

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

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

✓ **DETECCIÓN DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* EN
SEMILLA DE SANDÍA MEDIANTE REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA.** //

T E S I S
**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**
**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:
VIOLETA ADELINA FIGUEROA MEJÍA



Chapingo, México, Noviembre de 2002.

Bib. 98309

**DETECCION DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en SEMILLA DE SANDIA
MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

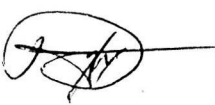
Tesis realizada por **VIOLETA ADELINA FIGUEROA MEJÍA** bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:


DR. NAHÚM MARBÁN MENDOZA

ASESOR:


M. C. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

ASESOR:


M. C. JORGE EVERARDO LÓPEZ NOLASCO

A = 40444

**DETECCION DE *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en SEMILLA DE SANDIA
MEDIANTE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA**

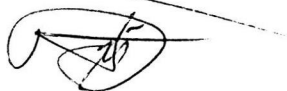
El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **VIOLETA ADELINA FIGUEROA MEJÍA** autor de la presente tesis de Maestría en Protección Vegetal estuvo constituido por:

PRESIDENTE:



DR. NAHUM MARBÁN MENDOZA

ASESOR:



M. C. DIMAS MEJÍA SÁNCHEZ

ASESOR:



M. C. JORGE EVERARDO LÓPEZ NOLASCO

DEDICATORIAS

A MIS PADRES: *Jaime C. Figueroa Ramos*
Sisana Angela Mejía Ramírez

Agradezco infinitamente todo el Amor, cariño, confianza, ternura, dedicación y apoyo que me brindan en todo momento, ya que son la base y el motivo para seguir adelante y superarme profesionalmente...¡ Y sobre todo por que se lo signifíco para Ustedes!

A MIS HERMANOS: *Jaime Saúl, Fredy Cruz, Marcoantonio, Visael, Florasalia, Yolanda*

Mil gracias por el apoyo, confianza y buenos deseos que siempre han tenido para mí, pero sobre todo por el cariño y amor que siempre nos une.

A MIS SOBRINOS: *Rocio Itzel, Alondra Abigail, Jaime Omar*

Por brindarme alegría, amor y ternura en todo momento, siendo una inspiración más para seguir adelante.

A MI CUÑADA: *Hilda Rocío*

*Por la confianza, cariño y amistad que siempre me ha brindado,
¡Gracias!...*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme financiado mis estudios, y brindarme la oportunidad de superarme.

A la Universidad Autónoma Chapingo por a través del Departamento de Parasitología Agrícola por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de postgrado.

A los Profesores de Posgrado por haber brindado y compartirme sus conocimientos que serán útiles en mi vida profesional.

A la Dirección General de Sanidad Vegetal, en especial al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, a través del Laboratorio de Fitobacteriología y Biología Molecular por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo.

Al Dr. Nahúm Marbán Mendoza por la dirección, asesoramiento, apoyo y revisión del presente.

Al M. C. Dimas Mejía Sánchez por la confianza que siempre me ha brindado, asesoramiento, apoyo, revisión, entusiasmo y disposición en la realización de este trabajo, sobre todo por su amistad.

Al M. C. Jorge López Nolasco el apoyo brindado para llevar acabó el presente, sugerencias y revisión del mismo.

Al Biólogo Jorge Aguilar Ríos, por su apoyo desinteresado, sugerencias, disposición y entusiasmo y optimismo en todo momento, pero sobre todo por su amistad.

A la Bióloga Bárbara Hernández Macías del Laboratorio de Fitobacteriología por su apoyo, confianza incondicional en todo momento, y por hacer mi estancia mi estancia agradable.

A la M. C. María del Rocío Hernández Hernández por brindarme siempre su apoyo, sugerencias y confianza desinteresada en todo momento y por su amistad.

Al M. C. Camilo Hernández Juárez por el apoyo, confianza, consejos a cada momento pero sobre todo por su amistad.

A la Ing. Claudia Rueda Barrientos por su apoyo, confianza, cariño así como por todos los momentos compartidos, sobre todo por su amistad.

Al Sr. Juan Chávez encargado del invernadero de la DGSV, por su apoyo y disposición que siempre me brindo.

A la Sra. Aurora por su apoyo brindado y disposición durante todo este tiempo, ¡Gracias!

A mis compañeros de Generación, por hacer que mi estancia fuera agradable ¡Gracias!

A mis amigos, por confiar en mí..

¡Gracias a todos Violeta Figueroa Mejía!

DATOS BIOGRAFICOS

Violeta Adelina Figueroa Mejía

Nació en México D. F. el 9 de Abril de 1973. Estudió en la Primaria Federal Cuauhtemoc, la Secundaria en la Secundaria Diurna No. 275, el Bachillerato en EL Colegio de Bachilleres No. 6 "Vicente Guerrero" en la especialidad de Administración de Recursos Humanos y la Licenciatura en la Universidad Autónoma Metropolitana "Unidad Xochimilco", de donde egreso con el título de Ingeniero Agrónomo. En el aspecto profesional ha laborado en la subdirección de Organización y concertación y Departamento de Organismos Auxiliares de la Dirección General de Sanidad Vegetal.

INDICE

Indice general	i
Indice de cuadros	iv
Indice de figuras	v
Resumen	vii
Summary	viii
I.- Introducción	1
II.- Revisión de literatura	2
2.1.- Aspectos generales del cultivo de sandía	3
2.1.1.- Clima y suelo	3
2.1.2.- Descripción botánica	4
2.1.3.- Variedades e híbridos	4
2.1.4.-Costo del cultivo	5
2.1.5.- Producción	5
2.1.6.- Plagas y enfermedades	6
2.2.- Descripción del patógeno	7
2.2.1.- Taxonomía y nomenclatura	8
2.2.2.- Distribución	8
2.2.3.- Rango de hospederos	8
2.2.4.- Síntomatología	9
2.3.- Transmisión del patógeno	10
2.4.- Manejo	12
2.4.1.-Manejo cultural	12
2.5.- Control químico	13
2.5.1.- Tratamiento de semillas	13
2.6.- Métodos para la detección de bacterias fitopatógenas	15
2.6.1.- Aislamiento	15
2.6.2.- Medios de cultivo	16
2.6.3.- Caracterización	16
2.6.4.- Utilización de fuentes de carbono	17
2.6.5.- Fuentes de carbono	17
2.6.6.- Metabolismo oxidativo y/o fermentativo	18
2.6.7.- Hidrólisis de lípidos	18
2.6.8.-Fuentes de nitrógeno	18

2.6.9.- Acumulación de inclusiones de poli β hidroxibutirato	19
2.7.- Pruebas de patogenicidad	20
2.8.- ELISA	22
2.9.- Métodos moleculares	23
2.9.1.- Hibridación de ácidos nucleicos	23
2.9.2.- Técnicas de hibridación <i>In situ</i>	24
2.9.3.- Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP's)	25
2.9.4.- Amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN (RAP's)	26
2.9.5.- Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP's)	27
2.9.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	28
2.9.7.- Uso de la PCR para la detección de e identificación de bacterias fitopatógenas	29
2.9.8.- Cuantificación de ácidos nucleicos	31
III.- Materiales y Métodos	32
3.1.- Semillas utilizadas	32
3.2.- Crecimiento en diferentes medios de cultivo	32
3.3.- Identificación	32
3.4.- Pruebas de patogenicidad	33
3.5.- Inoculación en frutos de sandía, melón, calabaza	33
3.6.- Caracterización fenotípica	34
3.6.1.- Determinación de fluoresceína	34
3.6.2.- Actividad lipolítica	34
3.6.3.- Acumulación de inclusiones de poli β hidroxibutirato	34
3.6.4.- Utilización de fuentes de carbono	35
3.7.- Técnica de ELISA	35
3.8.- Métodos de extracción de ADN	37
3.8.1.- Método Plan DNAzol	37
3.8.2.- Método Nucleo Spin Plant	38
3.8.3.- Método CTAB	39
3.8.4.- Calidad de ADN por electroforesis	39
3.8.5.- Cuantificación y pureza de ADN	40
3.8.6.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	40
3.8.7.- Inmuno- PCR y PCR	41

IV.- Resultados y discusión	43
4.1.- Serología	45
4.2.- Caracterización molecular	46
4.2.1.- Extracción y cuantificación de ADN	46
4.2.2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa	47
V.- Conclusiones	54
VI.- Bibliografía	55
VII.- Anexos	60

Indice de cuadros

Cuadro 1.- Temperaturas óptimas para el cultivo de la sandía.	3
Cuadro 2.- Plagas y enfermedades en el cultivo de la sandía	6
Cuadro 3.- Reactivos utilizados para Ic-PCR y PCR	42
Cuadro 4.- Características de las cepas de estudio comparadas con las reportadas para el género <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	43
Cuadro 5.- Cantidades óptimas de reactivos para Ic-PCR y PCR	48

Indice de Figuras

Figura 1. Gel de Agarosa al 0.8% mostrando la integridad del ADN obtenido por el método CTAB	46
Figura 2. Gel de Agarosa al 0.8% mostrando la calidad del ADN obtenido de bacteria con el protocolo Plan DNAzol	47
Figura 3. Gel de Agarosa al 0.8% mostrando la calidad del ADN generado apartir de cotiledón por el método Plan DNAzol	47
Figura 4. Gel de Agarosa al 2% mostrando las cantidades y condiciones óptimas de amplificación que se presentan en el cuadro 4, M: marcador molecular, 1 Control (-), 2 (control positivo), 3 y 4 ADN bacteria.	48
Figura 5. Gel de Agarosa al 2%, mostrando la amplificación por inmuno-PCR y PCR nested	49
Figura 6. Gel de Agarosa al 2% mostrando la amplificación utilizando muestras de semilla de sandía a través de Inmuno-PCR, M marcador de peso molecular de 100 pb, 1(-), 2 (+), 3,4 y 5 muestras de semilla	50
Figura 7. Gel de Agarosa al 2% mostrando amplificación usando ADN de semilla a través de PCR simple, generando bandas de 360 pb. M: marcador de 100 pb, 1 (-), 2 (+), 3 muestra de semilla 1, 4 muestra 2.	51
Figura 8. Gel de Agarosa al 2 % donde se observa que utilizando ADN de bacteria se generan bandas bién definidas, M. marcador molecular 250 pb, 1 (-), 2 (+), 3 y 4 ADN de bacteria.	51
Figura 9. Gel de Agarosa al 0.8% mostrando la cantidad de ADN por el método CTAB, MP: marcador de peso molecular 250pb; 1, 2, 3, 4 ADN de plántula; 5 ADN bacteria.	52

Figura 10. Gel de Agarosa al 2% mostrando la amplificación de ADN de bacteria por el método CTAB, MP: marcador de peso molecular 250pb; 1 control negativo; 2 ADN bacteria sin diluir; 3 ADN bacteria dilución 1:50 generando una banda bien definida. 52

Figura 11. Gel de Agarosa al 2 % mostrando amplificación de *Acidovorax avenae* sub.*citrulli* utilizando 0.2 µl de Taq polimerasa y 2 µl de MgCl, M: marcador molecular de 100 pb 53

RESUMEN

El manchado bacteriano de la sandía (*Citrullus lanatus*) causado por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* es una enfermedad devastadora de este cultivo y otras cucurbitáceas, debido a que el patógeno se transmite por semilla. Por lo tanto es recomendable emplear semilla libre de la bacteria para evitar su introducción en zonas, regiones o países donde no está presente. Tomando en cuenta todo lo anterior en la presente investigación se utilizaron técnicas de aislamiento, bioquímicas, fisiológicas, ELISA y moleculares para la detección de esta bacteria directa de semilla. Se logró aislar *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* de semillas infectadas y tipificar por pruebas bioquímicas, de patogenicidad y ELISA, logrando la reproducción de síntomas en frutos de sandía, melón y calabaza. También se detectó al patógeno por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) simple directo de semilla, lo cual permitirá un diagnóstico más rápido y sensible con el objeto de evitar la introducción del patógeno al país.

Palabras clave: *Citrullus lanatus*, *Acidovorax*, manchado bacteriano, PCR

SUMMARY

The watermelon fruit blotch (*Citrullus lanatus*) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* is a devastating disease for this crop and other cucurbits. As the pathogen is transmitted by seed it is recommended to utilize seed free of bacterium to avoid its introduction in areas, regions or countries where it is not yet present. In this research isolation, biochemist, ELISA, and molecular techniques were utilized to detect directly this bacterium in the seed. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* bacteria from infected seeds were isolated and they were sorted by biochemist, pathogenesis and ELISA tests, obtaining the reproduction of symptoms in watermelon, melon, and squash. The pathogen was also detected by PCR (Chain Reaction of Polymerase) directly from seeds, permitting a quick and sensitive diagnosis to avoid the introduction of this pathogen in the country.

