

— IICA —
CENTRO REFERENCIAL
BIBLIOTECA VENEZUELA

IICA



**MANUAL DE
TECNICAS PARA
EL DIAGNOSTICO DE
LAS ENFERMEDADES
DE LAS PLANTAS**

IICA



**DIAGNOSTICO
FITOSANITARIO II**

Carlos Sosa-Moss
Francisco Perdomo Roldán
Chelston W.D. Brathwaite
Juan José Salazar Cruz

AREA DE CONCENTRACION III - SANIDAD AGROPECUARIA

AGENCIA DE COOPERACION TECNICA DEL IICA EN MEXICO

CARLOS SOSA-MOSS.

Nació en Juchitepec, Edo. De México. Obtuvo el grado de Ingeniero Agrónomo en la Escuela Nacional de Agricultura, en Chapingo, México; la Maestría en Ciencias Agrícolas en Entomología, en el Colegio de Postgraduados y se graduó como Doctor en Ciencias Naturales, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Paris (Sorbona), Francia.

Las instituciones en las que se ha desarrollado profesionalmente son: Instituto para el Mejoramiento y la Producción de Azúcar y Colegio de Postgraduados, en donde desde 1967 ha ocupado diversos cargos. Desde 1993 hasta la fecha es el Especialista en Sanidad Vegetal del IICA-ACT México. Ha sido profesor también en la Universidad Autónoma Chapingo, en el Instituto Politécnico Nacional, en la Universidad Central de Macaray en Venezuela y en el Dept. of Plant Pathology de la Universidad Estatal de Carolina del Norte en E.U.A. Ha participado en numerosos congresos y simposios y ha sido autor de varios artículos técnicos y científicos. También ha sido editor, autor y coautor de libros.

FRANCISCO PERDOMO ROLDAN.

Nació en Tlaquiltenango, Morelos, México. Obtuvo el grado de Biólogo, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cursó la Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Fue Asistente de Laboratorio de Entomología de la Universidad Autónoma del Edo. de Morelos. Posteriormente se desempeñó como encargado del Laboratorio de Histopatología y Microscopia Electrónica del Instituto de Protección Vegetal del Colegio de Postgraduados. Es profesional aprobado por la Dirección General de Sanidad Vegetal en el área de Diagnóstico Fitosanitario de Ornamentales y en Roya Blanca.

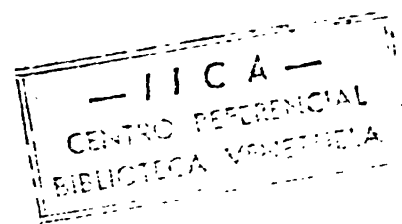
De 1993 a la fecha ocupa el cargo de Investigador Adjunto en el Área de Resistencia Genética a Fitopatógenos, participando, además, como profesor del curso Resistencia Genética de Plantas Cultivadas a Fitopatógenos en el Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados.

RECIBO

— I I C A —
CENTRO REFERENCIAL
BIBLIOTECA VENEZUELA

ISBN 92-9038-300 9

ISSN 0634-5391 : no. A3/Mx-96-01



TECNICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

Diagnóstico Fitosanitario II

Carlos Sosa-Moss
Francisco Perdomo Roldán
Chelston W. D. Brathwaite
Juan José Salazar Cruz

**INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION
PARA LA AGRICULTURA
AGENCIA DE COOPERACION TECNICA
IICA/MEXICO 1997**

00006958

1104
1120
31

TECNICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

**CARLOS SOSA-MOSS
FRANCISCO PERDOMO ROLDAN
CHELSTON W. D. BRATHWAITE
JUAN JOSE SALAZAR CRUZ**

© Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
Primera edición. 1996.

Reservados los derechos para todos los países. Ninguna parte de esta publicación, incluido el diseño de la cubierta, puede ser reproducida, almacenada, transmitida de ninguna forma, ni por ningún medio, sea electrónico, químico, mecánico, electro-óptico, grabación, fotocopia, o cualquier otro, sin previa autorización escrita por parte de sus autores y/o el IICA.

ISSN 0634-5391 : no. A3/Mx-96-01
ISBN 92-90-9038-300 9
IMPRESO EN MEXICO
PRINTED IN MEXICO

PRESENTACION

Todos los países de América Latina y el Caribe están sometidos en mayor o menor grado aun proceso de modernización que, en materia agrícola, les permita ingresar al comercio internacional de sus productos.

Al respecto, el Area de Libre Comercio de las Américas (ALCA) se ha dado a la tarea de integrar a todos los países del Hemisferio para que en los primeros años del siglo venidero exista un comercio sin barreras, dentro y entre los territorios que lo conforman.

Parte fundamental en este proceso, es la armonización de Medidas Sanitarias, Fitosanitarias y de Salud Alimentaria, así como la adopción por todos los países, de una serie de procesos y técnicas relacionadas, tales como el Análisis de Riesgo de Introducción de Plagas de un país infestado a otro libre, y sobre todo en relación con las metodologías de diagnóstico de plagas, patógenos y malezas, así como de residuos tóxicos en alimentos, medicamentos y otros insumos necesarios en la explotación agropecuaria.

El IICA, en su calidad de Organismo Internacional, está profundamente involucrado en todo este proceso de modernización y participa activamente con el Grupo de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias del ALCA.

Como resultado de su permanente preocupación en apoyar el desarrollo agrícola en el continente y de vigilar todo aquello que pudiese ser un factor que impida dicho desarrollo, publica esta obra sobre "TECNICAS PARA DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS", que seguramente contribuirán grandemente a lograr una mayor sanidad de los productos agrícolas en América Hispana.

Los especialistas dedicados al diagnóstico encontrarán en este libro, tanto las técnicas clásicas aún en uso, como las avanzadas, que aunque laboriosas y costosas son más precisas y serán de uso obligatorio en un futuro cercano, debido a que garantiza la confiabilidad que exigen los sistemas internacionales de comercio.

La ACT del IICA en México contribuye de esta manera a la solución de los problemas fitosanitarios tan complejos en países como los de América Latina, con una topografía accidentada que les confiere una gran variación en climas, con diversos cultivos y consecuentemente con grandes problemas fitosanitarios.

A T E N T A M E N T E

Juan José Salazar Cruz
Representante de la Agencia Cooperación Técnica
del IICA en México

P R E F A C I O

Frente al reto actual que presenta la globalización mundial del comercio, en lo que respecta al intercambio de productos y subproductos derivados de las actividades agropecuarias, dentro de las medidas no arancelarias se aseveran como las más importantes todas las relacionadas con la vigilancia fitosanitaria, basadas en la armonización de diversas técnicas y métodos, entre ellas las de Análisis de Riesgo y de Diagnóstico Fitosanitario, dirigidas a mejorar y mantener la sanidad en los cultivos, sus productos y subproductos.

El Diagnóstico Fitosanitario es una de las actividades determinantes para evitar la introducción de plagas exóticas a un país, salvaguardando su soberanía alimentaria, la salud de sus habitantes, animales y plantas, así como su diversidad biológica. Esta actividad está en constante cambio y modernización por lo que cada vez se generan nuevas técnicas más eficientes.

Como base de todo lo anterior, debe considerarse la capacitación técnica del personal responsable de las inspecciones en puertos, aeropuertos y fronteras, y sobre todo del encargado de realizar los diagnósticos fitosanitarios de productos, no sólo de importación-exportación, para excluir las plagas exóticas, sino también los sujetos al control de su movilización en el interior del país, para garantizar el éxito de las campañas de erradicación y control de plagas ya presentes.

El IICA, en su calidad de Organismo Internacional, está profundamente involucrado en el proceso de modernización y participa activamente con el Grupo de Trabajo sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias del ALCA, cuyo objetivo es asegurar un comercio sin riesgos en este Continente.

El presente Manual sobre **TECNICAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS**, pretende ser un apoyo a todos los técnicos del Hemisferio, especialmente de los países hispanoparlantes, para que mejoren la confiabilidad y oportunidad de los diagnósticos fitosanitarios, en lo cual radica la eficiencia de un país en el manejo de su comercio internacional.

Los especialistas dedicados al diagnóstico encontrarán en este libro, tanto las técnicas clásicas aún en uso, como las avanzadas, que aunque laboriosas y costosas son más precisas y serán de uso obligatorio en un futuro cercano, debido a que garantizan la confiabilidad que exigen los sistemas internacionales de comercio.

DR. CARLOS AQUINO GONZALEZ
DIRECTOR GENERAL DEL IICA

INDICE

I. INTRODUCCION	11
II. HONGOS FITOPATOGENOS	15
III. BACTERIAS FITOPATOGENAS	61
IV. NEMATODOS FITOPARASITOS	99
V. VIRUS, VIROIDES Y OTROS	139
VI. MICOPLASMAS Y ESPIROPLASMAS	209
VII. AGRADECIMIENTOS	223

I. INTRODUCCION

Las enfermedades de las plantas son uno de los factores naturales que más afectan la productividad agrícola. Es común ver cultivos destruidos por los patógenos que llegan a causar daños tan graves, que la cosecha se pierde totalmente.

En algunos casos es relativamente fácil hacer el diagnóstico de la enfermedad, debido a que los síntomas de la misma son tan característicos y exclusivos, que no hay posibilidad de error; como ejemplos pueden citarse: la roya lineal del trigo (*Puccinia striiformis*), el carbón del maíz llamado en México Huitlacoche (*Ustilago maidis*), tumores en el tronco de algunos frutales, rosas, eucalipto, etc. (*Agrobacterium tumefaciens*), agallas en las raíces de muchas plantas herbáceas y leñosas (*Meloidogyne* spp.), el anillo rojo del cocotero (*Radinaphelenchus cocophilus*), etc.

Aunque esto es de mucha utilidad en campo, el diagnóstico se logra únicamente cuando el técnico responsable ha adquirido suficiente experiencia.

Desafortunadamente, la gran mayoría de enfermedades requieren para su diagnóstico de la identificación precisa del patógeno (o patógenos) que las causa, bien sea porque los síntomas que inducen sean tan variables o imprecisos que den lugar a confusión, o porque diferentes patógenos causen un síntoma similar en la misma especie vegetal.

Actualmente existen técnicas que permiten identificar prácticamente a todos los organismos patógenos de las plantas; muchas son muy sencillas, otras lo son menos, pero algunas son tan complicadas que requieren ser realizadas por verdaderos especialistas; tal es el caso de las pruebas bioquímicas y serológicas que son necesarias para identificar virus.

Como puede verse, el diagnóstico de una enfermedad puede ser desde rápido y sencillo hasta difícil y tardado, ya que en el caso de ciertos patógenos que son parásitos

obligados, cuando no se dispone de un laboratorio bien equipado y con personal especializado, la manera de identificarlos es con plantas diferenciales, y se requiere hasta 20 días o más para obtener los resultados.

Dentro de estos dos extremos de dificultad y oportunidad existen todas las variaciones posibles, que dependen también de los objetivos del diagnóstico y de la precisión que se requiera.

El trabajo de laboratorio es sólo una parte del proceso de diagnóstico de una enfermedad; éste se inicia desde el campo, ya que es importante conocer el patrón que presenta la enfermedad en el cultivo, la edad de las plantas atacadas, las partes de las mismas que son afectadas, etc. Todos estos datos, de preferencia obtenidos por quien va a hacer el diagnóstico, son muy importantes, puesto que en el caso de patógenos muy específicos, la especie de planta cultivada de que se trate e incluso la variedad de la misma, así como el estado fenológico susceptible, dan una buena idea del organismo involucrado en la enfermedad. Muchos de los fitopatógenos pueden ser cultivados en medios artificiales, lo que facilita mucho el diagnóstico de las enfermedades.

Debido a los requerimientos nutricionales de cada uno de los organismos patógenos, algunos de los medios de cultivo y técnicas utilizadas para su diagnóstico pueden servir para varios de ellos, pero otros han sido desarrollados para ser utilizados únicamente con una especie de patógeno, e incluso, con una sola variante o raza de la misma.

De lo anterior se deduce que ciertos grupos de patógenos son más fáciles de identificar que otros, debido fundamentalmente a su propia naturaleza, que les confiere características de hábito y velocidad de crecimiento, tamaño, forma, tipo de reproducción, tejido en que se desarrollan o en el que aparecen sus signos, etc.

Para determinar el agente causal de una enfermedad en particular, no es suficiente haber aislado a un organismo patógeno de los tejidos afectados, sino que debe demostrarse que dicho organismo está involucrado, total o parcialmente, en dicha enfermedad, sobre todo en el caso de enfermedades poco comunes, desconocidas, de etiología incierta, o cuando se sospeche que son causadas por más de un patógeno. Para esto es obligatorio realizar los postulados de Koch, que permiten establecer sin lugar a dudas la relación patógeno-enfermedad. En el caso de patógenos que no pueden cultivarse fuera de sus plantas hospedantes, se deben hacer adecuaciones a estos postulados.

Los postulados de Koch exigen que el organismo sospechoso se encuentre permanentemente asociado con la enfermedad en cuestión; que sea aislado, cultivado y purificado para poder ser inoculado en plantas susceptibles; que se reproduzcan los síntomas de la enfermedad en las plantas inoculadas artificialmente, y que pueda ser nuevamente aislado el mismo organismo patógeno de los tejidos enfermos.

En los capítulos siguientes se presentan las técnicas de diagnóstico más comúnmente utilizadas con cada uno de los principales grupos de fitopatógenos.

II. HONGOS FITOPATOGENOS

Los hongos fitopatógenos se reproducen por esporas, formadas en estructuras conocidas como conidióforos, esporangios, ascocarpos, basidios, etc., las cuales son empleadas para la correcta identificación de estos organismos; tales estructuras pueden observarse directamente sobre la superficie del órgano vegetal afectado o dentro de los tejidos, incluso intercelularmente.

No en todos los casos es posible hacer la observación directa de los hongos fitopatógenos en los tejidos, pero afortunadamente muchos de ellos pueden cultivarse en medios sintéticos adecuados para cada especie, lo que es de gran ayuda en el diagnóstico de las enfermedades que causan.

A. DIAGNOSTICO

a. POR OBSERVACION DIRECTA DEL TEJIDO INFECTADO

Muchas veces es posible identificar con seguridad al hongo responsable de una determinada enfermedad por observación directa de los síntomas y/o signos en los órganos afectados; también la especie de planta hospedante puede ser determinante para saber, con absoluta seguridad, de qué patógeno se trata; tal es el caso de los hongos biotróficos como royas en trigo, café, frijol, girasol, entre otros.

Desafortunadamente no es posible hacer un diagnóstico correcto de todas las enfermedades con base en la observación directa del tejido infectado, debido a que muchos hongos fitopatógenos no producen los cuerpos fructíferos requeridos por la taxonomía, sino en condiciones determinadas de temperatura y humedad, como sucede con las cenicillas y las royas.

Además, una sola especie vegetal puede ser atacada por patógenos diferentes que le inducen síntomas similares; tal es el caso de la pudrición radical del clavel, que puede ser causada tanto por *Fusarium oxysporum* como por *F. roseum*.

Por todo lo anterior, se hace necesario realizar una serie de actividades que conduzcan a la identificación precisa del hongo causante de la enfermedad.

b. CULTIVANDOLO EN MEDIO SINTETICO

Este método es en general sencillo, y sólo para algunas especies puede llegar a ser muy laborioso. Esto depende de los requerimientos nutricionales de cada especie en particular, así como de sus exigencias en cuanto a los otros factores que intervienen en su desarrollo.

La base de este sistema de identificación de hongos fitopatógenos son los medios de cultivo, que pueden ser sólidos o líquidos. No obstante, es conveniente aclarar que ciertos hongos, tales como los causantes de royas (salvo algunas excepciones), mildius y cenicillas, no han podido ser cultivados con éxito en un medio nutritivo; éstos son llamados parásitos obligados.

Para la identificación precisa de los hongos que causan enfermedades en las plantas, es indispensable obtener sus cuerpos fructíferos, puesto que se requiere observar la manera en que son producidos, su forma, número de esporas que contienen, etc.; además, en algunos casos es necesario medir las esporas.

Por tal razón, es muy importante tomar en cuenta los componentes de los medios de cultivo, que deben proporcionar todos los elementos que el hongo necesita tanto para desarrollarse como para producir esporas. De igual manera, se debe vigilar que el pH sea ácido (5.5-5.8) puesto que la mayoría de los hongos fitopatógenos se desarrollan mejor en estas condiciones.

Otra consideración muy importante es seguir con cuidado las indicaciones para la preparación de los medios, ya que ciertos componentes de los mismos no pueden ser sobrecalentados. Esta es una de las razones por las cuales la esterilización de los medios de cultivo es una de las fases más delicadas del proceso.

A continuación se presentan algunas de las técnicas empleadas para cultivar a los principales hongos fitopatógenos de importancia económica, utilizando medios de cultivo comunes o específicos que permiten su desarrollo y estimulan la esporulación.

Las fórmulas de los medios de cultivo que se mencionan en el texto, se presentan en el Apéndice que aparece al final de este capítulo; esto se hace para evitar la repetición, ya que un mismo medio puede servir para muchos hongos.

Aphanomyces euteiches.

A. euteiches prospera perfectamente en cualquier medio sintético o natural al que se adicione azufre reducido, por lo que para su desarrollo y producción de oosporas los medios glucosa-acido glutámico, y Hanglud y King ofrecen buenos resultados.

Para obtener producción de zoosporas, el cultivo debe desarrollarse por cinco días a 25-28°C en una decocción de semillas de maíz, garbanzo o de ambos (410 g de semillas por litro de agua). El micelio se desarrolla en la superficie de este medio líquido, formando una nata, la cual se retira y se transfiere a agua corriente; después de 1 a 2 h se retira el agua y se substituye por agua destilada, la cual se mantiene aerada con un burbujeador de pecera. Las zoosporas son liberadas en 6 a 8 h (Llanos, 1959). En 1960, Llanos y Lackwood simplificaron esta técnica.

Alternaria solani.

La esporulación de *A. solani* es inducida al cultivarlo en cajas Petri con PDA básico por 10 a 14 días a temperatura ambiente (20 a 26°C) y bajo luz artificial constante o luz diurna. Sin embargo, el medio ideal es una modificación al PDA llamada P(M)DA.

Pasado el tiempo de incubación, el medio de cultivo con el hongo se corta en tiras o cuadros pequeños de aproximadamente 4 cm, los que se colocan en un matraz con 250 ml de agua esterilizada; se agita vigorosamente el matraz por 1 min y se deja reposar por 10 min. En seguida, del fluido resultante se agregan 1.5 ml a cajas Petri con P(M)DA y se deja incubar a 20°C bajo luz fluorescente constante, o a 23 °C con luz de día.

***Ascochyta* spp.**

Las esporas de *A. chrysanthemi* (*Mycosphaerella ligulicola*) se obtienen a partir de flores o tallos enfermos secados a temperatura ambiente y almacenados en seco. Se procede de la forma siguiente: el material seco se coloca 15 min en agua desionizada para que las esporas salgan del picnidio; posteriormente se filtra con una doble capa de manta de cielo para eliminar los tejidos vegetales, recolectándose la suspensión de esporas.

A. caulicola y *A. meliloti* se desarrollan perfectamente en PDA; se ha observado que la siembra en cajas Petri con este medio, tras un rayado con conidios de diferentes aislamientos de *A. meliloti* (*Mycosphaerella lethalis*) e incubar posteriormente a 4°C por varias semanas y aumentar después la temperatura a 24°C, favorece la formación de pentecios (Latch, 1962).

***Botrytis* spp.**

B. allii produce conidios en PDA, pero para producir grandes cantidades de inóculo se emplea el medio harina de avena-agar, e incubar los cultivos por siete a ocho días a 22°C.

B. cinerea y *B. squamosa* forman abundantes conidios al incubarlos por siete a 10 días bajo luz diurna (12 h diarias) a 21°C, en un medio específico que es sumamente elaborado. En el Apéndice aparece la fórmula, dentro de los ESPECIFICOS.

***Ceratocystis fagacearum*.**

De este hongo existen cepas homotáticas y heterotáticas, y desarrolla perfectamente en medio glucosa-fenilalanina-agar, en el cual produce abundantes esporas.

***Cercospora* spp.**

Para hacer esporular a algunas especies de *Cercospora* se han empleado varios medios a base de decocciones, pero debe aclararse que el medio que es conveniente para una especie puede no serlo para otras.

Un medio a base de decocción de hojas de zanahoria-agar induce la esporulación en varias especies, entre ellas: *C. brachiata*, *C. canescens*, *C. capsici*, *C. festucae*, *C. kikuchii*, *C. penniseti*, *C. pueraicola*, *C. sesami*, *C. sorghi*, *C. stizolobii*, y *C. zebrina*.

Como la profundidad del medio favorece la esporulación, para cultivar estos hongos se deben vaciar 25 ml del medio en cajas Petri de 9 cm de diámetro, lo que proporciona una capa de grosor suficiente.

Claviceps purpurea

Los esclerocios de esta especie se desinfectan superficialmente y se incuban primero sobre una rodaja de PDA por siete días a 20°C; luego se transfieren a cajas Petri con extracto de malta-agar y se dejan incubar por 10 días sobre una charola que imprime a las cajas Petri movimientos oscilatorios (Peach y Loveless, 1975).

Colletotrichum lindemuthianum

Este hongo se desarrolla y forma abundantes conidios en los medios jugo de frijol-agar, neopeptona-glucosa-agar y PDA.

Drechslera spp

Se pueden obtener abundantes conidios de algunas especies de este género en PDA. Además, el medio sucrosa-prolina-agar ofrece excelentes resultados para la esporulación de varias especies de *Drechslera*. El medio lactosa-caseína hidrolizada-agar induce la esporulación de *Drechslera zeicola* (*Cochliobolus carbonus*).

Diplocarpon earliana

Este hongo crece bien y esporula en un medio preparado a base de ejotes-malta-agar. En México se llaman ejotes a las vainas verdes de *Phaseolus vulgaris*.

Fusarium spp

Este género de hongos es muy versátil, y con algunas cepas, incluso de la misma especie, se obtienen a veces resultados erráticos. Se recomienda obtener información

específica sobre la esporulación de las diferentes especies, consultando a Burges (1983), Booth (1971) y otros autores.

Los medios que pudieran ser recomendados como generales para obtener esporulación de *Fusarium* spp son: Medio de Joffe, harina de avena-agar, papa-dextrosa-agar básico y papa-sucrosa-agar. La única diferencia entre los dos últimos medios es que el segundo contiene sucrosa en lugar de dextrosa, lo que incrementa la esporulación de varias especies de *Fusarium* y de muchos otros hongos.

Glomerella cingulata

Este hongo produce abundantes conidios en medio de cultivo jugo de zanahoria-agar; se obtiene mayor producción cuando se fortifica con 50 g por litro de pulpa de naranja fresca (Miller, 1970; Baxter, 1974).

Para la incubación se usan cajas Petri de 9 cm de diámetro con 30 ml de medio, en el cual se dispersa 1 ml de una suspensión hecha con un cultivo esporulante joven; se deja incubar bajo luz diurna (12 h diarias) a 25°C, y si no esporula se someten las cajas a temperaturas alternas de 15 y 25°C (Miller, 1970).

Helminthosporium spp.

Muchas especies de *Helminthosporium* esporulan en el medio sucrosa-prolina-agar, exponiendo los cultivos a alternancia de luz y obscuridad (Shoemaker, 1955; 1962); los peritecios se forman a 20°C.

Por otra parte, Malca (1962) informa que el medio lactosa-caseina hidrolizada-agar induce la esporulación de *Helminthosporium turcicum* (*Trichometasphaeria turcica*). También *Helminthosporium gramineum* (*Pyrenophora graminea*) esporula eficientemente en los medios Czapek-Dox-agar y PDA básico.

Leptosphaerulina briosiana

Las ascosporas de este hongo se obtienen fácilmente en el medio a base de jugo de verduras V8-agar, después de ocho a diez días de incubación a 20°C; las cajas Petri se colocan en posición invertida, bajo luz fluorescente (Raynal, 1975).

Macrophomina phaseolina

Existe un medio específico que contiene asparagina y peptona, en el cual esporula bien *M. phaseolina*; la fórmula de este medio especial aparece en el Apéndice, dentro de los ESPECIFICOS.

También fructifica este hongo en medio líquido de caldo de soya-sucrosa . Para obtener los cuerpos fructíferos, se coloca un litro del medio de cultivo en un matraz de cinco a seis litros de capacidad y se esteriliza a la autoclave; después se siembra con cuatro a cinco discos de una colonia de 15 días de edad, incubada a 30°C (Dhingra y Sinclair, 1975; Ilyas et al., 1976).

Nectria coccinea

Parker (1976) probó con éxito y recomienda el medio llamado extracto de malta-agar para desarrollar colonias de *Nectria coccinea* y obtener sus esporas.

Phymatotrichum omnivorum

Se utiliza un medio de cultivo selectivo que contiene tartrato de sodio, necesario para que esporule este hongo (Woods, Bloss y Gries, 1967). La fórmula del medio aparece en el Apéndice, dentro de los ESPECIFICOS.

Como no es fácil trabajar con este hongo patógeno, se recomienda buscar información adicional, consultando a Lyda y Burnett (1970 y 1971).

***Phytophthora* spp.**

Para la producción de zoosporas en condiciones de cultivo axénico, dependiendo de la especie de que se trate, se deben llevar a cabo pruebas de crecimiento en avena-agar, jugo de verduras V8-agar, medios naturales a base de extractos de alfalfa, frijol lima, etc., o de cocciones de semillas de cebada, avena, cáñamo, etc.

Posteriormente los cultivos experimentales se transfieren a una solución nutritiva pobre en nutrientes, a una solución salina, o a agua destilada, que reemplazan al medio en el

que el hongo se está desarrollando, y se incuba a temperatura ambiente; es esencial cambiar repetidamente las soluciones o el agua durante la incubación.

La calidad del agua que debe utilizarse es de suma importancia; se recomienda emplear agua destilada libre de iones tóxicos, como el cobre, obtenida en un desionizador de vidrio. El uso de agua tratada con agentes quelantes o con carbón vegetal también da buenos resultados.

La incubación bajo luz incrementa la formación de esporangios en muchas especies de *Phytophthora* (Harnish, 1965).

Una vez que los esporangios se han formado, las zoosporas son liberadas si se enfría el cultivo por una hora; la cantidad de zoosporas se incrementa si en el medio de cultivo la concentración de agar es de 0.15 a 0.20% y es nutricionalmente pobre (Schmitthenner, 1959).

Algunos medios selectivos para *Phytophthora* spp son: harina de maíz-agar, recomendado por Tsao y Ocaña (1969) y Mitchell *et al.* (1986) y extracto de malta-dextrosa-peptona-agar.

Con la utilización de este último medio se obtiene abundante producción de esporangios de *Phytophthora cinnamomi*; la colonia se incuba durante tres a cinco días a 25-27°C, después se remueve el medio y se enjuaga el micelio varias veces con agua destilada; en seguida se incuba en un filtrado de suelo no estéril, preparado con suelo secado durante 24 h a 40-43°C ó 72 h a 28°C (Mehrlich, 1935; Royle y Hickman, 1964).

Otra posibilidad de obtener esporangios de esta especie, es desarrollar primero al hongo en PDA o jugo de verduras V8-agar por tres a cinco días; después, se corta la colonia en discos que se colocan en PDA, complementado con un filtrado de suelo no esterilizado, y se dejan incubar por 48 h a 24°C (Zentmyer, 1959).

Para la esporulación de *Phytophthora parasitica* se han desarrollado diversas metodologías; entre ellas sobresalen las propuestas por Menyonga y Tsao (1966), Klotz y De Wolfe (1960) y Grimm y Hutchinson (1973).

Para que el hongo desarrolle, se siembra en matraces de 250 ml con 100 ml de medio líquido a base de caldo de frijol lima, incubándolo después por tres a cinco días; después se separa el micelio pasando el caldo por una tela, y se enjuaga con agua de lluvia.

La masa micelial obtenida se fracciona en una licuadora, haciéndola girar por un segundo, y se distribuye en cajas Petri grandes a las que se agrega suficiente agua de lluvia, pero cuidando que el micelio no quede sumergido; se deja incubar por 18 a 20 h a temperatura ambiente para que se liberen las zoosporas, lo que se incrementa con agitación y agregando más agua de lluvia aerada.

Para la producción de esporangios de esta especie se usa también agua de lago esterilizada, en placas Petri grandes, incubando por dos días a 25°C (Webster y Dennis, 1967). Una vez obtenidos los esporangios, las zoosporas se obtienen a una temperatura de 15°C, remplazando el agua de lago por agua desionizada esterilizada; después la suspensión es filtrada en tela para obtener la suspensión de zoosporas. Esta metodología se recomienda cuando se requieren grandes cantidades de inóculo.

El medio jugo de verduras V8-agar es excelente para obtener esporas de *Phytophthora cryptogea*. Los cultivos se mantienen bajo luz fluorescente a 25°C y después se inundan con agua desionizada por siete días; pasado este tiempo, las cajas Petri se someten a una temperatura de 9°C por 20 min, lo que ayuda a la liberación de las zoosporas (Mitchell, *et. al.*, 1978).

Phytophthora infestans desarrolla perfectamente en medio frijol lima-agar (Thurston, 1957), pero para la producción de esporangios y zoosporas a gran escala el medio a base de semillas de chícharo es más eficiente. Después de incubar al hongo por 10 días a 20°C en cualquiera de los dos medios, se agrega agua corriente esterilizada y se vuelve a incubar por dos a tres días.

Pythium spp.

Muchas especies de *Pythium* son fácilmente aisladas de los tejidos de las plantas cuando las infecciones son incipientes, desinfectándolos primero y colocándolos posteriormente sobre medio agua-agar a 2% o en un medio pobre en nutrientes, como harina de maíz-agar.

Cuando se trata de suelo infestado con alguna especie de este género, frecuentemente se dificulta aislarla, porque siempre están presentes bacterias y otros hongos competidores; consecuentemente, el uso de medios selectivos es obligado para facilitar esta tarea; Mitchell y Rayside (1986) recomiendan el penicilina-vancomicina-pimaricina (PVP), con el que se obtienen buenos resultados.

Para obtener las esporas de *Pythium ultimum*, OHH *et al.* (1978) obtuvieron cepas desarrollando al hongo en PDA; posteriormente, sembraron varios discos de una misma colonia de cinco días de edad en caldo de maíz, permitiendo su desarrollo por otros cinco días, o los cultivaron en vermiculita-jugo de verduras V8 por dos semanas; en ambos medios el hongo produjo abundantes esporas.

La especie *Pythium middletoni* se desarrolla bien en el medio semillas de cáñamo-agar; para la producción de zoosporas se cortan discos del medio de cultivo y se colocan en 20 ml de agua de charca o extracto de suelo, y se incuba por 15 h a 15°C (Webster *et al.*, 1967).

Pyricularia oryzae

P. oryzae esporula en el medio pulido de arroz-agar (Fasli y Schroeder, 1966). Los medios sintéticos específicos para esta especie, conocidos como A, B, y C, ofrecen buenos resultados para obtener las esporas (Ou, 1972). Los componentes de estos medios se presentan en el Apéndice, dentro de los ESPECIFICOS.

Rhynchosporium secalis

Se obtiene abundante producción de conidios de este hongo sembrando una suspensión de ellos en los medios jugo de verduras V8-agar o frijol lima-agar (Evans y Griffith, 1971).

Rhizoctonia solani

Este hongo desarrolla sobre PDA hecho con papas frescas; los esclerocios normalmente se forman 10 días después de iniciada la incubación (Manning *et al.*, 1970).

Sclerotium spp

Para la obtención de abundante micelio de algunas especies de este hongo, se cultivan primero en PDA o en medio Czapek-Dox-agar. Después de cuatro semanas de incubación,

el micelio y el medio se fragmentan en una licuadora por 30 segundos y se pasa la mezcla por un tamiz de 0.18 mm entre mallas para retener el micelio, que se enjuaga con agua corriente (Adams y Papavizas, 1971).

A partir del micelio, se obtiene producción a gran escala de esclerocios sembrándolo en el medio arena-harina de maíz (20:1 p/p) que incuba por tres a cuatro semanas a 20°C. Pasado este tiempo se lava siete u ocho veces (Coley-Smith, 1959).

Stemphylium spp

El jugo de verduras V8-agar es un medio en el cual esporulan muchas de las especies de *Stemphyllium*. Sin embargo, para la esporulación de *S. boliki*, *S. floridanum* y *S. solani*, el medio ideal es peptona-dextrosa-agar (Sober y Seymour, 1963).

Thielaviopsis basicola

T. basicola se reproduce sobre Czapek-Dox-agar o jugo de verduras V8-agar, pero para realizar infestaciones de campo que requieren de grandes cantidades de inóculo, se recomienda cultivar al hongo en medio líquido papa-dextrosa (Papavizas y Adams, 1969; Mathre *et al.*, 1966).

Verticillium spp

Para una abundante producción de conidios de especies de este género de hongos se usa el medio Czapek-Dox-agar, incubándolos bajo luz difusa por siete días a 20-24°C (Hall y Ly, 1972).

B. METODOS DE PRESERVACION DE HONGOS

En todos los laboratorios de diagnóstico de enfermedades de las plantas, es necesario mantener una colección de especies de patógenos que, perfectamente identificadas, puedan servir de referencia en identificaciones subsecuentes.

En el caso de los hongos, la colección de especies consiste en preservar el micelio (con o sin esporas) en tubos de ensaye. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la

transferencia a medio de cultivo nuevo, a intervalos regulares, trae como consecuencia que las especies fitopatógenas se adapten a desarrollar como saprófitas y pierdan su potencial patogénico y/o capacidad para esporular. Por otra parte, los hongos bajo cultivo permanente pueden experimentar cambios en su morfología, que crean confusión en su identificación.

Para evitar o reducir estos problemas, los fitopatólogos han desarrollado diferentes técnicas de preservación. De acuerdo con Dingra y Sinclair (1985), algunas de las más comúnmente usadas son:

a. LIOFILIZACION

La liofilización es un método muy usado en la preservación de microorganismos. Todas las bacterias y levaduras soportan satisfactoriamente la liofilización; también se conocen casos exitosos de preservación de muchas especies de hongos hasta por 17 a 24 años. No obstante, cabe aclarar que algunos hongos no sobreviven a la liofilización; tal es el caso de *Botrytis* spp, *Sclerotinia convoluta* y *Monilinia fructicola*.

En especies de *Pythium* y *Phytophthora* es comúnmente usado; también las royas pueden ser conservadas hasta por cinco a nueve años, observándose que su viabilidad declina después de los 10 años (Flor, 1967; Kilpatrick *et al.*, 1971; Sharp y Smith, 1952).

La liofilización tiene como principio la reducción de la cantidad de agua en las esporas (hasta del 2 a 3%) por secado al alto vacío, y su posterior almacenamiento en ausencia de oxígeno y vapor de agua. Los detalles de la técnica varían con la especie de organismo de que se trate y con el tipo de liofilizador que se use. Cuando no se tiene experiencia, es recomendable basarse en la literatura y experimentar hasta obtener resultados satisfactorios.

1. TECNICA BASICA

Los pasos básicos son:

- Precongelar una suspensión de esporas.
- Secar al vacío las esporas en un estado de congelación a bajas temperaturas, teniendo cuidado de no suspender bruscamente el vacío porque se puede dañar el material.

- Continuar el secado al vacío a temperatura ambiente.
- Sellar las ampulas al vacío con flama directa.

Generalmente, la suspensión de esporas que se van a liofilizar se prepara en un coloide, usando leche descremada, suero o en su defecto glucosa o sucrosa a 10% (Flor, 1967; Sharp, 1952; Baxter, 1974). Es necesario advertir que muchas uredosporas de roya no sobreviven en el medio de suspensión y pierden su viabilidad antes de ser liofilizadas (Flor, 1956; Sharp y Smith 1952; Hughes, 1964).

La manera general de proceder es como sigue:

En el fondo de las ampulas para liofilizar, esterilizadas, se colocan de 0.1 a 0.3 ml de la suspensión de esporas con una pipeta también esterilizada. Las ampulas se taponan con algodón esterilizado, dejando un espacio de 3 a 4 cm entre éste y la suspensión.

