



UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA
MAESTRIA EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

SINDROME Y ETIOLOGIA DEL DECAIMIENTO DEL
NISPERO JAPONES (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

T E S I S

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

P R E S E N T A:

MANUEL ORRANTIA ORRANTIA

DX8679S
-153074

CHAPINGO, MEXICO 1996.



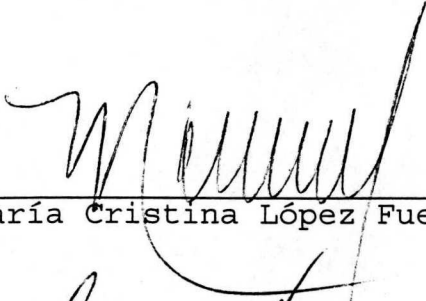
Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Comité Asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

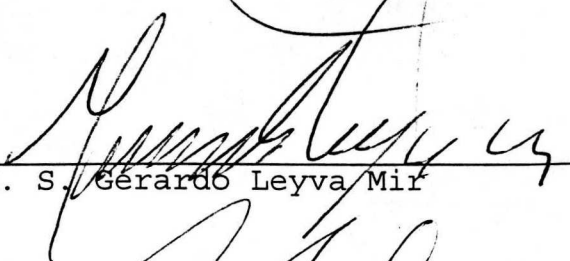
EN

PROTECCION VEGETAL

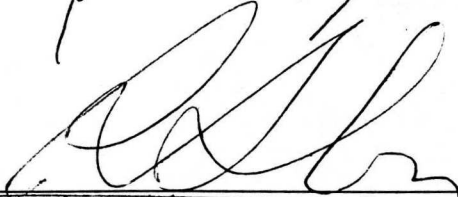
DIRECTOR


Dra. María Cristina López Fuentes

ASESOR


M.C. S. Gerardo Leyva Mir

ASESOR

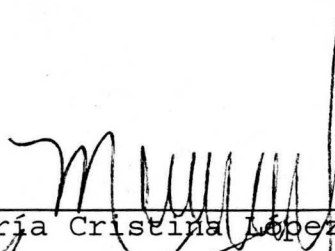

Dr. Sebastián Romero Cova

A. 3/2/7

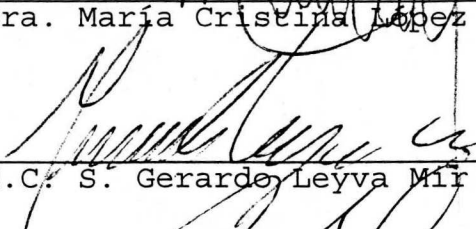
Chapingo, México, diciembre de 1996.

El jurado del examen de grado de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

PRESIDENTE


Dra. María Cristina López Fuentes

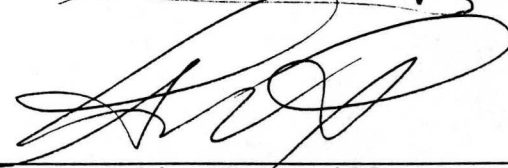
SECRETARIO


M.C. S. Gerardo Leyva Mir

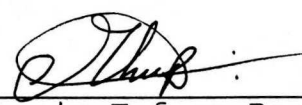
VOCAL


Dr. Sebastián Romero Cova

REPRESENTANTE DE LA
COORDINACION GENERAL DE
ESTUDIOS DE POSTGRADO
DE LA UACH.


M.C. Calixto Carrillo Fonseca

REPRESENTANTE DE LA
COORDINACION DE POSTGRADO
EN PROTECCION VEGETAL


M.C. José Antonio Tafoya Razo

Cada uno de los cuales revisó y aprobó la tesis presentada.

Chapingo, México, diciembre de 1996.

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater la Universidad Autónoma Chapingo y especialmente al Departamento de Parasitología Agrícola, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y por las facilidades otorgadas para lograr realizar la presente investigación.

A la Dra. María Cristina López Fuentes, por su excelente dirección del presente trabajo, permanente apoyo y oportunas sugerencias brindadas.

Al M.C. S. Gerardo Leyva Mir, Dr. Sebastián Romero Cova, M.C. Calixto Carrillo Fonseca y M.C. José Antonio Tafoya Razo por su acertada revisión y valiosas observaciones al presente trabajo.

Al Dr. Sebastián Romero Cova, por su sabiduría compartida, invaluable consejos, constante apoyo y amistad brindada.

Al Lic. José Leonides Rosas García, por su valiosa colaboración durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Señora Sofía Trujano López por su reconocida aportación en la captura de los primeros borradores.

Al M.C. Felicitos Larios Luna, por su desinteresado y valioso apoyo en la captura del documento final.

A todas las personas e instituciones que de alguna manera contribuyeron en la realización y culminación del presente trabajo.

DEDICATORIA

Al Creador, por tantas oportunidades que me ha brindado para reivindicarme.

A mis padres: Francisca y Manuel, con amor y gratitud, por su ejemplo y apoyo brindado durante toda mi vida.

A mis abuelos: María⁺, José⁺, Zenona⁺ y Alejandro⁺, con eterno y cariñoso recuerdo por su amor, ternura y calor familiar con que siempre me rodearon.

A mis hermanos: José, María Auxiliadora, Martha Olga, Beatriz⁺, Jesús, Carlos Alberto, Ana Beatriz y Francisco Javier, por su apoyo y unión familiar, porque siempre luchan por su superación personal.

A mis tíos, primos y familiares, con profundo agradecimiento, por hacer siempre más grata mi existencia.

Al Rancho San Miguel de los Orrantia, Sinaloa y sus habitantes con aprecio, primer estímulo en mi vocación profesional.

A mi primo Pay con afecto, un hermano más en mi existencia.

A mi esposa Ana María con amor, por su cariño, apoyo, comprensión y estímulo.

A mis hijos: Manuel Alejandro, Raúl Gerardo y Mariana Arlette con amor, fuente inagotable de inspiración, energía, motivación y deseos de superación personal.

A mis maestros, por sus valiosas enseñanzas, sabios consejos y amistad brindada.

A mis compañeros y amigos de maestría: María del Carmen Sánchez Gálvez, Olga Gómez Rodríguez, Leonel García García y Victor Manuel Díaz Vicente, por el ambiente de compañerismo, momentos compartidos y gratos recuerdos.

A todos aquellos que luchan y se esfuerzan por la superación y bienestar del ser humano y su medio ambiente.

*“Solo se ve bien con el corazón. Lo esencial
es invisible para los ojos”*

EL PRINCIPITO
(Antoine De Saint-Exupéry)

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1. Ubicación taxonómica del níspero japonés.....	3
2.2. Origen y distribución del níspero japonés.....	3
2.3. Descripción botánica del níspero japonés.....	4
2.4. Importancia y usos del níspero japonés.....	5
2.5. Plagas y enfermedades del níspero japonés.....	6
2.5.1. Plagas.....	6
2.5.2. Enfermedades.....	7
3. MATERIALES Y METODOS.....	9
3.1. Obtención del material enfermo.....	9
3.2. Aislamiento y purificación de microorganismos aislados.....	9
3.3. Pruebas de patogenicidad.....	10
3.3.1. Inoculación en plantas sanas de níspero....	10
3.3.2. Reacción de hipersensibilidad en tabaco....	10
3.3.3. Pudrición de tubérculos de papa.....	11
3.4. Pruebas bioquímicas y fisiológicas para la caracterización e identificación del patógeno.....	11
3.4.1. Características de las colonias bacterianas	11
3.4.1. 1. Tinción de Gram.....	11
3.4.1. 2. Tinción de flagelos.....	12
3.4.1. 3. Fluorescencia.....	12
3.4.2. Características bioquímicas y fisiológicas.	12
3.4.2. 1. Fermentación y/u oxidación de la glucosa.....	12
3.4.2. 2. Licuefacción de gelatina.....	13
3.4.2. 3. Producción de oxidasa.....	13
3.4.2. 4. Dehidrolasa de arginina.....	13
3.4.2. 5. Reducción de nitratos a nitritos.	13
3.4.2. 6. Crecimiento a 41°C.....	14
3.4.2. 7. Producción de 2-cetogluconato....	14
3.4.2. 8. Licuefacción de pectatos.....	14
3.4.2. 9. Hidrólisis de la esculina.....	14
3.4.2.10. Acido de sucrosa.....	15
3.4.2.11. Producción de ácido a partir de carbohidratos.....	15