Key words: *Citrullus lanatus*, *Acidovorax*, fruit blotch, PCR

DETECCION DE *Acidovorax Avenae* subsp. *citrulli* EN SEMILLA DE SANDIA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

I.- Introducción

A nivel mundial la sandía se cultiva en cuatro continentes, apareciendo México en el octavo lugar en producción, en el país existen importantes zonas productoras, en el Pacífico Sur destacan los estados de Oaxaca, Guerrero, Chiapas, así como el Bajío que comprende Guanajuato, Michoacán y Noroeste: Sinaloa, Nayarit, Sonora. Hasta la década de los noventa Sonora contaba con 6, 316 ha, representando el 15% del total nacional; Chihuahua en 1990 contaba con 434 ha, éste ha mostrado un crecimiento impresionante al pasar a 4,179 ha que representa un incremento de 863%; en estos dos estados el cultivo bajo riego abarca casi el 100%; del total nacional el 61.06% corresponden al área de riego y 38.94 a temporal; así como el 61.28% al ciclo Otoño – invierno y 38.72% a Primavera-Verano; Sinaloa representa el 6.6% y 6.3% Tabasco; conformando así un total de 47.2% de la superficie cultivada en nuestro país (SAGAR, reportado por ASERCA 1999).

El cultivo de la sandía es afectado por diversos factores bioclimáticos como son; la temperatura, precipitación pluvial, las plagas y enfermedades.

El manchado bacteriano es una enfermedad devastadora de la sandía (*Citrullus lanatus*), es ocasionada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, dicho patógeno se encuentra alojado en la semilla y es transmitido por la misma, siendo la

fuelle de inóculo primario; los daños más importantes los ocasiona en el fruto, este patógeno tiene un amplio rango de hospedantes en los que se encuentra el melón y otras cucurbitáceas. Reportes en Estados Unidos indican una incidencia de un 50 - 80%, ocasionando pérdidas hasta de un 90% del fruto, ya que disminuye su calidad y cantidad (Hopkins *et al.* 1997).

En la actualidad existen diferentes técnicas para el diagnóstico de bacterias de importancia cuarentenaria, como pruebas de aislamiento, bioquímicas y serológicas presentando desventajas en cuanto a sensibilidad, especificidad y tiempo. El diagnóstico directo de semilla es importante ya que en este caso el patógeno se encuentra alojado en ésta, por lo tanto es el medio más importante de introducción de esta bacteria en áreas libres de la enfermedad para ello se requieren métodos de diagnóstico que se puedan desarrollar en el menor tiempo posible, que ofrezcan mayor sensibilidad y especificidad, para detectar una baja concentración del patógeno en la semilla. En el presente trabajo se aisló e identificó *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* utilizando técnicas de aislamiento, serológicas y moleculares para la detección del patógeno a partir de semilla.

II .- Revisión de literatura

2.1.- Aspectos generales del cultivo de sandía

La sandía es una especie del Viejo Mundo, Mallick y Masui (1986), Jeffrey (1990), Bates y Robinson (1995); citados en ASERCA (1999) indican que la sandía cultivada era originaria de ya que éste es un importante centro secundario de diversificación del género (ASERCA, 1999).

2.1.1. Clima y suelo

La sandía es un cultivo muy sensible a las bajas temperaturas, por lo que requiere de climas calientes con temperaturas óptimas que fluctúen entre 18 y 25°C como se observa en el cuadro 1. Para su establecimiento se recomiendan suelos arenosos, profundos y fértiles; también es sensible a nublados y lluvias prolongadas, el cultivo se ve favorecido por tiempos soleados, secos y con suficiente humedad.

Le favorecen los suelos con un pH ligeramente ácido, que varía entre 5.5 y 6.5, incluso en suelos con pH de 4.5, se pueden lograr producciones de muy buena calidad, al utilizar productos que funcionan como solubles para reducir la tendencia ácida del suelo (ASERCA, 1999). La humedad relativa óptima para la sandía es de 60 % y el 80%, siendo un factor determinante durante la floración. (www.infoagro.com).

Cuadro 1. Temperaturas críticas para sandía en las distintas fases de desarrollo

Helada		0°C
Detención de la vegetación		11-13°C
Germinación	Mínima	15° C
	Optima	25° C
Floración	Optima	18 – 20°C
Desarrollo	Optima	23 – 28°C
Maduración del fruto		23 – 28°C

2.1.2. Descripción botánica

Según Jeffrey (1990); citado en ASERCA(1999), la sandía es una planta que pertenece a las angiospermas; taxonómicamente se encuentra ubicada en la Clase *Dycotiledonae*, Subclase *Dilliniideae*, Super orden *Violanae*, Orden *Cucurbitales*, Familia *Cucurbitaceae*, Subfamilia *Cucurbitoideae*, Tribu *Benincaseae*, Género *Citrullus* y Especie *lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai.(ASERCA,1999).

2.1.3. Variedades e híbridos

Las variedades de sandía generalmente se diferencian por la forma y tamaño de los frutos, ya que el resto de la planta no presenta variaciones notables.

En México hasta 1979 se cultivaban las variedades Jubilee, Pea Cok y Charleston Gay, principalmente (ASERCA, 1999).

Además de éstas se han cultivado otras variedades, como la *Sangría* y *Rayada* entre otras como las variedades sin semilla que han tenido gran éxito en los últimos años. La utilización de semilla mejorada y de variedades que se adapten mejor a la región, es de gran importancia para el productor, ya que en función de condiciones climáticas, tecnología aplicada y precio de la semilla, se elige la variedad que es más conveniente. Los híbridos que actualmente se siembran más son *Sangría*, *Calsweet* y *Royal Jubilee*; en el caso de los frutos triploides o sin semilla, se tienen *Nova*, *Abbot 5244* y *Scarlet Trio*, (Jeffrey, 1990; citado en ASERCA, 1999).

En el caso de la sandía sin semilla, siempre se debe asociar con sandía normal, pues la primera no cuenta con flores masculinas, requiriendo un polinizador intermedio para producir plantas y semillas con la información genética sin semilla. Para ello se utiliza preferentemente el híbrido *Sangía*, que produce abundante polen y frutos ampliamente aceptados en el mercado.

2.1.4. Costo de cultivo

Generalmente los costos de cultivo varían en función de la zona de producción, los costos de insumos y las necesidades de aplicación de estos por las condiciones de suelos, clima, presencia de plagas y enfermedades, utilización de maquinaria o animales para la preparación del terreno y las labores culturales que se practican. Sin embargo, en el caso de la sandía se tiene una variable más, la tecnología aplicada, que en el caso de Jalisco, se cuenta con la que se considera de punta acolchado, riego por goteo, fertirrigación, semilla mejorada, etc. (ASERCA, 1999).

2.1.5. Producción

Sonora es el principal productor de sandía en México, seguido de Chihuahua, Jalisco, Sinaloa y Tabasco. Los principales estados productores sumaron 400 936 toneladas en 1997, lo que representó 56.5% del total nacional.

2.1.6. Plagas y enfermedades

Existe una gran diversidad de plagas y enfermedades que afectan al cultivo de sandía, la presencia de estas depende de diversos factores como son las condiciones agroclimáticas y agnómicas favorables; en el cuadro 2 se presentan las plagas y enfermedades más frecuentes en el cultivo.

([www.infoagro.com.calidad./pro_integada/...ucia._sandia.asp](http://www.infoagro.com/calidad./pro_integada/...ucia._sandia.asp)*)

Cuadro 2. Plagas y enfermedades en el cultivo de sandía

Araña roja	<i>Tetranychus urticae</i> <i>Tetranychus turkestan</i>
Orugas	<i>Spodoptera exigua</i> (Rosquilla verde) <i>Spodoptera littoralis</i> (Rosquilla nega) <i>Helicoverpa armigera</i> (Heliotis) <i>Heliothis peltigera</i> (Heliotis) <i>Autogapha gamma</i> (Plusia) <i>Chrysodeixis chalcites</i> (Plusia)
Trips	<i>Frankliniella occidentalis</i>
Pulgon	<i>Aphis spp.</i> <i>Myzus persicae</i>
Mosca blanca	<i>Trialeurodes vaporariorum</i> <i>Bemisia tabaci</i>
Minador	<i>Liriomyza bryoniae</i> <i>Liriomyza huidobrensis</i> <i>Liriomyza strigata</i> <i>Liriomyza trifolii</i>
Nematodos	<i>Meloidogyne sp.</i>
Manchado bacteriano	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citulli</i>

Pudrición bacteriana	<i>Erwinia sp.</i>
Enfermedades vasculares	<i>Fusarium oxysporum</i>
Anthraxis	<i>Colletotrichum orbiculare</i>
Pudrición	<i>Phytophthora sp.</i>
Oidio	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>
Cancro gomoso del tallo	<i>Didymella bryoniae</i>
MNSV (Virus cribado del melón)	<i>Melón Necrotic Spot Virus</i>
ZYMV (Virus del mosaico amarillo del calabacín)	<i>Zucchini Yellow Mosaic Virus</i>
CMV (Virus del mosaico del pepino)	<i>Cucumber Mosaic Virus</i>
WMV-2 (Virus del mosaico de la sandía 2)	<i>Watermelon Mosaic Virus 2</i>

2.2.- Descripción del patógeno

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* es una bacteria Gram negativa, aeróbica obligada y móvil con un solo flagelo polar, en Agar nutritivo las colonias son blancas, convexas, con una zona traslúcida marginal; estas no florecen en medio B de King. Los síntomas de este patógeno se pueden confundir con los causados por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Sin embargo cuando se aísla el agente causal puede distinguirse fácilmente por la producción de fluoresceína en medio B de King.(Schaad, 1988).

2.2.1. Taxonomía y Nomenclatura.

Anteriormente esta bacteria fué clasificada como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* pero diferían en que ésta es patogénica para la sandía, melón, pepino, limón y naranja (Schaad *et al.* , 1978).

Por lo tanto esta nueva bacteria se nombró *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*, Hu *et al.*, 1991 encontraron una similaridad cercana entre esta bacteria y *Pseudomonas avenae* y de este modo se renombró *Pseudomonas avenae* subsp. *citrulli*. La bacteria de la sandía y otras subespecies de *P. avenae* constituyen una cadena separada de rARN dentro de la familia *Comamonadaceae*.

Comparándolas fenotípicamente, Willems *et al.*, 1992 encontraron que los componentes de esta cadena de rARN están relacionados más cercanamente al género *Acidovorax* y el manchado del fruto de la sandía fué renombrado *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.

2.2.2. Distribución

La bacteria se encuentra distribuida en las zonas productoras de sandía a nivel mundial se localiza en: Alabama, Arkansas, California, Delaware, Florida, Georgia, Indiana, Iowa, Maryland, Mississippi, Missouri, Carolina del Norte, Oklahoma, Oregon, Carolina del Sur y Texas; en Oceanía (Australia) y Asia (Turquía). Es probable que este presente en otras áreas de producción de sandía y melón en el mundo ya que se desconoce el origen geográfico de la bacteria (www.protenet.go.cr/bacterial1.htm).

2.2.3. Rango de Hospederos

Acidovorax avenae subsp. *citrulli*, tiene como principal hospedero a la sandía (*Citrullus lanatus*) y el melón (*Cucumis melo*); sin embargo es importante

destacar que artificialmente puede afectar a todas las Cucurbitáceas. Todas las Cucurbitáceas son susceptibles por inoculación, especialmente en la etapa de plantula (Schaad *et al.*, 1978, Latin y Hopkins, 1995).

2.2.4. Síntomatología

Los síntomas característicos de esta bacteria en sandía son unas pequeñas manchas de color verde olivo que en poco tiempo causan lesiones severas con márgenes irregulares. En pocos días, las lesiones se expanden y cubren la superficie del fruto, en infecciones avanzadas estas manchas se tornan necróticas. Bajo condiciones calurosas y de alta humedad relativa, los síntomas en el follaje y en el fruto se expresan más rápidamente.

La sandía y los melones dulces aparentemente son los más susceptibles, provocándoles síntomas foliares y manchado del fruto (Isakeit *et al.*, 1997). Los síntomas se desarrollan sobre el follaje inoculado de limón, naranja, pepinos y otras Cucurbitáceas, pero no se observan síntomas en el fruto sobre estos hospederos.

El citron (*Citrullus lanatus* var. *citroides*), una maleza común en algunas partes del sureste de Estados Unidos, es también un hospedante para *A. avenae* subsp. *citrulli*. Las infecciones foliares por la bacteria no llegan a ocasionar grandes problemas como la defoliación, sin embargo son un reservorio importante para la infección del fruto, la bacteria invade el fruto através de los estomas iniciando con lesiones pequeñas y acuosas.

En estudios realizados sobre rango de hospederos, se encontró que se reproducen los síntomas en tomate, follaje de pepino, pero no sobre el fruto. Cuando los síntomas iniciales que se presentan de *A. avenae* subsp. *citrulli* en plántulas de sandía aparecen como áreas acuosas en los cotiledones y las hojas, si continúan desarrollándose los síntomas puede ocurrir un colapso y muerte de la planta; como los cotiledones se expanden, las lesiones también tienden a elongarse y a oscurecerse.