Después de preparar un número suficiente de ampulas, se puede realizar la liofilización con alguna de las siguientes variantes de la técnica:

Método NRRL

Pegar las ampulas al múltiple del aparato y bajar éste por 1 a 3 min a la tina que contiene la mezcla de congelación, que está a una temperatura de -30 a -45°C. La mezcla congelante está compuesta de hielo seco con acetona, etanol 95% o etilen-glicol.

Después se hace el vacío, iniciando la evacuación en 25 hasta alcanzar 500 mm Hg; una vez alcanzado este nivel, se mantiene por 2 h.

Durante la primera fase, o período primario de secado, se baja gradualmente la temperatura hasta -10°C, agregando más mezcla de congelación; este período dura de 30 a 60 min, pero algunos investigadores prefieren prolongarlo hasta por 6 h.

Concluida la primera fase, se vuelve a sumergir gradualmente el múltiple en la mezcla congelante y se continúa con la evacuación por 30 a 60 min adicionales. Enseguida se sellan las ampulas al vacío *in situ*, rotándolas mientras están calientes; después se desprenden jalándolas despacio, para completar el sellado.

2. MODIFICACION LLAMADA METODO PRL

En esta variante, antes de colocar las ampulas en el aparato liofilizador, se deposita en ellas la suspensión de células y se congelan en la mezcla de hielo seco con acetona o en un congelador. El secado primario se hace al vacío durante 10 a 12 h a temperatura ambiente, en un desecador preenfriado.

Terminada esta fase se montan las ampulas al múltiple del aparato liofilizador y se continúa la deshidratación por 30 a 60 min; pasado este tiempo y aún bajo vacío, se sellan las ampulas *in situ*.

Durante la liofilización de uredosporas de roya o teliosporas de *Ustilago avenae*, el preenfriado es innecesario, e incluso puede ser perjudicial; por esta razón, el proceso completo se lleva a cabo a temperatura ambiente, pero efectuando el secado también al vacío (Flor, 1967; Sharp y Smith, 1952 y 1957).

Esta metodología básica de liofilización debe ser modificada cuando se usan aparatos de la marca Bellco o Virtis. En ambos casos, las ampulas con las esporas son congeladas en la mezcla acetona-hielo seco, y rápidamente pegadas al múltiple del aparato, continuando en seguida con la evacuación para hacer el vacío. Se procede así porque en estos liofilizadores se puede lograr un vacío de 500 mm Hg en 2 a 3 min.

Existen otras modificaciones a la técnica básica de liofilización; entre ellas pueden mencionarse las que siguen:

3. TECNICA SIMPLIFICADA

Colocar de 0.1 a 0.2 ml de la suspensión de células (no debe excederse de 0.2 ml) en el fondo de un tubo para liofilización esterilizado, de 25 a 30 x 0.8 cm; insertar un tapón de algodón esterilizado hasta que quede a 8 cm arriba de la suspensión; encima del algodón agregar una capa de 5 a 8 cm de desecante. Originalmente fue usado como desecante P_2O_5 , pero el $CaCl_2$, $CaCO_4$, $MgClO_4$ o el sílica-gel ofrecieron mejores resultados (Flor, 1967; Sharp, 1952 y 1957).

Después de agregar el desecante se coloca un segundo tapón de algodón y se sumerge el tubo en la mezcla congelante. Se procede a evacuar individualmente por 1 a 2 min el aire de los tubos, usando una bomba de vacío de alta capacidad.

Las muestras dentro de los tubos se mantienen congeladas en una capa de hielo seco en polvo, que debe quedar por encima del nivel de la muestra. Los tubos bien tapados se pasan del hielo seco a una gradilla, la cual se coloca en una bandeja con hielo y sal, que se mete en el congelador a una temperatura de -5 a -10°C por 2 a 4 h. Pasado este tiempo se sellan los tubos por abajo del desecante, 4 a 5 cm por encima de la muestra.

4. CASO PARTICULAR DE UREDOSPORAS DE ROYAS

El proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente, sin utilizar ningún medio para suspender las uredosporas. En las ampulas se depositan de 3 a 5 mg de esporas y se coloca un tapón de algodón en el cuello de la ampula; encima del algodón se agregan de 3 a 5 mg de desecante (CaCl_2); se montan las ampulas al múltiple del liofilizador para evacuar el aire por 3 a 5 min a 50 mm Hg; después se sellan por debajo del algodón (Flor, 1967 y Sharp y Smith, 1952 y 1957).

5. OTRAS APLICACIONES (SECADO Y ALMACENADO AL VACIO)

Roane (1973) menciona que esta modificación de la técnica de liofilización fue desarrollada para conservar especies de *Diaporthe*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Pseudomonas* y *Rhynchosporium*, que permite mantenerlas viables por más de 15 años. En el caso de especies de *Phytophthora* y *Phythium* la conservación es sólo por dos años.

La técnica consiste en lo siguiente: en las cajas Petri con un medio adecuado en donde se ha desarrollado el organismo, se colocan cuentas de vidrio, semillas pequeñas o fragmentos pequeños de madera, esterilizados previamente. Una vez que han sido completamente cubiertos estos materiales por el micelio, se transfieren porciones a ampulas esterilizadas que se taponan con algodón, para evacuarlas por 4 h a temperatura ambiente; la evacuación debe hacerse a no menos de 100 mm Hg. Las ampulas se sellan bajo vacío y se almacenan en refrigeración.

b. PRESERVACION EN ACEITE MINERAL

Este método es aplicable a muchos hongos filamentosos, actinomicetos, estreptomicetos, levaduras, etc.; también es ampliamente usado con varios ficomicetos. Es

importante aclarar que no es posible conservar bajo aceite mineral a hongos que producen ácidos o licúan el medio.

El tiempo que pueden conservarse los hongos con este método varía según la especie; así, por ejemplo: *Diplodia zea*, *Gibberella zea*, *Cochliobolus heterostrophus* y *Nigrospora oryzae* pueden ser almacenados por cuatro años; en cambio *Monilinia fructicola* y *Venturia inaequalis*, sólo por dos años.

Por otra parte, la patogenicidad de algunas especies de *Phytophthora* se reduce, pero no se pierde totalmente. Por la misma razón, no es recomendable almacenar *Fusarium* spp bajo aceite mineral (Dirgra y Sinclair, 1987).

Cuando los hongos van a preservarse por este método, es conveniente desarrollar las colonias en tubos que contienen un medio con agar inclinado, que permita el crecimiento con o sin esporulación. Una vez que la colonia ha crecido, en condiciones asépticas deben cubrirse los cultivos con una capa de aceite mineral esterilizado, de aproximadamente 1 cm de grosor, sobre el cultivo inclinado.

Debe emplearse aceite mineral de uso médico, con una gravedad específica de 0.86 a 0.89. Se esteriliza durante 1 a 2 horas a 170°C; después se deja reposar por 24 horas y se somete nuevamente a las mismas condiciones de esterilización. Para evitar que se contamine es recomendable esterilizarlo en recipientes pequeños, lo que evita guardar sobrantes.

Los tubos con los hongos y el aceite mineral pueden ser almacenados en el refrigerador o a temperatura ambiente.

Para recuperar el cultivo, se remueve del tubo una pequeña cantidad de micelio con o sin esporas, se elimina el exceso de aceite y se raya sobre la superficie de un medio sintético adecuado, en cajas Petri. Frecuentemente el primer subcultivo crece lentamente, siendo necesarias dos a tres transferencias para restaurar el vigor normal de la colonia. Si se va a renovar la cepa, se procede de la misma manera, pero la transferencia se hace a tubos con medio inclinado.

c. CONSERVACION EN SECO

Algunos hongos pueden sobrevivir largos períodos de almacenamiento en medio de cultivo que se deja resecar, o cuando los tejidos enfermos son prensados, secados y almacenados con baja humedad en un refrigerador.

Cochliobolus heterostrophus es una especie que puede ser conservada por este método; otro caso es el de *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, en el que al secar las hojas de cebada enfermas, las ascosporas retienen su viabilidad y patogenicidad por 13 años, manteniéndolas a 10°C (Moseman y Power, 1957).

d. ALMACENAMIENTO EN AGUA

Varios hongos fitopatógenos pueden ser almacenados en agua esterilizada, incluyendo a *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium cepivorum* y especies de *Fusarium* y *Phytophthora* que pueden mantener así su viabilidad por 14 a 18 meses (Boesewinkel, 1976). El Commonwealth Mycological Institute (CMI) almacena varias especies de *Phytophthora* y de *Pythium* en agua.

e. ALMACENAMIENTO EN SILICA-GEL

El CMI recomienda el uso de sílica-gel cuando la liofilización no puede aplicarse; Perkins (1962) afirma que los resultados obtenidos con estas dos técnicas son comparables.

Este método fue desarrollado inicialmente para almacenar *Neurospora* spp., pero varias especies de otros géneros de hongos pueden preservar así su viabilidad por cuatro a cinco años. También ha dado buenos resultados con las razas O y T de *Drechslera* = *Cochliobolus heterostrophus* (Sleesman et al., 1974).

La recuperación del cultivo, a partir de esporas conservadas en sílica-gel, es fácil, y una misma cepa puede ser usada para hacer cultivos periódicos.

El método consiste básicamente en esterilizar el sílica-gel de seis a 22 mallas, con calor seco a 180°C por 90 minutos, y almacenarlo en recipientes sellados herméticamente. Los hongos se desarrollan previamente en un medio adecuado que se mantiene inclinado; cuando el hongo esporula, se suspenden las esporas en leche a la que se le ha dejado solamente 10% de crema preenfriada a 4°C, manteniendo el recipiente en agua fría a esa temperatura.

Se va agregando la suspensión de esporas sobre el sílica-gel, en proporción de 0.5 ml de leche por cada 4 g del desecante; se deja el recipiente por 30 min en agua fría y se

almacena después a temperatura ambiente por una a dos semanas con la tapa floja. Pasado este tiempo se debe comprobar la viabilidad del inóculo, derramando algunos cristales de sílica-gel sobre un medio adecuado; si hay desarrollo del hongo es que son viables las esporas y entonces se cierra herméticamente el recipiente, se etiqueta correctamente y se almacena a 4°C.

El almacenamiento a temperatura ambiente tiene el inconveniente de que la viabilidad de las esporas puede perderse en corto tiempo.

f. ALMACENAMIENTO EN SUELO

Otra manera de preservar hongos, es utilizando suelo. Por ejemplo, algunas especies de *Phoma*, *Phyllosticta* y *Fusarium* pueden ser almacenadas en suelo por dos a cinco años (Bakerspingel, 1953 y 1954).

De esta técnica hay dos variantes:

En la primera de ellas se esteriliza el suelo, se infesta con una pequeña cantidad de inóculo, se deja secar y se almacena en el refrigerador.

La manera común de proceder es la siguiente:

- Tamizar suelo arcilloso con 20% de humedad.
- Agregar 5 g de este suelo a cada tubo de ensayo y cerrarlos con tapa de rosca o con algodón.
- Esterilizar tubos y suelo durante 48 h y dejarlos enfriar.
- Agregar 1 ml de suspensión concentrada de esporas del hongo que se quiera preservar.
- Mezclar, y a temperatura ambiente permitir que el suelo se seque, dejando floja la tapa del tubo durante una semana.
- Cerrar herméticamente los tubos y almacenarlos en el refrigerador.

En la segunda variante de esta técnica, el suelo se infesta primero con el hongo y se incuba para permitir su desarrollo; después se seca para preservar lo que sería en sí la segunda generación del patógeno.

Una tercera variante de esta técnica es la siguiente: en frascos con tapas de rosca se deposita suelo esterilizado que se inocula con discos de PDA en los cuales se desa-

rolló el hongo. Los frascos se mantienen por 14 días a temperatura ambiente hasta que se observa buen crecimiento de micelio; entonces se almacenan en el refrigerador. Con este método se ha podido almacenar *Helminthosporium victoriae* durante 12 años sin observar cambios.

C. APENDICE

MEDIOS DE CULTIVO

AGUA-AGAR (AA)

Ingredientes:

Agar	20.0 g
Agua destilada	1 litro

Preparación:

Disolver el agar en el agua, calentándola. Ajustar el pH con un indicador colorimétrico o con un potenciómetro, adicionándole 1N HCl o NaOH. Vaciar el medio en tubos, matraces o botellas taponadas con algodón o con sus tapas de rosca y esterilizarlas en autoclave.

ARENA-HARINA DE MAIZ

Ingredientes:

Arena fina de río	1000.0 gr
Harina de maíz	200.0 gr
Agua	200.0 ml

Preparación:

Mezclar la arena de río tamizada, la harina de maíz y el agua en una proporción 5:1:1. Puede utilizarse vermiculita en substitución de la arena.

CALDO DE MAIZ**Ingredientes:**

Semillas de maíz	10
Agua destilada	50 ml

Preparación:

Poner las 10 semillas de maíz en los 50 ml de agua destilada; someter a la autoclave por 20 minutos a 121°C.

CALDO DE FRIJOL LIMA**Ingredientes:**

Frijol lima	100.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Hervir el frijol lima en un litro de agua, filtrar a través de tela y completar el volumen a un litro con agua esterilizada.

CALDO PAPA-DEXTROSA**Ingredientes:**

Papa pelada	200.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Cocer las papas peladas y rebanadas en un litro de agua, filtrar en tela, ajustar el volumen y agregar de 10 a 20 g de dextrosa.

CALDO SOYA-SUCROSA**Ingredientes:**

Semillas de soya	100.0 g
Sucrosa	20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Hervir las semillas de soya en un litro de agua y después filtrar el caldo con tela desechando los granos; ajustar el volumen a un litro y agregar la sucrosa.

CZAPEK-DOX-AGAR.**Ingredientes:**

Sucrosa	30.0 g
KCl	0.5 g
NaNO ₃	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g
Agar	20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Si se usa agua destilada en un destilador de vidrio, agregarle 1 ml de ZnSO₄ a 1% y 1 ml de CuSO₄ a 0.5%; después se agregan los ingredientes y se calienta durante 15 min en baño María hasta la completa disolución de las sales; la sucrosa se disuelve por separado, y cuando la solución ya esté fría, se agrega junto con el agar. Finalmente se esteriliza en la autoclave; no debe filtrarse.

DECOCCION DE HOJAS DE ZANAHORIA-AGAR.**Ingredientes:**

Hojas de zanahoria	300.0 g
Agar	12.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Moler finamente las hojas de zanahoria y mezclarlas con 500 ml de agua destilada; cocerlas al vapor durante una hora y filtrar la pasta resultante; separadamente disolver los 12 g de agar en los 500 ml de agua restantes y mezclarlos perfectamente con el filtrado; ajustar el volumen a un litro y esterilizar al vapor por una hora. Es importante aclarar que la esporulación de los hongos no ocurre si el medio es esterilizado bajo presión, es decir, en la autoclave (Kilpatrick y Johnson, 1956).

EJOTES-MALTA-AGAR**Ingredientes:**

Vainas de frijol	200.0 g
Extracto de malta	5.0 g
Agar	17.0 g
Sucrosa	5.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Cocer las vainas tiernas de frijol en 700 ml de agua, filtrar y agregar al agua de cocción el extracto de malta y el agar; separadamente disolver los 5 g de sucrosa en 200 ml de agua; esterilizar en la autoclave por separado y posteriormente mezclar (Dhanvantari, 1967).

ESPECIFICO PARA LA ESPORULACION DE *Botrytis cinerea* y *B. squamosa***Ingredientes:**

Extracto de levadura	2.5 g
Extracto de malta	7.5 g

Caseína hidrolizada	0.25	g
Nucleato de Na	0.1	g
Solución de microelementos	1.0	ml
Agar	15.0	g
Caldo Czapek-Dox	1	litro

La solución de microelementos contiene, por litro de agua:

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	723.5 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	203.0 mg
H_2MoO_3	2.0 mg
H_3Bo_3	2.0 mg

El caldo Czapek-Dox se prepara como se indicó, pero sin el agar.

Preparación:

Se mezclan todos los componentes en el caldo Czapek-Dox y se esteriliza en la autoclave.

ESPECIFICO PARA *Macrophomina phaseolina*.

Ingredientes:

Glucosa	20.0 g
Peptona	20.0 ó 40.0 g
DL-asparagina	15.0 ó 20.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6 g
KH_2PO_4	1.0 g
Agar	20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien y ajustar el volumen a un litro. Una vez que todo esté bien disuelto, esterilizar en la autoclave a 120°C durante 15 min.

ESPECIFICO PARA *Phymatotrichum omnivorum***Ingredientes:**

Glucosa	2.0	%
Tartrato de sodio	1.0	ug/ml
KNO ₃	0.0008	M
Ca(NO ₂) ₂ .4H ₂ O	0.001	M
SO ₄ .7H ₂ O	0.00015	M
KCl	0.0087	M
KH ₂ PO ₄	0.00008	M
Agar	2.5	g
Agua	1	litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien y ajustar el volumen a un litro. Una vez que todo esté bien disuelto, esterilizar en la autoclave a 120°C durante 15 min.

ESPECIFICOS PARA *Pyricularia oryzae*

Estos son tres medios, A,B y C, cuya composición se indica a continuación:

MEDIO A:**Ingredientes:**

Sucrosa	15.0 g
NH ₄ NO ₃	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.75 mg

MnSO ₄ .5H ₂ O	0.22 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.60 mg
ZnCl ₂	7.50 mg
H ₃ BO ₄	0.9 mg
Biotina	5.0 ug
Tiamina	2.5 mg
Agua	1 litro

MEDIO B**Ingredientes:**

Sucrosa	30.0 g
KNO ₃	3.0 g
Urea	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.1 g
FeSO ₄ .5H ₂ O	0.75 mg
MnSO ₄ .5H ₂ O	0.22 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.6 mg
ZnCl ₂	7.5 mg
H ₃ BO ₄	0.09 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.06 mg
Biotina	5.0 ug
Tiamina	1.0 mg
Agua	1 litro

MEDIO C**Ingredientes:**

Sucrosa	15.0 g
KNO ₃	1.0 g

KH_2PO_4	0.25 g
K_2HPO_4	0.25 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
NH_4 citrato. H_2O	1.0 g
Na-glutamato	1.0 g
Na-acetato	0.25 g
Na-tioglicolato	0.1 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.75 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.22 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.60 mg
ZnCl_2	7.50 mg
Biotina	1.0 ug
Tiamina	2.0 mg
Agua	1 litro

Preparación:

Para cada uno de los medios A, B y C, en 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, excepto la biotina y tiamina, revolver bien, ajustar el volumen a un litro y esterilizar en la autoclave. Al enfriarse (43-45 °C) agregar las vitaminas mencionadas y mezclar bien.

EXTRACTO DE MALTA AGAR**Ingredientes:**

Extracto de malta	20.0 g
Agar	20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Se prepara calentando el agua con el extracto de malta hasta que se disuelva; entonces se agrega el agar y se sigue calentando hasta que el agar también se disuelva. El medio queda con un pH de 3.0 a 4.0 y hay que ajustarlo a 6.5 con NaOH.

EXTRACTO DE MALTA-DEXTROSA-PEPTONA-AGAR

Ingredientes:

Extracto de malta	5.0 g
Dextrosa	15.0 g
Peptona	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Agar	15.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien y ajustar el volumen a un litro; cuando todo esté bien disuelto, esterilizar.

FRIJOL LIMA-AGAR

Ingredientes:

Frijol lima	50.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Remojar las semillas de frijol lima durante 10 h en 500 ml de agua en la que previamente se han disuelto los 15 g de agar. Ajustar el volumen a un litro y esterilizar en la autoclave.

GLUCOSA-ACIDO GLUTAMICO

Ingredientes:

Glucosa	12.5 g
---------	--------

D-ácido glutámico	3.3 g
DL-metionina	150 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	110 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	400 mg
Fc	11 mg
Zn	0.7 mg
Boro	0.01 mg
Mn	0.1 mg
Mo	0.02 mg
Agua	1 litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien y ajustar el volumen a un litro. Cuando todo esté perfectamente disuelto, esterilizar en la autoclave.

GLUCOSA-FENILALANINA-AGAR**Ingredientes:**

Glucosa	3.0 g
Fenilalanina	0.5 g
Biotina	5.0 mg
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Zn	0.2 mg
Fe	0.2 mg
Mn	0.2 mg
Agar	20.0 gr
Agua	1 litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien, ajustar el volumen de agua a un litro, y el pH, a 6 ó 7.

HANGLUND Y KING**Ingredientes:**

Dextrosa	5.0 g
L-asparagina	0.75 g
L-metionina o L-cistina	20.0 mg
MgCl ₂	50.0 mg
K ₂ HPO ₄	2.0 g
Cloruro de Mn	5.0 mg
Cloruro de Zn	5.0 mg
Cloruro de Fe	5.0 mg
Agua	1 litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien y ajustar el volumen a un litro. Disolver bien y esterilizar.

HARINA DE AVENA-AGAR**Ingredientes:**

Harina de avena	100.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 litro

Preparación:

Mezclar la harina de avena con agua a 70 °C y mantenerla alrededor de una hora a 60 °C. Después completar el volumen a un litro de agua y añadir el agar, volviendo a calentar para que se funda. Vaciar el medio en tubos y esterilizarlos en la autoclave.

HARINA DE MAIZ-AGAR (POBRE EN NUTRIENTES)**Ingredientes:**

Harina de maíz	40.0 g
Agar	15.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Colocar los 40 g de harina de maíz en un litro de agua y calentar a 58 °C (nunca por encima de 60°C) por una hora. Filtrar con papel filtro, agregar los 15 g de agar y una vez disuelto esterilizar en la autoclave por 15 min a 115 °C.

HARINA DE MAIZ-AGAR (Fórmula según Tsao y Ocaña, 1969)**Ingredientes:**

Harina de maíz-agar (Difco)	17.0 g
Hymexazol	50.0 mg
Pimaricina	10.0 mg
Vancomicina	200.0 mg
PCNB (fungicida)	100.0 mg
Agua desionizada	1 litro

Preparación:

Disolver la harina de maíz-agar en un litro de agua desionizada y esterilizar a 120 lb durante 15 min. Posteriormente, cuando la temperatura esté a 43–45 °C (se soporta el matraz en la mano) entonces se agrega el resto de los ingredientes.

HARINA DE MAIZ-AGAR (Fórmula según Mitchell *et al.*, 1986).**Ingredientes:**

Harina de maíz agar (Difco)	17.0 g
-----------------------------	--------

Ampicilina	250.0 mg
Hymexazol	50.0 mg
PCNB (fungicida)	100.0 mg
Piramicin	10.0 mg
Rifampicina	10.0 mg
Agua	1 litro

Preparación:

Se prepara de la misma forma que la anterior.

JOFFE**Ingredientes:**

Almidón en polvo	0.2 g
Glucosa	0.2 g
Sucrosa	0.2 g
KH_2PO_4	1.0 g
KNO_3	1.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
KCl	0.5 g
Agar	15.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, mezclar bien y ajustar el volumen a un litro. Después de que todos los ingredientes estén disueltos perfectamente, esterilizar en la autoclave.

JUGO DE FRIJOL-AGAR**Ingredientes:**

Jugo de vainas verdes de frijol	570.0 ml
---------------------------------	----------

Agar	20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Después de obtener en un extractor el jugo de las vainas de frijol, se mezclan 430 ml con 570 ml de una solución de agar a 2%, que se logra disolviendo en la licuadora los 20 g de agar; la mezcla se esteriliza después en autoclave (Romanowski, 1962).

JUGO DE VERDURAS V8-AGAR**Ingredientes de la fórmula común:**

Jugo V8 (marca Herdez en México)	200.0 ml
CaCO ₃	3.0 g
Agar	10.0 a 20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Se mezclan perfectamente todos los ingredientes y se esteriliza. La opacidad es eliminada centrifugando parcialmente el jugo o filtrándolo primero con una capa sencilla de papel filtro y luego con una doble. El jugo de verduras V8-agar es un medio en el que esporulan muchos hongos; esta fórmula básica puede ser modificada, haciendo variar la cantidad de jugo o de CaCO₃; en estos casos el pH puede variar entre 7.0 y 7.5.

JUGO DE ZANAHORIA-AGAR**Ingredientes:**

Jugo de zanahoria	125 a 750 ml
Streptomycina o penicilina	100 mg
Agar	15.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Se mezclan 125 a 750 ml de jugo de zanahoria con los demás ingredientes, se afora a un litro con el agua, se ajusta el pH a 5.1 ó 5.5 y se esteriliza en la autoclave a 120°C por 15 min.

LACTOSA-CASEINA HIDROLIZADA-AGAR**Ingredientes:**

Lactosa	37.5 g
Caseína hidrolizada	3.0 g
Solución de microelementos	2.0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Agar	10.0 g
Agua	1 litro

La solución de microelementos contiene, por litro de agua:

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	439.8 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	203.0 mg
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	723.5 mg

Para aclarar esta solución, se debe agregar gota a gota H₂SO₄ mientras se agita.

Preparación del medio:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien y ajustar el volumen a un litro. Una vez bien disueltos todos los componentes, esterilizar en la autoclave.

LIQUIDO DE SEMILLAS DE CHICHARO**Ingredientes:**

Semillas secas de chícharo amarillo.

Agua en cantidad suficiente.

Preparación:

Remojar durante toda la noche las semillas secas de chícharo amarillo; colocar una capa de 2 a 3 cm de chícharos remojados en el fondo de un matraz y agregar agua hasta cubrirlos; por último, esterilizar en la autoclave.

NEOPEPTONA-GLUCOSA-AGAR

Ingredientes:

Glucosa	2.8 g
Neopeptona	2.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.23 g
KH ₂ PO ₄	2.72 g
Agar	20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien y ajustar el volumen a un litro. Después de que estén bien disueltos, esterilizar en la autoclave.

PAPA-DEXTROSA

Ingredientes:

Papa pelada y rebanada	200.0 g
Dextrosa	10.0 a 20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Hervir en un litro de agua las papas peladas y rebanadas hasta que estén blandas, después filtrar el cocido y completar nuevamente a un litro con agua destilada.

Agregar 10 a 20 g de dextrosa; agitar vigorosamente y esterilizar en el autoclave a 120°C durante 15 min.

PAPA-SUCROSA-AGAR.

Ingredientes:

Papas peladas y rebanadas	1.8 Kg
Sucrosa	20.0 g
Agar	20.0 g
Agua	5 litros

Preparación:

Previamente se prepara un caldo hirviendo por 10 min las papas peladas y rebanadas en 4.5 litros de agua; se filtra este cocido y se conserva en el refrigerador para usarlo posteriormente. Para preparar el medio se mezclan 500 ml del caldo de papa con 500 ml de agua; se agregan después la sucrosa y el agar. La mezcla se calienta hasta que todo esté perfectamente disuelto; finalmente, el pH se ajusta a 6.4 con CaCO_3 y se esteriliza en la autoclave.

PAPA-DEXTROSA-AGAR (PDA) BASICO

Ingredientes:

Papas peladas y rebanadas	200.0 g
Dextrosa	10.0 a 20.0 g
Agar	12.0 a 17.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Hervir en un litro de agua las papas peladas y rebanadas hasta que estén blandas, después filtrar el cocido y completar a un litro con agua destilada. Agregar 10 a 20 g de dextrosa y 12 a 17 g de agar; agitar vigorosamente para que se disuelvan los ingredientes y

esterilizar en la autoclave a 120°C durante 15 min. Existen numerosas variaciones en las cantidades de papa y dextrosa que se utilizan para preparar este medio, que es uno de los más utilizados en fitopatología.

P(M)DA

Ingredientes:

Papa macerada	15.0 g
Dextrosa	15.0 g
Agar	23.0 g
Agua	1.5 litros

Preparación:

Este medio es una modificación del PDA. En 1.5 litros de agua agregar la papa macerada, la dextrosa y el agar. Mezclar muy bien y esterilizar en la autoclave a 120°C por 20 min.

PEPTONA-DEXTROSA-AGAR

Ingredientes:

Phyton	15.0 g
Dextrosa	15.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar	17.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien y ajustar el volumen a un litro. Esterilizar en la autoclave a 120°C durante 15 min una vez que todos los ingredientes están bien disueltos.

PULIDO DE ARROZ-AGAR**Ingredientes:**

Arroz pulido	20.0 g
Agar	17.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Mezclar el pulido de arroz en 500 ml de agua y cocer al vapor por 15 minutos. Después homogeneizar el cocido agitando por varios minutos y añadir los otros 500 ml de agua en la que previamente se disolvió el agar. Someter a autoclave y vaciar en las cajas Petri agitando para evitar que el pulido sedimente.

PVP**Ingredientes:**

Harina de maíz-Agar (Difco)	17.0 g
Piramicina	10.0 mg
Vancomicina	200.0 mg
PCNB (fungicida)	100.0 mg
Agua desionizada	1 litro

Preparación:

Mezclar en el agua desionizada los 17 g de harina de maíz-agar y esterilizar en la autoclave aproximadamente 15 min. Después de la esterilización, cuando la harina de maíz-agar en agua esté a 43-45 °C, agregar los otros ingredientes mezclando perfectamente.

SEMILLAS DE CAÑAMO-AGAR**Ingredientes:**

Semillas de cáñamo	100.0 g
--------------------	---------

Agar	20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

Cocer las semillas de cáñamo en un litro de agua; filtrar y ajustar el volumen del caldo a un litro con agua destilada; agregar los 20 g de agar, disolverlo bien y esterilizar en la autoclave.

SUCROSA-PROLINA-AGAR**Ingredientes:**

Sucrosa	6.0 g
Prolina	2.7 g
FeSO ₄	10.0 mg
MnCl ₂	2.0 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
K ₂ HPO ₄	1.3 g
ZnSO ₄	1.6 mg
KH ₂ PO ₄	1.0 g
Agar	20.0 g
Agua	1 litro

Preparación:

En 500 ml de agua agregar uno por uno los ingredientes, revolver bien y ajustar el volumen a un litro. Cuando todo esté disuelto, esterilizar en la autoclave a 120°C durante 15 min.

VERMICULITA-JUGO V8**Ingredientes:**

Vermiculita	600.0 g
Jugo de verduras V8	300.0 ml

D. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, P.B.; PAPAIVIZAS, G.C. 1971. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some soil environmental factors on disease severity. *Phytopathology*. 61:1253.
- AINSWORTH, G.C.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A.S. 1973. *The Fungi*. Vol. I to Vol. IV B. Academic Press. N.Y.
- BAKERSPINGEL, A. 1953. Soil as a storage medium for fungi. *Mycologica* 45:596.
- BAKERSPINGEL, A. 1954. A further report on the soil storage of fungi. *Mycologica* 46:68.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.H. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3 ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- BARNETT, H.L. 1952. A new method for quick determination of oak wilt fungus. *Abstract Phytopathology*, 42:1.
- BARRATT, R.W.; TATUM, E.L. 1950. A simplified method of liophilizing microorganism. *Science*, 112:122.
- BAXTER JUNIOR, L.W.; FAGAN, S.G. 1974. A simplified method of inducing asexual sporulation in a strain of *Glomerella cingulata*. *Plant Disease Reporter*. 58:300.
- BHALLA, H.S.; MITCHELL, J.E. 1970. A method of obtaining viable, mycelium-free oospores of *Aphanomyces euteiches* using live water snail. *Phytopathology*. 60:1010.
- BOESEWINKEL, H.J. 1976. Storage of fungal cultures in water. *Trans Brith Mycology Society*. 66: 183.
- BOOTH, C. 1971. *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Key Surrey, England.
- BUELL, C.B.; WESTON, W.H. 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungus cultures. *American Journal Botanic*. 34: 555.

- BURGESS, L.W.; LIDDELL, C.M. 1983. Laboratory manual for *Fusarium* research. University Sydney, (Australia).
- COLEY-SMITH, J.R. 1959. Studies of the biology of *Sclerotium cepirovum* Berk. III. Host range, persistence and viability of Sclerotia. *Annual Applied Biology*. 47:511.
- DHANVANTARI, B.N. 1967. A leaf scorch disease of **strawberry** (*Diplocarpon earliana*) and the nature of resistance to it. *Canadian Journal Botanic*. 45:1525.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.F. 1975. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in soil: effects of soil moisture, carbon, nitrogen ratios, carbon sources and nitrogen concentrations. *Phytopathology*. 65:236.
- DINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. 1985. *Basic plant pathology Methods*. CRC Press, Inc Boca Raton, Florida
- EVANS, R.L.; GRIFFITHS, E. 1971. Infection of barley with *Rhinchosporium secalis* using single droplet infection technique. *Trans Brith Mycology Society*. 56:235.
- FAZLI, I.S.F.; SCHROEDER, H.W. 1966. Kernel infections of Bluebounet 50 rice by *Helmithosporium oryzae*. *Phytopathology* 56:507.
- FITZPATRICK, H.M. 1930. *The lower fungi-Phycomycetes*. Mc Graw-Hill N.Y. Book Co.
- FLOR, H.H. 1967. Preservation of urediospores of *Melampsora lini*. *Phytopathology* 57:320.
- FREZZI, M.J. 1950. *Las especies de Phytophthora identificadas en la Argentina*. Ministerio de Agricultura y Ganaderia Buenos Aires, Argentina.
- GRIMM, G.R.; HUTCHINSON, D.J. 1973. A procedure for evaluating resistance of citrus seedings to *Phytophthora parasitica*. *Plant Disease Reporter*. 57:669.
- GULATI, S.B.; NATHUR, S.K. 1979. A simple method for inducing sporulation in *Helminthosporium gramineum* in culture. *Current Science*. 48:598.

- HALL, R.; LY, H. 1972. Development and quantitative measurement of microesclerotia of *Verticillium dahliae* Canadian Journal Botanic. 50:2097.
- HANGLUND, W.A.; KING, T.H. 1962. Sulfur nutrition of *Aphanomyces euteiches*. Phytopathology 52:315.
- HARNISH, W.N. 1965. Effect of light on production of oospores and sporangia in species of *Phytophthora*. Mycologia. 57:85.
- HUGHES, H. P.; MACER, C.R.F. 1964. The preservation of *Puccinia scriiformis* and other obligate cereal pathogens by vacuum-drying. Trans Brith Mycology Society. 47:477.
- IYAS, M.B.; ELLIS, M.A.; SINCLAIR, J.B. 1976. Effect of soil fungicides on *Macrophomina phaseolina* Sclerotium viability in soil and in soybean stem pieces. Phytopathology. 66:355.
- JOFFE, A.Z. 1963. Mycoflora of a continuously cropped soil in Israel. With special reference to effects of manuring and fertilizing. Mycologia. 55:271.
- JOHNSON, E.M.; VALLEAU, W.O. 1949. Synonymy in some common species of *Cercospora*. Phytopathology. 39: 763-770.
- KEAY, M.A. 1954. Methods for studing the susceptibility of potato foliage to *Phytophthora infestans*. Plant Pathology. 3:131.
- KILPATRICK, R.A.; JOHNSON, H.W. 1956. Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. Phytopathology. 46:180.
- KLOTZ, L.J.; DEWOLFE, T.A. 1960. The production and use of zoospore suspensions of *Phytophthora* spp. for investigations on diseases of citrus. Plant Disease Reporter. 57:669.
- KILPATRICK, R.A.; HARMON, D.L.; LOEGERING, W.Q.; CLARK, W.A. 1971. Viability of urediospores of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* stored in liquid nitrogen, 1960-1970. Plant Disease Resporter. 55:871.

- LATCH, G.C.M.; HANSON, E.W. 1962. Comparison of three stem diseases of *Melilotus* and their causal agents. *Phytopathology*, 52:300.
- LLANOS, M.C.; LOCKWOOD, J.L. 1959. Factors affecting zoospore production by *Aphanomyces enteiches* (Abstr.). *Phytopathology*. 49:535.
- LYDA, S.D.; BURNETT, E. 1970. Sclerotical inoculum density of *Phymatotrichum omnivorum* and development of *Phymatotrichum* root rot in cotton. *Phytopathology* 60:729.
- LYDA, S.D.; BURNNET, E. 1971. Influence of temperature on *Phymatotrichum* sclerotical formation and disease development. *Phytopathology* 61:728.
- MANNING, W.J.; CROSSAN, D.F.; ADAMS, A.L. 1970. Method for production of sclerotia of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 60:179.
- MALCA, I.; ULLSTRUPS, A.J. 1962. Effect of carbon and nitrogen nutrition on growth and sporulation of two species of *Helminthosporium*. *Bulletin Torrey Botanic Club*. 89:240.
- MATHRE, D.E.; RAVENSCROFT, A.V. ; GARBER, R.H. Garber. 1966. The role of *Thielaviopsis basicola* as a primary cause of yield reduction in cotton in California. *Phytopathology*, 56:1213.
- MATHUR, R.S.; BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. 1950. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in cultures. *Phytopathology*. 40:104.
- MEHRLICH, F.P. 1935. Nonsterile soil leachate stimulating to the zoosporangia production by *Phytophthora* spp. *Phytopathology* 25:432.
- MENYONGA, J.M.; TSAO, P.H. 1966. Production of zoospore suspensions of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology*, 56:359.
- MIDDLETON, J. T. 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. *Mem. Torrey Botanic Club*. 20:1-171.