4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	16
4.1. Obtención del material enfermo y observación de la sintomatología de la enfermedad.....	16
4.2. Aislamiento y purificación de microorganismos aislados.....	16
4.3. Pruebas de patogenicidad.....	18
4.3.1. Inoculación en plantas sanas de níspero....	18
4.3.2. Reacción de hipersensibilidad en tabaco....	18
4.3.3. Pudrición de tubérculos de papa.....	18
4.4. Pruebas bioquímicas y fisiológicas para la características e identificación del patógeno....	18
4.4.1. Características de la colonia bacteriana...	18
4.4.1.1. Tinción de Gram.....	20
4.4.1.2. Tinción de flagelos.....	20
4.4.1.3. Fluorescencia.....	20
4.4.2. Características bioquímicas y fisiológicas.	20
4.4.2.1. Fermentación y/u oxidación de la glucosa.....	20
4.4.2.2. Licuefacción de gelatina.....	20
4.4.2.3. Producción de oxidasa.....	23
4.4.2.4. Dehidrolasa de arginina.....	23
4.4.2.5. Reducción de nitratos a nitritos..	23
4.4.2.6. Crecimiento a 41°C.....	23
4.4.2.7. Producción 2-cetogluconato.....	23
4.4.2.8. Licuefacción de pectatos.....	24
4.4.2.9. Hidrolisis de la esculina.....	24
4.4.2.10. Acido de sucrosa.....	24
4.4.2.11. Producción de ácido a partir de carbohidratos.....	24
4.5. Caracterización e identificación de las bacterias.	25
5. CONCLUSIONES.....	28
6. BIBLIOGRAFIA.....	29
7. APENDICE.....	36

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro No.		Pág.
1.	Resultados de las pruebas realizadas para la cepa No. 1. aislada de níspero japonés.....	21
2.	Resultados de las pruebas realizadas para la cepa No. 2. aislada de níspero japonés.....	22
3.	Resultados de las pruebas realizadas para la cepa No. 1. aislada de níspero japonés comparadas con las de <i>Pseudomonas syringae</i>	26
4.	Resultados de las pruebas realizadas para la cepa No. 2 aislada de níspero japonés comparadas con las de <i>Pseudomonas viridiflava</i> ..	27
Figura No.		
1.	Sintomatología de la enfermedad a nivel de campo: decaimiento progresivo y muerte parcial del árbol.....	17
2.	Sintomatología de la enfermedad a nivel de campo: necrosis cortical en ramas y formación de canchros.....	17
3.	Sintomatología de la enfermedad a nivel de campo: marchitez y hundimiento de tejidos necrosados y presencia de exudados bacterianos	19
4.	Prueba de patogenicidad: Inoculación en plantas sanas de níspero japonés.....	19

RESUMEN

En virtud de que por primera vez se reporta en algunos estados de la República Mexicana donde se cultiva níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lindl.) la presencia de una enfermedad denominada decaimiento del níspero, se realizó el presente estudio en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo con la finalidad de observar la sintomatología característica de esta enfermedad y aislar, caracterizar e identificar al agente causal.

Se colectó material enfermo y se llevó al laboratorio de Bacteriología, donde se efectuaron los aislamientos y la purificación de las colonias bacterianas desarrolladas. Posteriormente se procedió a la realización de las pruebas de patogenicidad en plantas sanas de níspero, reacción de hipersensibilidad en tabaco y pudrición de tubérculos de papa. Enseguida se realizaron las pruebas bioquímicas y fisiológicas para la caracterización e identificación del patógeno: tinción de gram, tinción de flagelos, fluorescencia, fermentación y/u oxidación de la glucosa, licuefacción de gelatina, producción de oxidasa, dehidrolasa de arginina, reducción de nitratos a nitritos, crecimiento a 41°C, producción de 2-cetogluconato, producción de ácido a partir de carbohidratos, licuefacción de pectatos, hidrólisis de la esculina y ácido de sucrosa.

En el desarrollo del presente estudio se obtuvieron los siguientes resultados.

En base a las pruebas de patogenicidad realizadas, la enfermedad denominada decaimiento del níspero japonés resulto ser de origen bacterial.

La sintomatología clásica de esta enfermedad bacteriana se caracteriza por una necrosis cortical en los troncos y ramas y formación posterior de un cancro, lo cual ocasiona un decaimiento progresivo del árbol. La marchitez de los tejidos necrosados y su hundimiento conducen a la formación de una placa fácilmente desprendible. El floema y una pequeña parte del xilema son afectados y es característica una exudación bacteriana.

Tomando como base las pruebas de patogenicidad, bioquímicas y fisiológicas, así como la sintomatología del hospedante y la información proporcionada por la literatura, la cepa bacteriana No. 1 fue identificada como *Pseudomonas syringae*, y la cepa No. 2 como *Pseudomonas viridiflava*.

SUMMARY

In various locations of Mexico, where loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) is cultivated, a disease commonly called "loquat decline" has been causing severe damages to this fruit tree. So, in order to apply adequate control measures the present research work was undertaken in the Department of Parasitology, University of Chapingo trying to reproduce and describe the characteristic syndrome of the disease, and to isolate, characterize and identify the causal agent. For this purpose, diseased material was collected and brought to the laboratory where isolations and purification of the isolated organisms were made. Since only two different bacteria came out of the diseased material they were purified and submitted to pathogenicity tests on healthy plants; simultaneously they were inoculated on tobacco and potato tubers to observe hypersensitivity reaction and tuber rot, respectively. Next, biochemical and physiological tests were run in order to characterize the bacteria. They were: Gram's staining, flagella staining, fluorescence, fermentation and/or glucose oxidation, gelatine liquefaction, oxidase production, arginine dehydrase, nitrates to nitrites reduction, growth at 41°C, 2-ketogluconate production, acid production from carbohydrates, pectates liquefaction, esculine hydrolysis, and acid production from sucrose.

Since the pathogenicity tests were positive it may be concluded that the "loquat decline" disease, in Mexico, is of bacterial origin.

The characteristic syndrome of the disease may be described as follows: cortical necrosis on the trunk and branches, which develops into a real canker, causing a progressive decline of the tree. Necrosis and sinking of the affected tissues lead to the formation of an easily detachable plate. Phloem and part of the xylem are affected, and is characteristic a bacterial exudate.

According to the pathogenicity, biochemical and physiological tests, as well as to the syndrome of the disease and reports in the literature, the bacterial strain No. 1 corresponds to *Pseudomonas syringae*, and the strain No. 2 to *Pseudomonas viridiflava*.

I. INTRODUCCION

No fue sino hasta los 1860s cuando las investigaciones de Pasteur y otros científicos finalmente refutaron la doctrina de la generación espontánea y la realidad de las enfermedades bacterianas en el hombre y animales pasaron a ser conceptos que aparentemente recibieron aceptación general. Nadie hizo más para completar este cambio excepto el bacteriólogo alemán Robert Koch, cuyas aportaciones y resultados, sumados al mejoramiento del microscopio compuesto, tuvieron repercusiones extensas, incluyendo el reconocimiento de las enfermedades bacterianas de las plantas. Es tradicional atribuir el descubrimiento de las enfermedades bacterianas en plantas al norteamericano T.J. Burril pero existen otros científicos que reclaman este reconocimiento (Ainsworth, 1981).

Dar un diagnóstico es un hecho difícil que integra las informaciones que vienen de síntomas relacionados con la presencia del organismo responsable de una enfermedad. Los métodos para poner en evidencia las bacterias, han evolucionado de tal manera que, ahora se puede revelar dentro o sobre las plantas, en ausencia de toda manifestación de síntomas; no se trata de diagnóstico propiamente dicho, pero si de una detección. Una metodología cada vez más fina, permite ahora, en muchos casos, aliviar un poco el carácter complicado de dar un diagnóstico (López, 1989).

El níspero japonés (*Eriobotrya japonica* Lind) perteneciente a la familia Rosaceae y originario de extremo oriente, es un árbol cuyos frutos y hojas son utilizados en muy diversas formas además de ser planta ornamental. Es un árbol fácil de cultivarse y ha sido distribuido ampliamente a través de países tropicales y subtropicales así como también adaptado a otros ambientes.

El cultivo del níspero japonés tiene, entre sus problemas de fitosanidad diversas plagas y enfermedades, las cuales al actuar afectan la cantidad y calidad de la producción de este frutal en forma muy considerable.

En la República Mexicana el níspero se cultiva principalmente en modestas huertas familiares en los estados de México, Veracruz, Michoacán, Puebla, Morelos, Hidalgo, Oaxaca y Guanajuato, donde en algunos lugares de ellos ha sido observada recientemente una enfermedad con cierta importancia denominada decaimiento del níspero, afectando a este frutal, debido a lo cual se decidió realizar el presente estudio con los siguientes objetivos.

- a) Definir la sintomatología de esta enfermedad.
- b) Aislar, caracterizar e identificar al agente causal.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Ubicación taxonómica del níspero japonés

Jones (1987) clasifica al níspero japonés de la siguiente manera:

Reino	Vegetal
Subreino	Embriophyta
División	Antophyta
Clase	Dicotyledoneae
subclase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Subfamilia	Pomoideae ó Pyroideae
Género	<i>Eriobotrya</i>
Especie	<i>Eriobotrya japonica</i> Lind.

