entre la que se encuentra especies del género *Erwinia*.

Gijón (1996), al inocular cladodios con esta bacteria antagónica, logró protegerlos de la infección por *E. c. pv carotovora*, y al inocularla después de la aparición de los síntomas, observó que la enfermedad ya no progresaba.

Este no es el único reporte sobre el efecto de esta bacteria para el control de fitobacterias ya que García (1997), reporta que el tratamiento a la semilla de zanahoria con la cepa CAE-01, antes de la siembra redujo la incidencia de *E. c. pv. atroseptica* en un 50 %.

Alvarez (1997), en un estudio realizado en lechuga encontró que la aplicación al follaje o al suelo de la bacteria antagónica CAE-01, redujo la incidencia y severidad de la pudrición inducida por *E. c. pv. atroseptica* hasta en un 75%.

Santiago (1997), reporta que el daño causado por la bacteria *Xanthomonas campestris pv campestris* en plantas de col, puede ser reducido, cuando las plantillas son tratadas con esta bacteria previamente al transplante.

2.9. Mecanismos de resistencia

Los mecanismos por los cuales una planta resiste la entrada y propagación de un patógeno dependen de la estructura y potencialidades bioquímicas de ambos, así como la vía por la cual el patógeno entra e invade a la planta hospedante (Azpeitia ,1973 y Manners, 1994).

La interacción de las plantas con los microorganismos a través del tiempo, les ha permitido desarrollar mecanismos o barreras preformadas que no permiten el establecimiento del patógeno . Siendo las más comunes la presencia de una cutícula gruesa, anatomía de los estomas, lenticelas y flores.

2.9.1. Barreras mecánicas inducidas

Varios tipos de barrera mecánica se forman como reacción a la infección, y el tipo formado depende de la naturaleza tanto del hospedero como del patógeno. La reacción de una planta al ataque de un patógeno suele ser similar a la de daños mecánicos. Las células dañadas mueren y en las capas de células inmediatamente cercanas a ellas se producen sustancias como la suberina, lignina, gomas, taninos y flobafenos. Esta barrera generalmente se forma dentro las primeras 24 horas de ocurrida la infección y conforme transcurre el tiempo empieza a formarse un cambium de corcho y esto produce una barrera más permanente de tejido suberoso. Además se disparan mecanismos bioquímicos entre los cuales destaca la producción de fitoalexinas antimicrobianas y enzimas hidrolíticas, como la proteinasas que inducen la respuesta de elicitación cuyo producto final es el etileno que inhibe el desarrollo de microorganismos (Dixon y Harrison, 1994).

2.10. Histología

Pennynpacker *et al* (1974), realizaron un estudio en crisantemo "Giants 4 Indianapolis White" donde inocularon las hojas jóvenes con *E. chrysanthemi*, posteriormente los tallos de las plantas fueron examinados histológicamente en diferentes estados de desarrollo de la enfermedad. Los resultados revelaron que el patógeno causó el rompimiento del tejido parenquimatoso, medular y floema, así como la separación de las células, y las paredes de éstas se observaron más delgadas.

Pennynpacker *et al* (1981), compararon los cambios estructurales en crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) para comparar los cambios estructurales inducidos por *E. c. subsp. carotovora* y *E. chrysanthemi*. Los estudios histológicos revelaron que estos patógenos indujeron cambios anatómicos idénticos, ya que en ambos casos se observó la maceración de los haces vasculares, seguida de la degradación de las células de la médula y que probablemente el mecanismo responsable de estas alteraciones en la planta fue a la acción de las enzimas que producen dichos patógenos.

Pennynpacker *et al* (1981), hicieron estudios histológicos e histoquímicos en plantas de *Chrysanthemum morifolium* White Marbie, inoculando a *E. c. subsp. carotovora* y *E. chrysanthemi* en el tejido vascular del hospedante, para determinar que cambios estructurales se presentaban. Ambas especies colonizaron rápidamente el sistema vascular del hospedante y causaron la desintegración de las células parenquimatosas. En las pruebas

histoquímicas se detectaron células suberizadas alrededor de los haces vasculares y hubo una disminución del material péctico en el parénquima.

Akhtar and Kelman (1958), estudiaron el papel que juegan las enzimas pectolíticas y celulolíticas en la patógenesis de *Pseudomonas solanacearum*, para lo cual inocularon plantas de jitomate y tabaco con tres cepas de este patógeno que presentaban pectinmetilesterasa, poligalacturosa, y enzimas celulolíticas, y al hacer el estudio histológico, observaron una reducción de las sustancias pécticas en el parénquima y médula, mientras que en el tejido cortical se presentó una desorganización s células, y conforme avanzó la infección, los haces vasculares se colapsaron y como consecuencia se formaron cavidades grandes.

Zumoff and Dikey (1987), analizaron los tejidos de *Syngonium podophyllum* "Wahite Butterfly" después de la inoculación con *Xanthomonas campestris* pv. *syngonii* para determinar el efecto del patógeno en los tejidos de las hojas, peciolo y tallos. El patógeno inicialmente colonizó los espacios intercelulares del mesófilo esponjoso y conforme progreso la infección, se presentó la desorganización de las células del mesófilo.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Fase de campo

La fase experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el periodo comprendido de octubre de 1997 a junio de 1998, en el campo experimental San Martín, perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, México.

El campo experimental se encuentra, situado a los 19° 29' de latitud Norte y 98° 53' de longitud Oeste, a una altura sobre el nivel del mar de 2250 m, con una temperatura promedio anual de 15.2°C y 636.5 mm de precipitación media anual (García, 1988).

El clima de la región es (CWO) (w) b (i') y se caracteriza de la siguiente forma:

(CWO): Templado sub-húmedo con lluvias en verano, siendo julio el mes más lluvioso.

(w): Lluvia invernal menor al 5 % del total anual.

B: Templado con verano fresco y largo, temperatura media anual entre los 3°C y 18°C, temperatura del mes más caliente 6-5 y 22 °C.

(i'): Oscilación anual de las temperaturas medias mensuales entre 5 C° y 7°C. Las condiciones de temperatura así como la temperatura durante el experimento se muestran en el apéndice 7.1, así como la humedad relativa.

3.1.1. Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por nueve cladodios, establecidos a una distancia entre ellos de 40 cm, dando un total de 32 unidades experimentales incluyendo el testigo.

3.1.2. Tratamientos

El tratamiento evaluado fue la bacteria antagónica CAE-01, en tres variedades de nopal tunero (Burrona, Picochulo y Naranjona) y una de nopal verdura (V1).

3.1.3. Siembra

La siembra del material vegetal se realizó de forma manual el 4 de octubre de 1997, colocando 72 cladodios de cada una de las variedades estudiadas a una profundidad de 15 cm.

Con la finalidad de evitar que los cladodios se pudrieran al momento de la siembra y así mismo facilitar la cicatrización de la herida producida por el corte, los tallos se sumergieron previamente en pasta bordeleza y luego se mantuvieron a la sombra durante 20 días.