Los síntomas en los frutos ocurren mucho después de la infección, son susceptibles a la infección solo durante la floración o formación del fruto invadiéndolo a través de los estomas, las lesiones aparecen en el fruto un poco antes de la maduración y siguen desarrollándose mientras estén unidos a la planta, los frutos maduros sólo pueden ser invadidos a través de las heridas.

Una vez que el patógeno se establece en un cultivo, la bacteria puede sobrevivir en las semillas de frutos infectados dejados en el campo (www.protecnet.go.cr/bacterial1.htm).

2.3. Transmisión del patógeno.

a).- Transmisión por semilla. La semilla es el medio más importante de introducción de la bacteria a viveros y áreas geográficas libres de la enfermedad, sobre todo si existen bajas concentraciones de la misma en la semilla que de por sí es difícil de detectar ya que se encuentra en la testa de la misma, las

bacterias son capaces de incrementarse y diseminarse a otras plantas durante la época de crecimiento del cultivo principalmente cuando se usa el método del trasplante ([www.protecnet.go.cr/bacterial 1.htm](http://www.protecnet.go.cr/bacterial1.htm)).

El brote de manchado bacteriano del fruto de sandía de 1989 en los Estados Unidos aparentemente se inició por semillas contaminadas. Los síntomas de la enfermedad aparecieron en Florida, Carolina del Sur, Carolina del Norte, Maryland, Delaware e Indiana, en tan sólo unos meses (Somodi *et al.*, 1991).

Muchos de los invernaderos y campos con manchado del fruto estaban asociados con un lote de semillas que más tarde demostró estar infectado con *A. avenae* subsp. *citrulli*. Las pruebas de laboratorio y de invernadero habían demostrado transmisión de la bacteria de semillas infestadas por encima del 80%. (Hopkins *et al.*, 1994; Kucharek *et al.*, 1993).

b).- Transmisión mecánica. Esta bacteria también puede transmitirse mecánicamente, una vez que existe la infección se favorece con los daños ocasionados en la manipulación de las plantas al momento del trasplante o al realizar labores de cultivo tales como el deshierbe con instrumentos manuales.

c).- Hospederos Alternos. Los cultivos de Cucurbitáceas o sandías voluntarias son fuentes potenciales del manchado bacteriano del fruto de sandía por lo tanto es importante eliminar Cucurbitáceas silvestres cercanas a los campos de producción; así como también eliminar residuos de cosecha.

2.4. Manejo

2.4.1. Manejo cultural

Las prácticas culturales en el transplante deben incluir una manipulación mínima de las plantas; desinfección de las manos, de los contenedores y herramientas después del contacto con las plantas; cerrando los lados del invernadero durante las tormentas o períodos de ventisca; y destrucción de las plantas infectadas. La expansión de la bacteria en el invernadero puede minimizarse manejando la humedad, temperaturas bajas y un riego adecuado (Hopkins, 1994; Latin *et al.*, 1995).

La irrigación con un aspersor puede favorecer la dispersión por salpicadura de la bacteria en el invernadero. Desinfectar el invernadero y esperar al menos 2–3 semanas para sembrar cucurbitáceas nuevamente. Una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% así como los bactericidas comerciales pueden ser utilizados para la desinfección. La posibilidad de que *A. avenae* subsp. *citrulli* sea introducida al campo desde sandías voluntarias contaminadas puede ser reducida con el uso de arado para eliminarlas, incluyendo sandías recolectadas, de un campo infectado (Hopkins *et al.*, 1997). Las semillas de sandía voluntarias de cultivos previos deben ser destruidas inmediatamente para eliminar fuentes potenciales del manchado bacteriano del fruto, eliminando las Cucurbitáceas silvestres y las Cucurbitáceas voluntarias cercanas a los invernaderos de transplante y los campos de producción. No se debe trabajar en campos infectados si el follaje está húmedo.

2.5. Control químico.

Las aplicaciones de fungicidas que contengan cobre en dosis recomendables han reducido la incidencia de síntomas del manchado bacteriano del fruto cuando las aplicaciones eran iniciadas antes de la etapa de fruto (Hopkins, 1991; Hopkins *et al.*, 1995).

Para reducir la incidencia del patógeno se recomiendan fungicidas que contengan cobre como Manzate 200, Kocide DF y CHAMP 2, en la primera floración y una semana antes de la fructificación, así como evitar el riego por aspersión, evitar el uso de semilla contaminada, emplear bajas temperaturas y baja humedad relativa, una buena estrategia de manejo es el uso de cultivares resistentes (Walcott, 2000, Hopkins, 1997).

Si se observan síntomas del manchado del fruto, las aplicaciones con fungicidas que contengan cobre pueden iniciarse al inicio de la floración de semillas. Las muestras de semillas recolectadas de frutos asintomáticos pueden presentar niveles de infección por encima del 80% (Kucharek *et al.*, 1993).

2.5.1. Tratamiento de semillas

Se han efectuado diversos estudios sobre el control del manchado bacteriano del fruto de sandía con tratamientos de las semillas. Schaad y Sowell (1978) reportaron que empapando las semillas que estaban infestadas con *A. avenae* subsp. *citrulli* en 1 mg/mL de estreptomicina por 16 horas se eliminaba la

infección de las plántulas que crecían de esas semillas. Sin embargo, este tratamiento no ha sido desarrollado como un tratamiento comercial efectivo.

El tratamiento con agua caliente a 50 °C de las semillas infectadas por 20 o 30 minutos mostró que eliminaba la transmisión de las semillas a las plántulas de sandía (Wall, 1988). Estudios realizados, con tratamientos de semillas en 0.525% de NaO_2Cl_4 por 20 minutos, en 1.8% de hipoclorito por 5 minutos y en agua a 50 °C por 20 minutos se ha demostrado que estos reducen significativamente el número de plántulas enfermas desarrolladas de las semillas infestadas, pero ninguno de los tratamientos previene la enfermedad (Rane y Latin, 1992). En un estudio de los tratamientos de las semillas húmedas aplicadas en las semillas cosechadas, la fermentación de las semillas en jugo de sandía y despojos por 24 a 48 horas o tratamiento en 1% de hipoclorito por 15 minutos siempre reducían la transmisión de las semillas a menos de 1% y en la mayoría de las pruebas, se eliminaban (Hopkins *et al*, 1993).

Un tratamiento plus de fermentación por 24 a 48 horas con hipoclorito era más efectivo en la eliminación de la transmisión por las semillas. Estos tratamientos son efectivos sobre semillas de sandía diploides, pero la germinación de semillas triploides se puede reducir con estos tratamientos. Aunque es importante considerar que el uso de estos tratamientos sobre todo de agua caliente puede afectar la viabilidad de la semilla.

2.6. Métodos para la detección de bacterias fitopatógenas

Existen diferentes métodos para la identificación de bacterias fitopatógenas como los métodos de aislamiento que determinan los requerimientos nutrimentales, condiciones físicas del medio que favorecen el desarrollo de una bacteria en particular, en ocasiones los resultados obtenidos son difíciles de interpretar y se requiere de determinado tiempo para completarse. (Rodríguez, 2001).

2.6.1. Aislamiento

Para el aislamiento de bacterias se pueden emplear diferentes técnicas, desde macerado del tejido; punción directa; inmersión del tejido en agua estéril; siembra directa del tejido enfermo; esto de acuerdo al síntoma, órgano afectado, avance de la enfermedad. Entre las principales características de las células bacterianas se encuentran su tamaño, forma, arreglo y estructuras, las cuales constituyen la morfología de la célula en cuanto a la especie en particular, las células individuales pueden ser: *esféricas*, con un diámetro aproximado de 1-2 μ ; otras bacterias más alargadas, son los *bacilos* y pueden observarse muy delgados o gruesos, cortos o largos, y curvos y en virgula, estos organismos también pueden presentar agrupaciones como: bacilos aislados, en pares o cadenas, unidos empalizadas o en manojo y finalmente algunas bacterias son espiraladas, como sucede con los espirilos, espiroquetas y treponemas. Es de gran importancia reconocer estos patrones de formas y arreglos ya que son características del grupo taxonómico (Rodríguez, 1994).

2.6.2. Medios de cultivo

Para el cultivo *in vitro* de bacterias, se requiere de la elaboración de un medio que proporcione todos los requerimientos nutrimentales para su reproducción.

Estos contienen cuatro componentes esenciales: fuentes de carbono, nitrógeno, minerales y vitaminas.

2.6.3. Caracterización

Las pruebas bioquímicas son de gran importancia para la caracterización de las bacterias fitopatógenas, ya que se utilizan sus propias habilidades metabólicas, tales como la producción de enzimas, tolerancia a ciertos compuestos tóxicos y la transformación de ciertos sustratos, oxidación/fermentación.

Como cualquier otro método de caracterización e identificación de bacterias, las pruebas bioquímicas están sujetas a ciertas objeciones, como el hecho de que se pueden producir mutantes que lleven información genética de un fago combinado con el material genético de la bacteria que presenten otras características.

Entre las características más empleadas y confiables figuran, la producción de pigmentos verdes y fluorescentes en el grupo de *Pseudomonas*, producción de pigmentos amarillos insolubles en el agua como es el caso de *Xanthomonas*, y el empleo de una serie de pruebas para la utilización de nitratos, metabolismo de azúcares y de producción de indol con el fin de separar especies de *Agrobacterium* (Schaad, 2001).

2.6.4. Utilización de fuentes de carbono

Para la identificación de bacterias; las fuentes de carbono son uno de los caracteres más empleados donde se toma en cuenta el cambio de pH que provocan en el medio donde se desarrollan, así como la producción de gas a partir de los carbohidratos. Requieren de las fuentes de carbono no solo como constituyente del citoplasma si no también para la obtención de energía proveniente de las reacciones de oxido-reducción involucradas en la degradación las mismas.

Existen medios de cultivo diferentes para determinar la capacidad de la bacteria para utilizar una fuente de carbono determinada (Rodríguez, 2001).

2.6.5. Las fuentes de carbono más utilizadas son:

Monosacáridos: Glucosa y Fructosa y Manosa.

Disacáridos: Sacarosa, Maltosa y Lactosa.

Polisacáridos: Almidón, Pectatos, Lignina, Celulosa y quitina.

Alcoholes: Glicerol, Manitol, Sorbitol, Eritritol y Dulcitol.

Glúcidos: Salicina, Esculina, y metil glucocido.

Lípidos: Aceite de algodón, aceite de ricino, yema de huevo, Tween 20.

(Rodríguez, 2001).

2.6.6. Metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa

Esta es una prueba muy importante para la identificación de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, debido a que son las únicas que tienen la capacidad de oxidar y fermentar la glucosa, aunque los

géneros *Bacillus* y *Clostridium* lo pueden hacer; sin embargo, éstos son Gram positivos. La oxidación de glucosa, ocurre cuando bajo condiciones aeróbicas la bacteria hidroliza este hidrato de carbono y se presenta un cambio de color en el medio (de azul a amarillo).

Mientras que en la fermentación, la glucosa es metabolizada bajo condiciones anaeróbicas, y de igual manera se produce un cambio de coloración de azul a amarillo en el medio de cultivo (Rodríguez, 1994).

2.6.7. Hidrólisis de lípidos

Los lípidos al igual que los carbohidratos son metabolizados por algunas bacterias para la obtención de carbono y energía, através de la producción de ácidos, los cuales podemos detectar por cambios de coloración o por la formación de precipitados, alrededor del crecimiento bacteriano, esta prueba es importante para la separación de especies de bacterias fluorescentes (Rodríguez, 1994).

2.6.8. Fuentes de nitrógeno.

Las bacterias requieren de nitrógeno para la síntesis de componentes celulares y para la obtención de energía. La fuente de nitrógeno generalmente usada son las proteínas, ya sea de origen animal o vegetal.

Durante el metabolismo de las proteínas se forma una gran variedad de productos entre los que se encuentra el amoníaco, ácidos orgánicos, fenol, cresol, indol, bióxido de carbono, ácido sulfhídrico. Sin embargo, la respuesta de los microorganismos depende del tipo de proteínas y del sistema enzimático del organismo. Es por eso que estas pruebas son utilizadas con fines taxonómicos. Las fuentes de nitrógeno que se utilizan son proteínas: gelatina; proteidos: caseína, peptona y aminoácidos (Rodríguez, 2001).

2.6.9. Acumulación de inclusiones de poli β hidroxibutirato

Para detectar las inclusiones de poli β hidroxibutirato, de una manera rápida y sencilla se puede hacer utilizando el medio de cultivo elaborado por Pierce y Schroth (1994); citado por Rodríguez, 2001, y de esa manera no recurrir a la observación microscópica.