2.2. Origen y distribución del níspero japonés

El níspero japonés, según Vavilov (1950), es originario de las regiones montañosas de la China Central y Occidental, junto con las tierras bajas colindantes mientras que Bononad y Escrivá (1969) lo reportan como originario del Extremo Oriente y Tamaro (1964) de la China Oriental.

En China, Japón e India es un árbol muy representativo. En Europa fue introducido en la segunda mitad del siglo XVIII, encontrando condiciones favorables para su cultivo en la zona templada de Italia y en Turquía. Parece que a España fue introducida por marinos mercantes. En Africa, el país en el que mejor se ha adaptado es Argelia. En Estados Unidos se cultiva en California y Florida, y en toda América Central (Bononad y Escrivá, 1969). Fue llevado a la Isla Mauricio por los jesuitas y de aquí introducido en Francia (Tamaro, 1984).

El níspero japonés es fácil de cultivarse, y ha sido distribuido ampliamente a través de países tropicales y subtropicales como también a la Isla de Malta, Argelia, Inglaterra, Madagascar, Australia, algunas islas de Oceanía, México, América Central, Sur América como Chile y Argentina (Popenoe, 1974).

En la República Mexicana se cultiva en pequeñas huertas de 2 a 3 hectáreas en los Estados de Veracruz y Michoacán, manejándose principalmente en modestas huertas familiares en los estados de México, Puebla, Morelos, Hidalgo, Oaxaca y Guanajuato (Espinoza, 1991).

2.3. Descripción botánica del níspero japonés

En estado silvestre el níspero japonés es un árbol de altura mediana, arbustivo y con fuertes ramificaciones espinosas. La planta cultivada es un árbol mediano de 5 a 6 metros de altura, con la copa piramidal o esférica y de aspecto magnífico, raíz muy ramificada, superficial, de notable fuerza de penetración, tronco derecho, a veces dividido en la base como para formar el arbusto (Tamaro, 1984).

Las hojas, más abundantes hacia las terminaciones de las ramitas son elíptico-lanceoladas a ovado-lanceoladas en contorno o

borde, remotamente dentadas, de color verde obscuro y vellosas en el envés. Las flores blancas y fragantes nacen en panículas vellosas terminales (Popenoe, 1974).

El níspero generalmente produce frutos agrupados en número de cuatro a cinco, las cuales son ovoides o piriformes, según la variedad, con epidermis de color variable del amarillo pálido al anaranjado obscuro; la pulpa es de color blanquecino o amarillento y tiene sabor agridulce (Bononad y Escrivá, 1969). Encierra de una a tres semillas gruesas, rara vez cinco (Tamaro, 1984).

2.4. Importancia y usos del níspero japonés

En relación a la importancia del cultivo, el níspero japonés es muy apreciado por la precocidad de maduración de los frutos, con los cuales se fabrica una especie de aguardiente; las hojas se venden como ornamentales y para preparar coronas (Tamaro, 1984). El fruto puede ser cocido y servirse como salsa o aderezo (Popenoe, 1974). Igual importancia tiene su uso como planta ornamental (Bononad y Escrivá, 1969).

Los frutos del níspero japonés se pueden comer al natural o prepararse en mermeladas, conservas, pasteles, jalea y otros productos similares.

El área actual del cultivo del níspero japonés se podría extender, con toda certeza, a las tierras altas tropicales y otras regiones donde los árboles puedan producir consistentemente, y con la introducción de variedades mejoradas, se convertiría ahí en un importante cultivo frutal (Ochse et al., 1986).

Las hojas de níspero japonés son usadas en varios países para tratar enfermedades de la piel y la diabetes, y en investigaciones realizadas con hojas y frutos de esta planta mostraron reducir los niveles de glucosa en la sangre en perros y conejos tratados, así

como actividad anti-inflamatoria cuando se aplicó tópicamente a ratas. Los componentes de extractos foliares han sido aislados y caracterizadas sus estructuras químicas (Shimizu, et al., 1986; Noreen et al., 1988; Qureshi et al., 1988; Tommasi et al., 1990).

2.5. Plagas y enfermedades del níspero japonés

2.5.1. Plagas

Bononad y Escrivá (1969) reportan, en España, como plagas del níspero japonés a los trips dañando principalmente el fruto; los barrenadores dañando la corteza y el tronco; y los piojos harinosos afectando principalmente tronco y ramas, sin indicar sus nombres científicos.

Cuatro insectos atacan ocasionalmente al níspero en California: la palomilla de la manzana (*Cydia pomonella* L.), el pulgón de la manzana (*Aphis pomi* DeGeer), la escama de San José (*Aspidiotus perniciosus* Comstock) y la escama cerosa de Florida (*Ceroplastes floridensis* Comstock). En otros países, el fruto es a veces atacado por la mosca del mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wied.) y por la mosca de la fruta de Queensland (*Bactrocera tryoni* Froggatt). En la India la oruga anar (*Virachola isocrates* Fabr.) barrena el fruto (Essig, 1915).

Otros insectos plaga que se reportan en níspero japonés son: mosca prieta, *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Dowell y Steinberg, 1990); el escarabajo *Coleopterus posticus* (Erichson) (Habeck et al., 1989); los piojos harinosos *Planococcus japonicus* sp. nov. y *P. litchi* sp. nov. (Cox, 1989); la mosca de la fruta del Caribe *Anastrepha suspensa* (Loew) (Sivinski, 1989); la palomilla barrenadora del fruto *Serrodus partita* (Swart et al., 1975); la mosca del mediterráneo *Ceratitis capitata* Wied. (Cheikh et al., 1975); la oruga de la corteza *Indarbela quadrinotata* (Wilk.) (Hukam et al., 1978); los trips *Frankliniella difficilis*, *Haplothrips*

gowdeyi y *Sphictyrtus chryseis* y el ácaro *Eriophyes eriobotryae* (Ojima et. al., 1976).

2.5.2. Enfermedades

Bononad y Escrivá (1969), indican que en España el moteado o mancha negra (*fusicladium dendriticum* variedad *eriobotryae* Scalia) afecta ramas, hojas y frutos del níspero japonés.

Las principales enfermedades del níspero japonés en California son el tizón del peral (*Bacillus amylovorus* Trev.) y la roña del níspero (*Fusicladium dendriticum* var. *eriobotryae* Scalia). En florida las flores son a veces atizonadas por la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (Popenoe, 1974).

El cultivo del níspero japonés puede ser afectado por enfermedades como: el cancro bacteriano (*Pseudomonas eriobotryae* (Takimoto)), mancha negra o roña (*Spilocea eriobotryae* (Cav.)), pudrición del cuello (*Sclerotium* sp.), pudrición de la raíz y del fruto (*Diplodia natalensis*), pudrición de la corona (*Phytophthora cactorum*), mancha o lunar (*Fabraea maculata* (Lev.)); mancha foliar (*Septoria eriobotryae* Maffei), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y tizón de fuego (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et. al.) (Cook, 1975).

El cancro bacteriano fue reportado en japon en 1931 y en California en 1970. Una bacteria gram negativa, *Pseudomonas eriobotryae* (Takimoto) Dowson, fue reportada como el agente causal. La enfermedad en California se caracteriza por numerosos cancrios de tamaño variable en tallos jóvenes. A medida que los tallos aumentan en tamaño, la corteza que cubre las lesiones expulsa los cancrios expuestos abiertos. El tejido duro alrededor de los márgenes de los cancrios adquiere un color bronceado y se desarrolla irregularmente alrededor de cavidades ennegrecidas y hundidas. Los cancrios pueden ser de 3-6 pulgadas en longitud y rodear

completamente el tallo o tronco (Takimoto, 1931; Lai et al., 1970; Lai et al., 1971; Lai et al., 1972).

Otras enfermedades que se reportan en níspero son las siguientes: pudrición blanda, *Pestalotiopsis versicolor* y *Fusarium semitectum* (Joshi, et al., 1983); pudrición blanca de la raíz, *Dematophora* (*Rosellinia*) *necatrix* (Sztejnberg y Madar, 1979); roña del níspero, *Spilocaea eriobotryae* (Salerno et al., 1971); mancha de la hoja y fruto, *Entomosporium maculatum* (*Fabraea maculata*) (Kudo y Takanashi, 1976), *Entomosporium eriobotryae* (Gao, 1981), *Entomosporium* spp. (Horie y Kobayashi, 1979); *Cercospora eriobotryae* (Gao, 1981); pudrición del fruto, *Aspergillus niger* (Rana y Upadhyaya, 1972); tizón de fuego, *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al., (Loubser, 1976); nemátodos, *Telotylenchus elongatus* sp. nov. (Sultan et al., 1988), *Helicotylenchus dihystra* y *Criconemoides curvatus* (Mead, 1987), *Xiphinema* sp., *Paratylenchus* sp., *Helicotylenchus* sp. y *Tylenchorhynchus* sp. (Taylor et al., 1972).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención del material enfermo

Teniendo conocimiento de la presencia de esta enfermedad en plantas de níspero, para iniciar el presente estudio se realizaron recorridos por diversas localidades del Estado de México con la finalidad de localizar y coleccionar material enfermo de plantas de níspero e irse familiarizando con la sintomatología de la enfermedad.