Para evaluar si la aplicación de la cepa antagónica al material de propagación de nopal protege a los nuevos brotes de la pudrición blanda inducida por *E. c. pv. carotovora*, 15 días después de la siembra del material vegetal, se inocularon 36 propágulos (correspondientes a las cuatro variedades

citadas anteriormente) con 1 ml de la suspensión acuosa de la bacteria antagónica con aproximadamente 3×10^7 UFC/ml.

Cuando los nuevos brotes alcanzaron una longitud de aproximadamente 23 cm, se realizó la inoculación del patógeno inyectando 1 ml de la suspensión en tres brotes de cada planta, incluyendo testigos y tratamientos.

3.1.4. Variable respuesta

La variable respuesta evaluada fue el porcentaje de pudrición, para lo cual se midió el largo y el ancho de la lesión y con estos datos se determinó el porcentaje de área dañada en relación al tamaño del cladodio.

Durante el ensayo se realizaron un total de 4 evaluaciones. La primera, se efectuó a las 72 horas después de haber aplicado la bacteria patógena; las otras evaluaciones se hicieron a intervalos de 24h, hasta cumplir las 144 horas de haber inoculado la patógena.

Una vez obtenidos los porcentajes de infección, se determinó el grado de eficacia mediante la formula de ABBOTT que se indica a continuación:

$$\text{Grado de eficacia} = \frac{IT - it}{IT} \times 100$$

Donde:

IT = Infección del testigo

it = Infección del tratamiento

A los datos resultantes del grado de eficacia se les practicó el análisis de varianza y posteriormente la prueba de Tukey.

3.2. Fase de laboratorio

Esta fase se realizó en el laboratorio de histopatología vegetal ubicado en el instituto de fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.

3.2. 1. Estudio histológico

Para conocer los cambios estructurales que ocurren en los cladodios de nopal cuando se inocula con la bacteria antagónica y que evitan que *E. c. pv. carotovora* induzca la desintegración de los tejidos de esta planta, se realizó un estudio histológico empleando únicamente la variedad V1. Los tratamientos analizados fueron: 1) cladodio inoculado con la bacteria patógena, 2) cladodio

inoculado con la bacteria antagónica y 3) cladodio inoculado con ambas. De los tratamientos antes mencionados se tomaron muestras de tejido a diferentes intervalos de tiempo (1, 4, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas), los cuales se fijaron en Crafo III (apéndice 7.2.1), durante 24 horas, luego se enjuagaron durante 15 minutos con agua y se llevaron al cambiador automático con las soluciones de alcohol etílico, xileno y una vez que se cumplió el periodo de la deshidratación de los tejidos, se incluyeron en parafina. Para hacer los cortes se utilizó un microtomo marca American-Optical, con el cual se hicieron cortes transversales y longitudinales de 10 micrómetros de grosor. Los cortes se pegaron a los portaobjetos con adhesivo de Haupt (apéndice 7.2.2) se colocaron sobre una plancha caliente a 50-52 C° durante 24 horas.

Para la tinción de los cortes se utilizó la tinción diferencial safranina-verde rápidoapéndice 7.2.3 descrita por Curtis (1984) la cual se hizo de la siguiente manera:

a.- Desparafinación

Xileno 6', Xileno 6', Xileno 6', alcohol etílico 100° 5', alcohol etílico 96° 5', alcohol etílico 70° 5', alcohol etílico 50° 5'.

b.- Tinción

Safranina acuosa saturada 24 hrs.

Enjuagar en: alcohol etílico 50° 3', alcohol etílico 70° 3', alcohol etílico 96° 3', alcohol etílico 100° 3'.

c.- Colorante diferencial

Verde rápido 1% 1'

alcohol etílico 96° 3', alcohol etílico 100° 3' Xileno 5', Xileno 5', Xileno 5'.

a.- Montar en resina sintética.

* Con esta técnica la lignina, cutina y cromatina se tiñen de color rojo, contrastando con el color verde de la celulosa y el citoplasma.

3.3. Estudio histoquímico

Los estudios histoquímicos se enfocaron a la determinación de lignina, pectatos y suberina siguiendo la técnica de Curtis (1984) y con la de Gahan, (1984) para proteínas.

3.3.1. Detección de lignina con Floroglucina-acido clorhídrico.

1.- Los cortes se desparafinaron e hidrataron.

2.- Se les aplicaron 2 gotas de floroglucina.

3.- Se les agregaron 2 gotas de ácido clorhídrico al 25 % en agua destilada.

4.- Se montaron en glicerol y se observaron al microscopio para detectar la presencia de lignina con la formación de una coloración roja.

3.3.2. Detección de sustancias pécticas con rojo de rutenio

1.- Las secciones se colocaron en solución de rojo de rutenio durante dos minutos.

2.- Se montaron en glicerol y se observaron al microscopio para detectar una coloración rojiza de las paredes celulares lo cual nos indicaba la presencia de pectatos.

3.3.3. Detección de suberina

1.- Los cortes se desparafinaron e hidrataron hasta llegar a agua destilada.

2.- Se tiñeron con negro de Súdán B saturado (0.1) durante 25 minutos

3.- Se pasaron por alcohol etílico al 50 % y se lavaron con alcohol etílico al 40 %.

4.- Se lavaron en agua destilada y se montaron en glicerol.

Con esta técnica la cutina y suberina se tiñen de negro.

3.3.4. Detección de proteínas con Azul mercúrico de bromofenol

a.- Los cortes se desparafinaron, e hidrataron.

b.- Se les adicionó solución de Azul mercúrico de bromofenol durante 30'.

c.- Se enjuagaron con ácido acético al 0.5 % durante 20'.

d.- Se enjuagaron con agua de la llave por 3'.

e.- Se deshidrataron con alcohol etílico 50° 5', alcohol etílico 70° 5', alcohol etílico 96° 5', alcohol etílico 100° 5'.

f.- Se montaron en resina sintética y se observaron al microscopio para detectar la presencia de proteínas con la formación de una coloración azul.

3.3.5. Reacción de Biuret

- 1.- Se hicieron cortes frescos en el microtomo de congelación a un grosor de 30µm y se fijaron en etanol.
- 2.- Los cortes se colocaron en un portaobjetos con una solución de KOH al 10%
- 3.- Se les adicionó una gota de sulfato de cobre al 1 %.
- 4.- Se montaron en agua y se observaron al microscopio para detectar la presencia de una coloración roja o violeta que nos indica la presencia de proteínas.

3.3.6. Reacción xanthoproteica para tirosina, triptofano y fenilalanina

- 1.- Se hicieron los cortes en el micrótopo de congelación a un grosor 30µm, éstos se fijaron en etanol absoluto.
- 2.- Los cortes se colocaron sobre el portaobjetos en presencia de amoníaco concentrado.
- 3.- Se les adicionó la solución de amonio.
- 4.- Se montaron en glicerol.