- MITCHELL, D.J.; STRANDBERG, J.O.; KANN WISCHER, M.E. 1978. Root and stem rot of watercress (*Nasturtium officinale*) caused by *Phytophthora cryptogea*. Plant Disease Reporter. 62:599.
- MILLER, S.B.; BAXTER JUNIOR, L.W. 1970. Some factors influencing asexual sporulation in a strain of *Glomerella cingulata* pathogenic to camellias. Phytopathology, 60:743.
- MORRIS, E.F. 1963. The synnematos genera of the fungi imperfecti. Western Illinois University. Series The Biological.
- MOSEMAN, J.G.; POWERS, H.R. 1957. Function and longevity of cleistothecia of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Phytopathology. 47: 294.
- NASH, S.M.; SNYDER, B.W.C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot *Fusarium* in field soils. Phytopathology 52:567-575.
- NELSON, P.E. 1990. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. Ed. por Ploetz, R.C. *Fusarium* wilt of banana. APS. Press. St. Paul, Minnesota. Sciences No. 3. p. 27-35.
- OU, S.H.; KING, T.H.; KOMMEDAHL, T. 1978. Evaluating peas for resistance to damping-off root rot caused by *Pythium ultimum*. Phytopathology. 68:1644.
- OU, S.H. 1972. Rice diseases. Commonwealth Mycological Institute. Key, Surrey, England. 368 p.
- PARKER, E.J. 1976. Production of *Nectria coccinea* perithecia in culture on a natural medium. Trans Brith Mycology Society. 66:295
- PAPAVIZAS, G.C.; ADAMS, P.B. 1969. Survival of root infecting fungi in soil XII. Germination and survival of endoconidia and chlamidospores of *Thielaviopsis basicola* in fallow soil and in soil adjacent to germinating been seed. Phytopathology. 59:371.
- PEACH, J.M.; LOVELESS, A.R. 1975. A comparison of two methods of inoculating *Triticum aestivum* with spore suspensions of *Claviceps purpurea*. Trans Brith Mycology Society. 64:328.

- PERKINS, D.D. 1962. Preservation of *Neurospora* stock cultures with anhydrous silica-gel. *Canadian Journal Microbiology*. 8:591.
- PERSON, L.H. 1961. A method of maintaining viability and ability to sporulate in isolates of *Ascochyta*. *Phytopathology*, 51:797.
- PLAATS-NITERINK VAN DER, A.J. 1981. Monography of the genus *Pythium*. *Studies in Mycology*. C.B.S. Baarn, Holanda.
- RAPER, K.B.; FENNELL, D.E. 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams y Wilkins Co., Baltimore, Md. E.U.
- RAPER, K.B.; THOM, C. 1968. A manual of the Penicillia. Hofner Publishing Co. New York and London.
- RAYNAL, G. 1975. Production *in vitro* of ascospores of *Leptosphaerulina briosiana*, agent of peperspot of lucerne. *Annual Review Phytopathology*. 7:329.
- ROANE, C.W. 1973. Vacuum storage of plant pathogens. *Abstract Phytopathology*. 63:804.
- ROMANOWSKI, R.D.; KUC, J.; QUACKENBUSCH, F.W. 1962. Biochemical changes in seedlings of bean infected with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathology*, 52:1259.
- ROYLE, D.J.; HICKMAN, C.J. 1964. Observations on *Phytophthora cinnamomi*. *Canadian Journal Botanic*. 42:311.
- SCHMITTHENNER, A.F. 1959. The effect of media concentration on sporangia production in *Phytophthora*. *Phytopathology*. 49:550.
- SHARP, E.L.; SMITH, F.G. 1952. Preservation of *Puccinia urediospora* by lyophilization. *Phytopathology*, 42:263.
- SHARP, E.L.; SMITH, F.G. 1957. Further study of the preservation of *Puccinia urediospora*. *Phytopathology* 47, 423.

- SHOEMAKER, R.A. 1955. Biology, cytology and taxonomy of *Cochliobolus sativus*. Canadian Journal Botanic. 33:562.
- SHOEMAKER, R.A. 1962. *Drechslera* Ito. Canadian Journal Botanic. 40:809.
- SLEESMAN, J.P.; LARSEN, P.O.; SAFFORD, J. 1974. Maintenance of stock cultures of *Helminthosporium maydis* (Race T and O). Plant Disease Reporter. 58:334.
- SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- SOBER, E.K.; SEYMOUR, C.P. 1963. *Stomphylium* leaf spot of *Echeveria kalanchoe* and *Sedum*. Phytopathology. 53:1443.
- SPARROW JUNIOR, F.K. 1960. Aquatic *Phycomycetes*. University of Michigan Press. Annual Arbor
- THOMAS, A.P.; MARCER, R.C.F. 1964. The preservation of *Puccinia striiformis* and other obligate cereal pathogens by vacuum-drying. Trans Brith Mycology Society. 47:477.
- THURSTON, H.D. 1957. The culture of *Phytophthora infestans*. Phytopathology. 47:186.
- TOUSSOUN, T.; NELSON, P.E. 1968. A pictorial guide to the identification of *Fusarium* species. Penn. State Univ. Press. University Park, Penn.
- TSAO, P.A.; OCAÑA, G. 1969. Selective inoculation of Species of *Phytophthora* from material soil on an improved antibiotic medium. Nature (London) 223:636-638.
- WATERHOUSE, G.M. 1962. Key to the species of *Phytophthora* De Bary. Mycological Papers 92, C.M.I. England
- WATERHOUSE, G.M. 1970. The genus *Phytophthora* De Bary. Diagnosis and figures. 2nd. Ed. Mycological papers 122. C.M.I. Kew Surrey, England.
- WOODS, R.; BLOSS, H.E.; GRIEA, G.A. 1967. Induction of sporulation of *Phymatotrichum omnivorum* on a defined medium. Phytopathology. 57:228.

WEBSTER, J.; DENNIS, C. 1967. A technique for obtaining zoospores in *Pythium middletonii*.
Trans Brith Mycology Society. 50:329.

YORINORI, J.T. ; THURSTON, H.D. 1974. Sporulation of *Pyricularia oryzae* on rice leaves
injured mechanically. Phytopathology. 4:24.

ZENTMYER, G.A.; MAERSHALL, L.A. 1959. Factors affecting sporangial production in
Phytophthora cinnamomi Abstract Phytopathology. 49:556.

III. BACTERIAS FITOPATOGENAS

De acuerdo con Oku (1994), aunque en la naturaleza el número de bacterias formalmente descritas es de alrededor de 1600, menos de 200 son consideradas como responsables de causar enfermedades en las plantas.

No obstante, las bacterias fitopatógenas están ampliamente distribuidas en las regiones agrícolas del mundo, y cuando existen condiciones favorables para su desarrollo, provocan pérdidas económicas tan graves, que llegan a ser catastróficas.

Como sucede con todos los organismos patógenos, las bacterias adquieren importancia económica cuando sus poblaciones alcanzan niveles epifíticos. En condiciones óptimas, las bacterias exhiben un potencial de multiplicación mayor que cualquier otro microorganismo fitopatógeno.

La taxonomía de las bacterias es muy compleja y ha sufrido frecuentes cambios. Goto (1990), tomando en cuenta la estructura y características químicas de la envoltura celular, agrupa los géneros fitopatógenos dentro de cuatro *Taxa*.

A. UBICACION DE LAS BACTERIAS FITOPATOGENAS EN LA CLASIFICACION DE PROCARIOTES

Dentro del Reino PROCARYOTAE, es en la División de los GRACILICUTES y en la Clase PROTEOBACTERIA en donde se encuentran clasificados la mayoría de los géneros de bacterias fitopatógenas de mayor importancia agrícola: ERWINIA, PSEUDOMONAS, XANTHOMONAS, AGROBACTERIUM Y XYLELLA. Sin embargo, también en la Clase THALLOBACTERIA, de la División FIRMICUTES los géneros CLAVIBACTER y STREPTOMYCES tienen especies que también causan daños graves en cultivos tan impor-

tantes como el jitomate y la papa. Los géneros BACILLUS, CLOSTRIDIUM, ARTHROBACTER Y CURTOBACTERIUM, también de los FIRMICUTES, poseen especies fitopatógenas, pero de menor importancia.

La mayoría de las bacterias patógenas de plantas tienen forma de bastón; están en general separadas, excepto durante la fase de reproducción, en que se observan agrupadas. Casi sin excepción, son móviles por medio de flagelos; pueden ser aerobias o anaerobias, y en ambos casos patógenas obligadas o facultativas; no forman endosporas, excepto *Bacillus* y *Clostridium*. La mayoría son Gram negativas, excepto *Clavibacter* (antes *Corynebacterium*), *Streptomyces*, *Clostridium* y *Bacillus*.

Mostrar que una bacteria está involucrada en un proceso patológico vegetal, es más difícil que en el caso de los hongos, debido a que son de tamaño muy pequeño, a que no contrastan con los tejidos afectados y a que es necesario lograr una purificación absoluta para conocer sus características.

A continuación se describen las actividades necesarias para realizar el diagnóstico de las bacterias fitopatógenas.

B. RECOLECCION Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Para hacer un diagnóstico confiable de las bacterias que estén causando una enfermedad en plantas, es muy importante tener una serie de cuidados para la toma y envío de las muestras. Aunque con todos los fitopatógenos es necesario tomar precauciones, en el caso de las bacterias éstas tienen que ser mayores, ya que los tejidos enfermos deben llegar al laboratorio en condiciones óptimas para ser analizados, con las mínimas probabilidades de hacer un diagnóstico incorrecto.

El aislamiento de bacterias de los tejidos infectados debe hacerse tan rápido como sea posible para evitar el desarrollo de organismos saprófitos en las muestras. Como el exceso de humedad favorece el desarrollo de los organismos saprófitos y en consecuencia la pudrición de las muestras, éstas se envuelven en papel poroso antes de introducir las en bolsas de plástico, y deben ser transportadas lo más rápidamente posible al laboratorio.

Es recomendable hacer el diagnóstico en muestras de tejido fresco, pero si no es posible examinarlas de inmediato, se deben almacenar en un refrigerador a una temperatura de -2 a 5 °C.

La muestra debe estar constituida por plantas, o partes de ellas, seleccionadas, que presenten los síntomas típicos de la enfermedad. Esto es imperativo dado que la sintomatología es el punto inicial de guía para la diagnosis, debido a que más de un patógeno o algún desorden fisiológico pueden estar involucrados. Es necesario tomar muestras de tejidos con síntomas iniciales e intermedios, lo que facilita el aislamiento de las bacterias presentes; no se recomienda incluir en las muestras tejidos con síntomas muy avanzados, porque en éstos están presentes organismos saprófitos que entorpecen el diagnóstico. Además, se recomienda coleccionar plantas o tejidos sanos del mismo estado de madurez que los enfermos; esto permite corroborar el diagnóstico de laboratorio.

También en el caso de manchas o necrosis en hojas y frutos, se deben coleccionar especímenes con síntomas iniciales; comúnmente las áreas necróticas avanzadas son sitios no recomendables para el aislamiento de los patógenos, pues han sido invadidas por bacterias secundarias.

En las hojas o tallos con síntomas de marchitez, es necesario coleccionar la planta entera, ya que el patógeno responsable del problema puede estar localizado en cualquier parte del vegetal, incluida la raíz.

Cuando la enfermedad se presenta como pudriciones radicales, es esencial que la raíz no se encuentre en un estado avanzado de putrefacción.

Para el caso de agallas causadas por bacterias, es recomendable seleccionar las que estén poco desarrolladas.

Cuando se trata de cánceres o secadera (*damping-off*), es necesario incluir plantas completas con lesiones en diferente estado de madurez; si se trata de ramas, se debe cortar el tejido enfermo, incluyendo parte del sano.

C. IDENTIFICACION

a. DETECCION RAPIDA CON COLORACION DIFERENCIAL

Para poner en evidencia a las bacterias dentro de los tejidos de una planta enferma, se utilizan algunas técnicas de coloración diferencial.

Una de ellas consiste en cortar un trozo pequeño del tejido infectado, macerarlo en una gota de agua esterilizada para que salgan las bacterias, hacer un frotis y teñir con rojo Congo.

En otra técnica un poco más elaborada, se hacen cortes muy finos del tejido enfermo, bien sea con micrótopo o a mano, se tiñen con los colorantes diferenciales azul-tionina y naranja G y se montan en xilol para observarlos al microscopio.

Por otra parte, si se requiere observar a las bacterias vivas para conocer el tipo de motilidad que presentan, debe hacerse primero un cultivo puro de ellas y después preparar en un portaobjetos excavado una "gota suspendida" de solución con bacterias.

Para los detalles sobre las técnicas mencionadas, puede consultarse a Brathwaite y Sosa-Moss (1995).

b. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION PRECISA

A partir de las muestras de tejido enfermo se deben aislar las bacterias hasta lograr un cultivo puro de ellas. La técnica que se emplea comúnmente es la de "Diluciones sucesivas", que consiste en macerar un trozo pequeño de tejido infectado en una gota de agua esterilizada, e ir transfiriendo con un asa pequeñas porciones de la suspensión de bacterias a gotas sucesivas de agua, para que se vaya diluyendo progresivamente la concentración de ellas. Hecha la serie de diluciones, se deja que las bacterias se incuben en un medio con agar. Las características de las colonias desarrolladas a partir de una sola célula bacteriana, indican si el cultivo está puro o si están mezcladas varias especies.

Si además de aislarlas es necesario conocer la población por gramo o centímetro cuadrado de tejido enfermo, se puede utilizar una modificación a la técnica de "Diluciones

sucesivas". Para esto se prepara primero una suspensión de bacterias, moliendo o licuando una cantidad conocida de tejido, en una cantidad también conocida de agua; de esta suspensión original se mezcla 1 ml con 9 ml de agua esterilizada. De esta suspensión se toma a su vez 1 ml y se diluye en 9 ml de agua, y así sucesivamente hasta lograr una dilución de aproximadamente 10^9 células bacterianas por ml. Para conocer la población original de bacterias, se siembra 1 ml de cada una de las diluciones hechas, en cajas Petri con agar, se cuentan las colonias derivadas de células bacterianas únicas y se multiplica por el factor de dilución.

Una vez que se tiene la bacteria en cultivo puro, se deben hacer varias pruebas, la primera de las cuales permitirá conocer si la bacteria aislada es fitopatógena o no. La prueba consiste en inyectar en hojas de tabaco una suspensión bacteriana con una concentración mayor a 5×10^7 bacterias por ml; si se observa antes de las 24 horas una reacción de hipersensibilidad, expresada en forma de necrosis, la bacteria es fitopatógena; como las bacterias saprófitas son incapaces de inducir esta reacción, la necrosis es la prueba infalible de que la bacteria aislada es fitopatógena.

Con las cepas fitopatógenas se deberán hacer las pruebas necesarias hasta lograr la identificación precisa de la bacteria responsable de la enfermedad que se desea diagnosticar.

Dentro de las pruebas de mayor importancia para la identificación de las bacterias está la tinción de Gram, que permite separarlas en dos grandes grupos. Las que se colorean de morado son llamadas Gram (+) y las que se tiñen de rosa o rojo Gram (-); la mayoría de las bacterias que causan enfermedades en plantas pertenecen a este último grupo. Los detalles de la técnica pueden consultarse en cualquier libro general de Fitopatología (Schaad, 1980, 1988; Brathwaite, 1985; Brathwaite y Sosa-Moss, 1995).

La demostración de la patogenicidad de una cepa bacteriana es un procedimiento complicado que requiere a veces de varios meses, ya que puede ser verificada sólo hasta que aparecen los síntomas de la enfermedad en plantas susceptibles inoculadas.

Rodríguez (1991) cita algunas pruebas rápidas para determinar en tiempo breve la patogenicidad de un aislamiento bacteriano. Estas pruebas permiten, en algunos casos, conocer la especie de bacteria involucrada en la enfermedad de que se trata. El procedimiento y los resultados comparativos se resumen en la Tabla 1 del Apéndice.

De acuerdo con Mayea y Padrón (1983), para la identificación de bacterias fitopatógenas debe realizarse lo siguiente:

- Conocer la morfología de las bacterias aisladas y de sus colonias.
- Realizar la prueba patológica del esquema para la caracterización de bacterias
- Determinar las propiedades fisiológicas y bioquímicas de las cepas fitopatógenas para identificar la especie a la cual pertenecen.
- Investigar, en caso necesario, la gama de hospedantes de las bacterias identificadas, realizando pruebas de patogenicidad.

El esquema para la caracterización de bacterias en la Figura 1 del Apéndice sirve para verificar si las cepas aisladas son fitopatógenas; esto simplifica mucho el trabajo de diagnóstico, porque sólo con las cepas patógenas se efectuarán los ensayos bioquímicos, que son complejos.

D. CLAVE PARA LA IDENTIFICACION DE LOS GENEROS

Para la identificación de los géneros de bacterias más comunes, es muy útil la clave propuesta por Schaad (1988), que se presenta enseguida:

1. Gram negativas	2
1' Gram positivas	8
2. No crece en medios convencionales	<i>Xylella</i>
2' Crecen en medios convencionales	3
3. Desarrollan colonias amarillas en YDC-Agar	4
3' Desarrollan colonias no amarillas en YDC-Agar	5
4. Desarrolla en MS-Agar	<i>Erwinia</i>
4' No desarrolla en medio MS-agar	<i>Xanthomonas</i>
5. Producen pigmentos fluorescentes en medio KB-agar	<i>Pseudomonas</i>
5' No producen pigmentos fluorescentes en medio KB-agar	6
6. Al desarrollarse forma depresiones sobre el medio CVP-Agar	<i>Erwinia</i>
6' Al desarrollarse no forman depresiones sobre el medio CVP-agar; sin embargo, existen algunas cepas que sí las forman, pero menos marcadas	7

7. Se desarrolla en D-1 M agar	<i>Agrobacterium</i>
7' No se desarrolla en D-1 M agar	<i>Pseudomonas</i>
8. Forman endosporas	9
8' No forman endosporas	10
9. Bacterias aerobias o anaerobias facultativas que cuando forman endosporas no están turgentes	<i>Bacillus</i>
9' Bacterias anaerobias que cuando forman endosporas están turgentes	<i>Clostridium</i>
10. Crecen en forma de micelio	<i>Streptomyces</i>
10' No crecen en forma de micelio	<i>Coryneformes</i>

La composición de los medios de cultivo mencionados se describe en el Apéndice.

E. CARACTERISTICAS DE DIAGNOSTICO DE LOS PRINCIPALES GENEROS

Para la identificación de las bacterias hasta especie, es necesario consultar las claves correspondientes.

A continuación se mencionan las características diferenciales de los principales géneros de bacterias fitopatógenas.

Género *Agrobacterium*, Conn, 1942.

Son bacterias redondeadas, móviles, con uno a cuatro flagelos peritricos y forman colonias no pigmentadas. Son aerobias y como resultado de su metabolismo pueden producir polisacáridos, 3-cetolactosas y ácido sulfhídrico. *A. tumefaciens* y *A. radiobacter* licúan la gelatina en pocas semanas, pero no la celulosa, la quitina, el agar ni la caseína.

Las especies fitopatógenas de este género han sido ampliamente estudiadas por Allen y Holding (1974); Da Silva (1982); Moore, Anderson y Kado (1980). En la Tabla 2 del Apéndice se muestran las características diferenciales de las especies.

Género *Clavibacter*, Lehmann y Neumann, 1896.

Estas bacterias, actualmente consideradas como un grupo complejo llamado "bacterias coryneformes" dentro de las cuales estaba el género *Corynebacterium* (actualmente *Clavibacter*), son típicamente Gram (+) pero pueden decolorar fácilmente y exhibir una tinción irregular, son estrictamente aerobias, catalasa-positivas, oxidasa- negativas, no forman ácido rápidamente. Pueden ser inmóviles o móviles con uno a tres flagelos laterales; son bacilos ligeramente curvados que llegan a formar agregados en forma de "V"; generalmente no forman micelio, pero puede ocurrir que lo formen, y no forman endosporas.

Aunque estas bacterias son difíciles de aislar, es un género relativamente fácil de identificar por la morfología de sus colonias, que presentan pigmentación de color rojizo o amarillo en medios fortificados con vitaminas; no se desarrollan cuando se les hace la prueba oxidativa-fermentativa de glucosa y no forman ácido rápidamente; no forman esporas aeróbicas; no ramifican y frecuentemente contienen gránulos metacromáticos.

Las especies de este género inducen una gran variedad de síntomas en las plantas susceptibles, incluyendo agallas, gomosis y marchitez; generalmente pueden ser identificadas con base en los hospedantes de las que son aisladas, ya que muchas son patógeno-específicas. Información detallada para su identificación puede ser obtenida consultando a Cummins *et al.* (1974), Vidaver (1980) y Vidaver y Davis (1988).

En la Tabla 3 del Apéndice se muestran las características diferenciales de las especies fitopatógenas de este género.

Género *Erwinia*, Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith, 1920.

Son células de 0.5 a 1 μm , Gram (-) y móviles por flagelos peritricos. Producen ácidos de la glucosa, fructosa, galactosa, metilglucósidos, sacarosa, manosa y ribosa, pero raras veces del adonitol, dulcitol y la melecitosa.

Utilizan el acetato, malato, gluconato, fumarato y succinato, pero no al oxalato, benzoato o propionato. Pueden o no producir gas de la glucosa; descarboxilan la arginina, ornitina y la lisina, y originan ácido a partir de la salicina. Para su cultivo se emplea el medio YDA .

Cowan, (1974), Lelliot (1974) , Mayea y Padrón (1983) reconocen tres grupos de *Erwinia*: *amylovora*, *herbicola* y *carotovora*.

El primer grupo comprende a las especies: *E. amylovora*, *E. salicis*, *E. tracheiphila*, *E. nigrifluens*, *E. quercina* y *E. rubrifaciens*. Las bacterias de este grupo no hidrolizan la caseína, aceite, gelatina ni almidón; no reducen los nitratos y no producen gas de la glucosa ni del indol. Tampoco producen ácidos de la lactosa, celobiosa, maltosa, melecitosa, adonitol y dulcitol.

El segundo grupo incluye a *E. herbicola* var. *herbicola* y var. *ananas*, *E. stewartii* y *E. uredovora*. Estas bacterias no hidrolizan al aceite, caseína ni almidón; producen gas de la glucosa; son ureasa-negativas y no producen ácido ni a partir del dulcitol ni de los metilglucósidos.

Las bacterias del tercer grupo causan pudriciones muy características y comprende a las especies *E. carotovora* var. *carotovora* y var. *atroseptica*, *E. chrysanthemi*, *E. cyripedii* y *E. raphontici*. Estas bacterias reblandecen discos de tubérculo de papa; no hidrolizan el almidón ni crecen en caldos con 10% de NaCl; son oxidasa y ureasa-negativas y utilizan la arbutina y el gluconato; producen ácido del eritrol, adonitol y dulcitol. Son sensibles a la kanamicina, neomicina, poliximicina, estreptomycin, cloramfenicol y tetraciclina. Licúan la gelatina y son catalasa-positivas; reducen los nitratos y fermentan la glucosa. Producen ácidos a partir de la glucosa, sacarosa, arabinosa, xilosa, glicerol, manitol, sorbitol, manosa, ribosa y celobiosa.

Para mayor información sobre estas bacterias puede consultarse a Lelliot y Stead (1987) y Schroth y Hildebrand (1980 y 1988).

En las tablas 4a, 4b, 4c y 4d del Apéndice se muestran las características diferenciales de las especies fitopatógenas de *Erwinia*.

Género *Pseudomonas*, Migula, 1894.

Son células monotricas, aisladas, en forma de bacilos rectos o curvados; son Gram (-) con dimensiones de 0.5 a 1 x 1.5 a 4 µm. No producen vaina ni endosporas de reposo. Son quimiorganotróficas con metabolismo respiratorio no fermentativo. Son aerobias

estrictas, excepto algunas que son denitrificantes. Excepcionalmente pueden reducir nitratos o usar el hidrógeno o el CO₂ como fuente de energía; utilizan el acetato como nutriente.

La mayoría de las especies de este género no necesitan para desarrollarse de factores de crecimiento, pero sí de lactato, succinato y glucosa. Pueden producir pigmentos solubles verdes-azules y amarillos, y muchas especies acumulan gránulos de ácido poli-β-hidroxibutírico, particularmente cuando crecen en un medio pobre en nitrógeno. Algunas producen fluorescencia en el medio B de King cuya fórmula aparece en el Apéndice.

Contrariamente a *Xanthomonas*, la mayoría de las especies de *Pseudomonas* no degrada al almidón y son muy resistentes a los antibióticos.

El género *Pseudomonas* ha sido ampliamente estudiado por Doudoroff y Palleroni (1974), Sands y Schroth (1980) y Hildebrand y Schroth (1988). Recientemente, algunas especies de este género han sido reclasificadas como *Burkholderia*.

Las principales especies de este género se enlistan en las tablas 5a, 5b y 5c del Apéndice.

Género *Xanthomonas*, Dowson, 1939

Las bacterias de este género son bacilos cortos Gram (-), rectos y monotricos, con dimensiones de 0.2-0.8 y de 0.6-2.0 μm; no producen vainas ni endosporas. Producen un pigmento carotenoide amarillo no difusible; el crecimiento de sus colonias tiene apariencia butirosa. Su metabolismo es estrictamente oxidativo y utilizan el oxígeno molecular como aceptador de electrones. Son oxidasa y catalasa-positivas y no producen acetoina ni indol. Son rojo de metilo-negativas y originan ácidos de muchos carbohidratos, pero no de la ramnosa, inulina, adonitol, dulcitol, inocitol, salicina y raramente del sorbitol. No acidifican la leche púrpura. Pueden usar el acetato, malatopropionato y el succinato, pero generalmente no utilizan el benzoato, oxalato o tartrato. La mayoría de las especies hidrolizan el Tween 80 rápidamente, pero no reducen el nitrato, ni producen ácido sulfhídrico a partir de la cisteína. No usan la asparagina como única fuente de carbono y nitrógeno y su crecimiento se inhibe con 0.15% de cloruro de tetrazolio, y a veces con sólo 0.02% de este compuesto en el medio.

Puede obtenerse información complementaria sobre este género de bacterias consultando a Dye y Lelliot, (1974), Dye (1980), Schaad y Stall (1988).

En la Tabla 6 se muestran las características diferenciales de las especies fitopatógenas más importantes del género *Xanthomonas*.

Género *Xylella*, Wells, Raju, Hung, Weisburg, Mandelco-Paul y Brener, 1987.

La taxonomía de las bacterias fitopatógenas es una disciplina incesantemente cambiante, en respuesta al avance de varios campos de la ciencia como la biología molecular, bioquímica, genética, bacteriología y fitopatología, entre otras. Esto ha permitido la correcta ubicación de las llamadas "bacterias fastidiosas" dentro del género *Xylella*.

Estas bacterias se distinguen de otras que atacan el xilema, por su falta de capacidad de infectar otros tejidos diferentes de éste, se transmiten por insectos y no se ha logrado la transmisión mecánica, excepto en la enfermedad asociada al erianismo de los brotes de la caña de azúcar, y por la falta de habilidad para crecer en los medios bacteriológicos convencionales.

Xillela usualmente forma bastones rectos de 0.25-0.35 x 0.9-3.5 μm y en ciertas condiciones de cultivo forma largas fibras filamentosas. Son Gram (-), no móviles y aerobias estrictas. Forma dos tipos de colonias: unas planas opalescentes y otras abultadas y rugosas.

En cuanto a sus requerimientos nutricionales, las bacterias fastidiosas crecen en un medio de extracto de levadura-agar, que contenga cisteína y carbón, o en el medio comercial glutamato-peptona-agar al que se le agrega suero de albúmina. Algunas cepas pueden crecer lentamente en medio con agar nutritivo ordinario. Las colonias desarrollan de 0.6-1.5 mm de diámetro después de 10 a 30 días.

En estas bacterias la relación mol% G+C del DNA es 51-53. Se establecen en el xilema y son transmitidas por injerto o por chicharritas. La especie tipo es *Xylella fastidiosa*, agente causal de la enfermedad de Pirce de la uva; falsa enfermedad del durazno; marchitez del Vincapervinca; quemadura de la hoja del almendro, durazno, olmo, sicomoro, roble, mora y maple; y tizón foliar de los cítricos.

Para el aislamiento en cultivo puro de las bacterias fastidiosas o bacterias limitadas al xilema, se han desarrollado medios que permiten su crecimiento. Este agente causal fue primeramente aislado con el medio JD1, que aparece en el Apéndice, de plantas de vid que presentaban síntomas de la enfermedad de Pirce y de árboles con la quemadura de la hoja del almendro (PD-ALS). Las bacterias causantes del PD-ALS han sido aisladas exprimiendo la savia de pecíolos de hojas enfermas o moliéndolos en amortiguador de fosfatos.

Las colonias son realmente visibles después de siete a 10 días de incubación aeróbica a 28 °C; son circulares con márgenes enteros, de 0.5-1 mm de diámetro y de color blanco a opalescente. El medio CD2, cuya fórmula se incluye en el Apéndice, ofrece resultados comparables con los obtenidos con el JD1, pero además facilita el aislamiento de otras bacterias cuyo ataque se limita al xilema.

Más amplia información puede ser consultada en Wells (1987) y Hopkins (1988).

F. METODOS DE PRESERVACION DE BACTERIAS

Todo laboratorio de diagnóstico requiere de una colección de cultivos plenamente identificados para usarse como referencia en las pruebas confirmatorias usadas para un diagnóstico correcto; esto es particularmente cierto cuando se realizan pruebas de patogenicidad.

Como sucede con los hongos, las bacterias no pueden ser almacenadas o mantenidas indefinidamente en medio de cultivo a temperatura ambiente, porque los subcultivos subsecuentes tienen el problema de pérdida de patogenicidad y de dar respuestas atípicas con respecto a cultivos nuevos (Lelliot y Stead, 1987). Para evitar esto existen varios métodos para preservar bacterias con poco riesgo de cambio.

Estos métodos son:

- Almacenamiento en agua destilada esterilizada a 10°C o a temperatura ambiente (De Vay y Schathorst, 1963):
- En agar inclinado, almacenado a -20°C (Stead, 1974).
- En suspensión sobre partículas esterilizadas de vidrio, almacenadas a -70°C (Feltham *et al.*, 1978).

- Como cultivos liofilizados (Lelliott, 1965).
- En aceite mineral sobre agar inclinado.
- En suelo esterilizado.

Los tres primeros métodos son menos utilizados que los tres últimos, por lo que solamente éstos se describen en detalle.

a. PRESERVACION POR LIOFILIZACION

La liofilización es el mejor método para preservar cultivos de muchas bacterias fitopatógenas, ya que muchas de las especies se conservan viables por largos períodos (generalmente 10 años, pero con frecuencia más de 50). Es el método preferido por los laboratorios que mantienen colecciones, incluyendo la National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPFB).

El procedimiento es el siguiente:

- Corroborar la pureza e identificación de la bacteria.
- Desarrollar un cultivo en el medio adecuado.
- Una vez desarrollada la colonia, hacer una suspensión en agua esterilizada y transferirla a un incubador grande o a una botella plana de Roux con el mismo medio de cultivo.
- Incubar hasta que las células bacterianas estén aproximadamente en la fase logarítmica de crecimiento, para asegurarse que hay el mayor número de ellas.
- Lavar las colonias con 20 ml de medio para liofilización esterilizado, que contiene sucrosa a 7 % y peptona a 7 % (esterilizar por separado la dos soluciones y después mezclar en partes iguales).
- Centrifugar la suspensión a 10,000 g por 10 min.
- Decantar el sobrenadante y resuspender las bacterias en 3 a 4 ml del medio sucrosa-peptona.
- Tapar con algodón las ampulas para liofilización y esterilizarlas en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Introducir asépticamente 0.02 ml de la suspensión bacteriana en cada ampula y reemplazar el tapón.
- Someter al liofilizador evacuando a más o menos 1.33 Pa y secar por 18 a 24 h en la oscuridad.

- Sellar las ampulas al vacío.
- Dejar que se enfríen las ampulas y almacenarlas a 14°C en oscuridad.

1. CONFIRMACION DE LA VIABILIDAD E IDENTIFICACION

Después de la liofilización es importante confirmar la identificación de la bacteria, para estar seguros de su pureza y evaluar si se produjo variabilidad durante el proceso.

Para recuperar la bacteria, se toma del lote de liofilización una ampula, se rompe y se procede como sigue:

- Agregar a la ampula un poco de solución esterilizada de peptona a 1 %.
- Vaciar el contenido en 20 ml de la misma solución de peptona a 1 % y mezclar perfectamente.
- Diluir 0.1 ml de esta suspensión de bacterias en otros 20 ml de solución esterilizada de peptona a 20 %.
- Nuevamente transferir 0.1 ml de la última dilución a 20 ml de un medio de cultivo sólido adecuado. No es recomendable el medio levadura-dextrosa-yeso-agar (Lelliot y Stead, 1987).
- Incubar las cajas Petri a 27°C durante dos a tres días.
- Determinar, pasado este tiempo, la viabilidad de la población por ampula; esto puede hacerse con papel milimétrico donde se cuenta en 1 mm², 10 mm² y 100 mm², el número de colonias desarrolladas. Cuando se desarrolla un número muy alto de colonias, se debe diluir más la concentración de bacterias, de tal suerte que se puedan contar cuando mucho 300 colonias por caja.
- Identificar nuevamente a la bacteria.

2. VERIFICACION DE LA PUREZA

La bacteria del lote liofilizado se recupera de la manera siguiente:

- Romper una ampula y agregarle peptona esterilizada a 1 %.
- Vaciar el contenido en un medio de cultivo adecuado, permitiendo el desarrollo de las colonias.

- Lavar las colonias con agua esterilizada.
- Diluir la suspensión bacteriana hasta obtener una población adecuada.
- Rayar con esta suspensión sobre un medio óptimo e incubar a 27°C por 10 días.
- Observar la variación de las colonias y la presencia de contaminantes, comparando con las características de las colonias de la bacteria liofilizada.

3. VERIFICACION DE LA AUTENTICIDAD

Con la primera solución hecha para comprobar la viabilidad total de la bacteria liofilizada, se raya sobre un medio de cultivo adecuado y se deja incubar a 27°C durante tres días hasta obtener colonias bien separadas (si es necesario deben hacerse diluciones). Se compara la morfología y otras características de las nuevas colonias, las cuales deben coincidir con las de la bacteria antes de someterla a la liofilización.

Además de esto, es recomendable realizar las pruebas que corroboren la autenticidad de la bacteria liofilizada.

b. PRESERVACION BAJO ACEITE

Esta metodología también fue descrita ampliamente para el caso de los hongos fitopatógenos.

La técnica aplicada a bacterias es la siguiente:

- Se raya con la bacteria la superficie de un medio con agar inclinado en tubos de ensaye, y se incuba a 20°C hasta obtener un crecimiento abundante.
- Cubrir el cultivo con aceite líquido de parafina . El nivel de aceite debe cubrir completamente el medio inclinado.
- Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente. En este último caso las bacterias duran viables menos tiempo.

Antes de utilizar el aceite debe esterilizarse en autoclave a una temperatura de 121°C por 15 min, dejándolo secar después durante toda una noche a 100°C.

c. PRESERVACION EN SUELO

De la misma manera que los hongos, las bacterias fitopatógenas se pueden preservar también en suelo. Para esto se procede como sigue:

- Secar el suelo a la sombra.
- Pasarlo a través de un tamiz de 2mm entre mallas.
- Esterilizar el suelo tamizado en la autoclave a 128°C por una hora y dejarlo reposar.
- Repetir esta operación durante tres días sucesivos.
- Depositar en cada tubo de 75 x 10 mm, 3 gr de suelo y agregar 0.5 ml de suspensión bacteriana de un cultivo nuevo desarrollado sobre agar inclinado.
- Almacenar los tubos a 4°C.