2.7. Pruebas de patogenicidad

Para realizar esta prueba es necesario seleccionar un método adecuado de inoculación de acuerdo al hospedante, lo cual dependerá del tipo de síntoma, órgano o tejido afectado y la vía de entrada del patógeno; para tratar de reproducir los síntomas típicos en condiciones de invernadero deben de tomarse en cuenta también las condiciones ambientales que permitan la manifestación de los síntomas en campo. Las pruebas rápidas de patogenicidad es otra forma para demostrar la patogenicidad de una cepa bacteriana, esta prueba incluye reacción de hipersensibilidad, pudrición del tubérculo de papa en donde los resultados se pueden observar en 24 horas de haberse realizado;

inoculación de frutos de peral o manzano en este caso los síntomas se pueden evaluar 3 o 5 días después de la inoculación. Es importante señalar que para realizar estas pruebas es necesario que los cultivos estén puros y no tengan mucho tiempo de haberse sembrado en medio de cultivo ya que pueden perder su patogenicidad.

La penetración de las bacterias a sus hospedantes generalmente es pasiva, esto es a través de heridas o aberturas naturales, por lo que al hacer la inoculación artificial se debe favorecer su penetración; para ello pueden utilizarse los métodos siguientes:

I.- Aspersión

a).- Manual

b).- Por aspersión

II.- Inyección

III.- Punción

IV.- Inmersión en suspensión bacteriana

2.7.1. Aspersión. Esta técnica es recomendada para bacterias que ocasionan manchas foliares o tizones porque penetran principalmente por estomas, también se puede realizar para aquellas bacterias que penetran a través de nectarios o estigmas como el caso de *Erwinia amylovora*, agente causal del tizón de fuego de las rosáceas (Rodríguez, 2001).

2.7.2. Punción.- Método más apropiado para inoculación artificial de bacterias causantes de marchitez o pudriciones blandas, es la punción del tallo o tejidos carnosos de la planta.

Los tallos u órganos se pinchan con una aguja, navaja o palillos sumergidos previamente en una suspensión bacteriana; en el caso de plántulas se hieren en el área entre el cotiledón y la primera hoja verdadera, o en la axila, la suspensión bacteriana también puede ser introducida con una jeringa estéril (Rodríguez, 2001).

Una de las pruebas recomendadas en la literatura para detectar a *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* es la de crecimiento de plántulas bajo condiciones favorables para el desarrollo de síntomas, que consiste en sembrar las semillas en recipientes estériles en condiciones de invernadero el cual éste libre de otras fuentes de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, las plántulas son lavadas por irrigación para promover la enfermedad de las plantas sintomáticas que son fácilmente visibles; la humedad del invernadero se debe mantener por encima de 55% y la temperatura es mantenida entre 24 y 38°C (Hopkins, 1994; Latin et al, 1995). Después de 16 a 21 días cada plántula es inspeccionada para detectar síntomas.

2.7.3.- Reacción de hipersensibilidad

Esta es una prueba muy útil en fitobacteriología, ya que con esta se puede determinar fácil y rápidamente si una bacteria es o no fitopatógena, sobre todo

en bacterias aisladas de muestras con manchas foliares y tizones, aunque algunas que causan pudriciones también pueden dar reacción positiva.

Para *Pseudomonas* del grupo fluorescente es muy útil para separar especies (Rodríguez, 2001). Esta prueba es positiva para el género *Acidovorax*, aunque es importante señalar que en ocasiones la reacción no se presenta en 24 horas esto puede deberse a que la cepa pierde patogenicidad si ha pasado mucho tiempo después de aislarla (Rodríguez, 2001).

2.8 .- ELISA

La prueba de inmunoabsorción con enzimas ligadas o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), es un método confiable y rápido para la detección de agentes fitopatógenos, ya que hace posible la detección de cantidades muy pequeñas de estos agentes en el tejido enfermo.

La sensibilidad de esta prueba es superior a otras pruebas serológicas por lo que ha sido extensamente utilizada para la detección de patógenos en humanos, animales y plantas. El ensayo denominado sandwich de doble anticuerpo (DAS), es la variante más común utilizada de la ELISA, que consiste en la absorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno seguida de la adición de los antígenos o fitopatógenos los cuales reaccionan con los anticuerpos adheridos a la placa; para formar el sandwich se agregan nuevamente anticuerpos ligados con enzimas que se adhieren a los patógenos capturados en la placa, una vez formada la secuencia biológica de

anticuerpo + antígeno + anticuerpo ligrado a una enzima, se adiciona el sustrato el cual es hidrolizado por la enzima dando lugar a un cambio de color de la solución y esto permite determinar los resultados visualmente y cuantificarlos espectrofotométricamente por medio de un lector de placas (Cruz, 1997).

2.9.- Metodos Moleculares

2.9.1.- Hibridación de ácidos nucleicos

Este método se inició a partir de 1961, cuando se descubrió que las hebras complementarias de la doble hélice se volvían a unir después de haber sido separadas por acción de la temperatura (proceso denominado renaturalización del ADN) (Valadez *et al.*, 2000).

Las reacciones de hibridación para la identificación microbiana y propósitos de tipificación pueden ser desarrolladas en uno de tres principales formatos: *in situ*; en solución; o en un medio sólido. La hibridación consiste básicamente en un apareamiento de ADN, esto ocurre al exponer el ADN desnaturalizado en una sonda (un fragmento conocido de ADN) que esta marcada por algún medio, en condiciones controladas pueden ser radiactivas o no radiactivas (digoxigenina, fluoresceína u otro sistema).

Las hibridaciones se dividen en varios grupos, dependiendo del tipo de patógeno (si este contiene ADN o RNA), del tipo de método de extracción (extracto crudo, fino, etc.), y del tipo de soporte en que se realice (nitrocelulosa, nylon, etc.) y de la forma como se detecta (radiactiva o no radioactiva) (Ascencio, 1999).

2.9.2. Técnicas de hibridación *In situ*.

Recientemente han sido usadas principalmente para localizar secuencias de ácidos nucleicos en secciones de tejido dispuestas sobre el microscopio. (Mathews y Kricka, 1988, citado por Towner, 1993).

Sin embargo, la mayoría de los microorganismos son permeables a pequeños oligonucleótidos etiquetados, a continuación una fijación, y por utilización de sondas etiquetadas con tintes fluorescentes, así es posible visualizar organismos particulares directamente por microscopia fluorescente (Giovanni *et al*, 1988; De Long *et al.*, 1989; Amman *et al*, 1989; citados por Towner, 1993).

La hibridación debe ser desarrollada en una cámara sellada para prevenir pérdidas de solución de hibridación por evaporación; como las pérdidas resultantes cuando se ligan las sondas fluorescentes a las células.

La temperatura de hibridación depende de cada oligonucleótido específico, y debe ser optimizado empíricamente. Después de la hibridación, las capas pueden ser visualizadas inmediatamente o almacenadas en la oscuridad por más de 6 meses. Si la sonda es específica para un ARNr, la sensibilidad se incrementa considerablemente debido a que generalmente hay miles de ARNr por célula.

2.9.3. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP's)

Generalmente los RFLP's sirven como marcadores moleculares que se han utilizado para construir mapas genéticos con selección asistida por marcadores, para la clonación de genes basados en mapas para la identificación de cultivares, así como para taxonomía o filogenética.

El grado de polimorfismo detectado por RFLPs difiere ampliamente entre las especies de plantas dependiendo de la sonda utilizada; las sondas que se utilizan para RFLP's se obtienen de fragmentos de ADN nuclear u organelos así como de secuencias transcritas como ADN complementario o ADN copia (Valadez *et al.*, 2000).

Los RFLP's están basados en las variaciones de la secuencia del genoma, el cual es detectado por cambios en los sitios de restricción, proporcionando fragmentos de ADN nuclear u organelos, (cloroplastos y mitocondrias en eucariontes) de diferente tamaño (Coddington y Gould, 1992; Campos, 1995; citado por Silva 2000), estos fragmentos son obtenidos con el uso de endonucleasas de restricción que cortan el ADN en sitios específicos, permitiendo detectar alelos y genes en genomas diferentes. Los RFLP's inicialmente fueron detectados usando hibridación con ADN después de la separación y digestión del ADN genómico por medio de electroforesis (análisis Southern), en la actualidad son detectados por electroforesis o digestión de productos de PCR, la diferencia en la longitud del ADN es debido a la presencia

o ausencia de sitios de reconocimiento, en particular por enzimas de restricción (<http://www.fao.org/biotech/gloss/rhtm>).

2.9.4. Amplificación aleatoria de polimorfismo del ADN (RAPD's)

Esta técnica identifica polimorfismos que son detectados como fragmentos de ADN amplificados mediante PCR, suelen ser como iniciadores oligonucleótidos cortos, de alrededor de diez bases con secuencias arbitrarias y se utilizan bajas temperaturas de apareamiento. Para cada iniciador utilizado, se obtiene un patrón de bandas que pueden estar o no presentes en los diferentes aislados de una misma especie. Como el número de iniciadores a ensayar virtualmente ilimitado, se puede obtener gran cantidad de información que permite caracterizar gran parte del genoma.

Cada banda de RAPD's representa un marcador genético (un alelo específico en un determinado locus) y la ausencia de la banda en una cepa se interpreta como variación en dicho alelo. Esta técnica permite tener determinadas cepas marcadas por su patrón de RAPD's y también agruparlas por sus características genéticas, en correspondencia o no con otro tipo de clasificaciones (Llácer *et al.*, 1996).

La base molecular de la variabilidad detectada mediante RAPD's se debe a las adiciones o eliminaciones de ADN existente entre los sitios reconocidos por los iniciadores así como a variaciones en la secuencia de bases del sitio de unión del iniciador (Hernández, 1999).

2.9.5. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de ADN amplificados (AFLP's)

Esta técnica se basa en la amplificación de fragmentos de restricción de ADN, producidos por enzimas diferentes una de corte poco frecuente (EcoRI) y otra de corte frecuente (MseI). Al producto de esta digestión se ligan secuencias de doble cadena de ADN conocidas como adaptadores.

Estos productos sirven como ADN blanco para posteriores amplificaciones, la secuencia adaptador sitio de restricción servirá para que se unan los iniciadores selectivos que se extienden hacia dentro de los fragmentos de restricción, uno de estos iniciadores se encuentran marcados con fluorescencia, de esta manera solo un subgrupo de fragmentos de restricción serán amplificados y visualizados, para separar estos fragmentos es por medio electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes, generando así los patrones de bandas (Vos *et al.*, 1995 citado por Ruíz, 1999).

Los adaptadores e iniciadores específicos que se utilizan tienen las siguientes características: dependiendo de las bases selectivas de los iniciadores, las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa difieren; los genomas complejos generalmente involucran dos etapas de amplificación, la primera la preamplificación se realiza con iniciadores que tienen una sola base selectiva, la segunda con iniciadores de 2 o 3 bases, dicho proceso termina con la separación de los fragmentos amplificados en un gel de acrilamida en donde las bandas que se observan son potencialmente polimórficas (Ruíz, 1999).

2.9.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica fue descrita por Kary Mullis en 1985; citado por Henry (1997) desde entonces ha revolucionado en las ciencias biológicas, actualmente es una de las técnicas básicas en biología molecular más usada como herramienta indispensable en proyectos de mapeo genómico y secuenciación; así como su aplicación en la identificación de genotipos de plantas, amplificación de un genotipo específico (Henry, 1997).

La reacción en cadena de la polimerasa puede describirse como una reacción enzimática en la cual una región específica del ADN es sintetizada *in vitro*. La PCR debe su elevada sensibilidad a este enorme poder de amplificación ya que si en una muestra se dispone de pocas copias de la secuencia específica de la bacteria problema, mediante sucesivos ciclos de amplificación, se podrá llegar a disponer en la muestra o extracto de suficiente ADN como para ser visualizado, incluso en presencia de grandes cantidades de ADN de la planta o de otros microorganismos.

El fragmento amplificado resultante se detecta visualmente mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, mediante métodos colorimétricos o por hibridación (Lláceret *al.*, 1996; Leyva, 2001).

Los pasos de cada ciclo están determinados por la temperatura y los tiempos específicos durante la desnaturalización (92-98°C), alineamiento (35-60°C), extensión o polimerización de la cadena (70-74°C).

Este proceso se repite de 25 a 50 veces, logándose una acumulación exponencial del fragmento de ADN de interés. El uso de PCR ha aumentado rápidamente en patología de plantas, así como en otras disciplinas con la introducción en 1988 de *Thermus aquaticus* (Taq) ADN polimerasa, esta técnica presenta grandes ventajas con los métodos tradicionales de diagnóstico, ya que los organismos no necesitan ser cultivados antes de ser detectados por PCR por la sensibilidad de la misma puede ser usada en diagnóstico, para detectar genomas o antígenos de microorganismos que son escasos o difíciles de cultivar e identificar una vez cultivados o patógenos de semillas (Henson y French. 1993; Leyva, 2001; Smith, 1996).