Si el color amarillo se torna rojo en presencia del amonio, indica que la proteína contiene tirosina, triptofano y/o fenilalanina.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Fase de campo

4.1.1. Primera evaluación

En la primera evaluación, realizada a las 72 horas después de haber inoculado la bacteria patógena, los cladodios testigos presentaron los síntomas típicos inducidos por *E. c. pv. carotovora*, ya que se observaron lesiones de color café claro a café oscuro, aspecto húmedo y de consistencia blanda, estos síntomas fueron similares a los reportados por (Fucickovsky, 1981, Osorio, 1994, y Gijón, 1996), ya que ellos reportan que la lesión inicia con un color café obscuro, de consistencia blanda y aspecto húmedo, además de presentar un olor desagradable, aunque ellos no señalan las variedades de nopal estudiadas, a este respecto, cabe señalar que en algunas variedades, como en la Picochulo, la lesión inicial, presentó un halo café amarillento. En cambio en las plantas tratadas previamente con la cepa antagónica, sólo algunos cladodios presentaron una pequeña pudrición de aproximadamente 0.3 cm de diámetro la mayoría de los tallos, únicamente desarrollaron una mancha amarillenta en el punto donde se inoculó el patógeno, y en la variedad Picochulo, se presentó además un abultamiento en el sitio de inoculación (Figura 1 a, b, c y d).

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza para el conjunto de datos correspondientes a la primera evaluación indican que no existió diferencia significativa para los factores bloques, pero si para los tratamientos, ya que los

testigos inoculados con la bacteria patógena presentaron un daño de 21 % para la variedad Burrón, mientras que para las variedades Picochulo, V1 y Naranjón, el porcentaje de infección fue de 17.57%, 17.34%, 17.14%, respectivamente, en cambio, cuando las plantas se inyectaron con la cepa antagonista, los índices de infección fueron bajos, oscilaron entre cero a 1.73 %, y aún cuando no hubo diferencias significativas, las variedades se comportaron de manera diferente, ya que la Burrón presentó mayor porcentaje de daño, en cambio la variedad Naranjón, no desarrolló pudrición. Al aplicar la fórmula de ABBOT, se encontró una eficacia superior al 90 % (Cuadro 4). En las siguientes dos evaluaciones el comportamiento fue similar.

4.1.2. Cuarta evaluación

En la última evaluación efectuada a las 144 horas (seis días) después de la inoculación de *E. c. pv. carotovora*, en los cladodios testigos, la pudrición alcanzó niveles altos, se encontraron lesiones de hasta 36 cm de diámetro, que llegó a cubrir totalmente los tallos, algunas pencas debido a la degradación de los tejidos mostraron rompimiento de la epidermis e incluso algunos ya se habían desprendido de la planta madre. Por otro lado los materiales tratados con la cepa CAE-01, solamente manifestaron cambios en los tejidos donde se inoculó al patógeno, de tal forma que la coloración amarillenta, observada inicialmente, pasó a café oscuro, con un aspecto seco y ligeramente hundido y aquellos cladodios que en la primera evaluación desarrollaron pudrición, en la mayoría de ellos las lesiones conservaron sus dimensiones y en otras crecieron, pero nunca llegaron a ser similares al testigo.

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza para el conjunto de datos correspondientes a la cuarta evaluación indican que no hubo diferencia significativa para los factores bloques, pero si para los tratamientos, ya que los todos los testigos de las variedades Picochulo, Naranjona, V1 y Burrón inoculados con la bacteria patógena presentaron un daño superior al 95 %, en cambio, cuando las plantas se inyectaron con la cepa antagónica, los índices de infección continuaron siendo bajos (0 a 9.3 %), y de igual forma que en las evaluaciones anteriores el análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas entre variedades. La variedad Naranjona, respondió mejor a la inoculación de la cepa antagónica ya que nunca presentó daño y al aplicar la formula de ABBOT, esta variedad manifestó un 100 % de eficacia (Cuadro 5).

Estos resultados indican que dicho agente brinda protección no sólo a los cladodios inoculados sino también a los nuevos brotes, lo cual lo hace un agente potencial para el control de la pudrición blanda.

Cuadro 4. Comparación de medias de Tukey para el porcentaje de eficacia de la cepa antagónica CAE-01 en la primera evaluación.

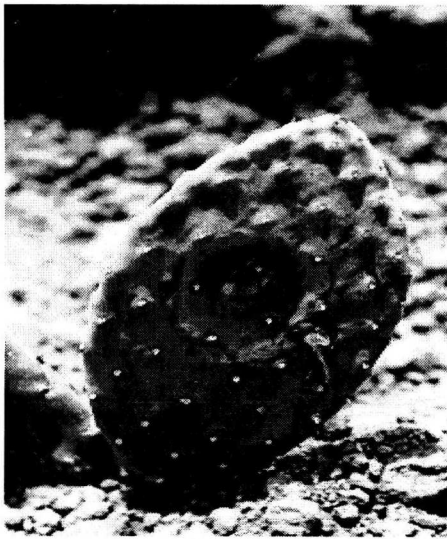
Variedades	% de infección	ABBOT % de eficacia
Naranjona	0.0 a*	100 a*
V1	0.42 a	97.50 a
Picochulo	0.39 a	97.40 a
Burrona	1.73 a	90.97 a
Testigo	18.44 b	0 b

*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $\alpha=0.05$).

Cuadro 5. Comparación de medias de Tukey para el porcentaje de eficacia de la cepa antagónica CAE-01 en la cuarta evaluación.

Variedades utilizadas	% de infección	ABBOT% de eficacia
Naranjona	0.0 a*	100 a*
V1	2.80 a	97.15 a
Picochulo	1.94 a	97.95 a
Burrona	9.34 a	90.64 a
Testigo	98.14 b	0 b

*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey con $\alpha=0.05$).