Para recuperar las colonias, se toma un poco de suelo con una espátula y se siembra en una caja Petri con agar.

G. APENDICE

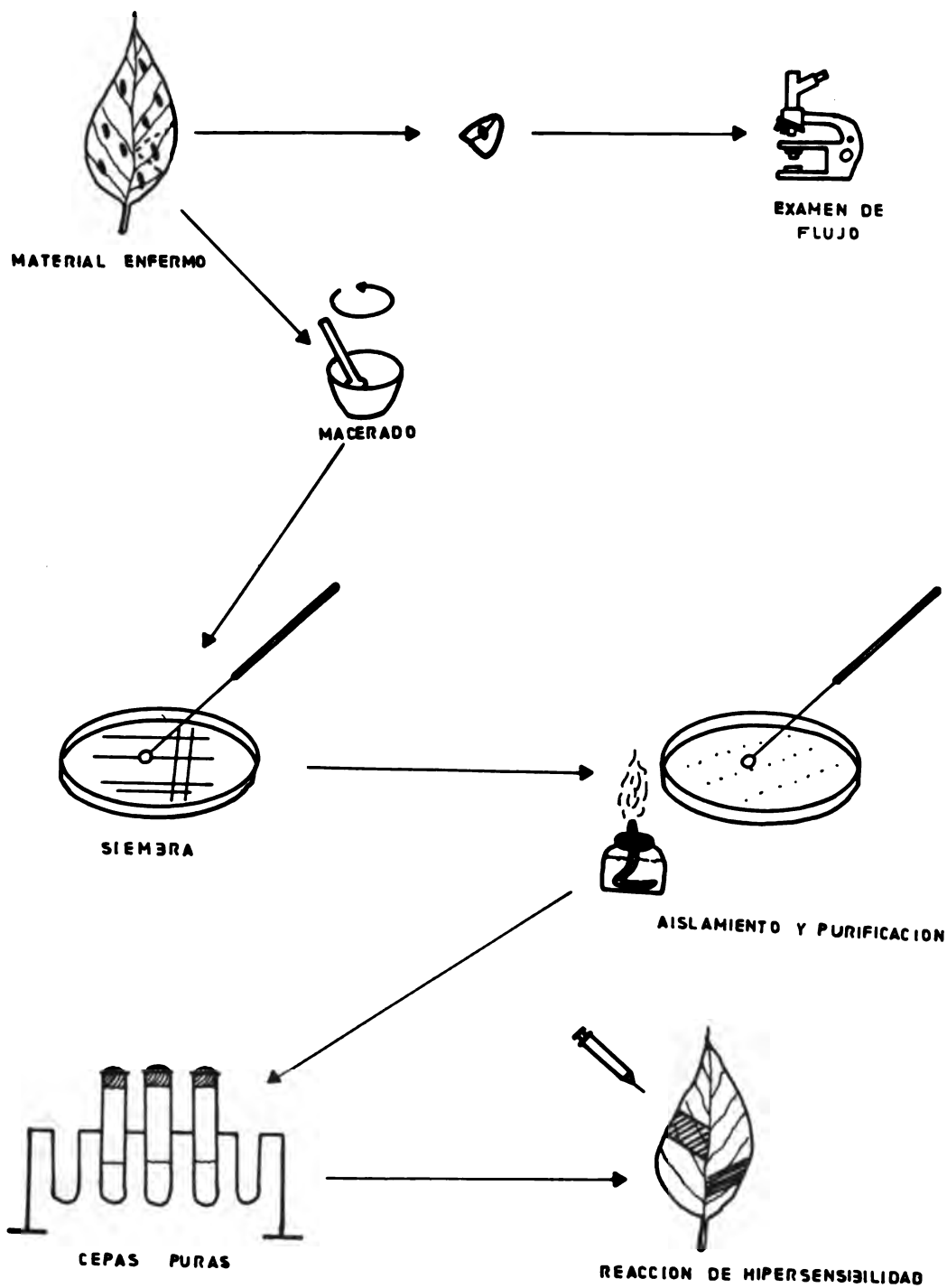


Figura 1. Esquema para la caracterización de bacterias

Tabla 1. Pruebas rápidas de patogenicidad.

Parte vegetal Inoculada	Método	Observación	Organismo
Rebanada de zanahoria	Gotas de una suspensión bacteriana	Raíces adventicias Putridión blanda.	<i>A. tumefaciens</i> <i>E. carotovora</i>
Rebanada de papa, cebolla, pepino	Cultivo bacteriano	Putridión blanda.	<i>E. carotovora</i> <i>P. fluorescentes</i> <i>X. campestris</i>
Frutos verdes de pera	Punción con agujas	Lesiones y exudados	<i>E. amylovora</i>
Vaina de chícharo	Punción con aguja	Lesiones	<i>P. syringae</i> <i>p.v. pisi</i>
Vaina de frijol	Punción con aguja	Lesiones	<i>P. syringae</i> <i>p.v. phaseolicola</i>
Hojas de tabaco	Infiltración de susp.	Reacción de hipersensibilidad bacteriana	<i>P. grupo fluorescente.</i> Grupo <i>E. amylovora</i>
Plántulas o semillas de chícharo dulce	Suspensión bacteriana	Fasciación	<i>C. fascians</i>

Tabla 3. Características diferenciales de las especies fitopatógenas del género *Clavibacter* (*Corynebacterium*)

PRUEBA	<i>C. fascians</i>	<i>C. tritici</i>	<i>C. sepedonicum</i>	<i>C. insidiosum</i>	<i>C. michiganense</i>	<i>C. floccumfaciens</i>	<i>C. poinsettiae</i>	<i>C. nebraskense</i>	<i>C. ilicis</i>
Movilidad	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Colonias pequeñas en AND ^a	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Crec. a 37°C	+	-	-	-	(+)	+	+	-	-
Ureasa	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrolisis de: esculina	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Pig. rosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pig. amarillo ^b	+	+	-	-	+ ^c	(+)	-	-	+
Prod. de Indigo-tíndine	-	-	-	-	+	-	d	-	-
Prod. ácido de Glucosa	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Sacarosa	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Maltosa	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Glicerol	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Manitol	+	-	+	-	+	-	+	+	-
Arabinosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Crec. TTC agar	+	.	+	+	+	+	+	+	ND
Causa hipertrofia en tallo	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Produce gomolets en inflorescencias	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Prod. marchitez y/o manchas foliares	-	-	+	+	+	+	+	+	-

a. En agar nutritivo dextrosa las colonias son 1 mm de diámetro después de 3 días

b. En medio NBY

c. Las colonias pueden tener gránulos azules

(+) La mayoría de las razas la dan positiva

ND No da la reacción

. No conocida

(Rodríguez, 1991)

Tabla 4a. Género *Erwinia*. Características diferenciales de las especies fitopatógenas de *Erwinia*. 1. *E. amylovora*, 2. *E. salicis*, 3. *E. tracheiphila*, 4. *E. nigrifluens*, 5. *E. rubrifaciens*, 7. *E. herbicola* var. *herbicola*, 8. *E. herbicola* var. *stewartii*, 9. *E. uredoovora*, 10. *E. uredoovora*, 11. *E. carotovora* var. *carotovora*, 12. *E. carotovora* var. *atroseptica*, 13. *E. chrysanthei*, 14. *E. cypripedi*, 15. *E. raphanitic*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
SH ₂ (cisteína)	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetonia	+	+	d	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Licuefacción de gelatina	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Índol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Hidrólisis de la caseína	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	d	-	-
Temperatura máxima en °C	33-34	35-40	32-39	38-39	38-40	37-40	40	35	31	37	35	37	34	38	34
Producción de ácido de:															
Arabinosa	d	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	-	+	-	-	d	+	-	d	+	+	+	+	+
Glucósidos	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d
Xilosa	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Rafinosa	-	-	-	+	-	-	d	+	+	+	+	+	d	-	+
Dulcitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Inositol	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	d	-	-	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	-	-	+
Melicitosa	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	d	d	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	d	+	-	d	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Dextrina	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	d	-	+	+	d	d	d	-	d	+	+	+	+	+
Manosa	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Ramnosa	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribosa	+	+	-	+	+	-	+	d	-	+	+	+	+	+	+
Sorbitold	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Clave: d = débil
(Mayea y Padrón, 1983)

Tabla 4b. Género *Erwinia*. Características fisiológicas y bioquímicas diferenciales para especies del "grupo" *E. amylovora*.

Prueba	<i>E. amylovora</i>	<i>E. salicis</i>	<i>E. tracheiphila</i>	<i>E. nigrifluens</i>	<i>E. quercina</i>	<i>E. rubrifaciens</i>
Crecimiento anaeróbico	±	±	±	+	+	+
H ₂ S Cisteína	-	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	+	-	-
Crecimiento a 36 C	-	-	-	+	+	+
Oxidación del gluconato	-	-	+	-	-	-
Sustancias recutoras de sacarosa	+	+	d	-	+	-
Degradación de pectato	-	+	-	-	-	+
Pigmento rosa en YDC	-	-	-	-	-	+
Acetoina	+	+	d	+	+	-
Crecimiento mucoide	+	+	-	-	+	+
Crecimiento en medio MS	+	-	ND	+	+	+
Hipersensibilidad en tabaco	+	-	ND	-	-	-
Producción de ácido de:						
Salicina	-	+	-	+	+	-
oc metil glucocido	-	-	-	-	+	+
Arabinosa	d	-	-	+	-	+
Manitol	-	+	-	+	+	+
Salicina	-	+	-	+	+	-
Xilosa	-	-	-	+	-	-
Raffinosa	-	+	-	+	-	-
Esculina	-	+	-	+	+	-
Manosa	-	+	-	+	+	+
Ribosa	+	+	-	+	+	+

(Rodríguez, 1991)

Tabla 4c. Género *Erwinia*. Características fisiológicas y bioquímicas diferenciales para las especies del "grupo" *E. herbicola*.

	<i>Erwinia herbicola</i> var. <i>herbicola</i>	var. <i>ananas</i>	<i>E. stewartii</i>	<i>E. uredoovora</i>
Inositol	-	+	-	+
Melezitosa	-	-	-	+
Melobiosa	-	+	+	+
Matosa	+	+	-	+
Adonitol	-	-	-	+
Celobiosa	-	+	-	+
Dextrina	+	-	-	+
Glicerol	-	+	-	+
Acetoina	+	+	-	+
Cre. mucoide	d	+	+	-
Movilidad	+	-	+	+
Red. nitratos	+	-	-	+
Licuef. gelatina	+	+	-	+
Desaminasa fenil-alanina	+	-	-	-
Indol	-	+	-	+
DNA asa	-	-	-	+

d = Reacción que algunas cepas lo dan positiva y otras negativas.
(Rodríguez, 1991).

Tabla 4d. Género *Erwinia*. Características fisiológicas y bioquímicas diferenciales para especies del "grupo" *E. carotovora*.

Prueba	<i>Erwinia carotovora</i>				
	var. <i>carotovora</i>	var. <i>atroseptica</i>	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>E. cyripedii</i>	<i>E. rhpontici</i>
Producción de ácido de:					
Lactosa	+	+	v	-	+
Maltosa	.	+	-	.	+
Trehalosa	-	+	-	.	+
Metil glucocido	-	+	-	-	v
Palatinosa	-	+	-	-	+
Producción de:					
Indol	-	-	+	-	-
Fosfatasa	-	-	+	-	v
Lucitinasas	-	-	+		
Pigmento azul	-	-	+		
Sustancias reductoras a partir de sacarosa	-	+	+ ^a	-	v
Sensibilidad a eritromicina	-	-	+	+	+
Crecimiento a 36°C	+	-	+	+	-
Crecimiento en NaCl 5%	+	+	-	+	+
Licuefacción de gelatina	+	+	v	-	-
Gas de glucosa	- ^c	- ^d	+	+	-
Pudrición de papa	+	+	+	-	+
Degradación del pectato	+	+	+	-	-

(Rodríguez, 1991)

Tabla 5a. Género *Pseudomonas*. Características fisiológicas y bioquímicas diferenciales para las especies del "grupo Fluorescente".

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. marginalis</i>	<i>P. tolaasii</i>	<i>P. agaricae</i>	<i>P. cichorii</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. syringae</i> (Grupo 1)
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	-
Dihidrolasa de arginina	+	+	ND	ND	-	-	-
Reducción de NO ₃ -N ₂	-	-	ND	ND	-	-	-
Crecimiento a 41 C	+	-	n	ND	-	-	-
Utilización de :							
Manitol	+	+	+	+	+	+	V
Geraniol	+	-	ND	ND	-	-	-
Benzoato	+	-	+	+	-	-	-
Calobios	-	-	+	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-
Trehalosa	-	+	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	+	-	-	-	-	-
m-Tartrato	-	V	ND	ND	+	+	V
D-Tartrato	-	V	ND	ND	-	+	V
D-Arabinosa	-	-	ND	ND	-	-	-
L-Rhamnosa	-	V	ND	-	-	-	-
Eritritol	+	+	NC	NC	-	+	-
Sacarosa	+	+	NC	NC	-	-	-

(Rodríguez, 1991)

Tabla 5b. Género *Pseudomonas*. Características fisiológicas y bioquímicas diferenciales para las especies del "grupo No Fluorescente".

	<i>P. carophy</i>	<i>P. avenae</i>	<i>P. cornuga</i>	<i>P. gladioli</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. pseudo</i> alcaligenes	<i>P. solanacearum</i> Biotipos		
	ii		ta			1	2	3 y	4
Pigmentos difusibles	V,C	-	-	V ¹ ,A,C	V ¹ ,A,C	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	V	+	+	+	+	+
Dihidrolasa de arginina	+	-	-	-	-	-	N	ND	ND
Reducción de nitratos a N ₂	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 41°C	+	+	-	V+	V+	+	Nd	ND	ND
Utilización de:									
Celobiosa	+	ND	-	+	+	-	-	-	-
Trehalosa	V	ND	ND	+	V	ND	+	-	+
D-Arabinosa	+	-	-	+	+	-	-	-	-
D-Tartrato	-	ND	V	+	-	ND	-	-	V
m-Tartrato	+	ND	ND	+	+	ND	-	V	+
Manitol	+	+	ND	+	+	ND	-	-	+
Sorbitol	+	+	ND	+	+	ND	-	-	+
L-Rhamnosa	+	ND	-	-	-	-	-	-	-
Levulinato	-	ND	ND	-	+	ND	V	V	V
Sacarosa	+	-	ND	+	+	-	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Benzoato	-	ND	ND	+	V+	ND	-	-	-
n-Propanol	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B-alanina	-	+	-	-	-	+	V	V	V

V¹ = Verde no fluorescente, C = Café, A = Amarillo, V = Reacción variable, N.D. No da la reacción positiva.
(Rodríguez, 1991).

Tabla 5c. Género *Pseudomonas*. Características de los patovares de *Pseudomonas syringae* 1. *Pv. tabaci*; 2. *Pv. ischrymans*; 3. *Pv. syringae*; 4. *Pv. aptata*; 5. *Pv. pisi*; 6. *Pv. antirrhini*; 7. *Pv. morspronomum*; 8. *Pv. delphinii*; 9. *Pv. tomato* 10. *Pv. erobotryae*; 11. *Pv. sesami*; 12. *Pv. savastanoi*; 13. *Pv. coronafaciens*; 14. *Pv. striafaciens*; 15. *Pv. mori*; 16. *Pv. passiflora*; 17. *Pv. glycinea*; 18. *Pv. phaseolicola*; 19. *Pv. persicae*; 20. *Pv. cannabina*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Levana	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Hundimiento ¹																				
del pectato	4,81	4,8	-	-	-	4	4	4	4	4	4,8	4	-	ND	4	ND	4	4	4	4
B glucosidasa	+	+	+	+	V	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Utilización de:																				
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	V	-	+	-
Betaina	+	-	+	+	+	+	+	+s	+	+	+	+	+	+	-	+	-	V	-	+
Inocitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	V	+	+s	+	+	+	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	V	+	+	V	+	-	-	+	-
Eritritol	V	+	+	+	V	-	Vs	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
L-Tartrato	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tartrato	-	-	V	+s	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lactato	-	-	+	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraniliato	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-
Homoserina	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. El hundimiento del pectato se presenta a un pH de 4.6 y 8.5 (Rodríguez, 1991)

Tabla 6. Género *Xanthomonas*. Características diferenciales de las especies más importantes.

Prueba	<i>X. campestris</i>	<i>X. fragariae</i>	<i>X. albilineas</i>	<i>X. axonopodis</i>	<i>X. ampelina</i>
Crec. a 35 °C	+	+	+	+	-
Hidrólisis esculina	+	+	+	+	-
Crecimiento mucoso	+	+	-	-	-
Licuefacción gelatina	V	+	V	-	-
Proteólisis de leche	+	-	-	-	-
H ₂ S de peptona	+	-	-	+	d
Ureasa	-	-	-	-	+
Tolerancia al NaCl%	2.0 - 5.0	0.5 - 1.0	< 0.5	1.0	1.0
Producción de ácido ^a					
Arabinosa	+	-	-	-	+
Glucosa	+	+	+	+	-
Manosa	+	+	+	-	-
Galactosa	+	-	d	-	+
Celobiosa	+	-	-	-	-
Trehalosa	+	-	-	+	-

a = Dentro de los 21 días según el método de Dye (1962)
(Rodríguez, 1991)

MEDIOS DE CULTIVO

BK

Ingredientes:

Proteosa peptona # 3 (Difco)	20.0 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1.5 g
Agar	15.0 g
Glicerol	15 ml
Agua destilada	1 litro

Preparación:

Los ingredientes se disuelven en el agua destilada en el orden citado, se mezclan bien y se esteriliza a 121°C por 20 min. Para evitar su preparación y obtener resultados

menos variables, la mezcla sólida de este medio la comercializa Difco con el nombre de *Pseudomonas*-agar-F.

CVP

a. Colocar 500 ml de agua destilada hirviendo en la mezcladora magnética, con un reóstato para controlar la velocidad. Hacerla funcionar a baja velocidad y agregar:

a. Solución de cristal violeta a 0.75 % (la concentración final es de 1.5 µg/ml de cristal violeta)	1 ml
b. NaOH 1N (8 g de NaOH en 200 ml de agua destilada)	4.5 ml
c. CaCl ₂ .H ₂ O a 10 % (use siempre solución fresca; no almacene por un período mayor de dos semanas)	6 ml
d. Agar (Difco)	2 g

La concentración de agar se puede incrementar a 4 g/500 ml cuando se va a rayar con cultivos de *Erwinia*. Si la concentración de agar se incrementa, la concentración de CaCl₂ puede ser reducida a 3 ml, y el citrato de sodio puede ser omitido.

e. NaNO ₃	1 g
f. Citrato trisódico dihidratado	2.5 g

Es un medio que facilita la detección de colonias de cepas pectolíticas.

g. Mezclar a alta velocidad durante 15.

h. Agregar lentamente 9 g de polipectato de sodio, mezclar cuidadosamente evitando formar grumos de polipectato de sodio. Mezclar a alta velocidad durante 15. La cantidad de polipectato de sodio en la fórmula original fue reducida a 9 g/500 ml de medio, pero en algunos casos la proporción puede incrementarse hasta 15 g/500 ml de medio.

i. Repartir en un matraz de 2 L; agregar 0.5 ml de una solución de lauril sulfato de sodio, a 10 % (SDS grado laboratorio).

j. Tapar los matraces con papel aluminio; esterilizar en la autoclave 25 min a 120 °C o 15 lb de presión. Dejar que la presión baje lentamente para evitar las burbujas.

k. Vaciar a las cajas lo más pronto posible.

Es esencial no usar cajas con el medio que se haya resecado por más de 48 h a temperatura ambiente. Igualmente, no deben usarse placas que presenten humedad excesiva al tiempo de inocularles la bacteria. Este es un aspecto muy importante para tener éxito con este medio.

D-1 M AGAR

Ingredientes

Manitol	15.0	g
NaNO ₃	5.0	g
LiCl	6.0	g
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0.002	g
K ₂ HPO ₄	2.0	g
MgSO ₄ .H ₂ O	0.2	g
Azul de bromotimol	0.1	g
Agar	15.0	g
Agua	1	litro

Preparación:

Los ingredientes se disuelven uno a uno en el agua en el orden citado, se mezclan bien y se esteriliza. El medio deberá tener un pH de 7.2 y un color azul obscuro.

JD1

Ingredientes:

Base para caldo PPLO (Difco)	10.0	g
Hemin chloride	40.0	mg
Albúmina de bovino	0.5	g
Agar	15.0	g
Agua	1	litro

Preparación:

Se mezclan todos los componentes, excepto la albumina de bovino y se esterilizan en la autoclave. La albúmina de bovino se prepara separadamente en solución acuosa a 0.5 %, disolviendo los 0.5 g en 100 ml de agua destilada, y se esteriliza pasándola a través de un filtro bacteriológico y se mezcla con el medio.

MS AGAR**Ingredientes:**

Manitol o sorbitol	10.0 g
Acido nicotínico	0.5 g
L-asparagina anhidra	3.0 g
K ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	2.0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
Taurocolato de sodio (Difco)	2.5 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 litro

Preparación:

El agar se disuelve primero en 800 ml del agua destilada; una vez disuelto, se agregan cada uno de los demás ingredientes sólidos en el orden citado, asegurándose de que cada uno esté bien disuelto antes de agregar el siguiente.

Por separado se preparan los siguientes ingredientes líquidos y se mezclan en el medio, en las cantidades que a continuación se mencionan.

Tergitol 7 (Sulfato heptadecil de sodio)	0.1 ml
Acido nitrilotriacético a 2 % (se prepara mezclando en 100 ml de agua destilada 2 g del ácido nitrilotriacético y se le agregan 1.4-6 g de KOH).	10.0 ml
Azul de bromotimol al 0.5 % (se prepara mezclando 0.5 g de bromotimol en 100 ml de agua destilada).	9.0 ml

Rojo natural a 0.5 %	2.5 ml
(se prepara mezclando 0.5 g del colorante en 100 ml de agua destilada).	
Hidróxido de sodio en solución acuosa 1N	5.0 ml
(no debe usarse si forma precipitado).	
Nitrato de talio a 1%	1.75 ml
(se prepara mezclando 0.1 g de Nitrato de talio en 10 ml de agua destilada).	
Cloruro de cobalto en solución acuosa 14 mM	50.0 ml
Cicloheximida a 1 %	5.0 ml
(se prepara disolviendo 0.1 g del compuesto en 10 ml de agua).	

Una vez agregados los ingredientes líquidos, se afora un 1 litro de agua destilada; el pH debe ser de 7.3.

PD2

Citrato trisódico	1.0 g
Succinato disódico	1.0 g
MgSO₄.7H₂O	1.0 g
K₂HPO₄	1.0 g
KH₂PO₄	1.0 g
Agar (Difco)	15.0 g
Digerido pancreático de caseína	
(Tryptona (Difco)	4.0 g
Digerido de papaína de harina	
de soya (Soytone (Difco)) o	
Peptona de Phitone (BBL)	2.0 g
Solución madre de	
hemin chloride (0.1 % de	
hemin chloride, disuelto	
en NaOH 0.05 N)1	10.0 ml
Albúmina de suero de bovino	
fracción 5 (BSA-5) (en Solución	
acuosa a 20 %)	10.0 ml

Preparación:

Se preparan primero y por separado la solución concentrada de hemin chloride y la albúmina de suero de bovino. Todos los componentes, incluidos los 10 ml hemin chloride a 0.1 % se mezclan y se someten a la autoclave en 980 ml de agua bidestilada; la solución de BSA-5 debe ser esterilizada pasándola a través de un filtro bacteriológico y se agrega aseptícamente al resto del medio cuando éste tenga entre 45-50 °C de temperatura.

El pH del medio debe ser aproximadamente siete, ajustándolo después de disolver el agar, pero antes de someterlo a la autoclave.

YDC

Ingredientes

Extracto de levadura	10.0 g
Dextrosa (glucosa)	20.0 g
Carbonato de calcio	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 litro

Preparación:

Los ingredientes se disuelven uno por uno en el agua destilada, se mezclan bien y se esterilizan a 121°C durante 15 minutos.

H. BIBLIOGRAFIA

ALLEN, O.M.; HOLDING, A.J. 1974. *Agrobacterium*. Ed. por Buchannan R.E. and N. E. Gibbons Burgey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 ed. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 264-267.

BRATHWAITE, Ch.W.D. 1985. An introduction to the diagnosis of plant disease. IICA. Educational Texts and Materials Series No.47. 50 p.

- BRATHWAITE, CH. W. D.; SOSA-MOSS, C. 1995. Introducción al diagnóstico de las enfermedades de las plantas.
- BUCHANNAN, R.E.; GIBBONS, N.E. (Ed.). 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 ed. Baltimore: Williams and Wilkins.
- COWAN, S.T. 1974. *Enterobacteriaceae*. Ed. por Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 ed Baltimore: Williams & Wilkins. p. 290-293.
- CUMMINS, C.S.; LELLIOTT, R. A.; ROGOSA, M. 1974. *Corynebacterium*. Ed. por Buchanan, R.E., and N. E. Gibbons, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8 ed Baltimore: Williams & Wilkins. p. 611-617.
- DA SILVA, R.R. 1982. Identificación de bacterias fitopatógenas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 109 p.
- DAVIS, M.J.; WHITCOMB, R.F.; Gillaspie, A.G. JUNIOR. 1982. Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so-called *Rickettsia* bacteria). Ed. por Mortimer, P.S. *Phytopathogenic bacteria*. Springer-Verlang. p 2172-2188.
- DE VAY, J.E.; SCHATHORST, W.C. 1963. Single cell isolation and preservation of bacterial cells. *Nature* 199:775-777.
- DOUDOROFF, M.; PALLERONI, N.J. 1974. *Pseudomonas*. Ed. por Buchanan, R.E. and N. E. Gibbons, *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8 ed Baltimore: Williams & Wilkins. p. 217-243.
- DYE, D.W. 1980. *Xanthomonas*. Ed. por Schad, N.W. *Plant Pathogenic Bacteria*. Bacteriology Committee of American Phytopathogenic Society. p 45-49
- DYE, D.W.; LELLIOT, R.A. 1974. *Xanthomonas*. Ed. por Buchanan, R.E., and N. E. Gibbons *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8 ed Baltimore: Williams & Wilkins. p.243-249.

FELTHAM, R.K.A.; POWER, A.K.; PELL, P.A.; SNEATH, R.H.A. 1978. A simple method for storage of bacteria at -76°C. *Journal of Applied Bacteriology* 44:313-316.

GOTO MASAO. 1990. *Fundamentals of bacterial plant pathology*. Academic Press, Inc. 342. p.

HILDEBRAND, D.C.; SCHROTH, M.N.; SANDS, D.C. 1988. *Pseudomonas*. Ed. por Schaad, N.W. (ed). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota.p. 60-80.

HOPKINS, D. L. 1988. *Xylella fastidiosa* and other costidious bacteria of uncertain affiliation. p. 95-103. In Sachaad, N.W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS. Press. The American Phytopathological Soc. St. Paul Minnesota. p. 95-103.

KELMAN, A.; DICKEY, R.S. 1980. Soft rot of "carotovora" group. Ed. por Schaad, N.W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Bacteriology Committee of American Phytopathogenic Society. p. 31-35.

LELLIOT, R.A. 1965. The preservation of plant pathogenic bacteria. of *Applied Bacteriology* 28: 181-193.

LELLIOTT, R.A. 1974. *Erwinia*. Ed. por Buchannan, R.E., and N. E. Gibbons *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8 ed. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 332-339.

LELLIOT, R.A.; STEAD D.E. 1987. *Methods for diagnosis of bacterial diseases of plants*. *Methods in Plant Pathology* Vol. 2. Blackwell Scientific Publications Oxford.

MAYEA, S. S.; PADRON, S.J. 1983. *Bacterias y hongos fitopatógenos*. Editorial Pueblo y Educación. 233 pp.

McCOY, R.E. 1982. Wall-free prokaryotes of plants and invertebrates. Ed. por Mortimer, P.S. *Phytopathogenic Bacteria*. Springer-Verlang. p. 2238-2246.

MOORE, L.W.; ANDERSON, A.; KADO, C.I. 1980. *Agrobacterium*. Ed. por Schaad, N.W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press. St. Paul Minnesota.p. 15-25.

- MOORE, L.W.; KADO, C.I.; BOUZAR, H. 1988. *Agrobacterium*. Ed. por Schaad, K.L.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS. Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. p. 16-36.
- MORTIMER, P.S.E (Ed.) 1982. *Phytopathogenic bacteria*. Springer-Verlang. N.Y. 250 p.
- OKU, H. 1994. *Plant Pathogenesis and Disease Control*. Lewis Publishers. 193 p.
- RODRIGUEZ, M. MA. DE L. 1991. *Manual de identificación de bacterias fitopatógenas*. Dpto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 91 p.
- SANDS, D.C.; SCHROTH M.N.; HILDEBRAND, D.C. 1980. *Pseudomonas*. Ed. por Schaad N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Bacteriology Committee of American, Phytopathogenic Society. p. 36-44.
- SCHAAD, N.W.; STALL, R.E. 1980. *Xanthomonas*. Ed. por Schaad, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS. Press. The American Phytopathological Society St. Paul Minnesota. p. 81-94.
- SCHROTH, M.N.; HILDEBRAND, D.C. 1980. *Erwinia*. Ed. por Schaad, N.W. Identification of plant pathogenic bacteria. Bacteriology Committee of American Phytopathogenical Society. p. 12-25.
- SCHROTH, M.N.; HILDEBRAND, D. 1988. *Erwinia*. Ed. por Schaad, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. p. 37-59.
- SEATTLER, A.W.; SCHAAD, A.W.; ROTH, D.A. (Ed). 1989. *Detection of bacteria in seed and other planting material*. APS Press. The Amer. Phytopathological Soc., ST. Paul, Min. 105 p.
- SIGEE, D.C. 1993. *Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects*. Cambridge, University Press. 325 p.
- TULLY, J.G.; W and R. F. Whitcomb. 1982. *The genus Spiroplasma*. Ed. por Mortimer, P.S. *Phytopathogenic bacteria*. Springer-Verlang. p. 2271-2284.

- VIDAVER, A.K. 1980. Gram-positive bacteria *Corynebacterium*. Ed. por Schaad, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Bacteriology Committee of American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. EUA. p. 12-17.
- VIDAVER, A.K.; MORTIMER, P.S. 1982. Phytopathogenic Coryneform and related bacteria. Ed. por Mortimer, P.S. Phytopathogenic bacteria. Springer-Verlang. p. 1179-1187.
- VIDAVER, A.K.; DAVIS, M.J. 1988. Gram-positive bacteria. Ed. por Schaad, N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS. Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. p. 104-119.
- WELLS, J. M.; RAJU, B. C.; HUNG, H-Y.; WEISBURG, W. G.; MANDELCO-PAUL, L.; BRENNER, D. J. 1987. *Xylella Fastidiosa* gen. nov.: Gram-negative, Xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. International Journal System Bacteriology. 37:136-143.



IV. NEMATODOS FITOPARASITOS

Existen muchas especies de nematodos parásitos de plantas superiores; sin embargo, sólo algunas de ellas deben ser consideradas como patógenos graves que pueden causar daños económicos muy severos.

Los nematodos fitoparásitos están adaptados a vivir en el suelo, bien sea durante todos sus estados de desarrollo o, en el caso de endoparásitos, en sus formas libres.

Los ectoparásitos son los que pasan toda su vida entre las partículas de suelo y su relación de parasitismo con las especies vegetales es únicamente para satisfacer sus necesidades nutricionales; algunos de ellos son transmisores biológicos de virus.

En el caso de especies endoparásitas, algunas son llamadas migratorias porque no pierden su condición filiforme y se desplazan dentro de los tejidos vegetales; tal es el caso de *Ditylenchus dipsaci*, ciertas especies de *Pratylenchus*, etc. Otras especies son consideradas endoparásitas sedentarias porque se fijan en tejidos vegetales especializados, e incluso los alteran tomando sus nutrientes de las células enfermas; como ejemplos puede citarse a *Nacobbus aberrans*, *Globodera rostochiensis*, *Meloidogyne* spp., etc.

Los nematodos parásitos de plantas son muy comunes en todos los suelos cultivados o no cultivados. En relación con la fitosanidad, únicamente causan pérdidas económicas cuando se presentan condiciones que los favorecen y sus poblaciones se elevan desmedidamente, o cuando aun en poblaciones bajas actúan como agentes fitopatológicos primarios, que debilitan, predisponen o causan heridas, que permiten la infección por un hongo o bacteria.

Cuando se trata de un problema causado únicamente por nematodos fitoparásitos en un cultivo determinado, es difícil hacer el diagnóstico en campo, porque salvo excepciones (agallas en raíces, hojas o semillas; presencia de quistes en las raíces; anillo de color

rojo en cocotero; etc.), no inducen síntomas característicos exclusivos; además, son organismos microscópicos poco visibles a simple vista. Por tales razones, para conocer con certeza si la enfermedad es causada por nematodos, debe realizarse un análisis de laboratorio, que puede ser sencillo o complejo, dependiendo de la especie de que se trate.

A. RECOLECCION DE MUESTRAS

Para un diagnóstico confiable, es necesario que las muestras que van a analizarse sean representativas del problema de campo. La manera de obtener las muestras varía con el tipo de cultivo de que se trate (anual, bianual o perenne), el tamaño de las plantas enfermas (herbáceas, arbustos, árboles, palmeras), la extensión del área cultivada y otros factores. Deberá considerarse también el material que va a muestrearse, que puede ser suelo o partes del vegetal, como raíces, hojas, flores, semillas, trozos de madera, etc. En algunos casos, en la misma muestra se puede incluir suelo y la planta entera o sólo el sistema radical, lo que dependerá del tamaño de las plantas y del objetivo del muestreo.

Dependiendo del problema de que se trate, la toma de muestras puede ser completamente al azar o al azar dirigido, y el número de ellas estará condicionado a la precisión que se requiera, lo que a su vez depende de los objetivos del estudio. Una manera de reducir el error durante el muestreo, es constituir las muestras con un número determinado de submuestras, lo que permite incrementar la precisión del diagnóstico y evitar trabajo innecesario.

Debido a que los nematodos son muy susceptibles a la desecación y a temperaturas altas, se recomienda tomar algunas precauciones en el manejo de las muestras, sobre todo en el caso de los filiformes en suelo. Debe evitarse que las muestras se sobrecalienten, por lo que no deben exponerse al sol; no debe permitirse que el suelo o los materiales vegetales se des sequen; y no deben apilarse muchas muestras encimadas, porque los nemátodos mueren también cuando se les comprime. Estas precauciones no son necesarias cuando se trata de suelo seco infestado con quistes de nematodos, ya que éstos no son afectados por los factores adversos mencionados.

Generalmente se utilizan bolsas de plástico para transportar las muestras; cuando se trata de suelo, las bolsas deben ser de plástico grueso para evitar roturas y dispersión del

suelo, con la consiguiente contaminación de estos parásitos a áreas no infestadas. Se recomienda usar dos bolsas metida una dentro de otra, lo que da mayor seguridad en el manejo de las muestras; además, esto permite utilizar dos etiquetas con todos los datos necesarios, una entre bolsa y bolsa y otra sujeta a la liga que se utiliza para cerrar la boca de las mismas; de esta manera, si por alguna razón se pierde la etiqueta exterior, la muestra no se inutiliza porque se tienen los datos de la etiqueta interior.

Cuando las muestras no pueden procesarse inmediatamente que llegan al laboratorio, deben conservarse en un refrigerador a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, pero no por más de dos semanas, debido a que los nematodos fitoparásitos mueren y los saprófitos se desarrollan, lo que es una fuente importante de error en el diagnóstico. Si se trata de nematodos formadores de quistes, las muestras de suelo deben secarse a la sombra y regresarse a las bolsas, pudiendo conservarse así por tiempo indefinido.