Una vez obtenido el material enfermo se colocó en bolsas de papel y se llevó al Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, posteriormente se colocó en bolsas de plástico y se guardó en el refrigerador, para proceder a su diagnóstico.

3.2. Aislamiento y purificación de microorganismos aislados

Los aislamientos se realizaron por medio de diluciones del tejido vegetal enfermo, precisamente del área recién afectada por la enfermedad, para posteriormente sembrar en los medios de cultivo PDA, B de King y CPG (Apéndice 1,2,3). Las cajas inoculadas se incubaron a 28°C durante 24 horas; posteriormente, se realizó otro tipo de aislamiento: se tomó con el asa bacteriológica inóculo del tejido enfermo y se suspendió en agua destilada estéril para luego sembrar en los medios de cultivo ya mencionados e incubar a 28°C. por 24 horas.

La purificación de las colonias bacterianas desarrolladas se realizó separando las colonias que presentaron fluorescencia, para sembrarlas por el método de estría cruzada en los medios de cultivo CPG Y B de King, de donde se obtuvieron dos tipos de colonias fluorescentes. Posteriormente, de las colonias bacterianas

desarrolladas se procedió a la realización de las pruebas de patogenicidad.

3.3. Pruebas de patogenicidad

3.3.1. Inoculación en plantas sanas de níspero

Una vez lograda la purificación de los cultivos bacterianos se incrementaron y se realizaron los postulados de Koch, para determinar las causantes de los síntomas observados en campo, pinchando las ramas de níspero con agujas estériles y depositando después en las heridas las bacterias respectivas, de 24 horas de edad. Un segundo método de inoculación, consistió en inyectar 3 ml de una suspensión bacteriana de 10^3 UFC/ml, en las ramas de la planta de níspero. En cada método de inoculación se probaron las cepas 1 y 2 conjuntamente y también se inocularon las cepas 1 y 2 separadamente. Cada método llevó su respectivo testigo.

Las plantas ya inoculadas se cubrieron con bolsas de plástico para crear una atmósfera de alta humedad relativa y temperatura y facilitar el desarrollo de la enfermedad, manteniéndose en estas condiciones durante 7 días. De las plantas donde se reprodujeron los síntomas, se aisló el agente causal y se procedió a su caracterización e identificación para compararlo con el aislado originalmente.

3.3.2. Reacción de hipersensibilidad en tabaco

Se prepararon suspensiones bacterianas en agua destilada estéril, a las concentraciones de 3×10^7 , 3×10^8 y 3×10^9 células/ml y con la ayuda de la aguja hipodérmica estéril se procedió a infiltrarlas en los espacios intercelulares entre dos venas secundarias de las hojas de tabaco. La reacción se considera positiva si se observa flacidez o muerte del tejido en la zona infiltrada (Klement et al., 1964).

3.3.3. Pudrición de tubérculos de papa

Se esterilizaron superficialmente tubérculos de papa de la variedad Alpha, flameándolos con etanol 96%. Se cortaron rebanadas de aproximadamente 0.6 a 0.8 cm de grueso que se depositaron en cajas de Petri con un papel filtro húmedo. En cada rebanada se hizo una incisión y, de cada par, sólo una fué inoculada con bacteria, la otra se uso como testigo; enseguida, se inundaron con agua destilada estéril y se incubaron a 28°C durante 24 horas, para observar la posible pudrición del tejido inoculado (Fucikovsky, 1975).

Esta prueba se realizó para las dos colonias bacterianas sospechosas de causar ese tipo de sintomatología en níspero japonés.

3.4. Pruebas bioquímicas y fisiológicas para la caracterización e identificación del patógeno

De plantas de níspero donde se reprodujeron los síntomas de la enfermedad se reaislaron dos cepas bacterianas, a las cuales ya purificadas e incrementadas se les practicaron las siguientes pruebas para su caracterización e identificación:

3.4.1. Características de las colonias bacterianas

3.4.1.1. Tinción de Gram

Se utilizó el método modificado de Nyfeldt, el cual consiste en hacer un frotis bacteriano fijado con calor sobre un portaobjetos, adicionándole después solución de cristal violeta por 1 minuto, se decantó y se le agregó la solución de lugol, la cual se decantó después de 1 minuto. Luego se lavó con etanol al 96% y se le adicionó la solución de safranina al 1% por 1 minuto y se lavó con agua, se secó la preparación y se observó al microscopio

compuesto (Dowson, 1957). Las bacterias gram positivas se tiñen de azul, mientras que las negativas de color rojo (Apéndice 4).

3.4.1.2. Tinción de flagelos

Se utilizó el método de Peppler que consiste en hacer un frotis de una suspensión bacteriana diluida y secada al aire, se le adiciona un mordente (Apéndice 5) dejándolo actuar por 3-5 minutos y lavándolo con agua. Después se le agrega la solución de cristal violeta y se deja por 2 minutos, se lava con agua y se seca al aire para observarse al microscopio compuesto.

3.4.1.3. Fluorescencia

Las bacterias se sembraron en el medio B de King (Apéndice 2) y se incubaron a 28°C durante 48 horas para observarse después iluminadas con luz ultravioleta (360 nm) para detectar la presencia o ausencia del pigmento fluorescina (Hildebrand y Schreth, 1972; King et al., 1954).

3.4.2. Características bioquímicas y fisiológicas

3.4.2.1. Fermentación y/u oxidación de la glucosa

Se empleó el método descrito por Hugh y Leifson para detectar la fermentación y/u oxidación de la glucosa debido a las bacterias, bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas, respectivamente. Se inocularon dos tubos con punción directa, adicionándole a un tubo una capa de 1 cm de aceite mineral (lugol) estéril y al segundo tubo se deja sin lugol, usando un tercer tubo sin inocular como testigo (Hugh y Leifson, 1953). Se considera como fermentativa la reacción, si bajo anaerobiosis hubo cambio de color de azul verde a amarillo, y oxidativa cuando sólo en condiciones aeróbicas hubo el mismo cambio de color (Apéndice 6).

3.4.2.2. Licuefacción de gelatina

Las bacterias se inocularon por punción en tubos conteniendo el medio de gelatina nutritiva (Difco) al 12% (Apéndice 7) dejando un tubo como testigo. Se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. La licuefacción de la gelatina durante el lapso de tiempo establecido fue considerada como prueba positiva (Anónimo, 1953).

3.4.2.3. Producción de oxidasa

Se impregnó un disco de papel filtro con una solución acuosa al 1% de N, N-dimetil-p-fenilenediamina monoclorido y sobre éste se depositaron pequeñas cantidades de la bacteria de 24 horas de edad en medio B de King con la ayuda de una asa de platino (Apéndice 8). La producción de un color púrpura o rojizo-negro en un lapso de 10 segundos se considera como una reacción positiva (Hildebrand y Schroth, 1971; Skjerman, 1967).

3.4.2.4. Dehidrolasa de arginina

Se inoculó la bacteria en tubos con el medio de cultivo de Thornley (Apéndice 9) y se agregó inmediatamente a los tubos 1 ml de aceite mineral con el fin de establecer condiciones de anaerobiosis. Posteriormente se incubó a 28°C durante 3 días. Se considera prueba positiva si en el medio se da un cambio de coloración de rosa a violeta (Thornley, 1960).

3.4.2.5. Reducción de nitratos a nitritos

En esta prueba se empleó el método descrito por Kiraly et al., inoculando la bacteria en tubos con medio estéril para este fin y dejando un testigo. Se incubó durante 5 días, adicionando diariamente a los tubos unas gotas de los reactivos 1 y 2 (Apéndice 10). La formación de un color rojo se toma como reacción positiva (Kiraly et al., 1970).

3.4.2.6. Crecimiento a 41°C

En esta prueba se sembró la bacteria en el medio CPG (Apéndice 3) para comprobar su crecimiento a temperatura de 41°C. Se observó el crecimiento bacteriano a las 24, 48 y 72 horas (Jaimes, 1977).