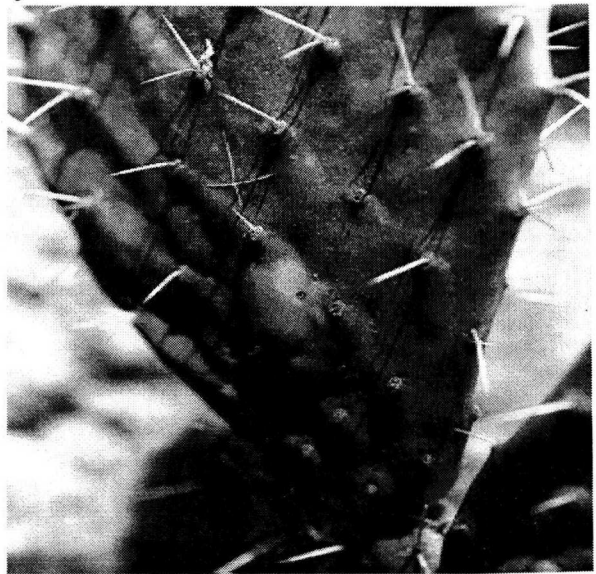
a



b



c



d

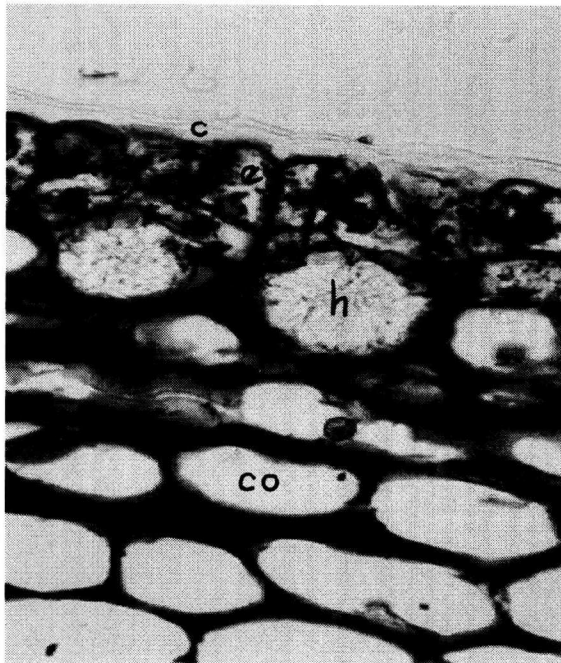
Figura 1. Respuesta del nopal a la inoculación de la cepa patógena y antagónica. **a.** Cladodio de la variedad V1 con el daño típico de *E. c. pv. carotovora* donde se aprecian lesiones de color café claro a oscuro y de aspecto húmedo. **b.** Cladodio de la variedad Cristalina con pudrición como en el caso anterior pero rodeada de una zona amarillenta. **c** y **d.** Cladodios de las variedades V1 y Cristalina tratados previamente con la cepa CAE-01 mostrando una mancha amarilla e hinchamiento como respuesta a la inoculación del patógeno.

4.2. Histología de cladodio sano

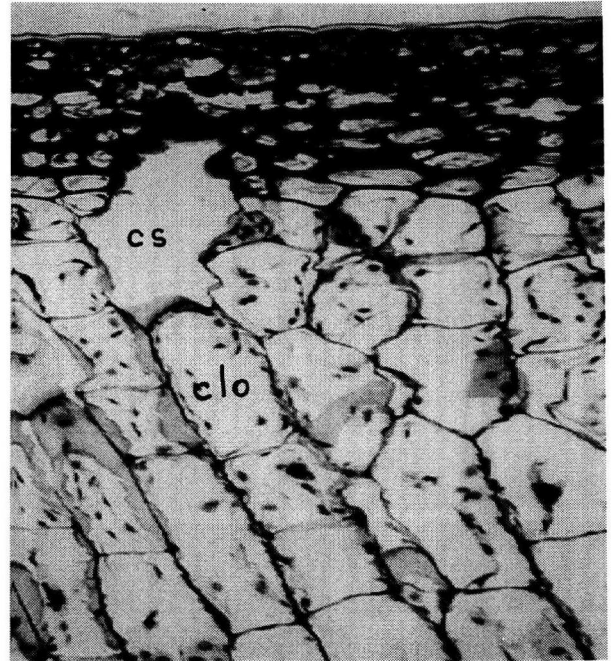
Los cladodios fueron examinados microscópicamente para determinar la anatomía de los tallos sanos e inoculados con la bacteria causante de la pudrición blanda (*E. c. pv. carotovora*) en diferentes estados de desarrollo de la infección, y con la cepa antagónica CAE-01 que no permitió el desarrollo de la pudrición.

En cortes transversales de cladodios sanos se observó la cutícula gruesa abajo de ésta se localizó la epidermis, la cual estuvo formada por una capa de células lenticulares, seguida por la hipodermis, constituida por una capa de células mas o menos rectangulares y con abundantes inclusiones cristalinas de oxalato de calcio, conocidas como drusas. Conde (1975), menciona que estos cristales ayudan a reducir la pérdida de agua y también actúan disminuyendo la adsorción de energía luminosa. Después de este tejido se localizo el colénquima, constituido por más de tres capas de células que se caracterizan por presentar paredes gruesas y contornos irregulares. El siguiente estrato denominado clorenquima, presentó varias capas de células grandes y alargadas, provistas de paredes delgadas, protoplasma abundante, cloroplastos y cristales de oxalato de calcio. Después de este tejido se observó parénquima "colector"; que fue el más abundante, con grandes células esféricas turgentes, de paredes delgadas y provisto de cavidades mucilaginosas, y en el citoplasma se detectaron cristales de oxalato de calcio; con el núcleo y nucleolo pequeños en relación con el volumen celular, se menciona que en este tejido se lleva a acabo la función de almacenamiento de agua, de ahí el nombre de "colector" (Osorio, 1989). Finalmente se observó el

parénquima medular, el cual estuvo formado por células grandes de contornos poligonales o esféricos y con gránulos de almidón. Los haces vasculares se encontraron distribuidos en el clorenquima y en el parenquima de almacenamiento (Figura 2 a, b, c y d).



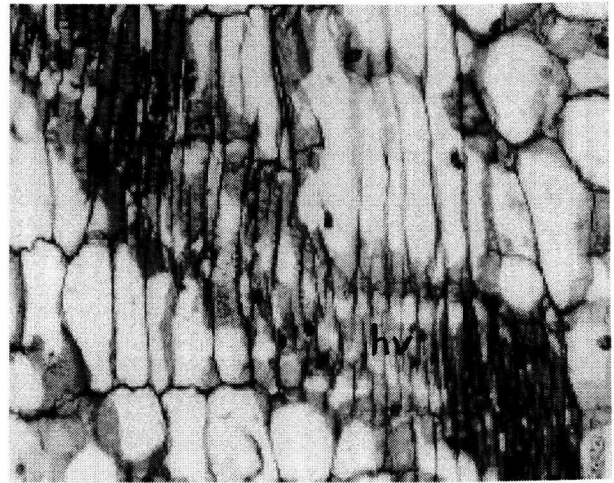
a



b



c



d

Fig 2. Representa una sección transversal de un cladodio sano. a, se puede apreciar la cutícula (c), epidermis (e), células de la hipodermis donde se observan las drusas (h), células constituyentes del colénquima (co). b, se muestra la cámara subestomatosa (cs) y el tejido clorenquimatoso, (clo). c, células del parénquima medular con gránulos de almidón (al). d, haz vascular en vista longitudinal (hv).