B. EXTRACCION Y PRESERVACION DE NEMATODOS DEL SUELO Y TEJIDOS VEGETALES

Una vez que las muestras llegan al laboratorio, debe procederse lo más pronto posible a hacer la extracción de los nematodos con cualesquiera de las técnicas que han sido desarrolladas para este fin.

La decisión de cuál metodología aplicar para la separación de los nematodos de los materiales infestados, depende de la precisión que se requiera en el análisis, del tipo de nematodo de que se trate, del equipo de laboratorio de que se dispone y, desde luego, de si se trata de suelo u otro tipo de material infestado.

Dentro de los métodos menos precisos para la extracción de nematodos filiformes de suelo y de tejidos vegetales debe citarse al embudo de Baermann, con sus múltiples modificaciones.

En el caso de nematodos que aunque no inducen la formación de agallas radicales, están parcial o totalmente incrustados en las raíces, como *Tylenchulus semipenetrans*, *Rotylenchulus reniformis*, *Ditylenchus dipsaci* y otros, y de especies que sí forman agallas verdaderas como *Meloidogyne* spp y *Nacobbus* spp, el diagnóstico puede hacerse tiñiendo

los tejidos con Fucsina ácida o Azul de algodón en lactofenol, lo que facilita la observación y extracción de los individuos para identificarlos.

La descripción de la técnica del embudo de Baermann, así como de la coloración diferencial de raíces, pueden consultarse en cualquier texto clásico de nematología agrícola, o bien en Brathwaite (1984) o Brathwaite y Sosa-Moss (1995).

Uno de los métodos más precisos de extracción de nematodos, tanto de suelo como de órganos vegetales infestados, es el de Centrifugación-flotación en solución azucarada, por el alto porcentaje de ejemplares (vivos o muertos) que se recuperan, y porque se utiliza una submuestra más grande, que es más representativa. Su única desventaja es que se requiere de una centrífuga que es costosa y que no siempre está a disposición en todos los laboratorios de diagnóstico fitosanitario de América Latina.

El procedimiento básico, desarrollado para separar los nematodos del suelo, es el siguiente:

- Homogeneizar la muestra traída del campo, revolviéndola con cuidado, y eliminar las piedras o gravas grandes.
- Tomar pequeñas porciones con una cuchara, hasta completar 100 ml en un vaso de precipitados grande.
- Agregar agua suficiente al vaso hasta completar aproximadamente 800 ml.
- Mezclar con un agitador motorizado de laboratorio (1550 rpm) durante 20 segundos y dejar sedimentar por 1 min.
- Decantar la suspensión sobre la malla de dos tamices empotrados entre sí; el de arriba debe ser de 40 mallas y retiene las partículas minerales y orgánicas grandes, dejando pasar a los nematodos; el de abajo, de 325 ó 400 mallas, retiene a los nematodos, arcillas y partículas orgánicas del mismo diámetro.
- Lavar el material del tamiz de 40 mallas, cuando todavía está sobre el otro y eliminar lo retenido.
- Transferir con una pizeta los nematodos y partículas retenidos en el tamiz de 325 ó 400 mallas a un vaso de precipitados de 150 ml.
- Agitar la suspensión del vaso y distribuirla equitativamente en los tubos de la centrífuga, que deben ser de 50 ó 100 ml de capacidad.
- Uniformizar el peso de todos los tubos en una balanza.

- Agregar a cada tubo 1 g de caolín y agitar vigorosamente.
- Centrifugar a 3,500 rpm durante 3 min y esperar hasta que la máquina se detenga por sí sola.
- Eliminar el sobrenadante rotando con cuidado los tubos para eliminar la materia orgánica que flota, porque no contiene nematodos. Esto se debe a que las partículas de caolín se adhieren al cuerpo de los nematodos por diferencia en las cargas eléctricas y los hace más pesados, sedimentándose en el fondo por la fuerza centrífuga junto con las partículas minerales del suelo, y así flotan únicamente los residuos de materia orgánica.
- Llenar los tubos con una solución azucarada que se prepara disolviendo 454 g de azúcar comercial en un litro de agua, y resuspender en ella el precipitado que quedó en el fondo, agitando vigorosamente.
- Centrifugar nuevamente a 3.000 rpm durante 3 min para que sedimenten únicamente el caolín y las partículas minerales del suelo, quedando así los nematodos suspendidos en la solución azucarada, debido a que las moléculas de azúcar neutralizan las cargas eléctricas del caolín, que al desprenderse del cuerpo de los nematodos permiten que éstos floten.
- Decantar la solución azucarada que contiene los nematodos, sobre un tamiz de 325 o 450 mallas.
- Lavar rápidamente con agua corriente para evitar que el agua azucarada dañe a los nematodos plasmolizándolos.
- Pasar cuidadosamente los nematodos a un vaso de precipitados de 150 ml con el agua de una pizeta, procurando que el volumen final no exceda los 30 ml.
- Tomar una alícuota de ésta suspensión y observar los nematodos al microscopio de disección.

Una de las modificaciones a ésta técnica, que permite incrementar aún más la precisión al aumentar el tamaño de la submuestra, sobre todo cuando las poblaciones de nematodos en el campo son bajas, fue hecha por Sosa-Moss (1974) y consiste en utilizar un litro de suelo en lugar de 100 ml. La muestra se mezcla en una cubeta con cinco a seis litros de agua, desbaratando los terrones suavemente con la mano. Después de agitar bien se deja reposar por 2 a 3 min para que las partículas de suelo más pesadas se asienten. El agua de la cubeta se decanta con cuidado, para no remover el suelo asentado, sobre los dos tamices empotrados de 40 y 325 ó 450 mallas, dejando perder el agua que pase a través de ellos. Las partículas minerales y orgánicas que quedan retenidas en el tamiz de arriba se lavan y se eliminan; los nematodos y otros materiales se recuperan del tamiz de malla cerra-

da en un vaso de precipitados; esta suspensión se distribuye en los tubos de la centrifuga y se procede como se indicó al describir la técnica básica.

Otra modificación a la técnica básica descrita anteriormente se utiliza para recuperar nematodos endoparásitos, tanto migratorios como sedentarios, de tejidos vegetales infectados.

El procedimiento es como sigue:

- Lavar cuidadosamente el material vegetal enfermo (raíces o cualquier otro tipo de tejido) y cortarlo en trocitos de 0.5 a 1.0 cm.
- Pesar 5 g del tejido ya cortado.
- Moler en licuadora los pedazos de tejido en 100 ml de agua, durante 30 segundos o menos.
- Pasar el material licuado a través de una serie de tamices de 60, 100, 200 y 325 mallas. Las partículas vegetales que quedan en los tamices de 60 y 100 mallas se desechan porque ahí no quedan retenidos nematodos.
- Transferir con una pizeta a un vaso de precipitados los nematodos y restos vegetales que quedaron en los tamices de 200 y 325 mallas.
- Agitar la suspensión del vaso y distribuirla proporcionalmente en los tubos de la centrifuga.
- Agregar aproximadamente un gramo de caolín a cada tubo y aforar con agua a 50 ml.
- Uniformizar el peso de los tubos en una balanza, antes de centrifugar.
- Agitar enérgicamente el contenido de cada tubo para que el caolín se suspenda uniformemente.
- Centrifugar a 3,500 rpm durante 3 minutos.
- Decantar cuidadosamente para eliminar el agua de los tubos y los restos de material vegetal, procurando perturbar al mínimo el precipitado que contiene al caolín y a los nematodos.
- Llenar los tubos con la solución azucarada preparada como ya se indicó.
- Agitar vigorosamente los tubos para resuspender el material asentado.
- Centrifugar nuevamente a 3,000 rpm durante 3 min. La fuerza centrífuga hace que el caolín vuelva a sedimentarse, pero los nematodos quedan suspendidos en la solución azucarada.
- Pasar la suspensión azucarada de los tubos por el tamiz de 325 mallas, lavando rápidamente con agua los nematodos retenidos, con la ayuda de una pizeta, para eliminar el azúcar que los plasmoliza y los distorsiona.

- Transferir cuidadosamente los nematodos a un vaso de precipitados de 150 ml con el agua de una pizeta, procurando que el volumen final no exceda 30 ml.
- Tomar una alícuota de la suspensión de nematodos y observarlos al microscopio de disección.

Para preservar los nematodos obtenidos, deben matarse primero en baño María o agregando igual volumen de fijador hirviendo. La función del fijador es preservar a los organismos evitando su descomposición, así como hacer resaltar algunos de sus caracteres morfológicos útiles en la identificación. Los fijadores más utilizados son: Formalina a 2 - 5%, TAF y FAA, cuyas fórmulas son ampliamente conocidas (Brathwaite y Sosa-Moss, 1995).

La extracción de nematodos formadores de quistes, así como los que inducen la formación de agallas, representan un caso especial.

Para separar de las muestras de suelo a los quistes se utiliza la característica de que cuando están secos flotan en el agua.

Una manera rápida de detectar la presencia de quistes en un campo infestado, es utilizando una cubeta llena de agua a la que se agrupa suelo, separando con una cuchara el material que flota para observarlo con una lupa; existen otras técnicas, como la llamada "técnica rápida" que requiere de un matraz Erlenmeyer o de cualquier recipiente de forma cónica, en donde se agrega suelo al que se vierte agua para hacer flotar los quistes que se recoger decantando sobre un papel filtro montado en un embudo.

Sin embargo, la metodología más precisa que se utiliza a nivel mundial es la del "Flotador de Fenwick". La ilustración del flotador de Fenwick se presenta en la Figura 1 del Apéndice.

Este aparato, que puede ser fabricado en cualquier lugar, es un recipiente cónico de lámina galvanizada que tiene alrededor de la boca un collar inclinado. Arriba de la boca, sostenido por tiras de lámina tiene un embudo sobre el que se coloca una coladera de cocina para retener gravas, arenas y otras partículas muy gruesas. El tallo de este embudo penetra en el seno del agua de que está lleno el recipiente cónico. Al lavar el suelo, con el exceso de agua los quistes y residuos de materia orgánica flotan, escurren por el collar del cuello y se recogen en un tamiz; a esto se le conoce como "Material de flotación"; las partículas minera-

les de suelo se sedimentan en el fondo del flotador. Estas últimas se drenan después quitando el tapón que tiene el cono en su base.

El procedimiento es el siguiente:

- Secar a la sombra, extendiéndolas sobre papel, las muestras traídas del campo, teniendo cuidado de no cambiar las etiquetas.
- Lavar cuidadosamente el Fenwick con abundante agua corriente, para evitar contaminaciones de quistes entre muestra y muestra.
- Pesar 500 g de suelo seco, vaciarlo sobre la coladera del embudo y hacerlo pasar al recipiente cónico del aparato de Fendwick, lavándolo con agua.
- Las partículas orgánicas finas y los quistes flotan saliendo del cono del aparato; en cambio, las partículas minerales se sedimentarán en el fondo.
- Con el exceso de agua que desborda, los quistes se deslizan por el collar inclinado y se recogen en un tamiz de 50 mallas (297 μ de abertura entre mallas).
- Recuperar el material de flotación.
- Separar los quistes e identificarlos.

Existen dos maneras de separar los quistes del material de flotación:

La primera es del material húmedo, inmediatamente después de la extracción; los pasos a seguir son:

- Colocar en la pared interior de un vaso de 250 ml una tira de papel absorbente (Figura 2 del Apéndice), adhiriéndola con agua.
- Agregar agua hasta la mitad del vaso.
- Depositar una alícuota del material de flotación y esperar unos segundos.
- Agregar unas gotas de agua con jabón o detergente (una cucharada pequeña de jabón o detergente en polvo en 200 ml de agua) para romper la tensión superficial del agua; el material de flotación es "empujado" hacia el papel absorbente pegado a la pared del vaso, en el cual se adhiere.
- Retirar con cuidado la tira de papel donde van adheridos los quistes y otras partículas orgánicas, y colocarla sobre una tira de madera, vidrio o acrílico de dimensiones ligeramente mayores a las del papel (Figura 2 del Apéndice).
- Observar al microscopio estereoscópico y separar los quistes con una aguja de disección o pincel; colocarlos en un frasco seco, etiquetándolo correctamente con los datos que

correspondan. Es importante mantener siempre húmedo el papel, porque si se seca los quistes ruedan con las corrientes de aire.

- Los quistes secos pueden conservarse por tiempo indefinido hasta que se haga su identificación.

La segunda técnica para separar los quistes del material de flotación está basada en el hecho de que los quistes secos ruedan por ser esféricos. Este método se recomienda cuando se requiere obtener quistes en grandes cantidades para estudios biológicos.

Se procede como sigue:

- Secar el material de flotación a la sombra y donde no haya corrientes de aire.
- Colocar el material de flotación seco dentro de un "salero".
- Dejar caer pequeñas cantidades sobre la superficie de un vidrio o cartulina dura inclinados. Los quistes y otras partículas esféricas ruedan hacia abajo y se recogen en otra cartulina blanca sobre la que descansa el plano inclinado (Figura 3 del Apéndice). Las partículas orgánicas que no ruedan se quedan retenidas en el vidrio o cartulina y se desechan.
- Repetir la operación anterior hasta que los quistes queden lo más depurado posible.
- Separar los quistes al microscopio estereoscópico, para identificarlos.
- El resto de quistes se conservan en seco a temperatura ambiente hasta su utilización. Debe recordarse que con los años se reduce su viabilidad.

C. IDENTIFICACION DE ESPECIES DE NEMATODOS

a. FILIFORMES

La identificación de nematodos a nivel de género no presenta mucha dificultad y con práctica puede ser dominada por cualquier técnico. Sin embargo, la identificación a nivel específico requiere del conocimiento profundo de cada género en particular, por lo que el diagnóstico preciso de una enfermedad causada por nematodos queda restringido a técnicos con una sólida preparación en taxonomía de nematodos de importancia agrícola.

La identificación se inicia con el uso de claves para separar a los géneros (Sosa-Moss, 1990) y posteriormente se reconoce la especie utilizando las claves específicas para cada género.

b. NO FILIFORMES

Existen grupos especiales que por su importancia económica han sido objeto de investigaciones muy amplias; en general, estos nematodos son endoparásitos y las hembras maduras se hacen obesas o globosas. Tal es el caso de los nematodos formadores de agallas del género *Meloidogyne*, que dieron origen a un programa de alcances mundiales (International Meloidogyne Project), y de los que se enquistan.

En los grupos mencionados, la vulva, ano, y otras estructuras asociadas al perineo, se usan para la identificación hasta especie. El corion de los huevecillos y los juveniles de segundo instar, poseen también características que son de gran valor taxonómico.

1. ENQUISTADOS PERTENECIENTES A LOS GENEROS *Punctodera*, *Dollicodera*, *Globodera*, *Cactodera*, *Heterodera* y *Afenestrata*

En el caso de especies donde la hembra madura después de morir se transforma en quiste, se utilizan, además de las estructuras ano-vulvares llamadas "fenestralia", ciertas características de la cutícula engrosada, endurecida y oscurecida (Hesling, 1978; Stone, 1986; Golden, 1986; Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991).

Para la identificación basada en las hembras enquistadas, pueden hacerse dos tipos de preparaciones:

Permanentes, procediendo como sigue:

- Obtener quistes directamente de las raíces infectadas o del suelo.
- Remojarlos en agua 24 h antes de la disección.
- Transferirlos a un portaobjetos o a un pedazo pequeño de plexiglas, en una gota pequeña de agua.
- Cortar el tercio posterior del quiste, bajo el microscopio estereoscópico, procurando que el área perineal quede en el centro de la parte cortada (Figura 4 del Apéndice).
- Seguir cortando hasta obtener una pieza pequeña de cutícula, procurando que la región vulvar quede en el centro de ella (Figura 4 del Apéndice).
- Limpiar los residuos de tejidos corporales adheridos a la cutícula, teniendo especial cuidado de no dañar las estructuras asociadas a la vulva.

- Transferir los pedazos de cutícula a una gota de agua oxigenada (H_2O_2) durante unos minutos, para que se decoloren un poco. Esto permite ver mejor los caracteres taxonómicos, sobre todo en especies de cutícula muy oscura.
- Enjuagar las cutículas en agua destilada para detener la acción del agua oxigenada.
- Pasarlas por unos minutos a etanol de 90° para deshidratarlas.
- Impregnarlas con aceite de clavo que actúa como desinfectante.
- Montar de tres a cinco cutículas en bálsamo de Canadá; también pueden ser montadas en Euparal después de pasarlas por Etanol de 70° o isobutanol; en ambos casos no es necesario poner calzas de fibra de vidrio ni sellar el cubreobjetos, pero si se montan en glicerina-gelatina sí debe sellarse el cubreobjetos con barniz de uñas o ZUT.
- Observar al microscopio compuesto e identificar hasta género y especie.

Temporales, que se hacen cuando se requiere una identificación rápida, procediendo como sigue:

- Limpiar bien los cortes de cutícula que contienen la región vulvar.
- Montar de tres a cinco cortes directamente en lactofenol claro.
- Colocar el cubreobjetos y sellarlo con barniz de uñas, ZUT o parafina.
- Observar al microscopio compuesto e identificar.

2. AGALLADORES DEL GENERO *Meloidogyne* spp.

Cuando se trata de nematodos formadores de agallas, del género *Meloidogyne*, que están ampliamente distribuidos a nivel mundial y frecuentemente en poblaciones muy altas, la sola presencia de agallas en las raíces de las plantas susceptibles es un indicador de su presencia en los suelos.

Para realizar el diagnóstico de un problema causado por *Meloidogyne* spp, se debe identificar con precisión la especie de que se trata, para lo que se requiere considerar lo siguiente: pueden existir poblaciones mezcladas de dos o más especies; la forma y tamaño de las agallas varía con el cultivo, variedad, condiciones ambientales y con la especie misma del nematodo; un técnico con poca experiencia puede confundir las agallas producidas por *Meloidogyne* spp con las de *Nacobbus* spp e incluso con las causadas por insectos agalladores de raíces, como el pulgón lanífero del manzano.

El género *Meloidogyne* agrupa más de 60 especies; de ellas, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* son las más ampliamente distribuidas a nivel mundial. Otras especies tienen importancia agrícola, pero su distribución y número de hospedantes es más reducido; tal es el caso de *M. chitwoodi*, *M. artiella*, *M. decalineata*, *M. africana*, *M. coffeicola* y *M. thamesi* (Sasser, 1980; Hartman y Sasser, 1985; Jepson, 1987; Eisemback y Hirschman, 1991).

Para la identificación de especies de *Meloidogyne* es necesario observar también los caracteres taxonómicos presentes en la región ano-vulvar llamada "modelo o patrón perineal" de las hembras maduras, por lo que es necesario hacer cortes en esta región del cuerpo.

El procedimiento para hacer las preparaciones es como sigue:

- Obtener raíces o tubérculos infectados, bien sea frescos o preservados en formol a 3-5 %.
- Separar de las raíces las hembras maduras con una aguja de disección y colocarlas en una gota de lactofenol-fucsina ácida para tefir la cutícula; también puede utilizarse azul de algodón como colorante. Muchos especialistas prefieren no colorear las hembras, en cuyo caso se utiliza lactofenol claro.
- Transferir las hembras a un portaobjetos o a un pedazo de plexiglas y cortarles el cuello.
- Presionar para vaciar los contenidos corporales.
- Colocar las hembras ya vacías en una gota de ácido láctico a 45%, lo que facilita la limpieza de la cutícula. Es recomendable reunir de 10 a 20 hembras vacías en la misma gota de ácido, dejándolas ahí de 30 min a varias horas.
- Hacer un nuevo corte ecuatorialmente, removiendo después la parte que tiene el perineo a una nueva gota de ácido láctico a 45%.
- Seguir cortando hasta obtener un trozo cuadrado de cutícula en donde esté el patrón perineal.
- Transferir de cinco a diez patrones perineales a un portaobjetos limpio con una gota de glicerina.
- Colocar el cubreobjetos, evitando la formación de burbujas. No deben colocarse calzas entre el porta y el cubreobjetos, para que el peso de éste ayude a distender los trozos de cutícula.
- Eliminar el exceso de glicerina con pedazos pequeños de papel filtro; si la glicerina no es suficiente, debe infiltrarse un poco más por un lado del cubreobjetos.
- Sellar el cubreobjetos con barniz de uñas o con cualquier otro sellador.
- Etiquetar la preparación adecuadamente.

D. IDENTIFICACION DE RAZAS PATOGENICAS DE ESPECIES DE NEMATODOS

Debido al incremento del comercio internacional entre bloques de países, se hace necesario identificar muchos de los patógenos hasta niveles subespecíficos (patotipos, biotipos, razas, etc.); tal es el caso de algunas especies de nematodos de importancia económica que se diseminan eficientemente con los productos agrícolas.

Se hace mención a las razas patógenas, porque en algunas especies de nematodos existe lo que se llama "razas genéticas", que son diferentes en su constitución cromosómica pero que aparentemente tienen el mismo comportamiento respecto de su potencial patológico; tal es el caso de *Meloidogyne hapla*.

Una de las técnicas más utilizadas para la identificación de razas en nematodos está basada en la susceptibilidad diferencial de un grupo de plantas.

a. RAZAS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Meloidogyne*

Las especies del género *Meloidogyne* forman el grupo de nematodos más ampliamente distribuidos a nivel mundial. Debido a que, dependiendo de la especie, su reproducción puede ser cruzada, partenogenética o mixta, su variabilidad genética es muy amplia, lo que se manifiesta en el gran número de plantas hospedantes que tienen y en la variación en patogenicidad que se presenta entre las poblaciones de una misma especie.

1. *Meloidogyne incognita* y *M. arenaria*

Para corroborar la identificación de *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla* basada en los modelos perineales, y para conocer de cuál de las razas de las dos primeras especies mencionadas se trata, se utiliza la "Prueba de Hospedantes Diferenciales de Carolina del Norte" (Hartman y Sasser, 1985).

Para esta prueba se procede como sigue:

- Incrementar las poblaciones de *Meloidogyne* spp en plantas de tomate cv. Rutgers sembradas en macetas de 15 cm de diámetro con suelo esterilizado, inoculado con una masa

de huevecillos por planta. El inóculo necesario para la prueba se tiene 45 a 60 días después.

- Sincronizar, como se explica más adelante, el desarrollo de las plantas diferenciales para hacer la inoculación.
- Obtener (técnica de Hussey y Barker, 1973) los huevecillos-larva de *Meloidogyne* spp de la cría en tomate Rutgers, removiendo las plantas de las macetas y sumergiéndolas en agua por 10 minutos. Cortar después las raíces y lavarlas para eliminar el suelo, con mucho cuidado para que no se desprendan las masas de huevecillos.
- Preparar 200 ml de una solución de NaOCl a 0.5%, usando blanqueador comercial de ropa.
- Cortar 20 g de raíces con agallas, ponerlas en el vaso de una batidora comercial y agregarles los 200 ml de NaOCl; batir durante tres minutos.
- Pasar el NaOCl que contiene los huevecillos a través de dos tamices, uno de 200 mallas (75 μ m de abertura entre mallas) y otro de 500 mallas (26 μ m entre mallas). Los huevecillos quedan retenidos en este último tamiz.
- Lavar rápidamente los huevecillos-larva con agua corriente, ya que pierden su capacidad infectiva cuando son expuestos por más de cinco minutos al NaOCl.
- Ajustar el nivel final del agua hasta que la suspensión contenga 1000 huevecillos-larva por mililitro.
- Inocular cada diferencial cerca de la base de la planta, con 5 ml de suspensión (5,000 huevecillos-larva), agitando constantemente la suspensión para homogeneizarla.
- Inocular cinco plantas de cada diferencial (repeticiones).
- Dejar desarrollar las plantas por un período de 60 días a una temperatura de 24 a 30°C, manteniendo condiciones apropiadas de humedad del suelo.
- Fertilizar cada semana, y de ser necesario utilizar solamente insecticidas o acaricidas no sistémicos.
- Recuperar a los dos meses las raíces de las plantas diferenciales y lavarlas cuidadosamente.
- Observar si hay agallas en las raíces; si son pocas y pequeñas, teñir con una solución de Floxina B a 0.0015% (15 mg/litro de agua) durante 15 a 20 minutos para facilitar su observación. El colorante es absorbido por la matriz gelatinosa que contiene a los huevecillos, tiñéndola de un color rosa a rojo. Los huevecillos no absorben el colorante y mantienen su viabilidad.
- Contar el número de agallas y de masas de huevecillos y asignar un índice como se explica en seguida.

La reacción de las plantas diferenciales se clasifica en función de la presencia (+) o ausencia (-) de agallas en las raíces, según la siguiente escala: 0 = no agallamiento ni masas de huevecillos presentes; 1 = 1 a 2 agallas o masas de huevecillos; 2 = 3 a 10 agallas o masas de huevecillos; 3 = 11 a 30 agallas o masas de huevecillos; 4 = 31 a 100 agallas o masas de huevecillos; y 5 = más de 100 agallas o masas de huevecillos.

Las plantas diferenciales con un índice de agallamiento o masas de huevecillos de dos o menos, son consideradas como resistentes (-) y aquellas con un índice mayor de dos, como susceptibles (+). El comportamiento del tabaco y algodón depende de la temperatura, y a más de 30°C algunas poblaciones de *M. incognita* pueden inducir infección en estas hospedantes que son consideradas como resistentes, conduciendo a una identificación errónea de la raza.

Para conocer de qué especie y raza se trata, los resultados obtenidos en la prueba de hospedantes diferenciales se comparan con el Cuadro 1 que se presenta en el Apéndice.

La manera de sincronizar el desarrollo de las plantas diferenciales, consiste en hacer la siembra de acuerdo con su fenología. El tomate cv. Rutgers, pimiento cv. California Wonder, sandía cv. Charleston Gray y cacahuate cv. Florunner se siembran 42 días antes de la prueba.

En el caso del tabaco NC 95, que es otra diferencial, se ponen a germinar las semillas 90 días antes en vermiculita fina; después se trasplantan las plántulas a macetas de 5 cm de diámetro para que tengan un buen desarrollo.

Por el contrario, las semillas de algodón cv. Delta Pine 16 se deben sembrar días antes de la prueba, escarificándolas previamente.

En el momento de hacer la inoculación, las diferenciales se trasplantan a macetas de 10 cm de diámetro con una mezcla 1/1 de suelo limoso y arena esterilizados previamente.

2. *M. chitwoodi*

Debido a la importancia económica de *M. chitwoodi* se creó una prueba para diferenciar dos de las tres razas que se le conocen. Esta prueba es similar a la empleada para la identificación de las cuatro especies más comunes de *Meloidogyne* y sus razas.

Una vez que *M. chitwoodi* ha sido correctamente identificada con el modelo perineal, se procede como sigue:

- Incrementar las poblaciones en tomate cv. Rutgers.
- Sembrar en suelo fumigado con bromuro de metilo las hospedantes diferenciales, que en este caso son: trigo cv. Nugaines, chile cv. California Wonder, alfalfa cv. Thor, zanahoria cv. Red Cored Chantenay y tomate cv. Columbia.
- Extraer los huevecillos por el método de NaOCl a 0.5 % (Hussey y Barker, 1973) como se explicó para *Meloidogyne* spp.
- Inocular con 5,000 huevecillos-larva por planta al momento de trasplantar las diferenciales a macetas de 10 cm de diámetro con suelo areno-arcilloso. Inocular cinco plantas (repeticiones) de cada diferencial.
- Recuperar las raíces de las plantas diferenciales después de 55 días de haberlas inoculado; lavarlas cuidadosamente y teñirlas con Floxina B, como se indicó para *Meloidogyne* spp.
- Contar las agallas y extraer los huevecillos con NaOCl a 0.5 %.
- Calcular el factor de reproducción (R) dividiendo la población final de huevecillos (Pf) entre la cantidad inoculada inicialmente (Pi).
- Comparar los resultados de la reacción de las plantas diferenciales con lo indicado en el Cuadro 2 del Apéndice.

El jitomate Columbia se usa en la prueba como hospedante susceptible universal; el pimiento California Wonder no es hospedante de *M. chitwoodi*, pero se incluye para detectar la posible presencia de *M. hapla* como contaminante, ya que ambas especies tienen los mismos requerimientos climáticos para su desarrollo y pueden estar presentes y mezcladas.

b. RAZAS DE *Nacobbus aberrans*

El género *Nacobbus*, que actualmente posee sólo dos especies, induce también la formación de agallas en las raíces de muchas plantas, tanto silvestres como cultivadas. Aparentemente la especie más distribuida es *N. aberrans*, que por tener un amplio número de hospedantes causa daños catastróficos en muchos cultivos en varios países de América Latina.

Al género *Nacobbus* se le conoce como "Falso Agallador" o "Nemátodo del Nudo en Rosario", debido a que las agallas que forma están bien separadas una de otra y no coalescen deformando totalmente a la raíz, como sucede con *Meloidogyne* spp. Además, las agallas de *Nacobbus* son laterales, en relación con el eje de la raíz, lo que permite conocer de manera práctica en el campo de cuál de los dos géneros se trata, aunque pueden estar mezclados.

Se ha observado que las poblaciones de *Nacobbus aberrans* no atacan todas a los mismos cultivos. La existencia de razas de este nematodo en México fue demostrada por Toledo (1990) y Toledo, Sosa-Moss y Zavaleta (1993), quienes proponen la técnica siguiente para separarlas:

- Colectar el inóculo en campo o incrementarlo en invernadero en plantas de acelga cv. Ford Hook Giant (*Beta vulgaris* var. *Cicla*).
- Sembrar en macetas con 1 kg de suelo fumigado con bromuro de metilo, cuatro repeticiones de las diferenciales: frijol cv. Negro Querétaro (*Phaseolus vulgaris*); tomate cv. Rutgers (*Lycopersicon esculentum*); acelga cv. Ford Hook Giant (*Beta vulgaris* var. *Cicla*).
- Inocular 20 huevecillos-larva por gramo de suelo, cuando las plantas tengas dos hojas verdaderas.
- Evaluar la reacción de las plantas diferenciales 60 días después de la inoculación, registrando con el signo "+" cuando haya presencia de agallas y con "-" cuando éstas no se observen.
- Comparar los resultados con el Cuadro 3 de respuestas de hospedantes diferenciales para la separación de razas de *N. aberrans* propuesta también por Toledo *et al.* (1993), que se presenta en el Apéndice.

Así como Hartman y Sasser (1985) llamaron "Prueba de Hospedantes Diferenciales de Carolina del Norte" a la que se utiliza para identificar las cuatro especies más comunes de *Meloidogyne* y sus razas, Toledo, Sosa-Moss y Zavaleta (1993) proponen el nombre de "Prueba de Hospedantes Diferenciales Chapingo" para identificar las razas de *Nacobbus aberrans*.

c. RAZAS DE *Ditylenchus dipsaci*

El género *Ditylenchus* presenta dificultades especiales para su identificación hasta especie, porque es muy variable morfológicamente. Caracteres tan útiles en la identificación

de especies de la mayoría de los géneros, varían en *Ditylenchus* dentro de rangos muy amplios, dando lugar a confusiones. Tal es el caso de la válvula esofágica, que puede estar ausente o presente; de la región glandular del esófago, que puede o no estar sobrepuesta al intestino; de la forma de la hembra madura, que puede ser filiforme u obesa, etc.

Existen dentro del género algunas especies de gran importancia económica, pero la que se presenta con mayor distribución a nivel mundial es *D. dipsaci*, debido a que tiene muchas plantas hospedantes.

Ditylenchus dipsaci es un nematodo con una variabilidad genética muy amplia, por lo que sus poblaciones presentan diferencias en su patogenicidad (razas). Desde el punto de vista fitosanitario y cuarentenario, es muy importante identificar también la raza a la cual pertenecen las poblaciones que causan problemas en campo.

Para separar las razas de *D. dipsaci*, el procedimiento propuesto por Caubel (1993) es el siguiente:

- Extraer los nematodos 24 h antes, cortando los tejidos enfermos en pedazos pequeños y colocándolos en un tamiz de 40 mallas; el tamiz se acomoda dentro de un recipiente con agua, procurando que se mantengan siempre bien húmedos los materiales vegetales. Los nematodos saldrán de los tejidos por sus propios movimientos y se asentarán en el recipiente con agua.
- Pasar la suspensión de nematodos por el tamiz de 325 mallas para eliminar los individuos muertos.
- Concentrar los nematodos en agua limpia y mantenerlos vivos aereando la suspensión con un burbujeador de pecera. Si fuera necesario conservarlos varios días (no más de tres), o si no se dispone de un burbujeador de pecera, se pueden mantener vivos cambiándoles el agua con frecuencia.
- Ajustar el volumen de agua de tal forma que la suspensión contenga 100 ± 10 nematodos en 20 μ l; contar mínimo cinco veces y hacer el promedio para reducir el error.
- Preparar un día antes de inocular las diferenciales una solución de metil-celulosa a 2 %, mezclando perfectamente 2 g de metil-celulosa en 100 ml de agua destilada, procurando que no haya burbujas en el seno de la solución, que es muy espesa.
- Agregar a la suspensión de nematodos una cantidad igual de metil-celulosa a 2 %; de esta forma en la dilución final habrá por cada 20 μ l 50 ± 5 nematodos y contendrá 1 % de metil-

celulosa. La metil-celulosa incrementa mucho la densidad del agua y protege a los nematodos de la desecación, aumentando las probabilidades de que penetren a los tejidos de las plantas en que se inoculan. Además, permite hacer una suspensión de nematodos homogénea, ya que por la alta densidad éstos no se sedimentan en el recipiente que los contiene.

- Inocular el grupo de diferenciales; trébol rojo cv. Khun (*Trifolium pratense*); trébol blanco cv. Avia (*Trifolium repens*); alfalfa cv. Europa (*Medicago sativa*); chícharo (*Pisum sativum*); papa (*Solanum tuberosum*); avena (*Avena sativa*); cardo (*Dipsacus fullonum*); narciso (*Narcissus* spp); jacinto (*Hyacinthus* spp); tulipán (*Tulipa* spp); haba cv. Aguadulce (*Vicia faba*); y cebolla (*Allium cepa*).
- Inocular también los cultivares resistentes: alfalfa cv. Vertus (*Medicago sativa*), trébol cv. Quinn (*Trifolium* spp.) y haba cv. INRA 29 H (*Vicia faba*).
- Inocular 30 plántulas de las alfalfas, tréboles, habas, chícharo, avena y cardo. Las habas y el chícharo se inoculan en el áxis de las dos primeras estípulas; la avena, en el coleoptilo, antes de que se extienda la primera hoja; y las alfalfas, tréboles y cardo, en medio de las dos hojas cotiledonares. Para sincronizar la inoculación de estas plantas, es necesario conocer su comportamiento fenológico.
- Inocular subdérmicamente los bulbos de cebolla, narciso, jacinto, tulipán y los tubérculos de papa, haciendo un orificio superficial, donde se coloca la suspensión de nematodos (20 µl); después se cubre la herida con parafilm.
- Inocular el ajo cortando el ápice de los "dientes" y depositando en la herida la suspensión de nematodos.
- Observar la respuesta de las plantas 45 a 60 días después de la inoculación, cuando se han desarrollado aproximadamente dos generaciones del nematodo.
- Para conocer de qué raza se trata, es necesario comparar la reacción de las diferenciales con los datos presentados en el Cuadro 4 para razas de *D. dipsaci* propuesto por Caubel (1993), que se presenta en el Apéndice.

E. LA ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL Y SU APLICACION EN LA IDENTIFICACION DE NEMATODOS

La electrofóresis bidimensional es una técnica de alta sensibilidad que permite trabajar con microvolúmenes; con ella se pueden detectar diferencias a una concentración de 2µg/µl de proteína.

Esta técnica es muy laboriosa y exige ser realizada bajo estricto control aséptico.

La descripción del procedimiento que se presenta en seguida, tiene como base las experiencias obtenidas Bossis y Mugniery (1993) en el Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Francia, con nematodos enquistados del género *Globodera*.

Los pasos a seguir son:

a. PRIMERA PARTE

Preparación y corrimiento de la primera dimensión (1D).