3.4.2.7. Producción de 2-cetogluconato

Para realizar esta prueba se utilizó el método de Graham, que consistió en cultivar la bacteria en tubos con el medio de peptonasacarosa, se incubaron con agitación continua durante 5 días, después a cada tubo se le agregó 1 ml del reactivo de Benedict (Apéndice 11), se mezcló e hirvió cada tubo en baño maría por 10 minutos y se enfrió rápidamente. Se dejó un tubo sin inocular como testigo. La presencia de un precipitado café o naranja indica que la prueba es positiva (Graham, 1972).

3.4.2.8. Licuefacción de pectatos

Se inocularon las bacterias problema de 24 horas en cajas de petri conteniendo el medio de polipectato ajustado a pH de 8.5 y 5.2 y se incubó a 28°C durante 6 días (Apéndice 12). El resultado se considera positivo si se observa en el medio hundimiento del mismo (Hildebrand, 1971).

3.4.2.9. Hidrólisis de la esculina

Para esta prueba se inoculan las bacterias problema en cajas de Petri con medio para hidrólisis de la esculina (Apéndice 13) y se incubaron a 28°C durante 7 días, dejándose también un testigo. El resultado se considera positivo si en ese lapso se observa un ennegrecimiento en el medio (Cowan y Steel, 1974).

3.4.2.10. Acido de sucrosa

Esta prueba se realizó empleando el método de Hugh y Leifson ya descrito anteriormente, con la única variante de sustituir a la glucosa por la sucrosa para detectar su fermentación y/u oxidación por las bacterias, bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas, realizando el mismo procedimiento (Hugh y Leifson, 1953). Se considera como fermentativa la reacción, si bajo anaerobiosis hubo cambio de color de azul-verde a amarillo, y oxidativa cuando sólo en condiciones aeróbicas hubo el mismo cambio de color (Apéndice 6).

3.4.2.11. Producción de ácido a partir de carbohidratos

Se utilizó el método de Graham y/o de Hugh y Leifson, usando en los medios 1% de peptona y 0.003 de bromotimol azul (Apéndice 14) y las siguientes fuentes de carbohidratos al 1%: sucrosa, d-arabinosa y manitol. Se dejó un tubo sin inocular como testigo. El cambio de color del medio de azul-verde a amarillo indica la producción de ácido a partir de los azúcares indicados (Graham, 1972; Hugh y Leifson, 1953).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Obtención del material enfermo y observación de la sintomatología de la enfermedad

En los recorridos realizados en el área de influencia de Chapingo durante los meses de junio y julio de 1991 se localizaron plantas de níspero japonés enfermas, con síntomas consistentes en la presencia de necrosis cortical en las ramas, que al crecer daban lugar a la formación de canchales, los cuales causaban un decaimiento progresivo del árbol, hasta la muerte más o menos rápida de una parte o de la totalidad del árbol. La proliferación del patógeno en los tejidos corticales durante el invierno dan lugar a que en la primavera se observen partes necrosadas que son difíciles de descubrir bajo una corteza oscura. Como consecuencia, la marchitez de los tejidos necrosados y su hundimiento conducen a la formación de una placa fácilmente desprendible. A este nivel se puede observar que el floema y una pequeña parte del xilema están afectados. Además, se logra observar que las áreas alrededor de los canchales adquieren una coloración café y en ciertas épocas la presencia de exudados bacterianos (figuras 1, 2 y 3), lo cual coincide con la sintomatología descrita y reportada por Takimoto, (1931); Lai et al., (1970); Lai et al., (1971); Lai et al., (1972).

4.2. Aislamiento y purificación de microorganismos aislados

Al hacer preparaciones del material enfermo y al observarlas al microscopio compuesto, se detectó la presencia de células bacterianas, lográndose obtener de las muestras analizadas varios tipos de colonias bacterianas; sin embargo, 2 fueron las más comunes. La purificación se llevó a cabo sin complicaciones ya que no hubo contaminación excesiva de saprófitos, realizándose por la técnica de estría cruzada y procediéndose después a efectuar las pruebas de patogenicidad.



Figura 1. Sintomatología de la enfermedad a nivel de campo: decaimiento progresivo y muerte parcial del árbol.



Figura 2. Sintomatología de la enfermedad a nivel de campo: necrosis cortical en ramas y formación de canchros.

4.3. Pruebas de patogenicidad

4.3.1. Inoculación en plantas sanas de níspero

De las colonias bacterianas que se inocularon sobre las ramas sanas de níspero solamente dos de ellas, denominadas como cepa 1 y cepa 2, lograron reproducir síntomas similares a los originales a los 12 días después de su aplicación, consistente en el desarrollo de necrosis cortical y desecación brusca de las partes terminales de esas ramas (Figura 4).

4.3.2. Reacción de hipersensibilidad en tabaco

Para esta prueba las dos cepas bacterianas infiltradas en las hojas de tabaco mostraron reacción positiva, ya que a las 24 horas se observó flacidez y muerte del tejido en la zona infiltrada (Cuadros 1 y 2), por lo que se confirmó que ambas son fitopatógenas, induciendo la reacción de hipersensibilidad en 8 horas.

4.3.3. Pudrición de tubérculos de papa

Al inocular las dos cepas bacterianas aisladas y purificadas sobre rebanadas de papa, ambas ocasionaron una pudrición blanquecina a las 24 horas después de su inoculación (Cuadros 1 y 2), por lo que se sospechó que corresponden al género *Pseudomonas*.

4.4. Pruebas bioquímicas y fisiológicas para la caracterización e identificación del patógeno.

4.4.1. Características de la colonia bacteriana



Figura 3. Sintomatología de la enfermedad a nivel de campo: marchitez y hundimiento de tejidos necrosados y presencia de exudados bacterianos.

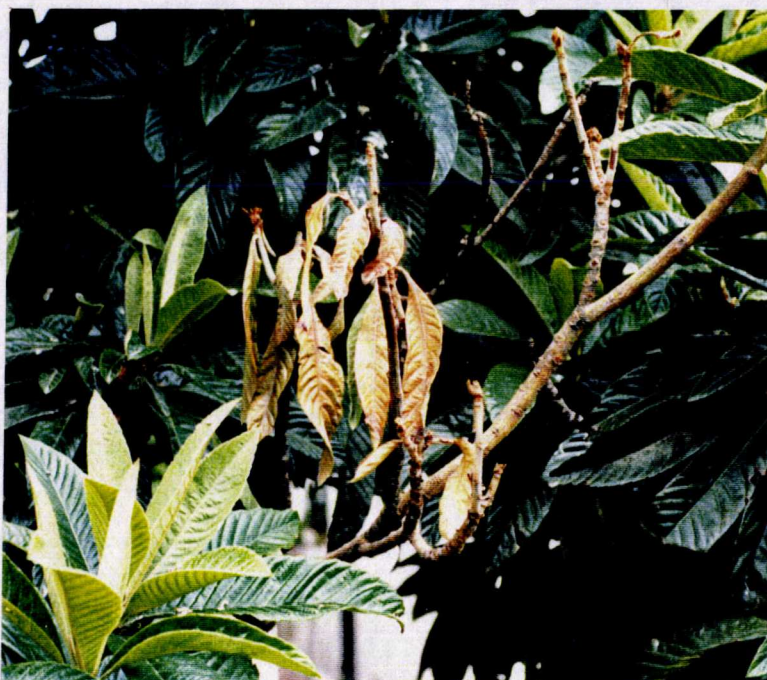


Figura 4. Prueba de patogenicidad: Inoculación en plantas sanas de níspero japonés.

4.4.1.1. Tinción de Gram

En esta prueba las dos cepas bacterianas resultaron ser gram negativas, ya que ambas se tiñeron al final de color rojo (Cuadros 1 y 2).

4.4.1.2. Tinción de flagelos

Al efectuar esta prueba se observó al microscopio compuesto que ambas cepas bacterianas presentaron dos flagelos en disposición lofotrica (Cuadros 1 y 2).

4.4.1.3. Fluorescencia

Al realizar la prueba de fluorescencia, se observó que al iluminar con luz ultravioleta las dos cepas bacterianas, ambas mostraron fluorescencia debido a la presencia del pigmento fluorescina (Cuadros 1 y 2) a través de la luz u.v.

4.4.2. Características bioquímicas y fisiológicas

4.4.2.1. Fermentación y/u oxidación de la glucosa

Para esta prueba ambas cepas bacterianas resultaron ser aeróbicas, ya que las dos produjeron reacción oxidativa al originar el cambio de color de azul-verde a amarillo bajo condiciones aeróbicas (Cuadros 1 y 2) y el tubo en condiciones anaerobicas no presentó cambio de coloración.

4.4.2.2. Licuefacción de gelatina

Se observó en esta prueba que las dos cepas bacterianas mostraron reacción positiva, ya que ambas lograron la licuefacción de la gelatina a los 7 días de incubación a temperatura ambiente (Cuadros 1 y 2), observándose en los tubos inoculados un medio hidrolizado.