4.3. Histología de cladodio inoculado con *E. c. pv. carotovora*

En los tallos inoculados con la bacteria patógena, no se observaron cambios en ninguno de los estratos celulares en las primeras 12 horas; sin embargo, en las muestras con 24 horas de incubación, en el punto cercano a la inoculación, se detectó desorganización celular, tendiendo al colapso y fue evidente la plasmolisis de las membranas celulares, estos daños indican que las células posiblemente se encontraban en un proceso de degradación por la acción de las enzimas pectolíticas y celulolíticas que produce el patógeno y que actúan principalmente en la lámina media y la pared celular primaria, produciendo así la maceración de los tejidos ya que los principales constituyentes de estas áreas son los péctatos y la celulosa. Conforme avanzó la infección se detectó la presencia de cavidades en el clorénquima, debido a la maceración de las paredes de varias células y en su interior se observó grandes cantidad de células bacterianas. Las células afectadas presentaron paredes más delgadas en comparación con las sanas y conforme aumentaba el periodo de infección el daño fue más severo hasta llegar a degradar completamente el tejido parenquimatoso y el medular (Fig 3. a, b, c y d), ya que la bacteria se propaga inicialmente en los líquidos liberados por células desintegradas, permitiendo así su rápida multiplicación y propagación. Síntomas similares fueron observados por Pennynpacker *et al* (1981), cuando inocularon plantas de crisantemo con *E. c. pv carotovora* y encontraron la degradación del tejido parenquimatoso.

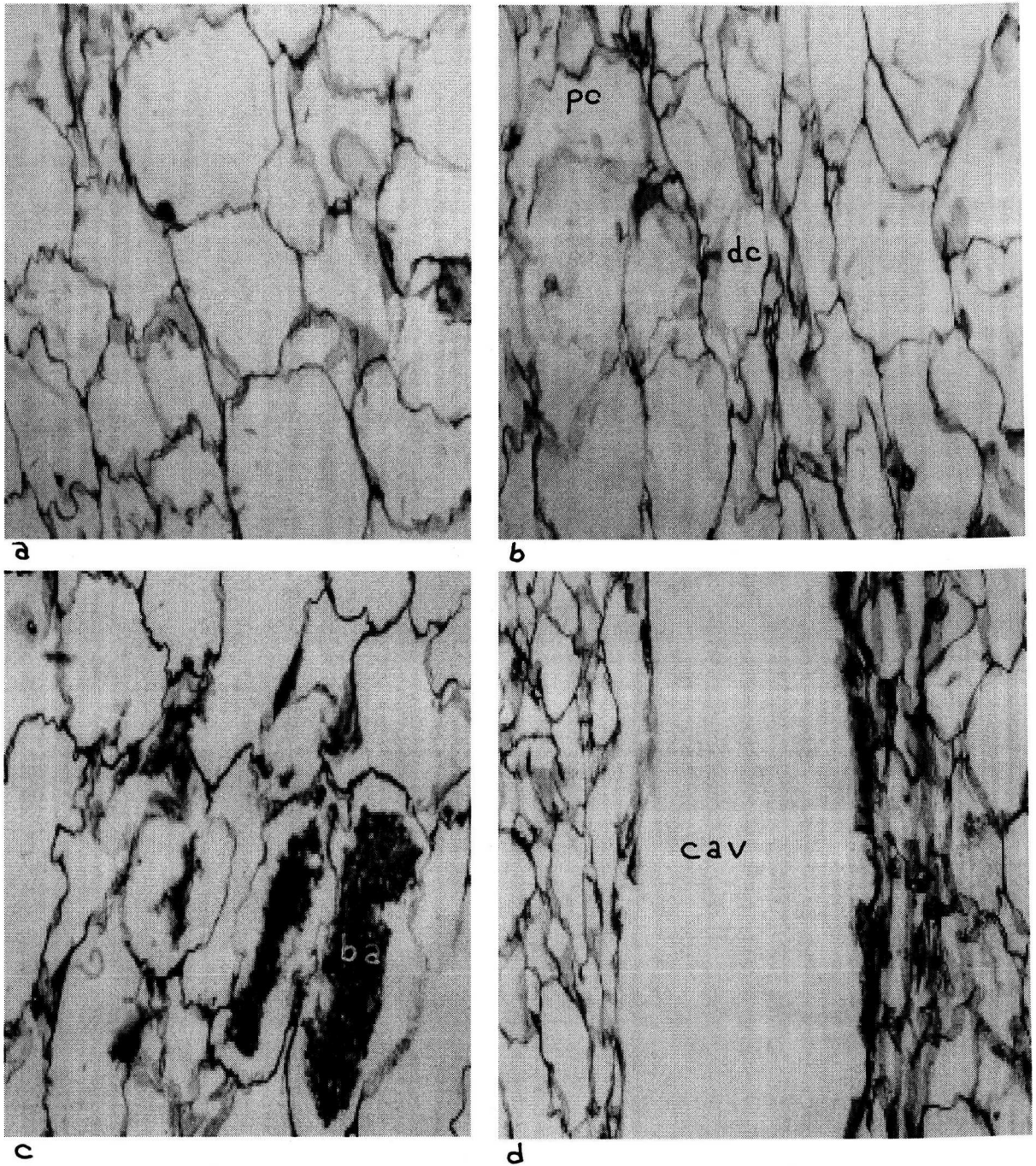
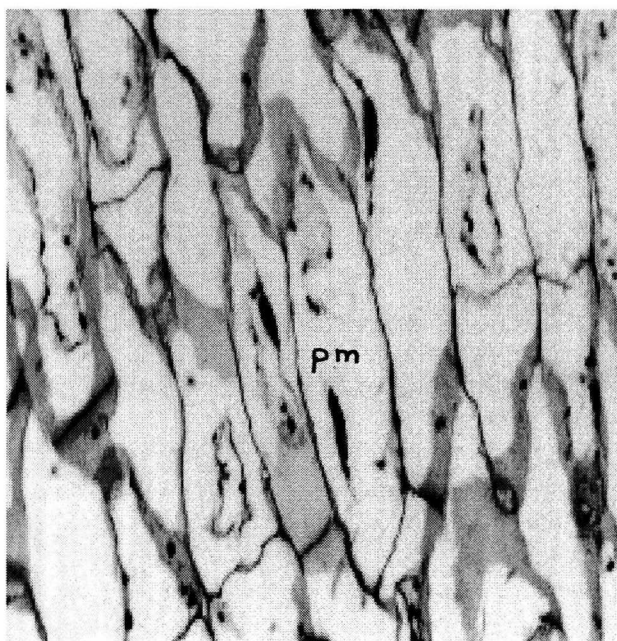