- Desarrollar en invernadero las poblaciones de especies de nematodos formadores de quistes, u obtenerlas en campo colectando las hembras directamente de las raíces de las plantas atacadas.
- Remover las hembras blancas y lavarlas tres veces en la solución W1 (Apéndice: Técnica Wageningen).
- Separar tres submuestras de 100 hembras blancas de cada población a estudiar.
- Macerar las hembras en frío con 10 µl de la solución W1, pero ajustando el pH a 7.9, mezclada con 30 µl de la solución R1 (Apéndice: Técnica Wageningen).
- Centrifugar el macerado a 10,000 g/10 min a 4°C y separar el sobrenadante. En caso de tener que suspender el proceso, congelar el sobrenadante a -80°C, pudiendo conservarse así por varios meses, para continuar posteriormente.
- Medir su concentración de proteínas por espectrofotometría. Para ésto, consultar el método de Bradford (1976) que requiere de la solución del mismo nombre (Apéndice: Técnica Bossis y Mugniery punto A)
- Marcar los capilares de 67 mm y preparar el soporte aplicando una fina capa de plastilina que se cubre con parafilm; debe evitarse al máximo contaminar la cara del parafilm que cubre a la plastilina.
- Llenar los capilares con el gel de primera dimensión 1-D (Apéndice: Técnica Bossis y Mugniery punto B) hasta la marca, evitando la formación de burbujas y pararlos en el soporte.
- Colocar el soporte con los capilares, en una cámara húmeda, hasta que polimerice el gel 1-D; una vez polimerizado extraer las microgotas de agua resultantes.

- Calibrar la microaguja que se va a usar para aplicar la proteína, con una gota de 2 μ l de agua destilada y marcar el nivel; para mayor precisión se pesa $\pm 1 \mu$ l = 1 μ g de agua y se comprueba la marca.
- Colocar con la microaguja $\pm 2\mu$ l de proteína en el capilar con el gel 1-D. Lavar el aplicador con agua destilada tres a cuatro veces antes de aplicar proteína a otro capilar; no deben usarse más de 5 μ g de proteína porque se pierde la resolución, es decir, dos proteínas diferentes pueden aparecer como una sola mancha, debido a la cantidad existente en el gel. Se recomienda correr dos o tres geles para cada población en estudio.
- Una vez agregada la proteína, cubrirla con la solución R3 (Apéndice: Técnica Wageningen); colocar la tapita del capilar llena también con la solución R3.
- Montar cada capilar en el soporte de la cuba del aparato de electrofóresis.
- Sosteniendo el soporte, adherir una microgota de ácido fosfórico 0.10 mM en la parte inferior del capilar.
- Meter el soporte con los capilares hasta el nivel que separa la cuba inferior (ánodo) de la superior (cátodo).
- Llenar la cuba inferior con ácido fosfórico 0.10 mM.
- Una vez llena la cuba inferior, llenar la superior con solución amortiguadora (Apéndice: Técnica Bossis y Mugniery punto C).
- Tapar el aparato y correr la primera migración; 18 v una hora; 180 v 1:30 hr; 270 v 30 min; 500 v 1:35 hr.; lo que equivale a 1375 vh.

Transcurrida la primera migración se separan los geles 1-D en solución W5 (Apéndice: Técnica Wageningen); en esta parte de la metodología los geles pueden guardarse en tubos Ependor y congelarse a -80°C para continuar posteriormente, siendo ésta la segunda y última ocasión en que se puede suspender el proceso.

b. SEGUNDA PARTE

Preparación y corrimiento de la segunda dimensión (2D).

El Gel 2D lo componen el de Separación y el de Concentración.

- Montar las placas perfectamente horizontales; marcar 15 mm hasta donde debe llegar el gel de separación (del Apéndice: Técnica Bossis y Mugniery punto D-a). Sobre el Gel de separación agregar el Gel de concentración(Apéndice: Técnica Bossis y Mugniery punto

D-b), evitando pelusa o contaminantes que interfieran con la tinción. Antes de aplicar el Gel de separación deberán mezclarse sus polimerizantes y con una jeringa poner hasta poco más arriba para después reducirlo hasta el nivel de la marca. De esta forma se pueden eliminar las burbujas, que deben evitarse a lo máximo; dejar que polimerice en una cámara húmeda. Si el tiempo es limitado, la cámara húmeda se puede guardar en el refrigerador y al otro día continuar con la segunda dimensión.

- Una vez que se ha dado la polimerización, se agregan 100 µl de butanol-agua (v/v) dejándolo por 20 min (el isopropanol da mejor resultado).
- Lavar con agua bidestilada y secar con papel filtro que no deje pelusa; agregar el Gel de Concentración.
- Aplicar con otra jeringa dicho Gel después de mezclarle su polimerizante, hasta el borde de la placa exterior; al polimerizar, lavar con agua bidestilada y secar por los costados con papel filtro que no suelte pelusa.
- Agregar 100 µl de butanol-agua (v/v) o en su defecto 150 µl de isopropanol, que da mejores resultados.
- Colocar el Gel 1-D eliminando los restos de la solución W5 en la que se conservaron, evitando dañar la superficie del gel con las pinzas.
- Terminando de colocar el Gel 1-D, agregar 100 µl de la solución colorante W4 (Apéndice: Técnica Wageningen), dispersándola a lo largo de la superficie del Gel 1-D.
- Montar correctamente las placas en los electrodos; introducirlos en la cuba de electroforesis y llenar la cuba inferior con la solución amortiguadora (Apéndice: Técnica Bossis y Mugniery punto E) hasta alcanzar un medio del tornillo superior.
- Eliminar las burbujas de la cuba inferior (esto es muy importante) con el tubo "L" de vidrio, unido a una jeringa por medio de una manguera de goma.
- La migración del Gel 2-D es de la siguiente forma: 20 min a 10 mA; 20 mA hasta que el colorante baje 2 a 3 mm antes del fondo (± 1.45 h).

c. COLORACION DE LAS PLACAS DE GEL 2-D

Todas las soluciones empleadas en la coloración se encuentran en el punto F de la técnica de Bossis y Mugniery en el Apéndice de este capítulo. Los pasos a seguir son:

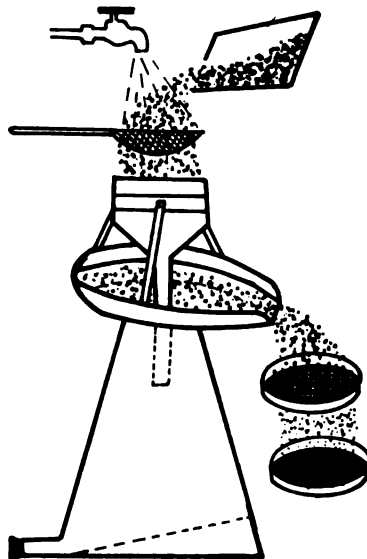
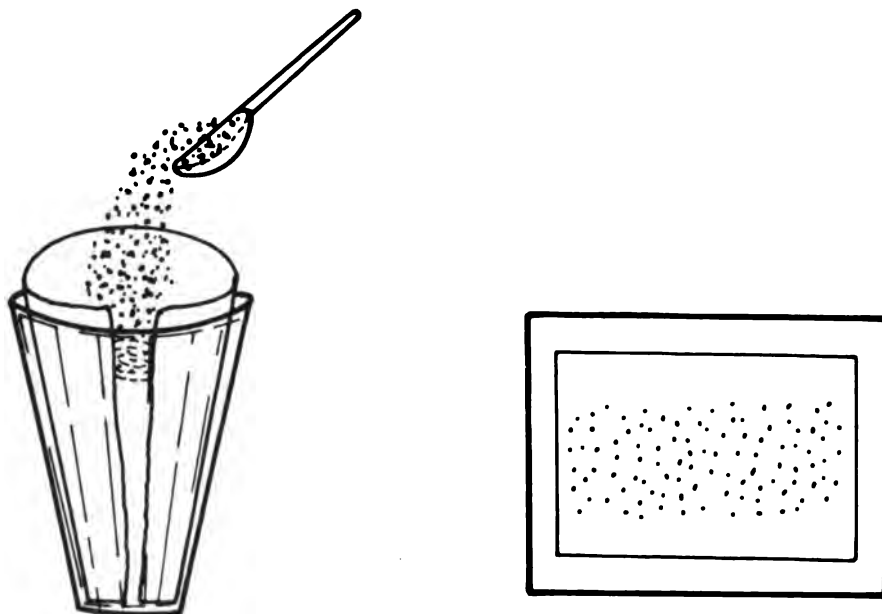
- Desmontar los Geles 2-D transcurrido el tiempo de la migración; el de Concentración se elimina y el de Separación se coloca en la Solución I por 30 minutos (fase de deshidratación).

- Retirar la Solución I y sustituirla por la Solución II que se deja por 30 minutos (fase de rehidratación); mantener todo en agitación constante para evitar la desecación de la capa superior del gel.
- Sustituir la Solución II por la Solución III y dejarla durante 2 h (fase de fijación del gel).
- Lavar cuatro veces (10 min cada vez) con la Solución VI y dejar reposar por 10 min en la misma solución.
- Retirar la Solución VI y agregar aproximadamente 50 ml de la Solución IV; dejar reposar por 25 min (fase de fijación del colorante) agitando constantemente la caja de revelado.
- Pasar el gel a otra caja con la Solución VI, dejándolo ahí durante 5 minutos; las cajas se lavan perfectamente para eliminar el AgNO_3 de la Solución IV.
- Lavar el gel dos veces más en la Solución VI (5 min cada vez).
- Retirar la Solución VI y agregar la Solución V, dejándola por aproximadamente cinco minutos (fase de revelado); la reacción se observa "a ojo".
- Enjuagar con la Solución VI.
- Fijar la coloración en la Solución VII por dos minutos.

d. MONTAJE Y SECADO DEL GEL 2-D

Para secar el Gel de Separación del Gel 2-D se prepara una solución de alcohol etílico a 20% y se procede como sigue:

- Lavar perfectamente una hoja de celofán en el alcohol.
- Extender el celofán sobre un marco que se hace especialmente para este propósito.
- Colocar sobre el celofán el Gel y cubrirlo con otra hoja de celofán, evitando la formación de burbujas.
- Colocar otro marco a manera de emparedado y sujetar con pinzas.
- Dejar secar por 40 h en una cámara donde no haya polvo. Una vez seca la placa, queda lista para hacer un análisis comparativo subjetivo. En los laboratorios muy bien equipados, se calcula el coeficiente de similitud y la distancia genética de la especie y/o raza del nematodo en estudio, con un sistema computarizado.

F. APENDICE**FIGURA 1. Dibujo del Fenwick****FIGURA 2. Separación de quistes por la técnica del vaso**

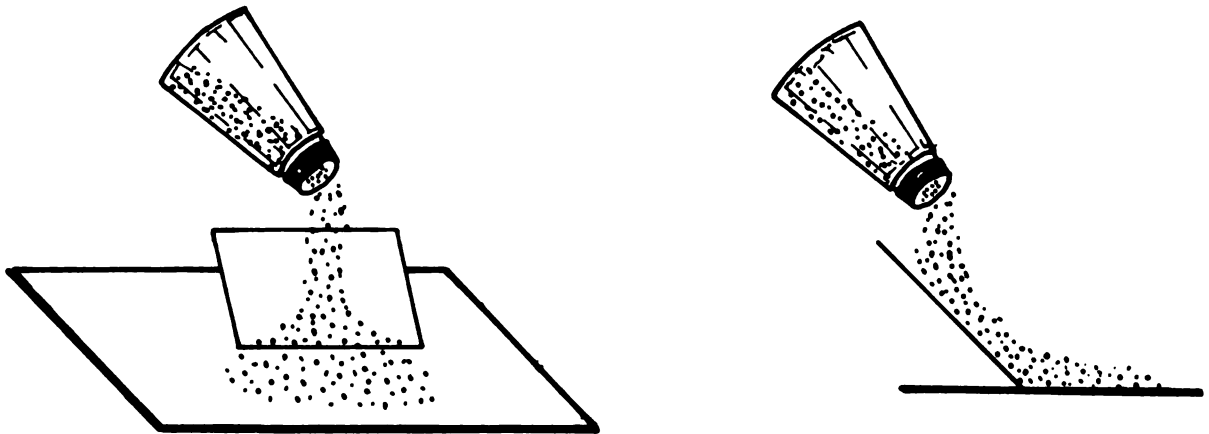


FIGURA 3. Separación de quistes por la técnica de rodamiento.

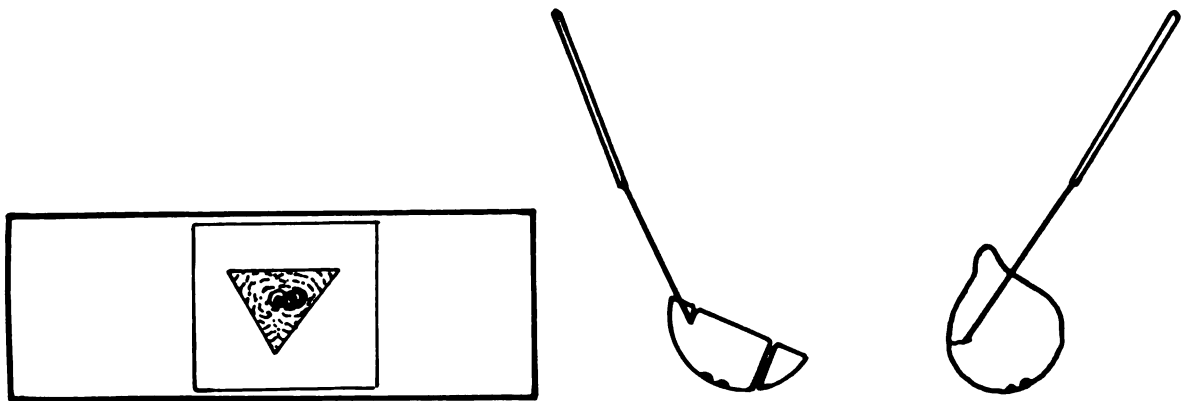


FIGURA 4. Corte del quiste en su parte fenestral.

Cuadro 1. Reacción de las cuatro especies comunes de *Meloidogyne* a la prueba de Hospedantes Diferenciales de Carolina del Norte.

Hospedantes diferenciales cultivar ¹	Tabaco NC 95	Algodón Delta- pine 16	Pimiento California Wonder	Sandía Charleston	Cacahuete Flor runner	Tomate Rutgers
<i>M. incógnita</i>						
Raza 1	-	-	+	+	-	+
Raza 2	+	-	+	+	-	+
Raza 3	-	+	+	+	-	+
Raza 4	+	+	+	+	-	+
<i>M. arenaria</i>						
Raza 1	+	-	+	+	+	+
Raza 2	+	-	-	+	-	+
<i>M. javanica</i>						
	+	-	-	+	-	+
<i>M. hapla</i>						
	+	-	+	-	+	+

* Tabaco (*Nicotiana tabacum*) cv NC95; algodón (*Gossypium hirsutum*) c.v. Deltapine 16; Pimiento (*Capsicum rutescens*) cv. California Wonder; Sandía (*Citrulus vulgaris*) cv. Charleston Grey; Cacahuete (*Arachis hypogea*) cv. Florrunner; Tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Rutgers.

Cuadro 2. Respuesta de hospedantes diferenciales a *Meloidogyne hapla* y razas de *M. chitwoodi*.

	Reacción de los hospedantes diferenciales ¹				
	Trigo	Chile	Alfalfa	Zanahoria	Tomate
<i>M. hapla</i>	-	+	+	+	+
<i>M. chitwoodi</i>					
Raza 1	+	-	-	+	+
Raza 2	+	-	+	-	+

¹ Trigo (*Triticum aestivum*) cv. Nugaines; Chile (*Capsicum annuum*) cv. California Wonder; Alfalfa (*Medicago sativa*) cv. Thor; Zanahoria (*Daucus carotae*) cv. Read Cored Chantenay; Tomate (*Lycopersicon esculentum*) cv. Columbia.

+ La capacidad de las especies para mantener un factor reproductivo > 1 por 55 días (Mojtahedi, Santo y Wilson, 1988).

Cuadro 3. Respuesta de hospedantes diferenciales para la separación de razas de *N. aberrans*

Raza	Reacción de las hospedantes diferenciales		
	Frijol	Tomate	Acelga
Na-1	-	+	+
Na-2	+	+	+
Na-3	+	-	+

Cuadro 4. Reacción de hospedantes diferenciales para la identificación de razas de *Dytlenchus dipsaci*.

RAZA	Trebol rojo	Trebol blanco	Alfalfa	Centeno	Ajo	Papa	Cardo	Jacinto	Narciso	Tulipan	Haba raza gigante	Haba raza normal
<i>Trifolium pratense</i> KHUN	++	-	-	-	-	-	-					
<i>Trifolium repens</i> AVA	-	++		-	-	-						
<i>Medicago sativa</i> EUROPA	-	-	++	-	-	-						
<i>Pisum sativum</i>	++		++	-	++	++					-	
<i>Solanum tuberosum</i>	-			+	+	++					-	+
<i>Avena sativa</i>	-		-	++								
<i>Dipsacus fullonum</i>			-				++					++
<i>Narcissus ssp</i>	-			-	-	-		-	++	++		
<i>Hyacinthus ssp</i>	-			-	-	-	++	-	++			
<i>Tulipa ssp</i>	-			-	-	-	-	-	++			
<i>Vicia faba</i> AGUA DULCE											++	++
<i>Allium sativum</i>	-		-		++						-	++
<i>Medicago sativa</i> VERTUS			-								-	
<i>T. pratense</i> QUIN	-											
<i>Vicia faba</i> IINRA 29 H											-	(-)+

++ = Alta reproducción.
 + = Baja reproducción.
 (Caubel, 1993)

- = No reproducción
 (-)+ = Reproducción escasa de algunas poblaciones

**REACTIVOS PARA LA TECNICA BOSSIS Y MUGNIERY (1993) DE
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

A. SOLUCION DE BRADFORD (1976) PARA CALIBRAR EL ESPECTOFOTOMETRO Y CONOCER LA CONCENTRACION DE PROTEINA

Ingredientes:

Comasina azul brillante G250	10 mg
Disolver en etanol a 95%	50 mg
Ajustar 85% (peso/volumen) ácido fosfórico	10 ml
Diluir en agua destilada	100 ml

B. GEL PARA LA PRIMERA DIMENSION 1D

Ingredientes:

Urea	1.375 g
Acyl PDA	334.0 µl
Biolyte 5-7	50.0 µl
Biolyte 6-8	50.0 µl
Biolyte 3-10	25.0 µl
Agua destilada	1 litro

Preparación:

Agregar uno a uno todos los ingredientes, mezclar bien y filtrar a 45 µm. Una vez preparado se agregan los polimerizantes, que se preparan como sigue:

Polimerización

Ingredientes:

APS	5.0 µl
Temed	2.5 µl

Preparación:

Mezclar la urea con el agua destilada tibia y agregar la acrilamida/PDA (334 μ l); una vez disuelta la urea agregar los anfolitos (anfolite de Bio-RAD). Filtrar con filtro de 45 μ usando una jeringa de 10 ml; una vez filtrado agregar los polimerizantes 2.5 μ l de Temed y 5 μ l de APS. Cabe aclarar que la velocidad de polimerización es de aproximadamente 10 min a 16-17°C y puede verse aumentada marcadamente por la temperatura, por lo que es recomendable reducir proporcionalmente los polimerizantes o trabajar sobre hielo.

C. Solución amortiguadora para las cubas 1 D**Solución concentrada**

a. Cuba inferior (ánodo): H_3PO_4 0.1M:100 ml diluir 10 veces 680 μ l/1000 ml (=10 mM).

Ingredientes:

b. Cuba superior (cátodo): H_3PO_4 a 85% = 15N. NaOH 0.2M:10 ml diluir 10 veces 80 mg/10 ml (desgasificar) pesar 400 mg de NaOH, disolver en 50 ml de A Dutilar, tomar 10 ml (80 mg/10ml), los 10 ml se aforan hasta 100 ml con agua destilada, y se somete a vacío con agitador magnético durante 20 min.

D. Geles para la segunda dimensión 2-D

a. Gel de separación: T = 12.9%

Ingredientes:

Acrilamida/PDA	13.000 ml
Tris HCl de pH 8.8	7.500 ml
SDS	0.300 ml
Tiosulfato	0.186 ml
Agua destilada	9.050 ml

Preparación:

Mezclar perfectamente todos los ingredientes y filtrar a 45 μ m.

Polimerizantes.

APS	240.0 μ l/3 = 80 μ l
Temed	13.5 μ l/3 = 4.5 μ l

Preparación:

Los ingredientes que son suficientes para preparar seis geles, se mezclan en el orden en que están anotados; después se filtra a 45 μ m y se somete a vacío (700 mm de Hg) por 10 min. Se retira la solución de la cámara de vacío y se le agregan los polimerizantes 80 μ l de APS más 4.5 μ l de Temed.

b. Gel de concentración: T = 4%**Ingredientes:**

Acrylamida/Bis	1.95 ml
Agua destilada	8.65 ml
Tris de pH 6.8	3.75 ml
SOS	0.15 ml
Volumen total	14.548 ml

Preparación:

Mezclar todos los ingredientes perfectamente y filtrar a 45 μ m; después desgasificar durante tres a diez min (700 mm Hg).

Agentes polimerizantes**Ingredientes:**

APS	40.0 μ l
Temed	8.0 μ l

Preparación:

12 Mezclar los ingredientes en el orden citado, filtrar a 45 μ m y someter a vacío 10 min. Agregar los polimerizantes (recuerde el volumen indicado para seis geles).

E. SOLUCION AMORTIGUADORA PARA LA CUBA (1 LITRO) PARA EL CORRIMIENTO DE LA SEGUNDA DIMENSION**Ingredientes:**

Tris	3.0 g
Glycine	14.4 g
SDS 10%	10.0 ml
Agua destilada	1 litro

Preparación:

Pesar cuidadosamente los 3 g de tris y 14.4 de glycine; agregar los 10 ml de la solución de SDS a 10% previamente preparada, y aforar a un litro con agua destilada.

F. Reactivos para la coloracion con nitrato de plata (Tecnica de Oakley modificada por Bossis y Mugniery, 1993)**Solución I (deshidratadora).****Ingredientes:**

Metanol	160.0 ml
Acido acético glacial a 96%	33.3 ml
Agua bidestilada	126.7 ml

Preparación:

Se mezcla todo perfectamente, y del volumen total de 320 ml se emplean 50 ml por placa.

Solución II (rehidratadora).

Ingredientes:

Metanol	22.5 ml
Acido acético glacial a 96 %	33.3 ml
Agua bidestilada	394.2 ml

Preparación:

Se mezclan los ingredientes perfectamente, y del volumen total de 450 ml se emplean 75 ml por placa.

Solución III (fijadora del gel).

Ingredientes:

Glutaraldehido	85.8 ml
Agua bidestilada	214.2 ml

Preparación:

Se disuelve perfectamente el glutaraldehido en el agua bidestilada, y del volumen total de 300 ml se emplean 50 ml por placa.

Solución IV (Fijadora del colorante).

Ingredientes:

Disolver un gramo de NaOH en 25 ml de agua bidestilada, se toman 2.2 ml de NaOH 1N y agregarlos a 50 ml de agua bidestilada, 588.0 mg/l AgNO_3 se disuelven en 10 ml de agua bidestilada (manéjese con sumo cuidado, producto muy corrosivo) colateralmente 150 ml de agua bidestilada se someten a vacío durante 10 minutos, a los 150 ml de NaOH se le agrega el nitrato de plata, la solución se obscurece, luego se agregan lentamente 3.03 ml de amoníaco (NH_3 25%), la solución se aclara completamente, una vez clara ajustar a 300 ml con agua bidestilada desgasificada. Volumen total 300 ml, volumen a usar 50 ml.

Solución V (revelado: reducción de la Ag).**Ingredientes:**

Acido cítrico a 1 % (P/V)	1.5 ml
Formaldehido a 37 % (P/V)	0.3 ml
Agua bidestilada	598.2 ml

Preparación:

Mezclar todo perfectamente y del volumen total de 600 ml utilizar 100 ml por placa (\pm 5 min).

Solución VI. (se llama así a agua bidestilada).

Solución VII (fijador).

Esta solución es ácido acético a 1 %.

REACTIVOS PARA LA TECNICA WAGENINGEN DE ELECTROFORESIS**Soluciones amortiguadoras para la extraccion de las proteínas de nematodos.****Ingredientes:****W1**

Urea	0.647 g
Tris HCl (10 mM) de pH 7.4	0.570 ml
β mercaptoetanol	30.000 μ l
Solución W2	133.000 μ l

W2

β mercaptoetanol	100.0	μ l
Biolytes 5-7	80.0	μ l

Biolytes 3-10	20.0 μ l
Agua destilada	200.0 μ l

W3

Urea	9.60 g
Tris HCl 10 mM de pH 7.4	10.00 ml
Biolyte 5-7	0.40 ml
Biolyte 3-10	0.10 ml
Agua destilada	1.00 ml

W4

Tris HCl 0.5 M de pH 6.8	8.75 ml
Glicerol	5.00 ml
SDS a 10%	10.00 ml
Bromofenol b a 0.1%	2.00 ml
Agua bidestilada	25.00 ml

W5

Tris	7.6 g
Agua destilada (= 0.0625M)	750.0 ml

Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N

SDS	23.0 g
Glicerol	78.0 ml
Agua qsp	1000.0 ml

R1

Esta solución es igual a la W1

R2

Agua destilada	200.0 μ l
β mercaptoetanol	100.0 μ l
Biolyte 5-7	40.0 μ l
Biolyte 6-8	40.0 μ l
Biolyte 3-10	20.0 μ l

R3

Biolyte 5-7

0.2 µl

Biolyte 6-8

0.2 µl

F. BIBLIOGRAFIA

AYOUB, M.S. 1980. Plant nematology an agricultural training aid. Neam Aid Publication. 195 p.

BALDWIN, G.I.; MUNDO-OCAMPO, M. 1991. Heteroderinae, Cyst-and non-cyst-farming nematodes. Ed. por Nickle, W.R. Manual of Agricultural Nematology. Mercer Dekker. Inc. p 275-362.

BAKKER, J. BOWMAN-SMITS, L. 1988. Genetic variation in polypeptide maps of two *Globodera rostochiensis* pathotypes. *Phytopathology*. 78:894-900.

BARKER, K.R.; SASSER, J.N.; CARTER, C.L. (eds.). 1985. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. II. Methodology. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. North Carolina State University Graphics.

BAKKER, J.; BOWMAN-SMITS, L. 1988. Contrasting rates of protein and morphological evolution in cyst nematodes species. *Phytopathology*. 78:900-904.

BOSSIS, M.; MUGNIERY, D. 1993. Specific status of six *Globodera parasites* of solanaceous plants studied by means of two dimensional gel electrophoresis with a comparison of gel patterns by a computed system. *Fundament Applied Nematology*. 16(1):47-56.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.

BRATHWAITE, Ch. W. D. 1984. An introduction to the diagnosis of plant disease. IICA. San José. Costa Rica.

- BRATHWAITE, Ch. W. D.; SOSA-MOSS, C. 1995. Introducción al Diagnóstico de las Enfermedades de las plantas. Diagnóstico Fitosanitario I. IICA. San José Costa Rica.
- CAUBEL, G. 1993. Curso de entrenamiento para la identificación de razas de *Ditylenchus dipsaci*. Francia, INRA-RENNES (Comunicación personal).
- DE BOER, J.M.; OVERMARS, H.; BOWMAN-SMITS, L.; DE BOEVERE, M.; GOMMERS, F.; BAKKER, J. 1992. Protein polymorphism within *Globodera pallida* assessed with mini two dimensional gel electrophoresis of single females. *Fundament Applied Nematology*. 15:493-501.
- EISEMBACK, J.D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). p. 95-112.
- EISEMBACK, J.D.; HIRSCHMANN, H.; SASSER, J.N.; TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1983. Guía para la identificación de las cuatro especies más comunes del nematodo agallador (*Meloidogyne especies*) con una clave pictórica. Traducida por Sosa-Moss, C. Publicación cooperativa entre el Department of Plant Pathology and Genetics, North Carolina State University, el Centro de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Chapingo, México y la Agencia para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos. Raleigh, North Carolina. 48 p.
- EISEMBACK, J.D.; HIRSCHMANN, T.H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Ed. por Nickle, W.R. (ed). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc.
- FERRIS, V. R.; FAGHIHI, J.; IREHOLM, A.; FERRIS, J.M. 1989. Two-dimensional protein patterns of cereal cyst nematodes. *Phytopathology*. 79:927-933.
- GOLDEN, M.A. 1986. Morphology and identification of cyst nematodes. Ed. por Lamberti F. and C.E. Taylor *Cyst Nematodes*. Plenum Press. Published in cooperation with NATO Scientific Affairs Division. New York and London. p. 23-45
- HARTMAN, K.M.; SASSER, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. Ed. por Barker, K.C.; Carter,

- C.C.; Sasser, J.N. An advanced treatise on Meloidogyne. Vol. II. Methodology. A Cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. North Carolina State University Graphics. p. 66-77.
- HESLING, J.J. 1978. Cyst nematodes: Morphology and identification of *Heterodera*, *Globodera* and *Punctodera*. Ed. por Southey, J.F. Plant Nematology. London. p. 125-155.
- HOCHTRASSER, D.F.; PATCHORNIK, A.; MERRIL, C.R. 1988. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. Analytical Biochemistry. 173:412-423.
- HOOPER, J.D. 1990. Extraction and processing of plant and soil nematodes. Ed. por Luc, M.; Sikora A. J.; Bridge, J. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. C.A.B. International Institute of Parasitology. p. 45-66.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter. 57:1025-1028.
- JEPSON, S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). C.A.B. International. Wallingford, Oxon. United Kingdom. 265 p.
- MOJTAHEDI, H.; SANTO, G.C.; WILSON, J.H. 1988. Host test to differentiate *Meloidogyne chitwoodi* Races 1 and 2 and M. hapla. Journal of Nematology. 20(3):468-473.
- MYERS, R.F. 1987. Identificación de especies y razas de *Meloidogyne*. Ed. por Zuckerman B.M.; Mai, W.F.; Harrison, M.B. Fitonematología. Manual de Laboratorio. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba. Costa Rica. p. 71-76.
- NIBLACK, L.T.; HUSSEY, S.R. 1987. Extracción de nematodos del suelo y de tejidos vegetales. Ed. por Zuckerman, B.M.; Mai, W.F.; Harrison, M.B. Fitonematología. Manual de Laboratorio. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. p. 235-242
- OAKLEY, B.R.; KIRSCH, D.R.; MORRIS, N.R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry. 105:361-363.

- O'FARRELL, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *Journal Biology Chemistry*. 250:4007-4021.
- PREMACHANDRAN, D.; BERGE, J.B.; EGBERT, E.C. 1984. Two-dimensional electrophoresis of proteins from root-knot nematodes. *Revue Nematology* 7:205-207.
- RIGGS, R.D. 1987. Preparación de patrones perineales de *Meloidogyne* spp y de conos vulvares de nematodos enquistados. p. 243-245.
- SASSER, J.N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64:36-41.
- SASSER, J.M.; BARKER, K.R.; CARTER, C.L. (Eds). 1985. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. 1: Biology and Control. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. North Carolina State University Graphics.
- SOSA-MOSS, C 1974. Curso de nematodos fitopatógenos. México, Colegio de Postgraduados de la Escuela Nacional de Agricultura, Rama de Fitopatología. (Comunicación personal).
- SOSA-MOSS, C 1990 Claves para género de nematodos fitoparásitos del Suborden *tylenchina*. Colegio de Postgraduados, Montecillos México. 45 p.
- SHEPHERD, M.A. 1986. Extraction and estimation of cyst. Ed. por Southey, J.F. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London: Her Majesty's Stationery Office. 202 p.
- SOUTHEY, J.F. (ed.). 1965. Plant nematology. Technical Bulletin. N° 7. Ministry of Agriculture Fisheries and Foods. London. 282 pp.
- STONE, R.A. 1986. Taxonomy and phylogeny of cyst nematodes. Ed. por Lamberti, F.; Taylor C.E. Cyst Nematodes. Plenum press. Published in cooperation with NATO Scientific Affairs Division. p. 1-21

- TOLEDO, R. J.C. 1990. Caracterización patogénica de cinco poblaciones de *Nacobbus aberrans* y evaluación del daño que causa a tomate, chile y frijol en México. Tesis de M. en C. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 64 p.
- TOLEDO, R. J.C.; SOSA-MOSS, C.; ZAVALA-MEJIA, E. 1993. Gama de hospederos de cinco poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*. 23(1):105-108.
- TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. 1978. Biology identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne species*). A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for the International Development. North Carolina State University Graphics. 111 p.
- ZUCKERMAN, S.M.; MAI, W.F.; HARRISON, M.B. (eds). 1987. Fitonematología. Manual de laboratorio. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 248 p.
- ZUCKERMAN, B.M.; MAI, W.F.; KRUSBERG, L.R. 1990. Plant Nematology Laboratory Manual. Published by Agricultural Experimental Station. University of Massachusetts at Amherst. 252 p.

V. VIRUS, VIROIDES Y OTROS PATOGENOS SIMILARES

A. VIRUS

Los virus son entidades tan pequeñas que no pueden observarse con el microscopio compuesto de luz. Causan enfermedades en las plantas y en los animales, incluyendo al hombre; teóricamente ningún ser vivo escapa al ataque de los virus.

Debido a su tamaño infinitamente pequeño, el diagnóstico de una enfermedad causada por virus es difícil; su estudio se dificulta aún más porque no pueden ser cultivados en medios sintéticos como los hongos o bacterias, debido a que al igual que los nematodos fitopatógenos son parásitos obligados. Pueden ser detectados observando las inclusiones que forman en las células de las plantas infectadas, o viendo sus partículas en el microscopio electrónico.

No obstante que no es fácil trabajar con los virus que atacan a los vegetales, existen actualmente técnicas que han sido desarrolladas para detectar a los virus dentro de los tejidos de las plantas enfermas.

Una técnica muy práctica y relativamente rápida, que permite conocer en una primera instancia si en la enfermedad que se pretende diagnosticar está involucrado un virus, es la de "transferir" los síntomas de una planta enferma a una sana, inoculando a ésta última con la savia de la enferma. La técnica de transmisión mecánica de virus puede consultarse en cualquier libro clásico de Fitopatología o en Brathwaite (1984) o Brathwaite y Sosa-Moss (1995).

Otra técnica similar consiste en injertar un trozo de tallo de la planta enferma en una planta sana y observar si esta última se enferma y se reproducen los síntomas. En teoría,

todos los virus fitopatógenos descritos hasta la fecha pueden transmitirse por injerto a sus plantas hospedantes y aun a especies cercanas; sin embargo, en la práctica, por diversos factores tales como la naturaleza de la planta hospedante, las características del propio virus, las dificultades técnicas para realizar el injerto, etc., no en todos los casos se tiene éxito con este tipo de transmisión.

Además, para eliminar la posibilidad de que los síntomas originalmente observados en la planta sean causados por toxinas de insectos, se recomienda hacer la transmisión seriada por tres o cuatro veces.

Debe aclararse que no puede hacerse lo anterior en todos los casos, sino únicamente con las plantas atacadas por virus que pueden transmitirse mecánicamente o por injerto.

Aunque los virus no pueden cultivarse *in vitro*, para su estudio es necesario purificarlos y concentrarlos, lo que equivale a los cultivos puros de hongos o bacterias.

a. PURIFICACION EN VIRUS

Jayasinghe y Salazar (1993) afirman que en la naturaleza existen muchos virus que infectan plantas; para hacer el diagnóstico es necesario conocerlos desde el punto de vista químico, físico y biológico. Para lo anterior es necesario purificarlos, es decir, obtener partículas ciento por ciento activas y tan libres de material de las células que infectan, como sea posible.

Las partículas virales así obtenidas pueden ser utilizadas para caracterizar al virus desde el punto de vista físico, químico y bioquímico; en investigaciones básicas de biología molecular; en trabajos básicos de investigación; o para la obtención de un antisuero específico que permita hacer el diagnóstico.

1. FUNDAMENTOS DE LA PURIFICACION

Purificación química de un virus se basa en que sus partículas difieren químicamente de los constituyentes normales de las células hospedantes. La purificación consiste en aprovechar tales diferencias para obtener partículas ciento por ciento activas y libres de material celular; sin embargo, debe aclararse que algunas partículas pierden su infectividad durante el proceso de purificación y que algunas veces también se presentan modificaciones en su

morfología, por lo que el proceso debe efectuarse de tal manera que el virus permanezca intacto. Para tal fin, se deben realizar una serie de etapas que se describen a continuación.