2.9.7. Uso de la PCR para la detección e identificación de bacterias fitopatógenas

Las ventajas en la aplicación de esta técnica para la detección e identificación de bacterias fitopatógenas se refieren a su enorme sensibilidad potencial y a la especificidad que se obtiene si los iniciadores han sido bien diseñados. Los principales inconvenientes que se observan en la utilización rutinaria de la misma son relativos a las dificultades de extracción del ADN bacteriano a partir del material vegetal y las inhibiciones de la ADN polimerasa en presencia de éste. Además es necesario señalar que relativamente su elevado costo en la actualidad, los frecuentes problemas de contaminaciones que dan lugar a falsos positivos y la necesidad de disponer de laboratorios adaptados a la exigencias de esta técnica como realizar las distintas etapas en distintos espacios.

Todo ello no favorece su utilización en el diagnóstico rutinario de un elevado número de muestras. A pesar de estos inconvenientes, que parecen normales porque la PCR aún está en los comienzos de su desarrollo, esta técnica no parece tener muchos límites para su utilización.

Permite ser utilizada incluso para la detección de bacterias no cultivables si se puede purificar su ADN o ARN, clonarlo, secuenciarlo o diseñarlo y diseñar iniciadores específicos a partir de dichas secuencias. La limitación más importante en su actual uso para detección estriba en que es necesario conocer ciertas secuencias de nucleótidos del genoma de la bacteria problema para poder diseñar iniciadores específicos. Las ventajas de las técnicas moleculares para el diagnóstico de bacterias fitopatógenas se resumen en su sensibilidad y especificidad. La más sensible es la PCR que teóricamente permite detectar una sola secuencia específica en una muestra (Henry, 1997).

La especificidad de estas técnicas depende como es lógico de las secuencias seleccionadas de las sondas o los iniciadores. Además la técnica de PCR puede ser combinada con enriquecimiento previo, amplificación biológica en medio apropiado inmunocaptura con anticuerpos específicos, o revelado serológico de los productos amplificados (Llácer *et al.*, 1996).

La IC-PCR (Inmuno-PCR) es una prueba que tiene una adaptación viable de adopción en casos en donde existen problemas de amplificación del producto de PCR, utilizando anticuerpos específicos para determinado patógeno, de esa

manera podemos capturar al patógeno de interés y en combinación con la PCR utilizando iniciadores específicos para generar los fragmentos del peso molecular esperado (Henry, 1997).

2.9.8. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para determinar la cantidad de ADN/ARN, la lectura debe hacerse a determinadas longitudes de onda; a 260 nm que permite el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra de la manera siguiente:

Concentración de ADN ($\mu\text{g/mL}$) = $[\text{DO}_{260} \times 100 (\text{factor de dilución}) \times 50 \mu\text{g/mL}] / 1000$. Una $\text{DO} = 1$ corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN de doble cadena, 40 $\mu\text{g/mL}$ del ADN de cadena sencilla y de ARN, 20 $\mu\text{g/mL}$ de oligonucleótidos de cadena sencilla.

La relación entre la lectura de absorbancia a 260 y 280 nm aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos, para que el ADN o ARN se consideren puros los valores deben estar entre 1.8 a 2.0 con $\text{DO} (260/280)$, pero si hay contaminación por proteínas o fenol los valores pueden ser diferentes significativamente, por ello es conveniente realizar una medición a 230 nm, debido a que a esta absorbancia se localiza, la absorbancia mínima de ácidos nucleicos y nucleótidos y la máxima absorbancia de enlaces peptídicos pero sobre todo nos indica la contaminación por proteínas o amortiguador u otras sales se absorben a esta longitud de onda. En el caso de ARN debe ser mayor de dos, pero si esta es menor la contaminación puede deberse a la presencia de tiocinato de guanidina (Valadez *et al.*, 2000).

III.- Material y Métodos.

3.1. Semillas utilizadas

Para aislar la bacteria se utilizó semilla de sandía infestada procedente de Estados Unidos, estas semillas fueron desinfectadas en hipoclorito al 1% durante un minuto y agua estéril, posteriormente se sembraron directamente en medio PDA (anexo 1), B de king (Anexo 2) y se incubaron a 28° C durante una semana. Se trabajo también con las cepas de referencia 9421, 9448, 9487, donadas por el Dr. Ron Walcott de la Universidad de Georgia.

3.2. Crecimiento en diferentes medios de cultivo

De las cepas utilizadas se preparó una suspensión bacteriana 1×10^{-6} de la cuál con una asa bacteriológica se tomó una gota y se sembró por estría cruzada sobre cajas de Petri conteniendo medio mEBB (anexo 3), medio PDA y B de King, posteriormente estas se mantuvieron en la incubadora por 15 días a 28°C, después se procedió a purificar los aislamientos (Schaad, 2001).

3.3. Identificación

Para identificar a *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, una vez aislada la bacteria se realizaron las pruebas correspondientes en base a la literatura:

Medio B de king

Acumulación de poly β - hydroxybutyrato

Fuentes de carbono

Actividad lipolítica

Reacción de hipersensibilidad

Pruebas de patogenicidad

En el medio B de king (Anexo 2) se sembró la bacteria por estría cruzada, se incubó a 28°C y después de 24 horas se observó si las colonias eran o no fluorescentes (Schaad, 2001). Para acumulación de β -hidroxibutirato se utilizó el medio NB (anexo 4), y en el medio Tween para actividad lipolítica (anexo 5).

3.4. Pruebas de patogenicidad

Se inocularon plantas de sandía, melón, calabaza y tabaco a los ocho días después de la emergencia, empleando 10 plantas por cultivo con una suspensión bacteriana de 1×10^{-6} UFC/mL por el método de punción, estas se mantuvieron en condiciones de invernadero con temperaturas que oscilaron entre 20 y 28°C, las observaciones se realizaron a partir del tercer día para evaluar la presencia o ausencia de manchas foliares en las plantas inoculadas.

3.5. Inoculación en fruto de sandía, melón y calabaza

Se preparó una suspensión bacteriana de 1×10^{-6} UFC/mL de la cual se tomó con una jeringa y aguja estéril para inocular dos frutos y un testigo por cultivo, estos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito al 1% y agua estéril; posteriormente se inocularon por el método de punción y capilaridad, los testigos fueron inoculados con agua estéril, finalmente se cubrieron con bolsas de plástico durante 48 h para incrementar la temperatura y humedad relativa, estos se mantuvieron en condiciones de invernadero en cámara húmeda, las observaciones se realizaron a partir de 24 h para detectar la presencia del manchado bacteriano.

3.6. Caracterización fenotípica

3.6.1. Determinación de fluorescencia: La bacteria se sembró directamente en cajas de Petri con medio B de King, estas se colocaron en la incubadora a 28°C durante 48 h, después de este tiempo se colocaron en un transluminador de luz ultravioleta para observar la presencia o ausencia de colonias con pigmentación fluorescente.

3.6.2. Actividad lipolítica: Se preparó el medio de cultivo Tween (Anexo 5), una vez solidificado se tomó con una asa bacteriológica una gota de solución bacteriana la cual se sembró por la técnica de punción, las cajas se incubaron por una semana a una temperatura de 28°C, las observaciones se iniciaron a partir del tercer día para observar la presencia o ausencia de colonias de color blanco con apariencia mucoide rodeadas por un halo.

3.6.3. Acumulación de poli β – hidroxibutirato: Para esta prueba se utilizó el medio de cultivo NB descrito por Schaad (2001), se tomó de la cepa correspondiente con una asa y se sembraron 10 cajas de Petri, se mantuvieron en incubación a 28°C, después de 48 horas se observó colocándolas en un transluminador de luz ultravioleta.

3.6.4. Utilización de fuentes de carbono: En esta prueba se utilizó un medio como base con pH 7.2 (anexo 6) al cual se le agregó por filtración azúcares y alcoholes, este medio se colocó en tubos de ensaye, se evaluaron arabinosa, glucosa, tirosina, etanol, propanol. Los tubos se incubaron a 28°C y después

de cinco días se empezaron a evaluar para observar si existía cambio alguno (Schaad, 2001).

3.7. Técnica de ELISA

▪ Cobertura de la placa

En una placa de microtitulación se seleccionaron determinado número de pozos esto en base al número de muestras, se utilizó el anticuerpo específico marca Agdia para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* este se disolvió en buffer de cobertura con pH 9.6 (Anexo 7) la dilución se hizo en relación 1:200, después con una micropipeta y puntas estériles se coloraron 100 µl por pozo a excepción del blanco.

Cada muestra con su respectivo duplicado, así como también los controles positivo y negativo.

▪ Incubación

La placa se cubrió con una tapa y se incubó por toda la noche a 4°C.

▪ Lavado

Este se realizó con una lavadora de placas automática marca **TECAN** que contenía buffer PBST (Anexo 7), para esto se colocó la placa y se lavó seis veces para eliminar los restos del anticuerpo primario no adherido a la placa.

▪ Adición de la muestra

Se prepararon 300 µl de solución bacteriana en un tubo de microcentrifuga utilizando buffer de extracción con un pH 7.4 (Anexo 7), todo esto bajo condiciones asépticas se mezcló bien y se agregaron 100 µl por pozo. El control

positivo se diluyó en 300 µl de buffer de extracción, para el control negativo solo se adicionó semilla sana.

En el caso de muestras de semilla, se peso un gramo de está, se lavaron tres veces con agua estéril luego se colocaron en un tubo de ensaye que contenía buffer de extracción, se maceró y de esta mezcla se colocaron 100 µl por pozo.

▪ **Incubación**

La placa cubierta con una placa se incubó por dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

▪ **Lavado**

Nuevamente se repitió el proceso de lavado descrito anteriormente para eliminar los restos de muestra que pudieran haber quedado adheridos en la placa.

▪ **Conjugado**

Se preparó el conjugado (anticuerpo + enzima) diluyendo en relación 1:200 en buffer de conjugado con pH 7.4 (Anexo 7), adicionando 100 µl por pozo.

▪ **Incubación**

Se cubrió nuevamente la placa y se incubó por dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

▪ **Lavado**

En este paso se repitió el mismo procedimiento antes descrito.

▪ **Revelado (adición del sustrato)**

Se preparó una dilución de p-Nitrofenil fosfato (sigma) en buffer PNP (Anexo 7), en 15 mL de buffer se diluyó una tableta de 15 mg y se agregó 100 µl por cada pozo incluyendo al blanco; la placa se cubrió con la tapa y se incubó a

temperatura ambiente en cámara húmeda durante 15 minutos, posteriormente en un lector de ELISA marca BIO-RAD se realizó la lectura con una absorbancia de 405 nm, con una referencia de 415 nm.

3.8. Métodos de extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando los siguientes protocolos, Plan ADNzol Reagent, Nucleo Spin Plant y CTAB, para ello se utilizaron cepas bacterianas puras las cuales fueron sembradas en el medio mEBB específico para *Acidovorax avenae* subsp.*citulli* así como también se hizo de semilla de sandía.

3.8.1. Método de extracción Plan ADNzol Reagent

Se peso y pulverizó 0.1g de semilla y se colocó en un mortero a menos setenta grados para congelar la muestra; posteriormente se maceró y se transfirió en un tubo de microcentrifuga con 0.3 mL de Plan ADNzol, se mezcló en vortex hasta obtener una solución, se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos en agitación, después se adicionaron 0.3 mL de cloroformo se mezcló vigorosamente nuevamente se incubó en agitación durante cinco minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo se agregaron 0.250 mL de etanol absoluto se mezcló 8 veces por inversión; se volvió a incubar cinco minutos, y se centrifugó cuatro minutos a 5000 rpm la pastilla que se obtuvo se lavó con etanol al 70% y se centrifugó por 4 minutos a 5000 rpm, una vez seca la pastilla se disolvió en agua deionizada estéril.

3.8.2. Método de extracción Nucleo Spin Plant

Se pesó 0.1g de semilla de sandía, esta se colocó en un mortero frío (-70°C) y se maceró, se transfirió el resultado a un tubo de microcentrifuga limpio y se adicionaron 300 µl de buffer C₁ más 20 µl de RNasa para eliminar proteínas y ARN. Se incubó a 65°C por 30 minutos y se centrifugó la mezcla por 10 minutos a 10,000 rpm. Después se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se adicionaron 300 µl del buffer C₄ y 200 µl de etanol y se mezcló en vortex durante 30 segundos. La mezcla obtenida se colocó en un tubo de centrifuga de 2 mL de Nucleo Spin Plant y se centrifugó durante 60 segundos a 13 000 rpm y se descartó el sobrenadante, para remover los contaminantes se adicionaron 500 µl del buffer CW al tubo de Nucleo Spin Plant nuevamente se centrifugó 60 seg, a 13 000 rpm y se descartó el sobrenadante y se adicionó 500 µl de buffer C₅ al tubo de Nucleo Spin Plant y se *centrifugó* durante 60 seg, a 13 000 rpm, se descartó el sobrenadante y el tubo de Nucleo Spin Plant se *centrifugó* para remover el buffer C₅. (Este paso se repitió nuevamente). Posteriormente se adicionó al tubo de Nucleo Spin Plant 100 µl del buffer CE y se centrifugó durante 60 segundos a 13 000 rpm y finalmente se transfirió el contenido a un tubo eppendorf de 1.5 mL.