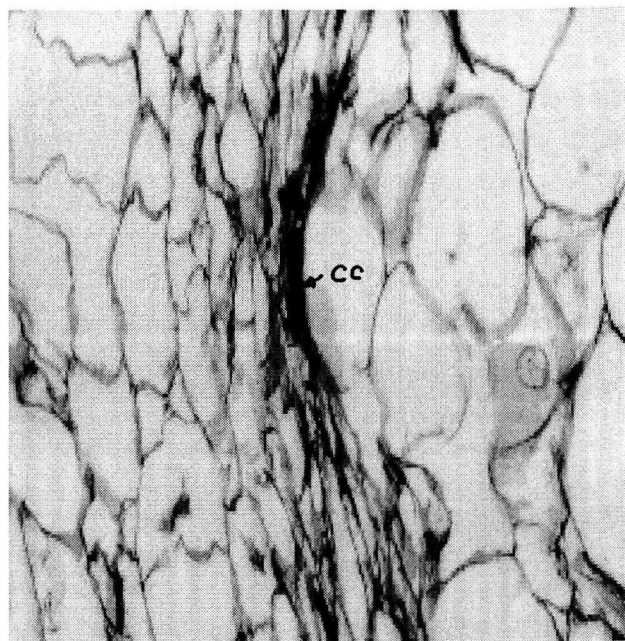
Fig 3. Sección transversal de cladodio inoculado con *E. c. pv. carotovora*. **a** células normales. **b**, desorganización celular (dc) y la plasmolización de las membranas celulares (pc). **c**, tejido clorenquimatoso con paredes delgadas y gran cantidad de bacterias (ba), **d**, desintegración severa del tejido clorenquimatoso con la formación de grandes cavidades (cav).

4.4. Histología de cladodio inoculado con la cepa antagónica CAE-01

La bacteria antagónica causó plasmolisis de la membrana, como consecuencia ocasionó la muerte de las células y a las 96 horas se apreciaron estratos de células colapsadas y necrosadas (Figura 4 a y b), cabe señalar que estos daños no fueron debido a la desintegración de las paredes celulares, sino a la muerte de las células, probablemente por la acción de sustancias producidas por la bacteria. Mediante pruebas histoquímicas no se detectó la presencia de suberina, lignina y proteínas, en los estratos de células dañadas, pero a nivel molecular Mejía (1995), determinó la inducción de una proteína. En esta investigación probablemente no se logro determinar la presencia de algún tipo de proteína debido a que se requiere de pruebas más específicas.



a



b

Fig 4. Sección transversal de cladodio inoculado con la cepa antagonística CAE-01. a. plasmolisis de la membrana celular (pm). b. Estratos de células colapsadas (cc), y células necrosadas.

4.5. Histología de cladodio inoculado con la cepa antagonica CAE-01 y

E.c pv. carotovora.

En el tejido parenquimatoso entre los puntos de inoculación de la bacteria patógena y antagonica, a las 48 horas después, se observaron varias capas de células de paredes delgadas, estas capas posiblemente funcionaron como una barrera física que impidió el desplazamiento de nutrientes hacia la bacteria patógena, lo que evitó que la pudrición se desarrollara, dando lugar aparentemente a una respuesta de defensa estructural inducida. Conforme transcurrió el tiempo estas capas de células se colapsaron y a las 96 horas se observaron algunas de ellas necrosadas (Figura 5 a, b y c). Las pruebas histoquímicas para detectar la presencia de suberina y lignina en el estrato fueron negativas, por lo que consideramos que la respuesta celular inducida por la bacteria antagonica, es la formación de una “zona de reacción” cuyas células no se suberizan, ni se lignifican. Se requiere realizar más estudios para determinar exactamente el papel que tiene esta zona.

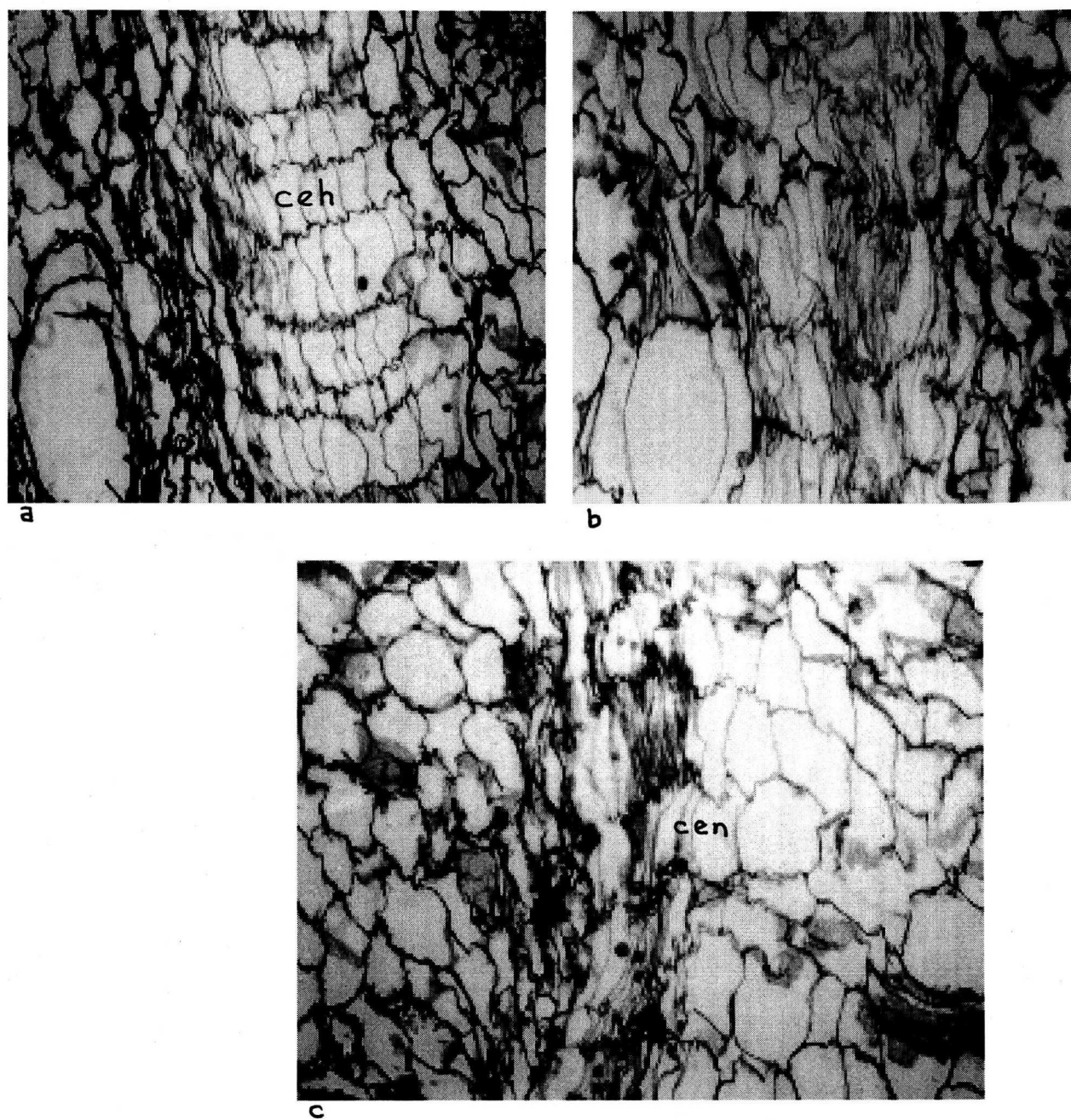


Fig 5. Sección transversal de cladodio inoculado con la cepa antagonica CAE-01 y *E. c. pv. carotovora*. a, células delgadas e hinchadas(ceh). b, células en proceso de colapsarce. c, capa de células necrosadas (cen).