CUADRO 1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS PARA LA CEPA No. 1 AISLADA DE NISPERO JAPONES.

PRUEBA	RESULTADOS
CARACTERISTICAS DE LA COLONIA:	
Hipersensibilidad en tabaco	(+)
Pudrición tub. papa	(+)
Tinción de Gram	(-)
Tinción flagelos	lofotrica
Fluorescencia	fluorescente

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS:

Ferment-Oxidac. glucosa	aeróbica
Licuefacción de la gelatina	(+)
Oxidasa	(-)
Dihidrolasa de arginina	(-)
Reducción de nitratos a nitritos	(-)
Crecimiento a 41°C	(-)
Producción de 2-Cetogluconato	(-)
Licuefacción de pectatos	(-)
Hidrólisis de la esculina	(+)
Acido de Sucrosa	(+)
Utilización de:	
D-arabinosa	(-)
Manitol	(-)
Sucrosa	(-)

Consulta:

- Schaad, J.N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.
- Lelliott, R.A. & D.E. Stead. 1987. Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of plants.

CUADRO 2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS PARA LA CEPA No. 2 AISLADA DE NISPERO JAPONES.

PRUEBA	RESULTADOS
CARACTERISTICAS DE LA COLONIA:	
Hipersensibilidad en tabaco	(+)
Pudrición tub. papa	(+)
Tinción de Gram	(-)
Tinción flagelos	lofotrica
Fluorescencia	fluorescente
CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS:	
Ferment-Oxidac. glucosa	aeróbica
Licuefacción de la gelatina	(+)
Oxidasa	(-)
Dehidrolasa de arginina	(-)
Reducción de nitratos a nitritos	(+)
Crecimiento a 41°C	(-)
Producción de 2-Cetofluconato	(-)
Licuefacción de pectatos	(+)
Hidrólisis de la esculina	(-)
Acido de sucrosa	(-)
Utilización de:	
D-arabinosa	(-)
Manitol	(-)
Sucrosa	(+)

Consulta:

- Schaad, J.N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.
- Lelliott, R.A. & D.E. Stead. 1987. Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants.

4.4.2.3. Producción de oxidasa

Observamos en los Cuadros 1 y 2, que en la aplicación de esta prueba las dos cepas bacterianas produjeron reacción negativa, ya que ninguna de ellas motivó la producción de color púrpura o rojizo-negro en el lapso de 10 segundos.

4.4.2.4. Dehidrolasa de arginina

Para esta prueba se observó que las dos cepas bacterianas mostraron reacción negativa, debido a que ninguna de las dos logró producir en el medio un cambio de coloración de rosa a violeta (Cuadros 1 y 2).

4.4.2.5. Reducción de nitratos a nitritos

Al efectuar esta prueba se observó que la cepa bacteriana No. 1 produjo reacción negativa y en cambio la cepa No. 2 mostró reacción positiva, en base a la formación o no de un color rojo en el medio (Cuadros 1 y 2), después de la aplicación de los reactivos correspondientes para la detección de nitritos.

4.4.2.6. Crecimiento a 41°C

En la realización de esta prueba se apreció que ambas cepas bacterianas no lograron desarrollarse a 41°C, ya que su crecimiento fue nulo a las 24, 48 y 72 horas (Cuadros 1 y 2).

4.4.2.7. Producción de 2-Cetogluconato

Debido a que no se apreció la presencia de un precipitado café o naranja, se consideró que las dos cepas bacterianas son incapaces de producir 2-cetogluconato (Cuadros 1 y 2), mostrando ambas un resultado negativo.

4.4.2.8. Licuefacción de pectatos

Al aplicar esta prueba se observó que la cepa bacteriana No.1 mostró reacción negativa, a diferencia de la cepa No. 2 que mostró resultado positivo, en base a la observación en el medio hundimiento o no del mismo (Cuadros 1 y 2).

4.4.2.9. Hidrólisis de la esculina

En esta prueba se apreció que la cepa bacteriana No. 1 originó un resultado positivo, en contraste con la cepa No. 2 la cual mostró una reacción negativa, en función de la observación o no de un ennegrecimiento en el medio (Cuadros 1 y 2).

4.4.2.10. Acido de sucrosa

Podemos apreciar en los Cuadros 1 y 2 que la cepa bacteriana No. 1 produjo reacción positiva y en cambio la cepa No. 2 mostró resultado negativo, en base a que hubo reacciones oxidativa y fermentativa, respectivamente.

4.4.2.11. Producción de ácido a partir de carbohidratos

En la aplicación de esta prueba podemos observar que la cepa bacteriana No. 1 mostró resultado negativo en la utilización de d-arabinosa, manitol y sucrosa; en cambio la cepa No. 2 mostró reacción negativa en la utilización de d-arabinosa y manitol, y positiva para sucrosa. Esto fue en base a la observación de un cambio de color de azul-verde a amarillo en el medio, lo cual indica la producción de ácido a partir de los azúcares utilizados (Cuadros 1 y 2).

4.5. Caracterización e identificación de las bacterias

Los agentes causales bacterianos se identificaron principalmente tomando como base los resultados de las pruebas bioquímicas, fisiológicas y la sintomatología del hospedante, así como apoyándose en la información que proporciona la literatura consultada.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados de las pruebas realizadas a la cepa bacteriana No. 1 aislada de níspero japonés y la comparación con las características de la bacteria que mas se le asemeja, que resulta ser *Pseudomonas syringae*, en base a la consulta de Schaad (1988) y de Lelliot y Stead (1987) lo cual condujo a que se le identificara definitivamente como *P. syringae*, ya que los resultados en la utilización de los azúcares manitol y sucrosa pueden ser variables según indican estos autores.

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de las pruebas realizadas con la cepa bacteriana No. 2 aislada de níspero japonés y la comparación con las características de la bacteria que más se le asemeja, *Pseudomonas viridiflava*. Considerando las características señaladas por Schaad (1988) y de Lelliot y Stead (1987), se puede establecer que esta cepa aislada corresponde a la especie *P. viridiflava*, a pesar de la discrepancia en la utilización de los azúcares manitol y sucrosa, lo cual es variable, ya que también las pruebas de patogenicidad refuerzan esta determinación.

Los análisis bacteriológicos de los canchros y necrosis confirma el papel principal de la presencia de la bacteria *P. viridiflava* la cual tiene una responsabilidad conjuntamente con *P. syringae*, y son frecuentemente aisladas juntas en una misma lesión. En las inoculaciones se demostró que la agresividad de *P. viridiflava* es mayor a la de *P. syringae*. Estas especies son capaces de reproducir cancro y decaimiento.

CUADRO 3. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS PARA LA CEPA No. 1 AISLADA DE NISPERO JAPONES COMPARADAS CON LAS DE *Pseudomonas syringae*.

PRUEBA	CEPA 1 AISLADA DE NISPERO	<i>Pseudomonas syringae</i>
CARACTERISTICAS DE LA COLONIA:		
Hipersensibilidad en tabaco	(+)	(+)
Pudrición tub. papa	(+)	(+)
Tinción de Gram	(-)	(-)
Tinción flagelos	lofotrica	lofotrica
Fluorescencia	Fluorescente	Fluorescente
CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS:		
Ferment-Oxidac. glucosa	aeróbica	aeróbica
Licuefacción de la gelatina	(+)	(+)
Oxidasa	(-)	(-)
Dihidrolasa de arginina	(-)	(-)
Reducción de nitratos a nitritos	(-)	(-)
Crecimiento a 41°C	(-)	(-)
Producción de 2-Cetogluconato	(-)	(-)
Licuefacción de pectatos	(-)	(-)
Hidrólisis de la esculina	(+)	(+)
Acido de Sucrosa	(+)	(+)
Utilización de:		
D-arabinosa	(-)	(-)
Manitol	(-)	(v)
Sucrosa	(-)	(v)

Consulta:

- Schaad, J.N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of plant Pathogenic Bacteria.
- Lelliott, R.A. & D.E. Stead. 1987. Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of plants.

CUADRO 4. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS PARA LA CEPA No. 2 AISLADA DE NISPERO JAPONES COMPARADAS CON LAS DE *Pseudomonas viridiflava*.