3.8.3. Método de extracción CTAB

Se maceró 0.2 g de material vegetal (semilla) y en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL que contenía 1 mL de solución CTAB y 10 mL de SBA, se adicionó el macerado y se incubó a 60°C durante 30 minutos, agitándose ocasionalmente, posteriormente se agregó un volumen de cloroformo – fenol y se centrifugó a

8000 rpm durante 10 minutos, la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se adicionó un volumen de alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos este paso se repitió nuevamente y se adicionaron 0.8 volúmenes de isopropanol por tubo (almacenado con anterioridad a -20°C), estos se dejaron toda la noche a 4°C , posteriormente se obtuvo el ADN centrifugando a 8000 rpm por 30 minutos, se descartó el isopropanol y se adicionó 0.5 mL de etanol al 70% se lavó la pastilla centrifugando a 8 000 rpm por 10 minutos, una vez eliminado el etanol la pastilla se dejó secar durante 15 minutos en la estufa a 60°C , finalmente ésta se disolvió en 100 μL de agua estéril.

3.8.4. Calidad del ADN por electroforesis

Para determinar la calidad del ADN se preparó un gel de agarosa al 0.8%; se pesó 0.24 g de agarosa y se disolvió en 30 mL de TAE 1X (Anexo 8) se calentó hasta que la agarosa estuviera completamente disuelta, se dejó enfriar sin que solidificara y luego se le agregó bromuro de etidio, se colocó en un portageles que contenía un peine para formar los carriles y se colocó en la cámara de electroforesis cubriendolo con buffer, posteriormente por cada pozo se depositaron 5 μL de ADN más 5 μL de amortiguador de carga, además se utilizó 2 μL de marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen life technologies*).

Finalmente las muestras se corrieron a 80 voltios por 20 minutos, después de este tiempo el gel se colocó en el transluminador de luz UV para observar la presencia de bandas bien definidas y de alto peso molecular.

3.8.5. Cuantificación y pureza de ADN

Para la cuantificación del ADN se determinó por medio de un espectrofotómetro spectronic marca *helio β*, y se ajustó a 260 nm de absorbancia; se calibró colocando en una celda agua destilada y posteriormente se tomó la lectura de cada muestra de ADN y de esa manera se obtuvo la concentración en ng/μL, para ello en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL se preparó una dilución 1:500 tomando 2μL de ADN y 998 μL de agua destilada estéril, esta se colocó en la celdilla de cuarzo del espectrofotómetro, se leyó a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm; una vez obtenida la lectura se hicieron los cálculos correspondientes para saber la cantidad y pureza del ADN.

3.8.6. Estandarización de las condiciones de PCR

En este estudio para lograr estandarizar las condiciones ideales de PCR, primeramente se hizo por medio de Inmuno- PCR através de inmunocaptura que consistió en sensibilizar una placa con anticuerpo primario específico para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, esta se incubó durante toda la noche a 4°C, se lavó con buffer y se adicionó la muestra utilizando los controles positivos para ELISA específicos para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Adgia), se incubó por dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda, ya transcurrido este tiempo nuevamente se lavó la placa seis veces para realizar la inmunocaptura que consistió en calentar agua hasta que esta hirviera y se colocaron 15 μL de agua destilada estéril caliente por cada pozo y la placa se cubrió con parafilm y colocándola sobre el vaso con agua caliente durante cinco

minutos, después de este tiempo se removió el agua que se agregó por pozo y se colocó en tubos de microcentrifuga de 0.2 mL y se guardaron a 4°C. Este procedimiento de inmunocaptura también se realizó sustituyendo el anticuerpo primario por el anticuerpo secundario; así como también se hizo utilizando en vez de control positivo muestras de semilla de sandía.

3.8.7. Inmuno-PCR y PCR

Cada reacción fue preparada en tubos de microcentrifuga nuevos y estériles con capacidad de 0.2 mL, las cantidades y concentración de los siguientes reactivos utilizados: buffers 10X (Promega), DNTP's(Promega), MgCl₂ (Promega), Taq polimerasa (Promega), Primers, las indicadas por Walcott, 2000. Los Primers utilizados fueron WFB1 (5'GAC CAG CCA CAC TGG GAC 3') y WFB2 (5' CTG CCG TAC TCC AGC GAT 3') específicos para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Sigma Genosys) estas secuencias amplifican una segmento de 360 pb (Walcott, 2000). El volumen final para cada reacción fue de 50 µl (5 µl de buffers 10x (Promega), 10 mM desoxiribonucleotidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 25mM de cloruro de Magnesio (Promega), 10pm de cada uno de los iniciadores WFB1 2 µl y WFB2 2 µl, Taq polimerasa 5U/µl (Promega), 3 µl producto de inmunocaptura ó ADN de semilla de sandía, la reacción se completo a 50µl con agua bidestilada estéril (GIBCO BRL); y finalmente se adicionaron dos gotas de aceite por cada reacción. Los tubos se colocaron en un termociclador *Lab line* en el cuál se creó un proGrama con las siguientes condiciones: una temperatura inicial de 95°C durante 10 minutos, desnaturalización 95°C por 30 segundos, seguido con 35 ciclos cada uno a

95°C por 30 segundos, anillamiento 55°C por 30 segundos, extensión 72°C por 30 segundos y finalmente 72°C durante 5 minutos.

Después de haber probado la inmuno-PCR, se prepararon reacciones con un volumen final de 50 µL solo que en este caso fue PCR simple directo tanto de ADN de bacteria como de semilla de sandía utilizando los mismos reactivos, concentraciones y cantidades así como las mismas condiciones de amplificación utilizadas para Inmuno- PCR. En el cuadro 3 se presentan las cantidades de los reactivos utilizados para inmuno - PCR y PCR simple.

Cuadro 3. Reactivos utilizados para IC-PCR y PCR

Buffers 10x	DNTP's (200mM/ µL)	MgCl 1.5mM	WFB1 20 pm	WFB2 20 pm	Taq polimerasa 5U/ µL	*IC/ADN 50 ng	Agua
5 µl	1µl	3 µl	2 µl	2 µl	0.5 µl	*3 µl	33.5 µl
5 µl	1 µl	4 µl	2 µl	2 µl	0.5 µl	*5 µl	31.5 µl
5 µl	1 µl	3 µl	2 µl	2 µl	0.5 µl	1 µl	35.5 µl
5 µl	1 µl	3 µl	2 µl	2 µl	0.5 µl	3 µl	33.5 µl
5 µl	1 µl	4 µl	2 µl	2 µl	0.5 µl	5 µl	31.5 µl
5 µl	1µl	4 µl	2 µl	2 µl	0.5 µl	5 µl	31.5 µl

**Producto de Inmunocaptura (IC)*

IV.- Resultados y discusión

Las pruebas de aislamiento, bioquímicas, de patogenicidad y ELISA permitieron aislar y caracterizar a *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Características Fisiológicas y Bioquímicas de las cepas de estudio comparadas con las reportadas para el género *Acidovorax* y la subsp. *citrulli*.

PRUEBA	CARACTERÍSTICAS		FISIOLÓGICAS Y	BIOQUÍMICAS
	Características reportadas para el Género <i>Acidovorax</i>	Características reportadas para <i>A. a.</i> subsp. <i>citrulli</i>	Cepas aisladas	Cepas de Referencia
Gram	-	-	-	-
Crecimiento anaerobico	-	-	-	-
Crecimiento a 41°C	+		+	+
L – Arabinosa	+	ND	+	+
L – Tirosina	+	ND	+	+
D – Glucosa	+	ND	+	+
Etanol	+	ND	+	+
Propanol	+	ND	+	+
Colonias mucoides en YDC a 30°C	+	ND	+	+
Fluorescencia	-	-	-	-
Acumulación de poli β- hidroxibutirato	+	+	+	+
Actividad lipolítica	+	+	+	+
Patogenicidad en:				
Sandía				
Melón	+	+	+	+
Calabaza	+	+	+	+
Fruto de. Sandía	+	+	+	+
Melón	+		+	+
Calabaza	+		+	+
	+		+	+
Hipersensibilidad en Tabaco	ND	ND	+	+

Las cepas aisladas crecieron a temperatura de 28°C y 41°C, como fuentes de carbono utilizaron arabinosa, glucosa, tirosina. En el medio Tween se observó la presencia de un halo (precipitado) que rodeaba a las colonias bacterianas.

Además tanto las cepas aisladas como las de referencia dieron positivas en cuanto a la reacción de hipersensibilidad en tabaco, Schaad (2001) indica que la prueba es positiva a nivel de género; se logró reproducir síntomas en fruto de sandía, melón y calabaza lo que permitió comprobar la patogenicidad de las cepas que se utilizaron como control positivo, estas pruebas pueden servir como modelo de pruebas rápidas de patogenicidad para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; Schaad (2001) reporta la reproducción de síntomas en plántulas de sandía y otras Cucurbitaceas pero no así en frutos de las mismas.

Schaad 2001 reporta la reproducción de síntomas en plántulas de sandía y otras Cucurbitaceas pero no así en frutos de las mismas; sin embargo es importante señalar que estos resultados constituyen un primer reporte de reproducción de síntomas en frutos inoculados de sandía, melón y calabaza bajo condiciones de invernadero lo que permitió comprobar la patogenicidad de las cepas bacterianas utilizadas como control positivo además se pueden considerar como modelo de pruebas rápidas de patogenicidad para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.

Acidovorax avenae subsp. *citrulli* según Walcott 2000, no da respuesta de hipersensibilidad en tabaco aunque hay que considerar que esto se puede deber a la diversidad existente entre los catorce haplotipos que el hace referencia en su estudio.

4.1. Serología

Los resultados de esta prueba tanto para las cepas utilizadas y muestras de semilla utilizadas fueron positivas en los dos casos, ya que al hacer la lectura en el lector de ELISA con una absorbancia de 405nm el valor del positivo concentrado fue de 0.523, positivo diluido 0.306, negativo 0.009; para la muestra de cepa 0.110 y para semilla 0.210 por lo tanto se considera como positiva ya que estos valores son mayores en relación al negativo; lo cual indicó la presencia del patógeno (ANEXO 9), estas cepas y muestras de semilla fueron utilizadas para realizar la extracción de ADN.

4.2.- Caracterización molecular

4.2.1.- Extracción y cuantificación de ADN

El método de extracción de ADN CTAB (Doyle and Doyle, 1987) resultó ser el mejor para las muestras de semilla utilizadas para la extracción con este método se logró obtener ADN de buena calidad para utilizarlo en la amplificación de PCR como indica Walcott, 2000; en cuanto a la cuantificación al realizar las lecturas por medio del espectrofotómetro se obtuvo buena cantidad y pureza del ADN con valores de 1.7 a 2; en la figura 1 podemos observar la integridad del ADN.

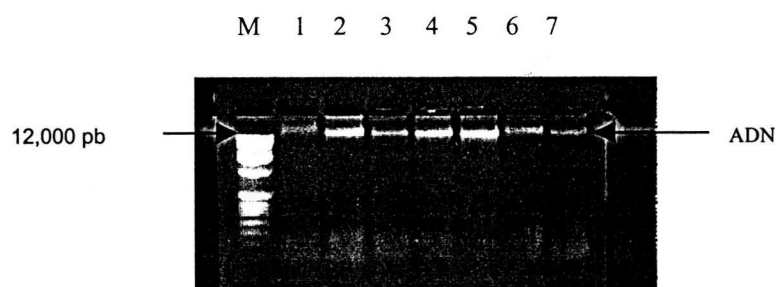


Figura 1. Gel de Agarosa al 0.8% mostrando la integridad del ADN obtenido por el método CTAB

Con el método de extracción Plan ADNzol para el caso de bacteria y cotiledón también mostró buenos resultados al obtener buena cantidad y calidad de ADN, como se observa en la figura 2 y 3.

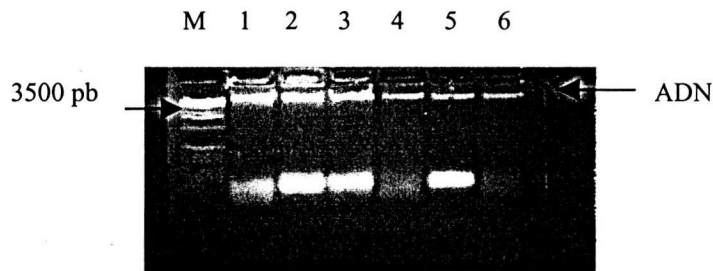


Figura 2. Gel de Agarosa al 0.8% mostrando la calidad del ADN obtenido de bacteria con el protocolo Plan ADNzol.