5. CONCLUSIONES

- 1.- La inoculación de los propágulos de las variedades de nopal Burrón, Naranjón, Picochulo y V1 con la cepa antagónica CAE-01 protege a los nuevos cladodios hacia la infección de *E. c. pv. carotovora*.
- 2.- La variedad Naranjón fue la que mejor respondió a la protección de la cepa antagónica CAE-01, ya que no desarrollo pudrición.
- 3.- La inoculación de la cepa antagónica en cladodios, solo indujo inicialmente plasmolisis y después colapso de las células del tejido medular. Sin maceración.
- 4.- La inoculación de la cepa antagónica cuando se aplica *E. c. pv carotovora* indujo el colapso y muerte de unas cuantas capas de células del tejido parenquimatoso, alrededor del punto de inoculación.
- 5.- Con las pruebas histoquímicas empleadas no se logro detectar la presencia ligninas, suberinas y proteínas en ninguno de los tratamientos.

6. LITERATURA CITADA

Agrios G., N. 1985. Fitopatología. Editorial Limusa, México. 752 pp.

Alvarez A., J. J. 1997. Comportamiento de la pudrición suave de la lechuga inducida por *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* con la aplicación de la cepa antagónica CAE-O1, en Chapingo, México. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 62pp.

Bautista C., R. 1982. Los Agrosistemas Nopalers del Valle de México. Tesis Profesional. Departamento de Zonas Aridas. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 92pp.

Boothroyd, C. W and D. A. Roberts. 1972. Fundamentals of Plant Pathology. pp:168-169.

Borrego E., J. y N.Burgos V. 1986. El nopal. Buenavista saltillo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah, México. 202 pp.

Bradbury, J.F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB. International. 332 pp.

Bravo H., H. 1978. Las Cactaceas de México. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. México. Vol 1. 743 pp.

Cacciola, S.O., S.L. and Magno Di .1988. Foot rot of prickly pear cactus caused by *Phytophthora nicotianae*. Plant Disease. 72:739-796.

- Campos B., A. 1996. Identificación del agente causal de la pudrición café del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* L.) Miller. En Milpa Alta, D.F. Tesis profesional. Chapingo, México. 41pp.
- Canales C., R. 1983. Etiología, evaluación de daños y control de la pudrición negra del nopal *O.fiscus-indica* en la sierra de Arteaga. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coah. México. 62 pp.
- CODAGEM. 1982. Comisión coordinadora para el desarrollo agrícola y ganadero del estado de México, cultivo, explotación y aprovechamiento del nopal, en el estado de México. Folleto informativo num. 12, México.
- Conde L., F. 1975. Anatomical comparasions of five species of *Opuntia* (Cactaceae) Ann. Missouri Bot. Gard. 62:425-473.
- Cortés M., A. 1990. *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, causal agent of rot Some Crop in Puerto Rico. The Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. Cuarta edición. Talleres offset. Larios S.A. México, D.F. pp:258-276-278.
- Figueroa H., F. 1984. Estudios de las nopaleras cultivadas y silvestres sujetas a recolección para el mercado en el antiplano Potosino - Zacatecano. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
- Flores V., C. 1997. La producción de nopal verdura en México. In Memorias del VII nacional y V Internacional Congreso sobre conocimientos y aprovechamiento del nopal. Monterrey, N.L. México.95pp.

- Flores V., C. A. y C. Gallegos V.1994. Situación y Perspectivas de la Producción de tuna en la Región Centro-Norte de México. *In*: Memorias Aportaciones Técnicas y Experiencias de la Producción Tunera en Zacatecas. CECCAM, Morelos, Zacatecas.95pp.
- Fucikovsky, L and J. James.1981. Bacteria disease of agave y cactus in México. Colegio de Postgraduados. Chapingo. México.59 pp.
- Gallegos V., C y S. Méndez. J.1997. Producción de nopal en México. *In* Memorias del VII Nacional y V Internacional Congreso sobre conocimientos y aprovechamiento del nopal. Monterrey, N.L. México.
- García A., M. 1979. Patología vegetal practica. Ed. Limusa. México.256pp.
- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. Cuarta Edición. Talleres Offset. Larios S. A .México, D.F. 61pp.
- García P., F. 1997. Aislamiento y selección de bacterias de la rizosfera de Zanahoria (*Daucus carota* L.) y su posible antagonismo a *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 52pp.
- Gijón H., A. R. 1996. Etiología de la Pudrición del Nopal (*Opuntia* spp) y su comportamiento con la cepa antagonica CAE-01. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. México. 50pp.
- Goto, M. 1992. Fundamentals of Bacterial plant pathology. Academic Press, Inc. Estados unidos de América.

Granados S., D. y D. Castañeda A. D. 1991. El nopal. Historia, Fisiología, Genética e importancia frutícola. Ed. Trillas. México. 267 pp.

Husain, A., and A. Kelman. 1958. The role of pectic and cellulolytic enzymes in pathogenesis by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*. 48:381

Lozano C. 1958. Contribución al estudio e industrialización del nopal. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah., México. 60 pp.

Lucas G., B., C.L. Campbell, and L.T. Lucas. 1985. Introduction to Plant Disease.

Martínez C., N. 1998. Control de la marchitez de la gerbera (*Gerbera jamesonii* L. Bolus) Inducida por *Phytophthora drechsleri* Tucker, en Tenancingo, México. Tesis Profesional. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 49 pp.

Mejía S., D. y Rodríguez, M. Ma. de L. 1995. Análisis molecular del efecto antagónico de una cepa avirulenta de *Erwinia tracheiphila* cepa CAE-01 sobre *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, causantes del tizón común y tizón de halo del frijol. Tesina de Licenciatura U.A.M. México.

Muñoz U., A. 1995. Estudio anatómico, morfológico y citológico de seis variedades de nopal tunero del Altiplano Potosino-Zacatecano. Tesis profesional. Montecillos, México. 70 pp.