2. ETAPAS EN LA PURIFICACION

Selección de la planta hospedante

No utilizar el hospedante natural del virus, para evitar una reacción inmunológica a la proteína de la planta. Seleccionar una planta hospedante de fácil manejo que permita obtener altas concentraciones de virus y que no tenga inhibidores como taninos, látex o compuestos fenólicos, en altas cantidades, ya que estos compuestos interfieren en la purificación del virus.

Extracción de la savia

A pesar de que los virus se distribuyen en toda la planta, generalmente en las hojas existe mayor concentración, lo que permite que por maceración se obtengan más fácilmente.

Algunos virus son muy estables, por ejemplo virus mosaico del tabaco, y no requieren de un medio de extracción complejo para la purificación. Sin embargo, existen varios virus que tienen requerimientos específicos de pH, concentración de sales e incluso pueden necesitar de otras sustancias específicas para estabilizarlos.

Para la extracción de savia se utilizan de 1 a 2 kg de tejido vegetal, de preferencia fresco, puesto que la congelación desnaturaliza las proteínas que, al volverse insolubles, se precipitan. Durante esta fase es muy importante que, en medio de extracción, entren en contacto inmediatamente con las células destruidas; las soluciones amortiguadoras comúnmente usadas son las de citrato, fosfato, borato y tris-HCl. Se procede como sigue:

- Moler el tejido en el mortero o licuadora. El uso de la licuadora tiene la desventaja de que fracciona los virus de partícula en forma de varilla. El molido debe realizarse en el menor tiempo posible para evitar la degradación de las proteínas por la fricción.

- Agregar compuestos estabilizadores de la savia durante el proceso de molienda, como se explica más adelante.
- Filtrar el macerado a través de gasas para eliminar la fibra vegetal y a la vez eliminar las partículas más gruesas.

Estabilización de las partículas de virus

La savia, al ser extraída de los tejidos, libera compuestos capaces de degradar a los virus. Entre estos compuestos, se encuentran algunos que inducen un pH ligeramente ácido, enzimas, etc. Por lo anterior, es necesario regular el pH de la savia por medio de una solución amortiguadora que puede ser de boratos, fosfatos, acetatos o Tris HCl. El efecto del pH variará de acuerdo con el punto isoeléctrico del virus. Por otra parte, debido a las reacciones propias de los componentes químicos celulares, se requiere de la adición de quelatantes, tales como el etilendiaminotetra-acetato (EDTA), para eliminar los iones de Ca y Mg y evitar que se altere la estructura del virus. También el uso de detergentes aniónicos como Tween 80, Triton X-100, urea o DT ayudan a solubilizar las partículas de virus, evitando la agregación lateral o terminal de partículas alargadas causada por la formación de puentes de disulfuro o de hidrógeno, respectivamente. Es común, también, el uso de agentes reductores como el ácido tioglicólico, 2-mercaptoetanol, cisteína o sulfito de sodio, para evitar la oxidación debida a taninos y compuestos fenólicos y la formación de quinonas.

Todos los compuestos que dan estabilidad a las partículas deben incorporarse durante la molienda, como se explicó anteriormente. Si el virus es inestable es aconsejable realizar la purificación en frío.

Clarificación de la savia

La clarificación de la savia consiste en eliminar la mayor cantidad de componentes vegetales, perdiendo la menor cantidad posible de partículas de virus. Los métodos más comunes de clarificación son:

- Centrifugar a baja velocidad para eliminar fibras, cloroplastos y material vegetal grueso; la centrifugación se hace a 8000 - 10000 rpm durante 10 a 15 min.
- Filtrar la savia a través de un embudo Buchner con papel filtro especial para clarificar savia.
- Calentar la savia en baño María a 50-60°C durante 10 minutos, o a 40°C durante 60 minutos, dependiendo del punto de inactivación térmica del virus.

- Congelar la savia a 0°C durante 12 horas, para desnaturalizar la proteína y luego centrifugar a baja velocidad para precipitarla.
- Acidificar agregando a la savia ácido acético o HCl diluido, aplicado gota a gota y agitando hasta llegar al punto isoeléctrico del virus, lo que desnaturaliza la proteína; centrifugar después a baja velocidad. En este caso el virus se precipita.
- Alcalinizar la savia, para lo cual la sal más comúnmente empleada es sulfato de amonio a 1/2 de saturación.
- Centrifugar a baja velocidad para precipitar las proteínas.

Concentración del virus

La concentración del virus permite eliminar impurezas adicionales; se realiza por ultracentrifugación o precipitación.

La ultracentrifugación a 40000-60000 rpm durante 2 a 4 horas en centrifugas preparativas es el método más comúnmente usado.

Purificación del virus

- Método común

El paso final para la purificación de un virus fitopatógeno es la centrifugación en gradientes de densidad, generalmente de sucrosa, que se logra por deposición del virus sobre una columna de sucrosa previamente preparada, sobreponiendo capas de distintas concentraciones de azúcar (generalmente 40%, 30%, 20%, 10% de agua). El gradiente de densidad del azúcar se forma dejando reposar los tubos algunas horas, lo que usualmente se hace durante la noche. Al día siguiente se coloca la suspensión de virus en la parte superior del gradiente y se centrifuga. El resultado es una banda azulosa donde se "estacionan" las partículas de virus al encontrar su densidad de flotación; de ahí se extraen por medio de un equipo fraccionador de gradientes de densidad, o a mano, con una jeringa hipodérmica.

Posteriormente el virus se centrifuga a alta velocidad para eliminar la sacarosa y podrá ser utilizado para pruebas posteriores, o bien, dependiendo de la estabilidad del virus, se dialisa con agua destilada o una solución amortiguadora.

Pueden usarse también sales que forman gradientes, como cloruro de cesio, tartrato de potasio y los bromuros de sodio y yodo.

- Otros métodos de purificación

Se conocen varios sistemas de purificación de acuerdo con el tipo de virus de que se trate. Algunos de los métodos que pueden ser empleados son: filtración por gel (agar-agarosa-sefaphadex), también conocido como cromatografía de tamizado molecular, que es de gran utilidad para aquellos virus que se desnaturalizan durante la centrifugación a altas velocidades; cristalización; precipitación isoelectrica, también conocido como precipitación por acidificación o por cambio de pH; electroforesis en gradiente de densidad (líquida) de sucrosa en una columna, que es un método muy efectivo en la purificación de virus inestables o virus que poseen un coeficiente de sedimentación similar al de los componentes vegetales; métodos serológicos (cromatografía por afinidad y uso de antisueros para remoción de los antígenos del hospedero); entre algunos otros.

La purificación debe realizarse siempre con virus que sean biológicamente homogéneos; esto significa que el aislamiento viral debe estar libre de virus contaminantes y que no debe contener mezclados aislamientos o cepas de virus diferentes.

Los virus mutan muy rápidamente, por lo que resulta difícil evitar la producción de mutantes durante su manejo. No obstante, la tasa de mutación puede ser mantenida a un mínimo evitando las condiciones en que éstas son más frecuentes, como temperatura elevada, irradiación y exposición a componentes químicos mutagénicos. La cepa viral aislada debe ser analizada periódicamente, utilizando plantas indicadoras para determinar la posible existencia de mezclas.

Una vez que la cepa esté purificada, se deberán extremar las precauciones para prevenir su contaminación.

Una forma de mantener al virus biológicamente puro es inoculando plantas indicadoras en las que se produzcan lesiones locales, y reaislando al virus de la lesión para inocular a otra planta hospedante. La transferencia reduce la probabilidad de que el aislamiento se contamine con otro virus u otra cepa del mismo virus. En ciertos casos es posible utilizar insectos vectores para separar virus diferentes.

Es importante elegir una buena planta hospedante que garantice la producción de grandes cantidades de virus en el menor tiempo posible. También es conveniente que las plantas hospedantes seleccionadas no contengan grandes cantidades de taninos, gomas, ni compuestos fenólicos, puesto que éstos interfieren con la purificación del virus.

Las plantas utilizadas para el incremento de los virus deben ser desarrolladas a 20-25°C, con intensidad de luz baja. Los nutrimentos que se proporcionen a las plantas y el fotoperíodo que se les aplique, pueden afectar la multiplicación del virus, pero sus efectos no son tan importantes como los de la luz y la temperatura. Es importante cosechar las hojas cuando la concentración del virus está cerca del máximo; las hojas cosechadas pueden ser almacenadas a -20°C, siempre y cuando el virus no sea inactivado por la congelación.

Para mayor información sobre los fundamentos de la purificación de virus consultar a Jayasinghe y Salazar (1993).

- Tipos de virus y su purificación

Grupo 1. Incluye los virus que tienen un solo componente nucleoprotéico (sólo ADN o ARN); es decir, las partículas del virus están constituidas por una molécula central, de cualquiera de los dos ácidos nucleicos, rodeada por una cubierta protéica. Ejemplos: virus mosaico del tabaco, virus esféricos parecidos al del mosaico del pepino y virus del enrollamiento de la hoja de la papa, entre otros.

Hasta el momento, la mayoría de los virus fitopatógenos aislados pertenecen a este grupo.

Grupo 2. Formado por los virus integrados por nucleoproteínas multicompuestas llamados virus multiparticulados. Estos virus pueden estar constituidos por varias partículas que contienen diferentes cantidades de ácido nucleico. El método utilizado en la purificación de estos virus es muy similar al empleado con los del Grupo 1, descrito previamente, pero en el paso final los tipos diferentes de partículas virales son separados haciendo uso de las diferencias en sus coeficientes de sedimentación o densidades.

Grupo 3. Agrupa a los virus satélite que son incapaces de multiplicarse solos en un hospedero, a menos que éste sea infectado simultáneamente por otro virus al que se le llama "AUXILIAR". Los dos virus son propagados juntos y luego separados durante o des-

pués de la purificación. Ejemplo: el virus satélite de la necrosis del tabaco (STNV), para ser infectivo requiere de la ayuda del virus necrosis del tabaco (VNT).

Grupo 4. En este grupo quedan comprendidos los virus cubiertos que tienen una membrana externa compuesta de lipoproteínas, que cubre la cápside protéica que encierra al ácido nucléico. Dicha membrana es muy delicada y se daña fácilmente, causando la inactivación de la partícula viral. Los procedimientos de purificación empleados para el Grupo 1, que son dirigidos hacia la destrucción de membranas, no son adecuados para estos virus. Se deben utilizar métodos menos fuertes.

Grupo 5. Incluye a los viroides que son moléculas libres de ácido nucléico que carecen de cubierta protéica. Los métodos de purificación utilizados están basados en el aislamiento de ácidos nucléicos. No es posible aislarlos por ninguno de los procedimientos utilizados para los cuatro grupos anteriores.

Determinación de la concentración del virus

Una vez que se tiene el virus purificado, es necesario determinar su concentración. Para ello se debe preparar una dilución del virus (normalmente 1/20) y leer su absorbancia a OD_{260} . Esta lectura debe ser corregida por la dilución utilizada y luego dividida por el "coeficiente de extinción" del virus, que es una característica propia de cada virus, y representa la absorbancia de una concentración de 0.1 % (1 mg/ml) del mismo, con un pasaje óptico de radiación de 1 cm, utilizando una longitud de onda de 260 nm. El coeficiente de extinción se representa con el siguiente símbolo: $E_{1cm, 260nm}^{0.1\%}$

Así, cuando una preparación diluida 1/20 tiene un valor de OD_{260} de 0.37 y su coeficiente de extinción es de 9.6, la concentración de virus será: $0.37 \times 20 = 7.4$, $7.4/9.6 = 0.77$ mg/ml.

Por medio de cálculos simples es posible conocer también los miligramos totales de la purificación y el rendimiento de virus por kilogramos de tejido de la planta hospedera.

Es recomendable que en cada uno de los pasos finales de la purificación se tomen pequeñas muestras de la preparación para que sean analizadas en el microscopio electrónico. De esta manera se puede saber si se está obteniendo un virus cada vez más concentrado y libre de contaminantes.

3. EJEMPLO DE PROTOCOLO DE PURIFICACION

Como ya se mencionó, la obtención de un virus purificado es necesaria para el estudio de sus propiedades físicas y bioquímicas, la producción de antisueros específicos, la preparación de sondas de ácidos nucleicos complementarios a la secuencia viral y para la determinación de sus productos finales de traducción.

De manera sintetizada, una purificación comprende los siguientes pasos:

- Extracción.
- Clarificación.
- Sedimentación a baja velocidad.
- Clarificación.
- Sedimentación a alta velocidad.
- Clarificación.
- Centrifugación en gradientes de densidad, a alta velocidad.
- Fraccionamiento.
- Sedimentación.
- Virus purificado.

A continuación, a manera de ejemplo, se describe el protocolo de purificación del virus Y de la papa (PVY).

Planta hospedera: *Nicotiana occidentalis*

Materiales: Tomar solamente el limbo de las hojas, 15 a 20 días después de la inoculación.

Extracción: Homogeneizar el material vegetal en dos volúmenes de solución amortiguadora fosfato de sodio y potasio 0.2 M de pH 8.0 con 0.2 % de 2-mercaptoetanol y 0.01 M de EDTA.

Filtrado: Filtrar el extracto a través de tres capas de gasa.

Clarificación: Clarificar centrifugando a 7840 G durante 20 minutos. Eliminar el sedimento y procesar el sobrenadante adicionando 1 % de Tritón X-100, manteniendo en agitación durante 120 minutos a 4°C. Clarificar una vez más a 7840 G durante 20 minutos. Eliminar el sedimento y procesar el sobrenadante adicionando 4% de PEG (PM 8000 a 8000) y 0.2 M de NaCl, manteniendo en agitación durante 60 minutos a 4 °C. Incubar después a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Sedimentación: Sedimentar centrifugando a 7840 G durante 20 minutos. Eliminar el sobrenadante y procesar el sedimento resuspendiéndolo con agitación en solución amortiguadora de fosfato de Na y K 0.02 M de pH 7.2 con 1 % de Tritón X-100 (1/5 del volumen original), manteniéndolo a 4°C durante toda la noche.

Clarificación: Clarificar centrifugando a 5089 G durante 10 minutos. Eliminar el sedimento y continuar procesando el sobrenadante.

Centrifugación: En "colchón de sucrosa" a 30 % (p/v) en solución amortiguadora de fosfato de Na y K 0.05 M de pH 7.2 (15 ml de muestra por 5 ml de sucrosa a 30 %), 72527 G durante 150 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en solución amortiguadora de fosfato de Na y K 0.01 M de pH 7.2 con 0.01 M de EDTA (1/30 del volumen original), manteniéndolo a 4°C durante 4 horas.

Clarificación: Clarificar centrifugando a 5089 G durante 10 minutos. Eliminar el sedimento y al sobrenadante agregarle 0.5 g de CsCl por cada 1.5 ml de muestra.

Centrifugación en gradientes de densidad: Preformados los gradientes de cloruro de cesio (CsCl a 30, 60 y 90 %, p/v) en solución amortiguadora de fosfato de Na y K 0.01M de pH 7.2 con 0.01M de EDTA (1.5 ml de muestra por 3 ml de gradiente), centrifugar en rotor de columpio a 128 028 G durante 3 horas.

Fraccionar: Colectar la banda del gradiente que contiene el virus.

Procesamiento de fracciones: Adicionar igual volumen de solución amortiguadora de fosfato de Na y K 0.01M de pH 7.2 con 0.01M de EDTA.

Sedimentación: Sedimentar centrifugando a 102.681 G durante 60 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en solución amortiguadora de fosfato de Na y K 0.01M de pH 7.2 (1/50 del volumen original), manteniéndolo a 4°C durante toda la noche.

Clarificación: Clarificar centrifugando a 5089 G durante 10 minutos. El sobrenadante constituye el virus purificado. Eliminar el sedimento.

Lectura de la absorbancia: En un espectrofotómetro leer la absorbancia del virus purificado.

Los protocolos de purificación de los principales virus de papa pueden consultarse en Jayasinghe y Salazar (1993).

b. CARACTERIZACION INICIAL DE UN VIRUS

Se han desarrollado diferentes metodologías para la caracterización inicial de un virus; entre las características más útiles están el "punto final de dilución", el "punto de inactivación térmica" y la "longevidad *in vitro*" que permiten conocer la concentración y estabilidad de las partículas virales en la savia de la planta enferma (Hill, 1984).

1. PUNTO FINAL DE DILUCION

Esta prueba permite conocer el número mínimo de partículas virales que se requiere para que ese virus en particular infecte.

Para conocer el número mínimo de partículas, se procede como sigue:

- Extraer la savia de las hojas infectadas.
- Preparar, en Solam 0.02 M de pH 7.0, las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-5} .
- Inocular, iniciando con la dilución máxima, dos hojas que sean más o menos de la misma edad, haciendo tres repeticiones; continuar inoculando otras hojas con las demás diluciones, de mayor a menor.
- Colocar las plantas en un lugar aislado del invernadero.
- Contar el número de lesiones, cuando éstas aparezcan.
- Elaborar una gráfica con los datos obtenidos, para conocer a partir de cuál dilución ya no se presentan lesiones.

Cuando se requieren datos más precisos sobre el punto de dilución límite, se hacen 3 o 4 diluciones intermedias (Hill, 1984).

Esta técnica es útil para conocer la concentración relativa de virus en la savia infectiva.

2. PUNTO DE INACTIVACION TERMICA

Esta prueba, además de ser una herramienta de diagnóstico inicial, permite conocer algunos cambios físicos y químicos que ocurren en las partículas virales y que les confieren la propiedad infectiva; también es un indicador de ciertas características específicas de los hospedantes, que facilitan el diagnóstico (Bawden, 1984).

Por otra parte, el Punto de Inactivación Térmica de un extracto crudo de savia de plantas infectadas, permite conocer la temperatura requerida para lograr la inactivación del virus, expuesto durante 10 minutos (Pinto, 1991).

Para conocer el Punto de Inactivación Térmica, la técnica es la siguiente:

- Extraer con un molino de carne, savia de hojas de plantas enfermas.
- Poner 0.5 ml de savia en cada uno de 14 tubos pequeños y taparlos.
- Colocar separadamente, durante 10 minutos, en Baño María, dos tubos en cada una de las siguientes temperaturas: 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 95°C.
- Pasados los 10 minutos, sumergir inmediatamente los tubos en agua fría para detener la acción del calor.
- Inocular mecánicamente las plantas indicadoras, con las savias tratadas con las diferentes temperaturas, haciendo cuatro repeticiones.
- Registrar los resultados y hacer gráficas con los datos obtenidos, para conocer a partir de qué temperatura se inactiva el virus.

3. LONGEVIDAD *in vitro*

La longevidad *in vitro* se define como el tiempo en horas, días o semanas, durante las cuales la savia cruda con virus, mantenida a temperatura ambiente, conserva su infectividad (Hill, 1984).

Para conocer el punto aproximado de la longevidad *in vitro* de un virus, es necesario hacer una prueba inicial, a intervalos con progresión geométrica; por ejemplo: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32... días.

El procedimiento es el siguiente:

- Preparar un extracto crudo de hojas relativamente jóvenes, que muestren los síntomas típicos de la enfermedad (10 a 14 días después de la inoculación). Para uniformizar la determinación de las características básicas de un virus en particular, se sugiere usar amortiguador (es) para el extracto crudo.
- Tomar con una pipeta una alícuota de 2 ml de savia para colocarla dentro de los diferentes tubos. El número de tubos dependerá de cuántos tiempos se van a incluir en la prueba; por ejemplo, para la serie de intervalos de 0, 0.25, 1, 2, 4, 7, 10 y 14 días, se requerirán ocho tubos, que una vez con la savia se sellan con parafilm.
- Colocar los tubos a temperatura ambiente, cuidando de no exponerlos a la luz directa del sol, o a variaciones bruscas de temperatura que puedan interferir en la prueba.
- Transcurrido el tiempo establecido, cada tubo se abre y se usa la savia para inocular mecánicamente las plantas indicadoras.
- Valorar la reacción de la planta inoculada con el virus, después de un tiempo apropiado.

c. TRANSMISION DE VIRUS

Los virus fitopatógenos son parásitos obligados, inmóviles e incapaces de penetrar por sus propios medios a una célula, por lo que requieren de un transmisor que los introduzca. Esta característica ha sido aprovechada en los procesos experimentales para el estudio de los virus. Todos los virus pueden ser introducidos a cualquier planta por inoculación mecánica, pero no todos pueden iniciar y establecer efectivamente la infección, pues existen una serie de factores que condicionan el comportamiento del virus en la célula.

Existen varias técnicas disponibles para transferir un virus de una planta a otra. En todas ellas se requiere que una o más partículas virales entren a una célula vegetal viva y susceptible. Los virus se multiplican en las células nuevamente infectadas y se mueven después a las células contiguas, enfermado así a ciertos órganos o a toda la planta. Este proceso infectivo puede expresarse en forma de pequeñas lesiones necróticas visibles a simple vista.

Las principales formas de transmisión, natural o experimental, de los virus, son: por semilla, polen, insectos, ácaros, hongos, nematodos, y mecánicamente; también por cúscura y por injerto.

1. TRANSMISION NATURAL

Se realiza por contacto entre plantas; el rozamiento entre ellas daña los tricomas y células epidérmicas, lo que permite que el virus de la savia de una planta enferma se introduzca por las heridas de la planta sana. Esto ocurre únicamente en los virus estables, como el virus mosaico del tabaco (VMT) y el virus X de la papa (PVX).

Tanto los mamíferos como los insectos con aparato bucal masticador, pueden transmitir estos virus sin que haya una interacción específica entre ellos, sino más bien en forma accidental.

El hombre puede transmitir virus con las manos contaminadas, ropa e implementos de labranza, durante las labores culturales y en la cosecha de frutos y otros productos agrícolas.

- Transmisión por semilla

La transmisión de virus por semilla es importante porque se convierte en una fuente de inóculo primario distribuido al azar, de donde los vectores o el hombre se encargan de diseminarlos.

Los virus que están dentro de la semilla pueden perder su infectividad, aun antes que se pierda la viabilidad de la semilla. Uno de los virus más persistentes en semilla es el virus mosaico de la calabaza, que puede permanecer viable más o menos tres años en semilla almacenada.

De las semillas derivadas de una planta enferma con virus, sólo una pequeña porción de ellas (1-10%) puede transmitir la enfermedad. Existen pocos casos en que cerca de cien por ciento de las semillas de una planta resultan infectadas; por ejemplo con el tobacco ringspot virus en soya; en otros casos, la transmisión por semilla puede alcanzar entre 28-94%, con el virus mosaico del melón en sandía; 50-100% con el virus mosaico estriado de la cebada (Agrios, 1969; Matthews, 1992).

Por otra parte, este tipo de transmisión es de gran importancia en el comercio internacional de semillas, ya que es una forma muy eficiente de diseminar virus de región a región, de país a país y de continente a continente.

Aproximadamente, 119 de los 500 virus fitopatógenos conocidos, se transmiten por semilla; pueden ir en la testa (Virus Mosaico del Tabaco), o en el embrión, como en la mayoría de los casos. La infección a la semilla se puede realizar a través del ovario o por el polen; el virus penetra a la semilla antes de la diferenciación de las microsporas, cuando todavía no se forma la capa de callosa.

- Transmisión por polen

Existe la posibilidad de que muchos virus transmitidos por semilla sean transmitidos por el polen de plantas enfermas. Presumiblemente, la autopolinización de plantas enfermas puede resultar en un alto porcentaje de semillas infectadas. No obstante, cuando una planta sana es polinizada con polen infectado con cierto virus, pueden resultar afectadas solamente las semillas, pero en otros casos, la planta completa puede resultar afectada.

La transmisión por polen es importante en frutales, porque se infecta a toda la planta, como sucede con el virus de la mancha anular del cerezo agrio y el enanismo arbustivo de la frambuesa.

La eficiencia de la transmisión por polen varía ampliamente, los virus del grupo de los Cryptovirus son los más eficientemente transmitidos de esta manera (Matthews, 1992). Sin embargo, pocos son los virus que se transmiten por polen, debido a varias causas: que los granos de polen aborten; que el tubo polínico crezca lentamente; que las plantas enfermas produzcan menos polen que las sanas; que la viabilidad del polen sea muy corta; que el polen no pueda diseminarse, etc.

2. TRANSMISION EXPERIMENTAL

Se utiliza para conocer la etiología viral de una enfermedad, o para identificar una enfermedad virosa desconocida. El método consiste en inocular savia de una planta enferma a plantas sanas. Se utilizan plantas diferenciales como *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Datura stramonium*, *Lycopersicon esculentum*, *Capsicum annum*, *Physalis* spp. y algunas cucurbitáceas, entre otras.

La inoculación debe realizarse bajo condiciones de asepsia y puede hacerse con gasa, isopos, espátula de vidrio, pinces, los dedos, o con jeringas hipodérmicas. El método consis-

te en asperjar, como abrasivo, carborundum de 500-600 mallas y frotar con una gasa humedecida con la savia infectiva. Después se lavan las hojas para evitar que se quemen por efecto del abrasivo.

-Transmisión por injerto

Basándose en que muchos virus pueden ser transmitidos por injerto, en virología se utiliza éste para determinar la naturaleza viral de muchas enfermedades y eliminar la posibilidad de que los síntomas sean causados por una toxina, así como para certificar que en un lote de plantas está libres de virus.

Para realizar esta prueba es necesario que la planta donante y la receptora sean compatibles y que el virus infecte sistémicamente a la planta indicadora. La rapidez con que se desarrollen los síntomas en una planta, depende del tejido donde se encuentre el virus. En el tejido parenquimatoso tardan aproximadamente 28 horas, y en tejidos vasculares más tiempo.

El material requerido para hacer los injertos debe estar estéril o ser nuevo; la técnica debe realizarse bajo condiciones de asepsia.

Materiales necesarios

- Hoja de afeitar o bisturí.
- Tiras de parafilm de 1 x 3 cm para sellar la herida.
- Estacas para sostener las plantas.
- Bolsas de plástico.
- Plantas portainjerto (los tallos deben ser fuertes y suficientemente gruesos para sostener al injerto).
- Material vegetal que se va a injertar.

Injerto de pua

- Retirar de la planta portainjerto la mayoría de las hojas maduras.
- Efectuar en el tallo una incisión oblicua de 0.5 a 1 cm de profundidad, hacia abajo.
- De la planta donante seleccionar un ápice joven; cortar la base en forma de cuña, dejándola de 0.5 a 1 cm de longitud.

- Insertar la púa en la incisión del portainjerto y asegurarla con parafilm.
- Cubrir la planta injertada con una bolsa de plástico para hacer una cámara húmeda, y colocarla en un lugar sombreado y fresco. Se debe cuidar que la bolsa de plástico esté húmeda por dentro; retirarla a los tres o cuatro días y transferir la planta al invernadero.

Injerto de aproximación

Este tipo de injerto es de gran utilidad cuando las plantas no son compatibles y rechazan el injerto de pua.

- En la planta enferma hacer un corte oblicuo de 1 cm de profundidad hacia abajo del tallo, a 4-5 cm sobre el nivel del suelo.
- En la planta receptora sana, realizar un corte a la misma altura del tallo, pero hacia arriba. El tallo debe tener un grosor semejante al de la planta donante y el corte debe ser de las mismas dimensiones que el de la otra planta.
- Insertar una planta en la otra por las incisuras que están en sentidos contrarios.
- Sellar con parafilm y mantener las plantas en el invernadero.
- Esperar a que aparezcan los síntomas en la planta receptora.

- Transmisión por cúscuta

La cúscuta es una planta parásita que pertenece a la familia Convolvulaceae. En sus primeros estados de desarrollo se alimenta de las reservas de la semilla, pero después se enreda en una planta hospedante y produce haustorios por medio de los cuales extrae nutrimentos de la misma.

Se utiliza como puente de transmisión cuando un virus no se puede transmitir por otros medios, o cuando se quieren separar dos virus de un hospedante, como es el caso de la mezcla de virus moteado del chícharo con el virus marchitez del chícharo; únicamente el primero se transmite a través de la cúscuta.

Las principales desventajas de la transmisión por cúscuta es que es un método muy lento y que esta planta parásita puede ser hospedante de otros virus, como el llamado virus latente de la cúscuta.

Transmisión por insectos

Algunos insectos masticadores pueden transmitir virus en forma mecánica por simple contaminación de sus piezas bucales. Sin embargo, los homópteros transmiten los virus a través de un fenómeno complejo en el que están involucrados: insecto, virus, planta y condiciones ambientales.

Existen los términos "vector" y "biotransmisor" para indicar si un insecto es capaz de transmitir un virus. El término "vector" es más específico y se aplica cuando el paso del virus por el insecto es indispensable para que el patógeno permanezca en la naturaleza; es también el término más correcto para referirse a insectos en los cuales se multiplica el virus.

Los principales grupos de insectos vectores de virus fitopatógenos son:

Orden	Familia	Especies vectoras	Virus transmitidos
Homoptera	Cicadellidae	60	35
	Aphididae	200	190
	Psillidae	1	1
	Pseudococcidae	15	2
	Aleyrodidae	3	25
Coleoptera	Chrysomellidae	30	20
Thysanoptera	Thripidae	6	3
Orthoptera	Tettigonidae	10	6
Dermaptera		1	1
Lepidoptera		4	5
Diptera		2	3
Hemiptera		2	2

Los áfidos son los vectores más importantes y efectivos en la transmisión de virus. De las 3 800 especies de áfidos que se han descrito, únicamente 200 son vectoras de virus.

La especie *Myzus persicae* Sulzer es capaz de transmitir 190 virus, lo que indica que los áfidos son eficientes vectores de estos patógenos debido a que sus piezas bucales están modificadas para succionar la savia de la planta de la que se alimentan. Al unirse los estiletes maxilares, forman el canal alimenticio y el canal salival; en la parte externa están los estiletes mandibulares. Los estiletes penetran intra e intercelularmente y la penetración es acompañada por secreciones salivales que contienen celulasas y pectinasas. Las pruebas iniciales de alimentación las hace el insecto en las células epidérmicas, formando un gel llamado "vainas salival".

Para satisfacer su hambre, el áfido introduce el estilete en los tejidos del floema, adquiriendo así el virus. Esta operación se realiza en pocos minutos.

Posteriormente, al alimentarse nuevamente, el áfido inyecta el virus junto con la saliva que habitualmente secreta.

En la transmisión de virus por insectos se emplean los términos siguientes:

- **Período de ayuno.** Es la suspensión temporal de cualquier tipo de alimento para el áfido. La intención de esto es eliminar saliva del estilete mandibular, o para que haya un cambio de hábito alimenticio del insecto.

- **Período de adquisición-alimentación.** Es el tiempo que necesita el vector para adquirir el virus.

- **Período de acceso.** Es el tiempo de permanencia del pulgón en la planta.

- **Período latente.** Es el tiempo que requiere el vector para poder transmitir el virus, después de haberlo adquirido.

- **Período de inoculación-alimentación.** Es el tiempo necesario para que un insecto transmita un virus, después de que es puesto en contacto con una planta sana, para que se alimente de ella.

- **Período de retención.** Se refiere al tiempo durante el cual un insecto es capaz de retener un virus, sin que pierda su capacidad de transmitirlo.

- **Persistencia.** Período durante el cual un vector retiene a un virus.
- **Umbral de transmisión.** Es el tiempo mínimo que requiere un vector para adquirir un virus y poder después inocularlo a plantas sanas.
- **Virulífero.** Condición del insecto cuando es capaz de transmitir un virus. Se dice también del vector que tiene el virus y es capaz de transmitirlo.

Existen dos criterios para clasificar las formas de transmisión por insectos. El primero se basa en el tiempo que el insecto permanece virulífero después de adquirir el virus, y el segundo, la ruta que sigue el virus dentro del insecto antes de ser inoculado.

De acuerdo con la ruta que siguen sus partículas en el cuerpo del vector, los virus transmitidos por insectos se dividen en:

- **Virus de estilete o no circulativos.** La transmisión no circulativa sólo se ha observado en áfidos, en el virus enanismo clorótico del maíz transmisible por chicharritas y posiblemente sea el caso del virus moteado leve del caupí transmisible por mosca blanca. En esta modalidad de transmisión, las partículas virales responsables de la infección no pasan al tracto digestivo ni a la hemolinfa del insecto, sino que sólo se adhieren en forma específica a ciertos sitios de la cutícula que reviste los estiletes, la faringe o el esófago. El insecto los adquiere después de alimentarse algunos segundos de una planta infectada, pudiéndolo transmitir pocos segundos después y perderlo después de la muda. Ejemplos: PVY (Virus Y de la papa), CMB (virus mosaico del pepino), y WMV (Virus mosaico de la sandía).
- **Virus circulativos no propagativos.** Son aquellos que ingeridos por el insecto recorren su cuerpo hasta llegar a las glándulas salivales, pero sin replicarse en sus tejidos. Ejemplos: Virus hoja enrollada del frijol, virus mosaico dorado del caupí, virus moteado del caupí y virus mosaico de la calabaza.
- **Virus circulativos propagativos.** Son aquellos que se replican en el cuerpo del insecto vector; es decir, en las cuales hay una mayor asociación virus-vector, existiendo algunos capaces de infectar células embrionarias de donde son transferidos transovariamente a su descendencia. Ejemplos: virus enanismo del arroz, enfermedad viral de Fiji y virus rayado del arroz.

Según el tiempo durante el cual el áfido permanece virulífero después de haber abandonado la fuente de inóculo, los virus se clasifican en tres grupos:

- **No persistentes.** Son aquellos que permanecen en el vector por un período menor a cuatro horas; estos virus los pierde el insecto con la muda. El grupo incluye a la mayoría de los virus de estilete.

Sus características son las siguientes: se transmiten mecánicamente; son adquiridos durante cortos períodos de alimentación (5 segundos); el umbral de transmisión es corto; la transmisión es rápida y por cortos períodos (períodos de alimentación e inoculación prolongados reducen la eficiencia de transmisión); el ayuno incrementa la capacidad del áfido para transmitir el virus; la especificidad del áfido vector es baja. Ejemplos: virus mosaico del caupí, virus mosaico del pepino, tobacco etch virus, virus mosaico de la sandía y cacao swollen shoot virus.

- **Semipersistentes.** Son aquellos que permanecen en el vector durante 10 a 100 horas. Tienen las siguientes características: la eficiencia de transmisión se incrementa cuando se aumenta el tiempo de adquisición, de 2 a 24 horas; no hay período latente; se transmiten mecánicamente con dificultad; la transmisión es más fácil cuando son adquiridos del floema; existe una mayor especificidad virus-vector; el período de retención es de uno a tres días; se encuentran en la hemolinfa del insecto; se pierden con la muda; el ayuno tiene poco efecto en la transmisión; el virus tiene algún sitio de retención en el cuerpo del vector. Ejemplos: virus mosaico amarillo del nabo, virus mosaico sureño del frijol, virus cascabelero del tabaco, virus amarillo de la remolacha, y virus tristeza de los cítricos.

- **Persistentes.** Son virus que permanecen por más de 100 horas en el vector; generalmente durante toda su vida. Sus características son las siguientes: no se transmiten mecánicamente; son adquiridos después de largos períodos de alimentación; se encuentran en el floema; la eficiencia de transmisión se incrementa con un mayor acceso a la fuente de inóculo; el virus puede ser retenido después de la muda. Ejemplos: virus de la hoja enrollada de la papa (PLRV); pea enation mosaic; virus marchitez manchada del tomate; virus enanismo amarillo de la cebada; virus amarillamiento del oeste de la remolacha; virus rizado de la remolacha.

Prueba de transmisión por áfidos.

Dada su alta eficiencia como vectores de virus, los áfidos son utilizados con frecuencia para transmitirlos de plantas enfermas a otras sanas.

El primer paso consiste en obtener una colonia de áfidos libres de virus. Para esto es conveniente conocer qué tipo de transmisión presentan los virus, con el fin de determinar si pueden o no permanecer en el áfido, después de que éste se retire de la fuente de infección, o si se pueden obtener ninfas recién nacidas (primer instar) para el inicio de la colonia.

Generalmente, los áfidos transfieren virus no persistentes o no circulativos, por lo que los problemas para obtener una colonia libre de virus se reduce a un mínimo cuidado en la sanidad de la planta hospedante y en el limpiado del estilete del áfido iniciador de la colonia, utilizando un hospedante temporal o una planta intermedia, antes de colocarlo en el hospedante final (Villanueva, 1990).