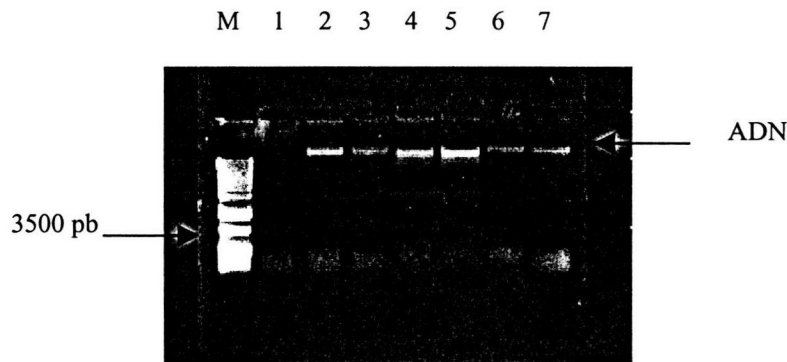


Figura 3. Gel de Agarosa al 0.8% mostrando la calidad del ADN generado apartir de cotiledón por el método Plan DNAzol

4.2.2. Estandarización de las condiciones de Inmuno - PCR y PCR

En el siguiente cuadro se muestra las cantidades óptimas de los reactivos para IC-PCR y PCR, estas fueron las mejores para la amplificación, de esa manera se logró obtener la banda bién definida del peso molecular esperado de 360 pb, como se observa en la figura 4.

Cuadro 5. Cantidades óptimas de reactivos para Ic-PCR y PCR

Reactivos		Volume en μL
Buffers	1x	5
DNTP's	200 μM	1
MgCl	1.5 μM	3
WFB1	20 pm/ μl	2
WFB2	20 pm/ μl	2
Taq polimerasa	5U/ μl	0.5
IC/ADN	50ng	3
Agua		33.5

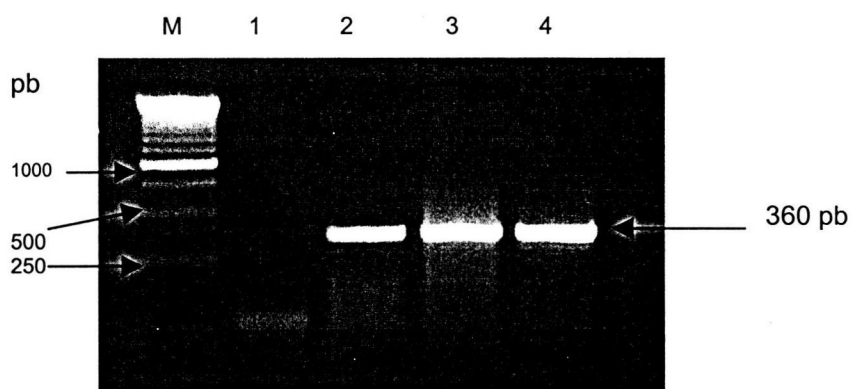


Figura 4. Gel de Agarosa al 2% mostrando las cantidades y condiciones óptimas de amplificación que se presentan en el cuadro 4, M: marcador molecular, 1 Control (-), 2 (control positivo), 3 y 4 ADN bacteria.

En la figura 5 podemos observar la amplificación con las cantidades de reactivos mencionados en el cuadro 3. En el carril dos se observa una banda bien definida de 360 pb producto de Inmuno-PCR donde se utilizó la inmunocaptura del control positivo de Adgia específico para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, en el carril tres se observa que realizando PCR-nested se puede generar una banda del mismo peso molecular solo que más marcada utilizando los mismos iniciadores y las mismas condiciones de amplificación.

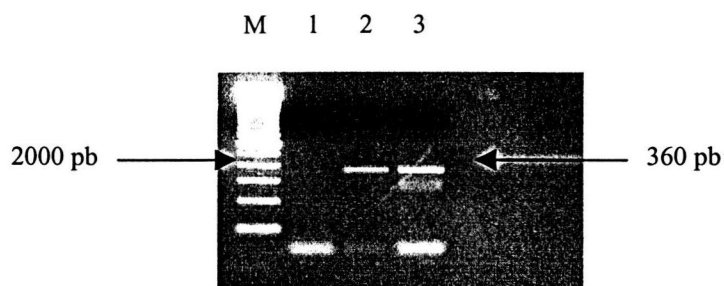


Figura 5. Gel de Agarosa al 2%, mostrando la amplificación por inmuno-PCR y PCR nested.

En cuanto al Inmuno-PCR que se hizo através de Inmunocaptura utilizando muestras de semilla, también se logró generar bandas de 360 pb como se muestra en la figura 6; es importante señalar que estas muestras fueron procesadas através de la técnica de ELISA en donde de acuerdo a las lecturas obtenidas se consideran como negativas.

Sin embargo por Inmuno-PCR si hubo amplificación por lo tanto está técnica es elemental como herramienta de diagnóstico ya que por su alta sensibilidad nos permite amplificar una secuencia blanco a partir de ADN obtenido utilizando un método de extracción no muy sofisticado, además solo se requiere una cantidad muy pequeña de ADN y así detectar al patógeno de interés como en este caso a *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* aunque este se encuentre en mínimas cantidades en las muestras analizadas.

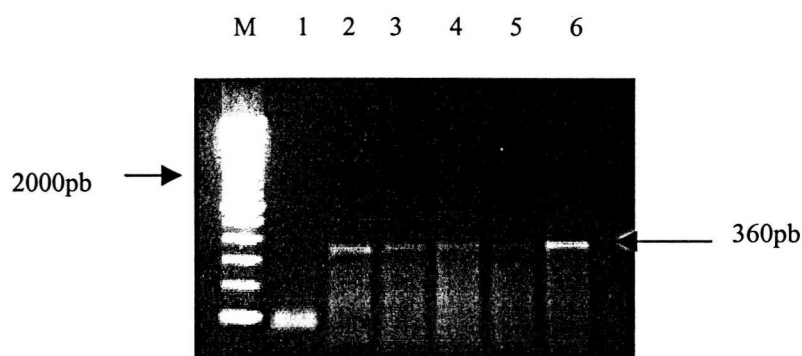


Figura 6. Gel de Agarosa al 2% mostrando la amplificación utilizando muestras de semilla de sandía através de Inmuno-PCR, M marcador molecular de 100 pb, 1 (-), 2 (+), 3,4,5 y 6 muestras de semilla de sandía.

También se realizó PCR simple utilizando directamente ADN de semilla de sandía, plántula y bacteria donde también se logó generar la banda del peso molecular esperado de 360 pb para *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* como se observa en la figura 7 utilizando los mismos iniciadores y condiciones de amplificación utilizadas para Inmuno-PCR.

Es importante señalar que usando ADN de bacteria se generan fragmentos bien definidos en comparación con los que se detectan con ADN total de semilla(incluyendo ADN de bacteria), aunque en este caso puede ser porque la bacteria se encuentra en cantidades pequeñas o aún existe presencia de inhibidores de la misma (Figura 8).

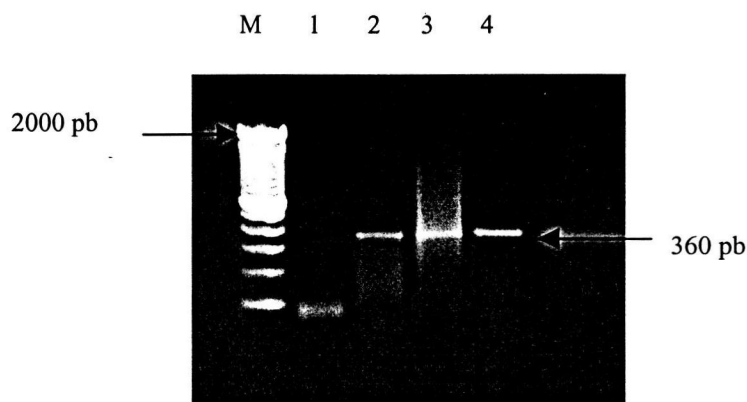


Figura 7. Gel de Agarosa al 2% mostrando amplificación usando ADN de semilla através de PCR simple, generando bandas de 360 pb. M: marcador de 100 pb, 1 (-), 2 (+), 3 muestra de semilla 1, 4 muestra 2.

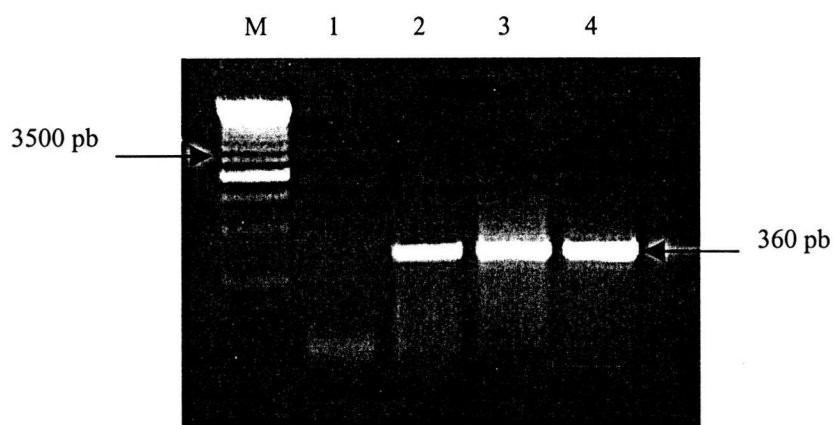


Figura 8. Gel de Agarosa al 2 % donde se observa que utilizando ADN de bacteria se generan bandas bien definidas, M. marcador molecular 250 pb, 1 (-), 2 (+), 3 y 4 ADN de bacteria

Además podemos lograr amplificar aunque al momento de observar la integridad del ADN como en este caso que al realizar la extracción de ADN de bacteria por medio del método CTAB en el gel no se logra apreciar muy bien en el carril 5 como se presenta en la figura 9, en comparación con los demás carriles que corresponden al ADN de plántula.

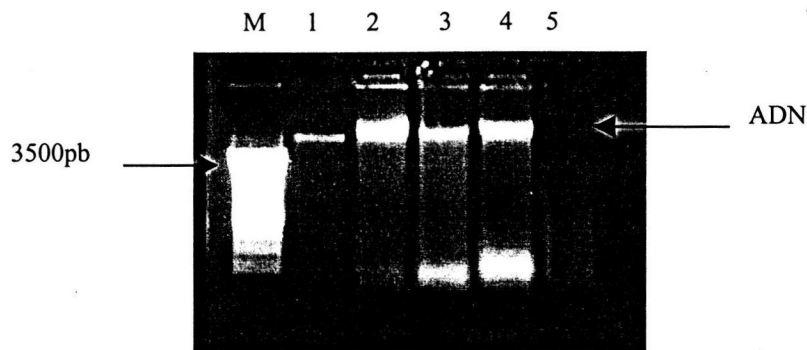


Figura 9. Gel de Agarosa al 0.8% mostrando la cantidad de ADN por el método CTAB, MP: marcador de peso molecular 250 pb; 1, 2, 3, 4 ADN de plántula; 5 ADN bacteria.

Sin embargo es importante señalar que con el ADN obtenido de bacteria por el método CTAB se obtuvo muy buenos resultados de amplificación generando la banda del peso molecular esperado como se observa en la figura 10.

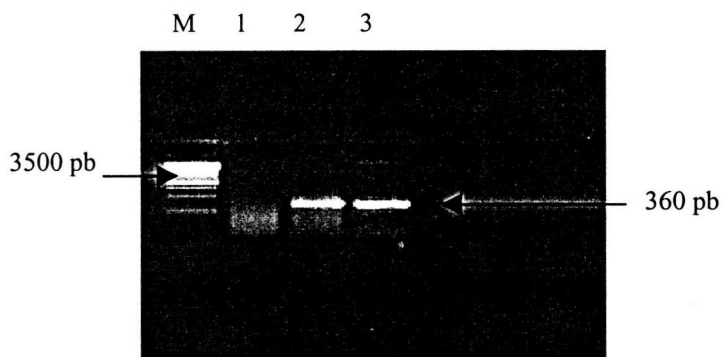


Figura 10. Gel de Agarosa al 2% mostrando la amplificación de ADN de bacteria por el método CTAB, MP: marcador de peso molecular 250pb; 1 control negativo; 2 ADN bacteria sin diluir; 3 ADN bacteria dilución 1:50 generando una banda bien definida.

Finalmente podemos observar en la figura 11 que utilizando concentraciones menores de cloruro de magnesio (2 μ L) y 0.2 μ L de Taq polimerasa se logra obtener bandas bien definidas.