- Nolasco A., J.J. 1992. Control químico de la mosquita blanca (Homoptera: Aleyrodidae) mediante tres métodos de aplicación del insecticida imidacloprid, en tomate de cascara (*Physalis ixocarpa* Brot) en Totolapan, Morelos. Tesis Profesional. Parasitología Agrícola. Chapingo, México.
- Osorio A., F. y E. Soto A. 1994. Enfermedades del Nopal tunero. In :Memorias Aportaciones Técnicas y Experiencias de la Producción Tunera en Zacatecas. Memorias. CECCAM, Morelos, Zacatecas. 95 pp.
- Osorio A., F.1989. Estudio sobre el en grosamiento de cladodios de nopal (*Opuntia* spp). Tesis de Maestría en Ciencias.Colegio de Postgraduados Montecillos, México. 79 pp.
- Pennypacker, B.W., C.M. Smith., R.S. Dikey., and P.E. Nelson, 1981. Histopathology of a symptomless *chrysanthemum* cultivar infected by *Erwinia chrysanthemi* or *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Phytopathology. 71:141-148.
- Pennypacker, B.W., P.E. Nelson., and R.S. Dikey.1974. Histopathology of Chrysanthemum Stems Artificially Inoculated with *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology. 64:1353-1358.
- Piña, L. 1977. La grana o cochinilla del nopal, Monografía, num 1 de los Laboratorios Nacionales De la Subsecretaria de Fomento Industrial, en México. 55 pp.
- Rodríguez M. Ma de L. y D. Mejía S. 1995.Aislamiento de bacterias antagónicas a bacterias fitopatógenas. Resúmenes del VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Ixtapa, Zihuatanejo, México. P.57.

- Salgado M., C. 1984. El cultivo del nopal, una alternativa económica en suelos áridos y semiáridos. Tesis Profesional. Departamento de Economía agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, México.21-24 pp.
- Sánchez P., E. 1988. Evaluación de cuatro productos para el control de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones). Berg. En dos cultivares de lechuga (*Lactuca sativa* L) en el campo experimental de la F.A.U.A.N.L; en Marín. N.L. Tesis Profesional. Facultad de Agronomía de la Universidad autónoma Nuevo León.65 pp.
- Santiago B., J.1997. Comportamiento de la vena negra de las crucíferas causado por, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pam) Dows, en col, *Brassica oleracea* var. *capitata* L. Ante la aplicación de la bacteria antagonica CAE-01, en invernadero. Tesis Profesinal. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México.42 pp.
- Velázquez C.1962. Aspectos ecológicos, distribución y abundancia de *O. streptacantha* y *O. leucotricha*. México.
- Villarreal G., L.1985. Supervivencia, dispersión y patogenicidad de *Erwinia carotovora* y su relación con *S. Rolfsi* y *Sclerotinia*. Tesis Profesional. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.
- Zumoff, C.H., and R.S. Dikey.1987. Histopathology of *Syngonium podophyllum* artificially inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *syngonii*. *Phytopathology*. 77:1263-1268.

7. APENDICE

7.1. Datos referentes a temperatura y humedad relativa resgistrados durante el experimento.

Cuadro 6. Promedio de temperaturas*, durante el periodo de evaluación de la cepa CAE-01 para el control de la pudrición blanda del nopal, en Chapingo, México. 1997-1998.

Mes	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)
Octubre	18.0	23.7	7.9
Noviembre	17.2	23.5	6.18
Diciembre	16.2	23.2	4.4
Enero	14.9	22.1	1.5
Febrero	19.2	27.4	3.3
Marzo	20,2	27.1	4.2
Abril	23.0	29.6	8.7
Mayo	24.3	31.2	8.3
Junio	21.3	28.9	11.2

*Datos obtenidos de la estación meteorológica de la Universidad Autónoma Chapingo

Cuadro 7. Promedio de humedad relativa*, durante el periodo de evaluación de la cepa CAE-01 para el control de la pudrición blanda del nopal, en Chapingo, México. 1997-1998.

Mes	HR media (%)	HR máxima (%)	HR mínima (%)
Octubre	53	98	31
Noviembre	49	96	23
Diciembre	52	94	28
Enero	51	96	27
Febrero	29	54	15
Marzo	37	78	21
Abril	41	81	24
Mayo	48	91	28
Junio	65	100	37

*Datos obtenidos de la estación meteorológica de la Universidad Autónoma Chapingo.

Cuadro 8. Promedio de Temperatura* diaria del mes de junio para la evaluación de la cepa CAE-01 en el control de la pudrición blanda del nopal, en Chapingo, México. 1997-1998.

Días del mes de Junio	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)
1	23.6	30.2	7.7
2	24.2	29.6	13.4
3	21.8	28.5	13.8
4	23.0	28.6	9.2
5	22.9	30.2	11.4
6	21.8	28.5	11.0
7	23.0	28.9	10.4
8	23.6	30.1	9.9
9	25.3	31.2	11.0
10	24.0	29.4	12.0
11	24.4	29.7	13.1
12	24.7	31.2	11.6
13	24.2	3.7	10.6
14	25.5	30.9	11.3
15	26.1	32.8	10.0

* Datos obtenidos de la estación meteorológica de la Universidad Autónoma Chapingo.

Cuadro 9. Promedio de humedad relativa diaria del mes de junio para la evaluación de la cepa CAE-01 en el control de la pudrición blanda del nopal, en Chapingo, México. 1997-1998.

Días del mes de Junio	HR Media (%)	HR Máxima (%)	HR Mínima (%)
1	58	100	29
2	61	100	39
3	78	100	50
4	64	100	45
5	68	100	31
6	69	100	37
7	57	100	35
8	57	100	30
9	51	100	32
10	58	100	36
11	62	100	36
12	58	100	30
13	59	100	30
14	47	100	30
15	42	100	21

Datos obtenidos de la estación meteorológica de la Universidad Autónoma Chapingo.

7.2. Preparación de colorantes y reactivos

7.2.1. Fijador Craff III

Sol. A	Ac. Crómico	1gr
	Ac. Acético	7cc
	Agua destilada	
	aforar a	92cc
Sol. B	Formaldehido	30cc
	Agua destilada	70cc

Mezclar A y B en partes iguales al momento de usar.

7.2.2. Adhesivo de Haupt

Gelatina	1gr
Glicerol	13 ml
Fenol	2gr
Agua	100 ml

Se mezcla la gelatina con el glicerol y se le agrega el agua, se calienta agitando constantemente hasta disolver (tener cuidado de que la temperatura no exceda a los 45°C) y luego se agrega el fenol y se filtra.

7.2.3. Safranina acuosa saturada

Sulfato de amonio	13 gr
Agua destilada	100 ml

7.2.4 Verde fijo alcohólico

Verde fijo	1%
Alcohol 96 °	1 gr

7.2.5. Rojo de rutenio

Rojo de rutenio	0.1 gr
Agua destilada	50 ml

7.2.6. Negro de sudan B

Negro Sudán B saturado	0.1%
n-butanol	25%
Etilenglicol	75%

7.2.7. Azul de bromofenol mercúrico

Cloruro mecúrico	10 gr
Azul de bromofenol	100 mg por cada 100 ml de Etanol al 96 %.

7.2.8. Floroglucina- ácido clorhidrico

Floroglucina	0.1 g
Etanol al 96%	10 cc