PRUEBA	CEPA 2 AISLADA DE NISPERO	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
CARACTERISTICAS DE LA COLONIA:		
Hipersensibilidad en tabaco	(+)	(+)
Pudrición tub. papa	(+)	(+)
Tinción de Gram	(-)	(-)
tinción flagelos	lofotrica	lofotrica
fluorescencia	fluorescente	fluorescente
CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS:		
Ferment-Oxidac. glucosa	aeróbica	aeróbica
Licuefacción de la gelatina	(+)	(+)
Oxidasa	(-)	(-)
Dehidrolasa de arginina	(-)	(-)
Reducción de nitratos a nitritos	(+)	(+)
Crecimiento a 41°C	(-)	(-)
Producción de 2-Cetogluconato	(-)	(-)
Licuefacción de pectatos	(+)	(+)
Hidrólisis de la esculina	(-)	(-)
Acido de sucrosa	(-)	(-)
Utilización de:		
D-arabinosa	(-)	(-)
Manitol	(-)	(+)
Sucrosa	(+)	(-)

Consulta:

- Schaad, J.N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteriai.
- Lelliott, R.A. & D.E. Stead. 1987. Methods for Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se establecen las siguientes conclusiones:

1.- En base a las pruebas de patogenicidad realizadas, la enfermedad denominada decaimiento del níspero japonés es de origen bacteriano.

2.- La sintomatología clásica de esta enfermedad bacteriana es: Necrosis cortical en los troncos y ramas y formación posterior de un cancro, lo cual ocasiona un decaimiento progresivo del árbol. La marchitez de los tejidos necrosados y su hundimiento conducen a la formación de una placa fácilmente desprendible. El floema y una pequeña parte del xilema son afectados y es característica una exudación bacteriana.

3.- Tomando como base las pruebas de patogenicidad, bioquímicas y fisiológicas, así como la sintomatología del hospedante y la información proporcionada por la literatura, la cepa bacteriana No. 1 fue identificada como *Pseudomonas syringae*, y la cepa No. 2 como *Pseudomonas viridiflava*.

6. BIBLIOGRAFIA.

- Ainsworth, G.C. 1981. Introduction to the history of plant pathology. Cambridge University Press. p.63.
- Anónimo. 1953. Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. 9th, Ed. Difco Laboratories Inc. Detroit, Michigan, U.S.A. 350 P.
- Bononad, G. S. y A. Escrivá, F. 1969. El níspero. Ministerio de Agricultura. Hojas divulgadoras 5-6/69. Madrid, España. 24 p.
- Cook, A.A. 1975. Diseases of tropical and subtropical fruits and nuts. Hafner Press. New York, USA. P. 219-224.
- Cox, J.M. 1989. The mealybug genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). Entomology, Bull, of the Brit, Mus. (Nat. Hist.) 58(1): 1-78.
- Cowan, T.S. and K.J. Steel. 1974. Manual for the identification of medical bacterial. Cambridge University Press. 2nd. Ed. England. 238 p.
- Cheikh, M., J. F. Howell, E. J. Harris, H. B. Salah, and F. Soria. 1975. Suppression of the Mediterranean fruit fly Tunisia with released sterile insects. Jour. Econ. Ent. 68(2):237-243.
- Dowell, R.V. and B. Steinberg. 1990. Influence of host plants fecundity of *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Homoptera:Aleyrodidae). Pan-Pacific Ent. 66 (1):62-65.
- Dowson, W.J. 1957. Plant diseases due to bacteria. 2nd. Ed. Cambridge, England. University Press. p. 66-67.

- Espinoza, E.R. 1991. Depto. de Fitotecnia, UACH. Chapingo, México. Comunicación personal.
- Essig, E.O. 1915. Injurious and beneficial insects of California. St. Com Hort. 2nd Ed. Sacramento California.
- Fucikovsky, Z.L. 1975. Estudio de la pudrición blanda del capítulo del girasol. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 108 p.
- Gao, R. 1981. Occurrence of two diseases on seedling of loquat in Fujian (*Entomosporium eriobotryae* and *Cercospora eriobotryae*). Acta Phytopathologica Sinica: 11 (1): 63-64.
- Graham, D.C. 1972. Identificación of soft rot coliform bacteria. En H.P. Maas Geesteranus ed. Proceedings of the Third International Conference on plant pathogenic bacteria. Wageningen, p. 273-279.
- Habeck, D.H., J. Nagel, and J. E. Peña. 1989. *Coleopterus posticus* (Erichson), a nitidulid beetle new to the United States. Florida Entomologist. 72(1):89-90.
- Hildebrand, D.C. 1971. Pectate and pectin gels for differentiation of *Pseudomonas* sp. and other plant pathogenic bacteria. Phytopathology. 61:430-436.
- Hildebrand, D.C. and H.N. Schreth. 1971. Identification of fluorescent *Pseudomonas*. En P.H. Maas Geesteranus. Ed. Proc. of the Third Intern. Conf. on Plant Pathogenic Bacteria. Wageningen p. 281-288.

- Horie, H. and T. Kobayashi. 1979. *Entomosporium* leaf spot of Pomoideae (Rosaceae) in Japan. I. Distribution of the disease; morphology and physiology of the fungus. *European journal of Forest Pathology*. 9(6):366-379.
- Hugh, R. and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacterial. *J. Bacteriology* 66:24-26.
- Hukam, S., S. Basant, and S. Chandra. 1978. Control of bark eating caterpillar, *Indarbela quadrinotata* (Wlk) (Lepidoptera: Metarbelidae) on loquat. *India. Vatika*. 1(1):106-107.
- Jaimes S., F. 1977. *Manual de prácticas de bacterias fitopatógenas* Depto. de Parasitología Agrícola. E.N.A. Chapingo, México.
- Jones, S.B. Jr. 1987. *Sistemática vegetal*. Trad. por Huesca T.M.L. Edit. McGraw-Hill. México. 536 p.
- Joshi, I.J., A. Saxena, and S. B. Saksena. 1983. Two new soft rot diseases of loquat from India. *Current Science, India* 52(12):610.
- King, E.O., H. K. Ward and E. E. Raney. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. and Clin. Med.* 44:301-307.
- Kiraly, Z., Z. Klement, F. Solymosy, and J. Voros. 1970. *Methods in plant pathology*. Akademiai Kiado, Budapest. 509 p.
- Klement, Z.G., L. Farkas and L. Lovrekovich. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54:474-477.

- Kudo, A. and K. Takanashi. 1976. The pathogenicity of *Entomosporium maculatum* on pomaceous species, Bull. of the Fruit Tree Research St. A. Japan. (3):53-66.
- Lai, M., W. O. McCartney, and C. W. Morin. 1970. Loquat canker incited by *Pseudomonas* sp. in California. Phytopathology 60:1535.
- . 1971. Canker of loquat caused by *Pseudomonas* sp. Phytopathology 61:248-249.
- Lai, M., C. W. Morin, and C. G. Weigle. 1972. Two strains of *Pseudomonas eriobotryae* isolated from loquat cankers in California. Phytopathology. 62(3): 310-313.
- Lelliot, R.A. and D.E. Stead. 1987. Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants. ESPP. London, England.
- López F., M.C. 1989. El diagnóstico en fitobacteriología, Depto. de Parasitología Agrícola, Univ. Aut. Chapingo. Chapingo México. 14 p.
- Loubser, J.T. 1976. Introduction of fire blight through ornamental shrubs. Deciduous Fruit Grower. 26(11): 448-450,453.
- Mead, F.W. 1987. Bureau of nematology. Tri-ology Technical Report. 26(1): 5-6.
- Noreen, W., A. Wadood, H. K. Hidayat, and S. A. M. Wahid. 1988. Effect of *Eriobotya japonica*, on blood glucose levels of normal and alloxan-diabetic rabbits. Planta Medica. 54(3): 196-199.

- Ojima, M., O. Rigitano, S. Simao, y T. Ique. 1976. Mancha-arroxeadada da nespera e sua relacao com os tripses das flores, o percevejo *Sphictyrtus chryseis* e o acaro *Eriophyes eriobotryae*. Brasil. Bragantia. 35 LXI-LXV.
- Ochse J.J.; M.J. Soule Jr.; M.J. Dijkman y C. Wehlburg. 1986. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. 7a. reimp. 2 vols. Ed. LIMUSA México. p. 789-791.
- Popenoe, W. 1974. Manual of tropical and subtropical fruits. Reimp. Hafner Press. New York. p. 250-267.
- Qureshi, M.A., M. R. Ali, and S. A. Jafri. 1988. Antidiabetic effect of *Eriobotrya japonica* (loquat) in dogs. Pakistan Veterinary Journal 8(2):95-97.
- Rana, O.S. and J. Upadhyaya. 1972. A new fruit rot of loquat (*Eriobotrya japonica* L.). India. Science and Culture. 38(1):35-36.
- Salerno, M., V. Somma, y B. Rosciglione. 1971. Ricerche sull'epidemiologia della ticchiolatura del nespolo del Giappone. Italia. Tecnica Agrícola. 23(1):3-15.
- . 1971. Confronto di fungicidi nella lotta contro la ticchiolatura del nespolo del Giappone. Italia. Técnica Agrícola. 23(6):947-956.
- Schaad, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria. Bacteriology Comites for American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota, USA.