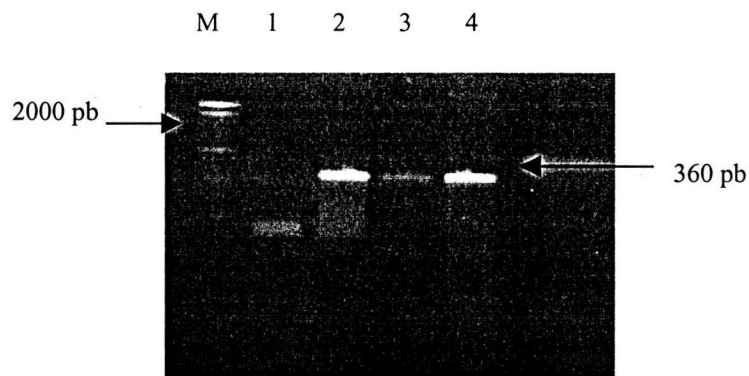


Figura 11. Gel de Agarosa al 2 % mostrando amplificación de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* utilizando 0.2 μ L de Taq polimerasa y 2 μ L de MgCl, M: marcador molecular de 100 pb.

Walcott (2000) ha logrado detectar a *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* directo de semilla por medio de separación inmunomagnética así como también Rodríguez Herrera *et al.*, (2001) a través de inmuno-PCR ha logrado detectar a este patógeno, sin embargo es importante resaltar que este es el primer reporte de detección directa de semilla sin el uso de separación inmunomagnética e inmunocaptura reduciendo costos, tiempo e incrementando sensibilidad lo cuál representa un avance en el diagnóstico de este patógeno siendo de interés cuarentenario para México.

V.- CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

- Se logró reproducir los síntomas de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en frutos de sandía, melón, calabaza, lo que permitió comprobar la patogenicidad de las cepas utilizadas.
- Las cepas de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* utilizadas si ocasionan la reacción de hipersensibilidad en tabaco.
- Las muestras de semilla de sandía que fueron negativas con la técnica de ELISA a través de Inmuno-PCR resultaron positivas por la alta sensibilidad que ofrece esta técnica.
- Para la extracción de ADN los mejores resultados se obtuvieron con el método CTAB en el caso de semilla y PlanDNAzol para bacteria.
- Se logró detectar *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* por medio de Inmuno-PCR y PCR simple a partir de semilla, plántula y cepa; modificando el tiempo inicial y la temperatura de anillamiento .

VI.- Bibliografía

- Ascencio, I., J. 1999. Hibridación molecular como herramienta de diagnóstico. *In* Memorias: Detección e identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenaria mediante técnicas moleculares. DGSV-CNRF. México. D. F.
- ASERCA. 1999. El Cultivo de Sandía en: Claridades Agopecuarias, #75. Edit. Abriendo surcos. México.
- Cruz, F. M., y Frías, T. G. 1997. Guía ilustrada de inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. DGSV. México.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. Arapid ADN isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Henrry, J. R. 1997. *Practical Applications of Plant Molecular Biology*. London. 5ª edición .Editorial Chapman & Hall.
- Henson, M. and French R. 1993 *The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease Diagnosis*. *Annual Review. Phytopathology* . Vol 31: 81-109.
- Hernández, J. C. 1999. Caracterización de bacterias fitopatógenas causantes de pudriciones blandas del nopal (*Opuntia* spp.) en algunas regiones de México. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo. Edo. de México.
- Hopkins, D. L. 1991. Control of bacterial fruit blotch of watermelon with cupric hydroxide. (Abstr.) *Phytopathology*, 81:1228.

- Hopkins, D. L., Thompson C, M., Elmstron G. W. 1993. Resistance of watermelon seedlings and fruit to the fruit blotch bacterium. HortScience: 28(2): 122-123; 10 ref.

- Hopkins, D. L. 1994. Spread of bacterial blotch of watermelon in the geenhouse. Phytopathology: 84:775.

- Hopkins, D. L., Stall. R., Kucharek T., Gay, D., Giatis, R., Cook, W., Kienath, A., and Latin, R. 1995. B. University of Florida , Gainesville; University of Georgia, Athens; Clemson University, Clemson, SC; and Purdue University, West Lafayette, IN.

- Hopkings, D., Stall. R., Latin R y Rusihing J. 1997. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon. Citrus Vegetable Magazine. February.

- Hopkins, D. L. 1997. Effect of seed contamination level on final incidence of bacterial fruit blotch of direct-seeded watermelon. Phytopathology, 87-S44.

- Hu F, P., Young, J M., Triggs, C. 1991. Numerical analysis and determinative tests for nonfluorescent plant-pathogenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and reclassification of species related to *Pseudomonas avenae* Manns 1909. International Journal of Systematic Bacteriology, 41(4):516-525.

- Isakeit T, Black., M, C., Barnes L, W., Jones J, B. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae subsp. Citrulli*. Plant Disease Rep. 81:694.

- Klement Z., Rudolph K. 1990. Methods in Phytobacteriology. Akaddemiai Kiadó, Budapest.

- Kucharek, T., Perez, Y., and Hodge, C. 1993. Transmission of the watermelon fruit blotch bacterium from infested seed to seedlings. (Abstr.) *Phytopathology*: 83 (4):466.

- Latin, R. X., Tikhonova, I, Rane., K. K. 1995. Factors affecting the survival and spread of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon transplant facilities. *Phytopathology*: 85:1413-1417.

- Latin R, X., Hopkins D, L., 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon. The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Disease Rep.* 79(8):761-765;27 ref.

- Leyva, L. N. 2001. La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR): aspectos básicos y sus diferentes modalidades. Curso: Fitopatología molecular. DGSV. México.

- Llácer, G., M, M. López., A, Trapero. 1996. "Patología Vegetal". Edit. Sociedad Española de Fitopatología, España. p. p 695.

- Minsavage, G. V., Hoover, R. J., Kucharek, T. A., Stall, R. E., 1995. Detection of the watermelon fruit blotch pathogen on seeds with the polymerase chain reaction. *Phytopathology*. (Abstr.) 85:1162.

- Rodríguez, H. R., Castillo, R. F., L, V., Ramirez, R. E., Hernández, C. D., Flores, D. M. 2001. Detección de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* en semillas de sandía usando Inmuno-PCR *In*: Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Fitopatología. 15-18 julio. Querétaro, Qro. México. F-155.

- Rodríguez, M. 1994. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. UACH. Chapingo Edo de México.

- Rodríguez, M. 2001. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas. UACH. Chapingo Edo de México.

- Ruíz, J. D. 1999. Marcadores genéticos moleculares aplicados en el fitomejoramiento. En Memorias: Curso detección e identificación de fitopatógenos de importancia cuarentenaria mediante técnicas moleculares. DGSV-CNRF. México. D. F.

- Sowell G Jr., Schaad N, W., Goth, R. W., Colwell, R. R., Webb, R. E. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. Citrulli subsp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, 28(1):117-125.

- Schaad, N. W. 1988 "Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria". 2a. edición. Edit. APS Press. Estados Unidos.

- Schaad, N., Jones, J. B. 2001. "Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria". 3a. edición. Edit. APS Press. St. Paul Minnesota.

- Silva, R. H. 2000. Caracterización de Bacterias Fitopatógenas Causantes de Manchas Foliares en el Cultivo de Frijol. *Phaseolus vulgaris* en México. C.P. Montesillos Texcoco Edo. de México.

- Smith, E. J. 1996. Biotechnology. 3ª edición. University Cambridge.

- Somodi, G. C., Jones, J. B., Hopkins, D. L., Stall, R. E., Kucharek, T. A., Hodge, N. C., Watterson, J. C. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Disease: 75:1053-1056.

- Towner, K. J. 1993. Molecular Methods for Microbial Identification and Typing. 5ª edición; London; Editorial; Chapman & Hall.

- Valadez, M. E., Kahl Gunter. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas. Mundi-Prensa . México S.A de C.V.

- Wall, G. C., and Santos V, M. 1988. A new bacterial disease on watermelons in the Mariana Islands. (Abstr.) Phytopathology. 78:1605.

- Walcott, R. R. 2000. Investigating Intraspecific Variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Using ADN Fingerprinting and Whole Cell Fatty Acid Analysis. Phytopathology. 90:191-196.

- Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., Ley, J. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. International Journal of Systematic Bacteriology, 42(1):107-119.

- [www.protecnet.go.cr/bacterial 1.htm](http://www.protecnet.go.cr/bacterial1.htm))

- (www.infoagro.com)

- <http://www.fao.org/biotech/gloss/rhtm>

- [www.infoagro.com.calidad./pro_integada/...ucia._sandia.asp*](http://www.infoagro.com/calidad/pro_integada/...ucia._sandia.asp)

VII.- ANEXOS

1.- Medio PDA

Papa dextrosa agar (Sigma)	19.5 g
Agua	500 mL

2.- Medio B de King

Proteosa peptona	10 g
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0.75 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.75 g
Agar	7.5 g
Glicerol	15 mL
Agua	500 mL

3.- Medio selectivo mEEB

NH ₄ H ₂ PO ₄	1.3 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
K ₂ HPO ₄	0.15 g
KCl	0.1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1g
Extracto de levadura	0.15 g
Acido bórico	0.25 g
Purpura de bromocresol (15mg/mL)	0.3 mL

Azul brillante R (10mg/mL)	0.5 mL
Agua	500 mL

4.- Medio NB

NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5 g
KCl	0.1g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
DL- β hidroxibutirato	2.5 g
Proteosa peptona	10 g
Sol 1% de azul de nilo	0.5 mL
NaOH 1N	2.25 mL
Agar	8.75 g
Agua	500 mL

* Ajustar pH 7.0, adicionar por filtración 100mL de glucosa 20%. (Schaad, 2001)

5.- Medio Tween

Peptona	5g
NaCl	2.5 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.05 g
Tween 80	5 m
	7.5 g
Agua	500 mL

- Ajustar pH 7.4 (Rodríguez, 2001)

6.- Fuentes de carbono

NH ₄ H ₂ PO ₄	0.5g
KCl	0.1g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1g
Azul de bromotimol (1.6% v/v en 95 % etanol)	1mL
Agar	6 g
Agua destilada	500 mL

*Ajustar pH 7.2 y adicionar por filtración 0.1% w/v de la fuente a utilizar. (Schaad, 2001)

Nota: Todos los medios se esterilizan a 121°C por 15 minutos a menos que se indique lo contrario.

7.- Buffers de ELISA

- Buffer de cobertura

Carbonato de sodio	1.59 g
Bicarbonato de sodio	2.9 g
Azida de sodio	0.2 g
Agua destilada	1000 mL

*Ajustar pH 9.6 y almacenar a 4°C

- Buffer de extracción

Sulfito de sodio	1.3 g
Polyvinylpyrrolidona (PVP)	20.0 g
Azida de sodio	0.2 g
Albumina de huevo	2.0 g
Tween – 20	20.0 g

Agua destilada	1000 mL
----------------	---------

* Ajustar pH 7.4 y almacenar a 4°C

- **Buffer de lavado**

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato de sodio (dibásico)	1.15 g
Fosfato de potasio monobásico	0.2 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Tween – 20	0.5 g
Agua destilada	1000 mL

- Ajusta pH 7.4 y almacenar a 4°C

Buffer de conjugado

Albumina de bovino	2.0 g
Polyvinylpyrrolidona (PVP)	20 g
Azida de sodio	0.2 g
Agua destilada	0.2 g

- Ajusta pH 7.4 y almacenar a 4°C

- **Buffer de revelado**

Diethanolamina	97.0 mL
Azida de sodio	0.2 g
Agua destilada	800 mL

- Ajusta pH 9.8 y almacenar a 4°C

8.- Soluciones para extracción de ADN

- Cloroformo.
- Etanol absoluto; y etanol al 70%.
- CTAB (1.4M NaCl, 0.02M EDTA, 0.1M Tris-HCl Ph 8.0, 2g CETAB/100mL).
- SBA (0.2mg/mL).
- Fenol-cloroformo (fenol, 0.5 g de 8-hidroxiquinoleína, 480mL cloroformo, 20 mL de alcohol isoamilico, 125mL tris HCl pH 7.4).
- Isopropanol
- Alcohol isoamílico (24:1)
- TE (Tris-HCl 10Mm, EDTA 1mM)
- Agua estéril
- Solución de corrimiento (Loading blue 0.25% bromofenol blue), 0.25% Xilencyanol, 30% glicerol en agua.
- Buffer TAE, 40mM Tris base, pH 7.8, 20mM acetato de sodio y 2mM EDTA

9.- Resultados de la técnica de ELISA

	1	2	3	4	5	6	7
A	-0.001		0.110		0.210		0.001
B							
C	0.523		0.210		0.408		0.168
D							
E	0.306				0.206		
F							
G	0.009				-0.011		

Blanco: 1A, 5A.

Control positivo concentrado: 1C, 5C.

Control positivo diluido: 1E, 5E.

Negativo: 1G, 5G.

Muestra semilla: 3A, 7A.

Muestra de bacteria: 3C, 7C

IMPRESA ANHER

IMPRESIONES & ENCUADERNACIONES

FRAY PEDRO DE GANTE No. 118-D
TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

BIBLIOTECA CENTRAL U. A. CH.