- Shimizu, M., H. Fukumura, H. Tsuji, S. Tanaami, T. Hayashi, and N. Morita. 1986. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. I. Constituents, and anti-inflammatory effect of *Eriobotrya japonica* Lindl. Japan. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 34(6):2614-2617.
- Sivinski, J. 1989. Lekking and the small-scale distribution of sexes in the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew). Journal of insect Behavior. 2(1):3-13.
- Skerman, V.B.D. 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. Williams and Wilkins Co. altimore. Md. 303 p.
- Sultan, M.S., I. Singh, and P. K. Sakhuja. 1989. Plant parasitic nematodes of Punjab, india. V. *Merlinius communica* n. sp. with key to species of the genus and *Telotylenchus elongatus* n. sp. Indian Journal of Nematology. 18(1): 44-48.
- Swart, P.L., A. E. Kock, and D. J. Rust. 1975. Fruit-piercing moths. Deciduous Fruit Grower. 25(4):97-102.
- Sztejnberg, A. and Z. Madar. 1979. The host range of *Dematophora* (*Rosellinia*) *necatrix*, the causal agent of white root rot in fruit trees, and preliminary trials on control. Israel. Alon Hanotea. 33(11):787-791.
- Takimoto, S. 1931. Bud blight disease of loquat. Plant Protect. 18:349-355.
- Tamaro, D. 1984. Tratado de fruticultura. Ed. Gustavo Gili. Barcelona, España. p. 683-696.
- Taylor, D.P., A. T. Saad, and W. E. Schlosser. 1972. Occurrence and distribution of Plant-Parasitic nematodes in Lebanon. FAO Plant Protection Bulletin. 20(5): 105-110.

- Tommasi, N. de, F. de Simone, R. Aquino, C. Pizza, Z. Z. Liang, and F. De Simone. 1990. Plant metabolites. New sesquiterpene glycosides from *Eriobotrys japonica*. Journal of Natural Products. 53(4):810-815.
- Thornley, M.S. 1960. the differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bact. 23(1):37-52.
- Vavilov, N.I. 1950. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Waltham, Mass. Chronica Botanica. 364 p.

APENDICE

Medios de cultivo y reactivos

Medios de cultivo y reactivos:

1.- Medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA)

Ingredientes:

Trozos de papa.....	250.0 g
Dextrosa.....	15.0 g
Agar.....	15.0 g
Agua destilada.....	1.0 l

Preparación: Las papas peladas se cocieron en 500 ml de agua durante 10 minutos a 1 kg/cm² de presión: esta solución se filtró en manta de cielo y se aforó a 500 ml, finalmente se adicionaron el resto de componentes contenidos en 500 ml. Se esterilizó convencionalmente.

2.- Medio B de King

Ingredientes:

K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1.5 g
Proteosa peptona No. 3.....	20.0 g
Glicerol.....	10.0 ml
Agar.....	15.0 g
Agua.....	1.0 l

Preparación: Los reactivos se adicionaron en el orden citado disolviendo primero cada uno de ellos y se esterilizaron durante 20 minutos a 1 kg/cm² de presión y se vació en cajas de petri estériles.

3.- Medio CPG

Ingredientes:

Glucosa.....	10.0 g
Peptona.....	10.0 g
Casamino ácidos (Difco).....	1.0 g
Agar.....	18.0 g
Agua.....	1.0 l

Preparación: El medio se esterilizó durante 20 minutos a 1 kg/cm² de presión y luego se vació a cajas de petri estériles.

4.- Tinción de Gram

Solución de cristal violeta.

Cristal violeta.....	500.0 mg
Fenol.....	2500.0 mg
Etanol 95%.....	20.0 ml
Glicerina.....	80.0 ml
Agua destilada.....	100.0 ml

Solución de Lugol

Yodo.....	1000.0 mg
Yoduro de potasio.....	2000.0 mg
Agua destilada.....	100.0 ml

Solución safranina

Safranina.....	1000.0 mg
Agua destilada.....	100.0 ml

5.- Tinción de flagelos

Mordente:

Acido tánico.....	20.0 g
Solución de CrO ₃ (2.5%).....	15.0 ml
Agua destilada.....	80.0 ml

Preparación: El ácido se disolvió en agua previamente calentada, luego se adicionó el otro reactivo dejándolos reposar por 4 días 18°C. La mezcla se filtró antes de ser utilizada.

6.- Medio de Hugh y Leifson

Ingredientes:

Peptona.....	2.0 g
NaCl.....	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Agar.....	3.0 g
Azul de bromotimol.....	0.03 g
Glucosa.....	10.0 g
Agua.....	1.0 l

Preparación: Antes de adicionar el agar se ajustó a pH 7.1, la glucosa se esterilizó con un filtro millipore de 0.4 u y así, se adicionó al medio, previamente esterilizado durante 20 minutos a 1 kg/cm² de presión.

7.- Licuefacción de gelatina

Medio gelatina nutritiva

Ingredientes:

Extracto de carne.....	3.0 g
Bacto-peptona.....	5.0 g
Bacto-gelatina.....	120.0 g
Agua.....	1.0 l

Preparación: El medio nutritivo se esterilizó y se colocó en tubos de ensaye dejándolos solidificar en forma vertical. Se inoculó directamente en los tubos dejando uno como testigo y se incubó a temperatura ambiente durante 5-7 días.

8.- Producción de oxidasa

Ingredientes:

N, N-dimetil-p-fenilenediamina monoclorido.....	1.0 g
Agua destilada.....	100.0 ml

Preparación: Se remojaron tiras de papel filtro con el reactivo y se transfirieron directamente las colonias sobre este

papel filtro usando un asa de platino.

9.- Dehidrolasa de arginina

Medio de Thornley

Ingredientes:

Peptona.....	1.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 G
Agar.....	15.0 g
R rojo de fenol.....	0.01 g
Arginina-HCl.....	10.0 g
Agua destilada.....	1.0 l

Preparación: Los ingredientes se disolvieron en el agua destilada y se ajustó el pH a 7.2, se distribuyeron en tubos y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.

10.- Medio para la reducción de nitratos

Ingredientes:

KNO ₃	1.0 g
Extracto de carne.....	3.0 g
Peptona.....	5.0 g
Agua.....	1.0 l

Preparación: El medio se esterilizó en la forma habitual y se vació el contenido en tubos de ensayo.

Reactivo 1

Acido acético glacial.....	100.0 ml
Agua.....	250.0 ml
Acido sulfanílico.....	2.8 g

Reactivo 2

Dimetil-alfa-naftalina.....	5.0 g
Acido acético 5 N.....	1.0 l

11.- Producción de 2-cetogluconato

Medio para la producción de sustancias reductoras de sacarosa.

Ingredientes:

Peptona.....	1.0 g
Sacarosa.....	4.0 g
Agua.....	0.1 l

Preparación: El medio se esteriliza en forma convencional, y es vaciado a cajas de petri estériles.

Reactivo Benedict

Solución 1: Se disolvieron 1.73 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml de agua destilada.

Solución 2: Se disolvieron 16.3 g de citrato de sodio y 10 g de Na_2CO_3 anhidro en 80 ml de agua destilada caliente. Se procedió a filtrar y se adicionó a esta solución , la solución 1 y se aforó a 100 ml.

12.- Licuefacción de pectatos

Ingredientes:

NaOH Sol IN.....	4.5 ml
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ solución 10%	3.0 ml
Azul de bromotimol	0.02 g
Extracto de levadura	2.5 g
Polipectato de sodio	9.0 g
Agua destilada	500.0 ml

Preparación: Se calentó el agua a 70 °C y se colocaron 200 ml de agua en una licuadora previamente calentada con agua hirviendo, se agregó el polipeptato y se licuó durante 30 segundos. Se adicionaron los ingredientes restantes y se licuó durante 2 minutos, se ajustó el pH a 7.3-7.4 y se vació en un matraz de 1.0 l y se tapó con papel aluminio, después se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.

13.- Hidrólisis de la esculina

Ingredientes:

Caldo-Aesculina	1.0 g
Aesculina	0.5 g
Citrato férrico	10.0 g
NaCl	5.0 g
Agua	1.0 l

Preparación: todos los ingredientes se disolvieron en el agua y se esterilizó a 115 °C durante 10 minutos.

14.- Medio para la producción de ácido a partir de carbohidratos.

Ingredientes:

Peptona.....	1.0 g
Bromotimol azul.....	0.003 g
Carbohidrato.....	1.0 g
Agua.....	100.0 g

Preparación: Los reactivos se mezclan y se esterilizan excepto el carbohidrato el cual se esteriliza con un filtro millipore de 0.4 u y así, se agrega al resto del medio. Posteriormente es vaciado a tubos de ensayo esterilizado previamente.

IMPRESOS
Sagitario



**TESIS
URGENTES**

2 DE MARZO No. 715
TEXCOCO, EDO. DE MEX.