Se conocen pocos casos de transmisión transovárica en áfidos; entre ellos pueden citarse: virus del enrollamiento de la papa; virus del amarillamiento de la lechuga y virus de la venación amarilla del cardo (Harris, 1979). Con estos virus existe la necesidad de comprobar que la ninfa utilizada para iniciar la colonia no haya adquirido previamente algún virus que pueda transmitir a la planta hospedante, para iniciar la colonia con aquellos áfidos que estén libres (Swenson, 1967).

Para establecer una colonia de *Myzus persicae* libre de virus, se requiere de plántulas sanas de chile (*Capsicum annum*) o col china (*Brassica pekinensis*), un pincel, una caja Petri, papel filtro y jaulas de vaso.

Procedimiento para la transmisión:

- Colocar en una caja Petri con papel filtro húmedo, una hoja de chile o col.
- Transferir varios pulgones (*M. persicae*) ápteros, traídos del campo, cuidando de no dañarlos.
- Transferir un día después las ninfas recién nacidas a una planta sana de chile.
- Colocar la jaula de vaso sobre la maceta que contiene la planta sana de chile.
- Incluir un testigo en las mismas condiciones, pero sin infestar con pulgones.

- Permitir la reproducción de los áfidos, una vez que se establezca la colonia libre de virus, lo cual será indicado porque la planta de chile permanecerá sana.
- Una vez que se tiene la colonia de áfidos libres de virus, transferir algunos a un papel filtro húmedo dentro de una caja Petri; cerrar la caja y mantenerla durante una hora en un lugar fresco y seco (ayuno).
- Colocar una hoja de la planta infectada con el virus que se pretende transmitir, en otra caja Petri, y transferir los áfidos de la colonia no virulífera a ella.
- Asegurarse que los áfidos se alimenten de la hoja.
- Permitir la alimentación de los áfidos durante 20 minutos en el caso de los virus no persistentes, o de 24 a 48 horas para los persistentes. Para prevenir el desecamiento de la hoja, que normalmente ocurre en 24 horas, colocar un algodón humedecido en la base del peciolo.
- Transferir por lo menos cinco áfidos a cada planta de prueba, una vez cumplido el período de alimentación.
- Cubrir la planta con una jaula de plástico, y en el caso de los virus no persistentes dejar que se alimenten durante 15 minutos y durante 24 a 48 horas en el caso de los persistentes.
- Matar los áfidos con insecticida y colocar las plantas así tratadas en el invernadero para observar si hubo transmisión del virus, en cuyo caso aparecerán los síntomas.
- Utilizar un testigo apropiado para distinguir los síntomas virales de los provocados por otros factores.
- Se debe alimentar a un grupo de áfidos en plantas sanas y transferirlos a plantas indicadoras, para asegurarse que la colonia de insectos está libre de virus.

Transmisión por otros organismos

Como ya se mencionó, además de los insectos, existen otros grupos de organismos capaces de transmitir virus, como son los ácaros, nematodos y hongos.

Dentro del orden Acarina, varias especies de las familias Tetranychidae y Eriophidae son transmisoras de virus. Ejemplos: virus Y de la papa; mosaico estriado del trigo y virus mosaico del durazno; además, se sospecha que ambos tipos de ácaros transmiten otros virus (Pinto, 1991).

Los nematodos para alimentarse de las raíces de las plantas, insertan su estilete de manera semejante a como lo hacen los insectos chupadores; así, transmiten activamente a ciertos virus en las células de vegetales susceptibles; aproximadamente 14 virus son transmitidos por nematodos.

Los nematodos vectores de virus pertenecen al Orden Dorylaimida y los géneros más importantes son: *Xiphinema*, *Longidorus*, *Trichodorus* y *Paratrichodorus*. Estos nematodos son vectores de virus poliédricos, como los que producen las enfermedades: virus abanico de la vid, mancha anular del tabaco, mancha anular del tomate, mancha anular de la frambuesa y anillo negro del tomate. *Trichodorus ssp* transmiten algunos virus en forma de varilla como el virus jaspeado del tabaco y el virus empardecimiento temprano del chícharo.

Los virus que persisten en el suelo por largos períodos pueden ser transmitidos de una planta a otra por hongos. Dos órdenes de hongos, los Chitridiales y los Plasmodiophorales, adquieren el virus de las plantas infectadas. Cuando estos hongos habitantes del suelo producen zoosporas y éstas se encuentran infectadas, pueden transmitir el virus a otras plantas.

En condiciones adversas, los hongos producen esporas de reposo altamente resistentes que pueden contener al virus, lo que explica su persistencia en suelo por meses o años.

El género *Olpidium* transmite cuatro virus fitopatógenos que son: necrosis del tabaco, necrosis del pepino, nevadura gigante de la lechuga y enanismo del tabaco. Los géneros *Synchytrium*, *Polymyxa*, *Spongospora* y *Pythium* transmiten a: virus X de la papa, virus mosaico del trigo, virus del enanismo de los tallos de la papa, virus de la nevadura amarilla necrótica de la remolacha y virus del falso enrollamiento foliar del chícharo.

Los hongos muestran gran especificidad de transmisión, ya que, por ejemplo, *Olpidium brassicae* transmite al virus necrosis del tabaco, pero no al virus de la necrosis del pepino; mientras que *O. cucurbitacearum* transmite al virus de la necrosis del pepino, pero no al virus necrosis del tabaco.

d . IDENTIFICACION DE UN VIRUS

Se han desarrollado algunas metodologías para identificar a un virus involucrado en una enfermedad determinada. Las técnicas más utilizadas son: plantas diferenciales, observación de inclusiones en las células afectadas, microscopia electrónica de transmisión y métodos inmunológicos.

1. USO DE PLANTAS DIFERENCIALES

El desarrollo de técnicas de inoculación frotando hojas con savia que contiene partículas de virus, y el descubrimiento de la reacción de hipersensibilidad, expresada como lesiones locales, que exhiben ciertas especies vegetales (plantas diferenciales) al ser inoculadas por este método, han facilitado el estudio de los virus fitopatógenos y son útiles en la identificación de los virus que causan enfermedades en los vegetales; afortunadamente con la gran mayoría de los virus fitopatógenos conocidos a la fecha puede utilizarse este método.

Las plantas indicadoras comúnmente usadas son: *Gomphrena globosa*, *Nicotiana tabacum* v. *xanthi*, *N. tabacum* v. *hicks*, *N. sylvestris*, *N. glutinosa*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. quinoa*, *Capsicum annuum*, *Lycopersicon esculentum*, *Physalis floridana* y *Cucumis melo*.

La elección de las plantas diferenciales a utilizar dependerá del grupo al que pertenezca el virus, o del virus en particular, por lo que debe consultarse la bibliografía específica (CMI/AAB, 1970; Kurstak, 1981; Hill, 1984).

Para la inoculación de un virus frotando la savia, se usan los siguientes materiales:

- Mortero y pilón esterilizados
- Plantas indicadoras
- Carborundum de 600 mallas
- Hisopos de algodón esterilizados
- Material vegetal que va a ser probado (hojas jóvenes, pétalos, tubérculos, raíces u otras partes infectadas por el virus)
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 8.0
- Atomizador con agua destilada.

El amortiguador de fosfatos se prepara de la siguiente forma:

Solución A: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27.60 g/l
Solución B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	53.65 g/l
o	
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	71.64 g/l

Mezclar perfectamente 2.65 ml de solución A y 47.35 de la B; después aforar a 100 ml con agua destilada.

El procedimiento es como sigue:

- Lavarse las manos con agua y jabón.
- Etiquetar las plantas indicadoras anotando el grupo al que pertenece el virus inoculado (en caso de que se conozca), la fecha de inoculación y cualquier otra información pertinente.
- Moler en el mortero un pedazo de hoja infectada, añadiendo 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos para extraer la savia.
- Esparcir en tres hojas de cada una de las plantas indicadoras y en las testigo, carborundum de 600 mallas, y frotarlas con un hisopo humedecido en la savia con virus.
- Hacer, mínimo, tres repeticiones y dejar como testigo hojas frotadas con solución amortiguadora únicamente.
- Después de la frotación, lavar con el agua del atomizador las hojas inoculadas.
- Anotar los síntomas observados y el tiempo de aparición de los mismos, que pueden ser: lesiones locales necróticas, lesiones locales cloróticas, mosaicos, manchas anulares, moteados, necrosis, enchinamientos, etc.

2. OBSERVACION DE INCLUSIONES VIRALES

Las inclusiones virales se forman en las células de las plantas, como resultado de las infecciones producidas por los virus; se ha demostrado que 369 de los virus fitopatógenos conocidos forman inclusiones que pueden utilizarse en el diagnóstico de las enfermedades causadas por ellos. Además, con las inclusiones se puede determinar si una infección es producida por más de un virus (Cárdenas y Galindo, 1980; Stevens, 1983; Cárdenas, 1986; Pinto, 1993).

Por su localización dentro de las células y por su forma, las inclusiones virales pueden ser: nucleares y/o citoplasmáticas, y éstas últimas a su vez, pueden ser:

Amorfas:

Granulosas

Fibrosas

Vacuoladas

Bandeadas
Laminadas
Cuerpos densos
Irregulares
Otros tipos

Cristalinas:

Hexagonales
Piramidales
Rectangulares
En huso
Isométricas
Paracristalinas
Otros tipos

En una misma planta los virus pueden formar inclusiones en el núcleo o en el citoplasma o en ambos y pueden ser amorfas o cristalinas, o presentarse los dos tipos a la vez.

- Inclusiones Amorfas

Granulosas. Son de forma redondeada u ovalada con la apariencia de pequeños gránulos, de tamaño variable según el tiempo de infección que tenga la planta.

Fibrosas. Son alargadas y a veces se agrupan en un mismo punto.

Vacuoladas. Son de forma redondeada, con límites bien definidos por una membrana y con áreas claras en el interior.

Bandeadas. Se observan como cuerpos alargados con bandas a todo lo largo.

Laminadas. Forman cuerpos lineales en forma de láminas.

Cuerpos densos. Como su nombre lo indica, son cuerpos densos, redondos, de tamaño variable.

Irregulares. Son inclusiones de forma y tamaño variables.

Inclusiones Cristalinas

Cristalinas. Estas inclusiones tienen todas las propiedades de un cristal y sus formas pueden ser hexagonales, piramidales, rectangulares, de huso, isométricas, etc. Las paracristalinas son inclusiones cristalinas en forma de agujas alargadas.

La determinación de la presencia de inclusiones virales dentro de las células vegetales, frecuentemente se hace observando tiras de epidermis de hojas con síntomas; en este tejido se localizan las inclusiones inducidas por la mayoría de los virus transmisibles mediante frotado de savia.

Cuando la transmisión por frotado de savia no es posible o se logra esporádicamente, o cuando las inclusiones están posiblemente localizadas en el mesófilo, parénquima del floema o conductos vasculares, se recomienda para el diagnóstico localizar estos tejidos, eliminando en un sitio de la hoja una de las capas epidérmicas. Esto se logra tallando suavemente con una "lija de agua" de 400-600 mallas.

Cuando es difícil eliminar la epidermis, se puede lijar del haz al envés, trabajando sobre la epidermis abaxial. Cuando las inclusiones se forman en otro tejido, entonces se deben hacer cortes de las hojas u otros órganos de la planta, ya que las inclusiones pueden encontrarse en tallo, raíz, flor o fruto.

La técnica para la observación de las inclusiones se basa en el uso de colorantes que se presentan en el **Ápndice**

El procedimiento es como sigue:

- Desprender la epidermis, o lijar del haz al envés cuando la epidermis no se pueda desprender, o cuando los virus estén localizados en el floema.
- Colocar las tiras de epidermis durante 15 minutos, en una gota de azul de bromofenol y transferirla después a otra de rodamina-verde de metilo.
- Enjuagar con agua corriente las muestras coloreadas con azul de bromofenol, y con agua destilada las teñidas con rodamina-verde de metilo.
- Observar en el microscopio compuesto a un aumento de 1000X.

El verde de metilo colorea de azul al núcleo (ADN), mientras que la rodamina tiñe de rosa las inclusiones (ARN) y el bromofenol las tiñe de azul. Se recomienda usar la rodamina-verde de metilo cuando se tiene poca experiencia, porque proporciona un mejor contraste, pudiendo distinguirse con mayor facilidad las inclusiones granulosas de virus que se forman dentro del núcleo.

Para la identificación de virus con base en las inclusiones observadas, se recomienda consultar a Cárdenas (1986) y Christie y Edwards (1987).

3. TINCIÓN NEGATIVA PARA OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

Los virus son altamente transparentes a los electrones, por lo que para observarlos directamente en el microscopio, deberán colocarse sobre una película de material denso para los electrones.

Para que la tinción de partículas virales sea efectiva, se recomienda usar ácido fosfotúngstico a 1% en agua destilada, con pH de 6.9, para virus de varilla, y acetato de uranilo a 2% en agua destilada, para virus poliédricos.

Para examinar virus extraídos de savia infectada, parcialmente purificados o purificados, es necesario colocar las preparaciones sobre un soporte rígido, como una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro y de 60-160 mallas/cm (comúnmente usada en microscopía electrónica de transmisión).

El procedimiento es como sigue:

- Preparar con anticipación las rejillas, cubriéndolas con una película de Fomvar al 0.25% en agua destilada.
- Macerar por separado pedazos de hojas infectadas con virus, en una gota de ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo.
- Humedecer las rejillas ya preparadas, con el macerado.
- Colocar las rejillas dentro de una caja Petri con papel filtro, procurando que la cara cubierta con Fomvar no haga contacto con el papel.
- Observar al microscopio electrónico de transmisión las características de las partículas del virus.

4. PRUEBAS SEROLOGICAS

Las pruebas serológicas pueden ser decisivas en la identificación de un virus desconocido, e importantes para estudiar la relación entre variantes de un mismo virus o entre virus relacionados. Tales pruebas se basan en la capacidad de unión que los anticuerpos individuales tienen para sus antígenos específicos (Pinto, 1993).

- Doble difusión en agar

La prueba de doble difusión en gel (con frecuencia referida como prueba de Ouchterlony) es una de las más empleadas por los virólogos, y permite darse cuenta del tamaño de la partícula viral, de su homogeneidad y de la pureza de las partículas, así como de la relación serológica que existe con los antígenos.

El desarrollo de la técnica es como sigue:

- Calentar 24 ml de solución salina a 0.85% más 0.2 g de agar purificado (agar iónico), hasta que éste último se disuelva.
- Agregar 1 ml de azida de Na a 0.5% (para evitar la contaminación por microorganismos) cuando la temperatura baje de 60°C.
- Verter aproximadamente 20 ml del agar disuelto en la solución salina, en una caja Petri de fondo plano y poner el resto en Baño María para evitar que se solidifique.
- Hacer orificios de 7 mm de diámetro en el agar solidificado de la caja Petri, cuya separación sea también de 7 mm.
- Con una gota pequeña del agar mantenido líquido en Baño María, cubrir el fondo de cada perforación.
- Depositar en las perforaciones el antisuero y las savias a probar, distribuyéndolas de acuerdo con la finalidad del estudio. Debe incluirse savia de tejido sano en la prueba, como testigo.
- Colocar las cajas en una charola y meterlas en una bolsa de polietileno.
- Anotar los resultados a las 24 o 72 horas, considerando la respuesta como positiva o negativa, dependiendo de la reacción antigénica.

En esta prueba se hacen difundir los antígenos y los anticuerpos, que al unirse reaccionan en la capa de agar; la reacción serológica se presenta como líneas de precipitación en el agar.

Si la línea de reacción está cerca de donde se puso la savia, la partícula viral es grande, pero si está alejada, entonces es pequeña. Por otra parte, con las partículas poliédricas se observa que los precipitados que forman la línea de reacción son finos, y con los de partícula de varilla, son gruesos. Estas son sólo algunas de las bondades de la técnica.

Las técnicas de inmunodifusión utilizadas con más frecuencia, fueron actualizadas por Ouchterlony (1968), Crowle (1973) y Ouchterlony y Nilson (1978).

Prueba de látex

La prueba de látex es una modificación de la técnica anterior y se basa en la formación de un precipitado visible entre un antígeno (virus) y su anticuerpo específico, adsorbido en las esferas de poliestireno de 810 nanómetros de diámetro que forman el látex.

Mediante un proceso denominado **sensibilización del látex**, las esferas de poliestireno son recubiertas con los anticuerpos, después de lo cual se mezclan en una caja Petri con la savia previamente extraída de hojas, o con virus purificado.

La agregación, al igual que la microprecipitación, tiene lugar si el antígeno se encuentra presente en las muestras. En este caso, como las esferas de látex son mucho más grandes que los anticuerpos, la reacción se puede observar a simple vista cuando la placa Petri es colocada sobre un fondo negro.

La técnica completa se describe a continuación:

Los materiales requeridos son:

- Bolsas de plástico (10 x 15 cm)
- Tubos de ensayo (10 x 75 mm)
- Placas Petri de plástico
- Jeringas hipodérmicas de 1 ml
- Látex sensibilizado para cada virus
- Agua destilada
- Solución amortiguadora Tris HCl 0.05 M de pH 8, que contenga 0.01 M de bisulfito de sodio y 0.05 % de Tween-20.

Procedimiento:

- Con una regla y un lápiz de cera, trazar líneas paralelas separadas 0.8 cm, en la parte interior de la caja Petri. Después trazar líneas perpendiculares para formar cuadros.
- Colectar hojas a diferentes alturas de la planta que va a ser examinada, manejándolas con una bolsa de plástico para evitar el contacto con las manos.
- Incluir en la prueba dos testigos: uno negativo (savia de hojas de una planta sana) y uno positivo (savia de hojas de una planta previamente infectada artificialmente con el virus que se desea identificar). Si no se tienen testigos de la planta de interés, es posible utilizar hojas sanas e infectadas, respectivamente, de otro hospedero o planta indicadora.
- Extraer el jugo de la muestra con un extractor automático, o en la bolsa de plástico, agregándole 0.3 cm³ de solución amortiguadora Tris HCl. Con un rodillo u otro objeto cilíndrico presionar fuertemente la bolsa de plástico varias veces sobre una mesa, de modo que se expriman las hojas.
- Colectar el jugo en un tubo de ensayo y dejarlo en reposo por dos horas, de preferencia a 4°C.
- Poner 0.45 ml de la solución amortiguadora Tris HCl en dos tubos de prueba para preparar las diluciones 1/10 (primer tubo) y 1/100 (segundo tubo).

Preparación de las diluciones de savia

- Transferir al primer tubo, con una jeringa hipodérmica, 0.05 ml de jugo, del nivel superior del tubo en que se colectó, evitando el sedimento.
- Mezclar bien, extrayendo el jugo con la jeringa y expeliéndolo de nuevo en el tubo de ensayo. Esta es la dilución 1/10. Otra forma de prepararlo es mezclando nueve gotas de la solución amortiguadora Tris-HCl con una gota de jugo.
- Transferir 0.05 ml de la dilución 1/10 al segundo tubo y mezclar como en el caso anterior. Esta es la dilución 1/100. También puede prepararla mezclando nueve gotas de solución amortiguadora Tris HCl con una gota de la dilución 1/10. Es necesario hacer estas dos diluciones, porque las reacciones no son visibles cuando el virus está muy concentrado.
- Con la jeringa en posición vertical dejar caer una gota de látex sensibilizado en cada cuadro del fondo de la placa Petri.
- Preparar tantos cuadros como sean necesarios, para tener dos repeticiones por muestra.
- Preparar cuatro cuadros adicionales para los testigos (negativo y positivo).
- Colocar las muestras en la placa Petri, siguiendo un plan predeterminado, de modo que se puedan distinguir fácilmente las muestras de los testigos.

- Colocar, con otra jeringa, una gota de la dilución 1/100 sobre una gota de látex. Luego, con la misma jeringa, colocar una gota de la dilución 1/10 encima de otra gota de látex.
- Enjuagar la jeringa tres o cuatro veces con agua destilada, antes de utilizarla con la muestra siguiente.
- Aplicar el mismo procedimiento para cada muestra y llevar un registro del plan que se ha seguido.
- Si no se dispone de un agitador, colocar las placas Petri sobre un cartón y rotarlas manualmente sobre una mesa.
- Abrir la placa Petri y observar las reacciones sobre un fondo oscuro. Si la reacción es positiva, se observa una agregación de partículas de látex; pero si la reacción es negativa, el látex permanecerá con un aspecto lechoso.

Inmunoabsorbancia con enzimas conjugadas

ELISA

ELISA es un acrónimo de "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay". Esta prueba ha demostrado ser precisa, sensitiva y más rápida que otras técnicas serológicas convencionales, para detectar virus de plantas, además de utilizar pequeñas cantidades de antisuero (Pinto, 1993).

El principio de ELISA está basado en que el virus de la muestra es atrapado e inmovilizado selectivamente por anticuerpos específicos (gamma-globulina), adsorbidos en una superficie sólida. Después, las partículas atrapadas se hacen reaccionar con otros anticuerpos a los que se les ha unido una enzima, formando así un complejo de fracciones que son estables aun después de lavar. Al adicionar a la enzima un sustrato adecuado, éste se hidroliza y se induce un cambio de color en la solución; esto permite detectar la reacción visualmente o con la ayuda de un espectrofotómetro. La intensidad del cambio de color, provocado por la reacción, es proporcional a la concentración del virus.

Puesto que una pequeña cantidad de enzima puede hidrolizar una cantidad mayor de sustrato, la reacción se ve así amplificada, lo que aumenta la sensibilidad de la técnica. Cabe aclarar que los resultados que se obtienen, dependen en gran parte del conocimiento y la habilidad del técnico que realice la prueba; también conviene mencionar que la alta sensibilidad de esta técnica incrementa la probabilidad de obtener resultados erróneos, por lo que el técnico debe conocer a fondo cada una de las etapas del proceso.

La obtención de la gamma globulina, la conjugación con la enzima y las soluciones amortiguadoras necesarias para la prueba, se citan en el Apéndice.

A continuación se describe la metodología de la prueba de ELISA.

Materiales:

Reactivos - PBS (pH de 7.4), PBST, Solam de cubrimiento, Solam de extracción, Solam del conjugado, Solam sustrato y Solam tris.

Sustrato - Tabletetas Sigma N° 104-105 (5 mg/tableta).

Enzimas - Fosfatasa alcalina (Sigma alkaline phosphatase type VII) (p 450.2).

Placas - Cooke microelisa substrate plates c1223-24, de fondo plano. (Dynatech Labs. Inc. 900 Slaters Lane. Alexandria, VA. 22314 U.S.A.).

Procedimiento:

Sensibilización de la placa (anticuerpo)

Esta etapa consiste en cubrir los pozos de la placa de microtitulación con un anticuerpo (gamma globulina purificada) específico para cada virus, el cual es adsorbido por la superficie.

Para lograr lo anterior, se agrega a cada pozos de la placa 100 µl de gamma globulina purificada (anticuerpo) en Solam de cubrimiento (Apéndice). Se deja incubar la placa por 4-6 h a 37°C, o durante toda la noche a 6°C, para que las moléculas de gamma globulina se adhieran a las paredes del pozo. Las placas que no se usan en el momento deben ser cubiertas y selladas con polietileno adherible y almacenadas a 6°C; en éstas condiciones pueden ser usadas o utilizadas en un intervalo de ocho días.

La concentración da gamma globulina normalmente usada es de 1-2 µg/ml; sin embargo, la óptima debe determinarse previamente .

Para continuar, vaciar la placa y lavarla con PBST + Tween 20 usando una pizeta y esperar 3 minutos, después de lo cual se debe vaciar y sacudir fuertemente sobre una toalla de papel en una mesa; repetir esta operación tres veces para eliminar el exceso de gamma globulina, pero los anticuerpos quedarán adheridos a las paredes del pozo.

Cuando se realiza la técnica rutinariamente, las placas con gamma globulina pueden ser preparadas con anticipación y conservarse perfectamente a -20°C por períodos largos.

Colocación de las muestras (antígeno)

Las muestras por analizar pueden ser extraídas por diferentes métodos. Puede hacerse la maceración del tejido vegetal y utilizarse una solución amortiguadora (Solam de extracción) para obtener una dilución 1/10 a 1/20. Durante el procedimiento, el Solam y las muestras vegetales deben mantenerse frías, colocándolas en una charola con hielo.

Cuando se considera que los virus se encuentran en concentración baja en el tejido infectado, se puede utilizar menos solución amortiguadora para obtener una dilución más concentrada.

La manera más práctica de obtener la muestra, es macerar el tejido vegetal en bolsas pequeñas de plástico a las que se agrega PBS-Tween+2% PVP-40 recientemente preparado. El PBS-Tween+2% PVP-40 es la solución amortiguadora PBS-Tween a la que se le agrega 2% de polivinil pirrolidona PM 40 000.

Se maceran las muestras haciendo rodar con presión un tubo de ensayo o algo semejante sobre la bolsa de plástico. Se deben utilizar como testigos, tanto muestras de tejido sano como de tejido enfermo, procesadas de la misma manera.

En laboratorios muy bien equipados, la savia de las muestras se extrae con un aparato especialmente fabricado para tal fin. El jugo se recoge en un tubo de ensayo y se le agrega solución amortiguadora hasta lograr la dilución requerida.

Una vez logrado lo anterior, agregar 100 μl de savia de cada planta a probar, en dos pozos, utilizando una pipeta limpia para cada muestra. Incubar a 6°C toda la noche o a 37°C por 4-6 h.

Si la muestra contiene partículas del virus específico (antígeno) para los anticuerpos con los cuales se insensibilizaron los pozos de la placa, quedarán adheridas a las paredes de éstos y no serán eliminadas en el proceso de lavado, que se hace como ya se explicó.

Adición del conjugado (enzima-gamma globulina)

Aunque otras enzimas pueden conjugarse con las moléculas del anticuerpo, la fosfatasa alcalina es la que ha dado los mejores resultados.

El conjugado (enzima-gamma globulina) se adquiere ya preparado y a la dilución conveniente, que puede ser de 1:400 a 1:1000. Esto es más práctico, debido a que el laboratorio que lo fabrica y distribuye (AGDIA Inc.) indica la manera de prepararlo y usarlo; además, se reduce la posibilidad de errores.

La adición del conjugado se hace en las siguientes etapas:

- Agregar en cada pozo, 100 µl del conjugado ya preparado.
- Incubar a 30°C por 3-6 h, para que el conjugado se adhiera al compuesto virus-anticuerpo pegado a las paredes del pozo y se forme un "sandwich" anticuerpo-virus-conjugado anticuerpo enzima.
- Lavar la placa tres veces como ya se describió, para eliminar el exceso de conjugado enzimático que no esté adherido a las partículas de virus.

Adición del sustrato enzimático.

- Agregar 150 ó 200 µl, dependiendo del tipo de pozos de la placa que se va a usar.
- Incubar a temperatura de laboratorio por 30 a 60 min. hasta que se observe un color amarillo en algunos pozos.
- Detener la reacción agregando 50 µl de NaOH 3M a cada pozo.

En esta etapa solamente reaccionarán los pozos que contienen la enzima.

Evaluación de resultados

La intensidad del color amarillo es un indicador de la cantidad de partículas de virus presentes en la muestra; cuanto más intenso es el color, mayor es la concentración del virus.

Las lecturas pueden realizarse por observación visual o midiendo la absorbancia con ayuda del fotómetro o colorímetro.

Los resultados se pueden registrar en una hoja, o fotográficamente.

Reutilización de las placas

Para volver a usar las placas, debe procederse como sigue:

- Lavarlas dos veces con PBST y sacudirlas hasta que sequen.
- Inundarlas con glicina-HCl 0.2M de pH 2.3.
- Incubar 60 min a temperatura ambiente.
- Sacudir las placas y lavarlas tres veces con PBST.
- Utilizar las placas con nuevas muestras.

Reutilización del conjugado

Para reducir los costos de la técnica de ELISA, se puede volver a usar el conjugado. Para esto debe hacerse lo siguiente:

- Aspirar el conjugado de cada pozo, al final de la incubación.
- Volver a usarlo tal cual o concentrarlo a su actividad original (cuando el número de muestras que dan reacción positiva es bajo, el conjugado conserva cerca de 2/3 de su actividad).

Problemas comunes con ELISA, su posible origen y solución

No hay coloración al final de la prueba.

Esto puede deberse a que:

Se omitió algún paso durante el proceso.

No se usaron las soluciones Solam correctas en cada paso.

La enzima y/o el suero no estaban activos.

Recomendaciones:

Usar testigos positivos confiables en cada placa.

Probar previamente el conjugado en el sustrato.

Verificar la gama globulina purificada, con antígenos específicos a las gamma globulinas.

Coloración no específica.

Puede presentarse en los pozos de la periferia de la placa, cuando se utilizan en la prueba; además, pueden dar reacciones espontáneas erróneas, particularmente en las esquinas de la placa.

Recomendación:

No utilizar los pozos de la periferia de la placa, sino llenarlos únicamente con Solam.

Se pueden presentar también en toda la placa, cuando:

El antisuero contiene anticuerpos para antígenos normalmente presentes en la planta.

El lavado fue incompleto.

El sustrato estaba viejo.

Hubo errores en la secuencia de llenado de los pozos.

Recomendaciones:

Usar testigos negativos confiables en cada placa.

Usar sustrato fresco y verificar cambios espontáneos de color.

Cubrir las placas con polietileno delgado adherible.

Algunos pozos dan reacción inconsistente o inesperada.

Puede deberse a:

Lavado incompleto

Error en la aplicación de antígenos

Contaminación o salpicado entre pozos.

Recomendaciones:

Hacer un lavado extra.

Manipular las placas con sus cubiertas puestas.
Predeterminar el orden de llenado antes de llenar los pozos.
Secar con toalla la cara superior de la placa, después de enjuagar.
Coloración muy rápida o color en algunos testigos.

Cuando se presentan estas anomalías, pueden deberse a:

Concentración muy alta del conjugado.
Concentración muy alta del sustrato.

Recomendaciones:

Usar concentraciones adecuadas del conjugado y/o sustrato.

DAS-ELISA

La prueba DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich) ha alcanzado gran difusión como método rutinario para la detección de virus en papa. En esta prueba serológica se emplean complejos enzima-anticuerpo, a los que se les denomina conjugados enzimáticos. Las enzimas empleadas en DAS-ELISA tienen que producir algún tipo de reacción coloreada que permita una evaluación de manera sencilla; actualmente la fosfatasa alcalina es la más empleada. Aunque DAS-ELISA es un método rápido y eficiente, muchos países no pueden hacer uso rutinario de la técnica, debido al alto costo por muestra, que en gran parte se debe a la enzima y al sustrato enzimático empleado, que es el p-nitrofenil fosfato.

DAS-ELISA es una técnica serológica de gran sensibilidad para la identificación de virus fitopatógenos. Las ventajas de esta técnica son las siguientes:

- Mayor sensibilidad que otros métodos para detectar a la mayoría de los virus, incluyendo al PLRV (virus enrollamiento de la hoja de la papa) y PVA (virus A de la papa) que normalmente se encuentran en baja concentración en la savia de plantas infectadas.
- Requiere menos antisuero, lo que significa bajar sus costos.
- Es el único método que detecta eficientemente al PLRV en tubérculos o follaje de papa.
- Es una técnica fácilmente adaptable a programas de mejoramiento de variedades, además de ofrecer resultados rápidos y confiables con la mayoría de los virus.

Las desventajas principales son:

- El gran número de etapas necesarias para completar la prueba.
- El elevado costo del equipo.
- Los altos costos de los reactivos utilizados.

Esta técnica es otra variante de ELISA; mayores detalles sobre ella, pueden ser consultados en Clark y Adams (1977).

Procedimiento

Sensibilización de la placa.

Los anticuerpos (gamma-globulina) específicos para cada virus, son adsorbidos a la superficie de cada pozo de la placa de microtitulación. Para lograrlo, es necesario realizar la siguiente rutina:

- Preparar la solución amortiguadora de adsorción, que consiste en disolver 1.59 g de Na_2CO_3 más 2.93 g de NaHCO_3 , luego agregar agua destilada hasta completar un litro; en seguida disolver 0.2 g de NaN_3 . Esta solución se puede almacenar en el refrigerador hasta por un mes a 4°C.
- Diluir la gamma globulina purificada (anticuerpo) en ésta solución amortiguadora. Para determinar la dilución mas adecuada, referirse al capítulo de purificación y conjugación de antisueros.
- Agregar 200 μl de la gamma globulina purificada y diluida, a cada pozo de la placa de microtitulación.
- Incubar la placa por 2 a 4 horas a 37°C. Se recomienda no utilizar los pozos periféricos porque se ha observado que producen reacciones no específicas, razón por la cual sólo deben ser llenados con la solución amortiguadora. Este proceso permite a las moléculas de la gamma globulina adherirse a la superficie interna de los pozos.
- Al término del período de incubación, la placa se vacía y se lava con PBS-Tween, cuya composición es la siguiente: 8.0 g de NaCl , 0.2 g de KH_2PO_4 , 2.9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de KCl , 0.2 g de NaH_2PO_4 , y 0.5 ml de Tween 20, aforado después a un litro con agua destilada.

- Llenar los pozos con PBS-Tween y dejar reposar durante tres minutos, pasado este tiempo vaciar la placa nuevamente, repitiendo el lavado tres veces para eliminar la gamma globulina exedente. Si son muchas muestras a procesar, las placas pueden prepararse con anticipación, cubrirse con polietileno adherible y almacenarse por largos períodos, a -20°C.

Preparación de las muestras para su análisis (antígeno).

La forma más práctica es macerar los tejidos vegetales en bolsas de plástico. Comúnmente se usa solución amortiguadora para obtener una dilución del macerado, de 1/10 a 1/20. Cuando los virus se encuentran en una baja concentración en los tejidos infectados, es recomendable usar menos solución para así tener una dilución más concentrada.

Agregar en la bolsa de macerado PBS-Tween + 2% PVP-40 recién preparado, lo que facilita la maceración de la muestra. El PBS-Tween-PVP es la solución amortiguadora PBS-Tween a la que se agrega 2% de polivinil pirrolidona PM 40 000.

Las muestras se maceran haciendo rodar un tubo de ensayo o algún otro artefacto semejante sobre la bolsa de plástico. Siempre se deben usar muestras sanas (testigos) y enfermas, procesándolas de la misma forma. El jugo se vacía en un tubo de ensayo, de donde se toma la cantidad necesaria para preparar la dilución requerida. Cada pozo de la placa se llena con 200 μ l (0.2 ml) de muestra diluida. Para cada muestra se debe usar siempre una pipeta Pasteur limpia. No se debe olvidar que los pozos periféricos pueden mostrar reacciones no específicas, por lo que no es recomendable usarlos. Las muestras se disponen en la placa según un plan previamente trazado. De este modo, tanto las muestras como los testigos pueden ser fácilmente identificados.

Una vez colocados los antígenos, se incuba la placa a 4°C durante 18 horas (o toda la noche), o a 37°C durante 4 a 6 horas. Pasado este tiempo se lava la placa como ya se describió. Repetir el lavado tres veces o hasta que la placa quede completamente transparente, sin jugo o tejidos vegetales.

Las partículas de virus (antígeno) del jugo de los tejidos vegetales, se conjugan con los anticuerpos con los cuales se sensibilizó la placa.

Adición del conjugado (enzima-gamma globulina)

También en esta técnica otras enzimas pueden ser conjugadas con las moléculas del anticuerpo, pero la fosfatasa alcalina da mejores resultados. La adición del conjugado se hace como sigue:

- Diluir el conjugado enzimático en PBS-Tween con 2% de PVP-40 y 0.2% de albúmina de huevo o leche en polvo; para determinar la dilución más adecuada, referirse al capítulo de purificación y conjugación de antisueros.
- Agregar a cada pozo de la placa 200 μ l (0.2 ml) del conjugado enzima gamma globulina diluido. Los pozos de la periferia deben ser llenados únicamente con solución amortiguadora.
- Incubar a 37°C por 3 a 6 horas.
- Lavar tres veces la placa como ya se describió; para que el conjugado enzimático que no esté adherido a las partículas del virus sea eliminado durante este proceso.

La conjugación del anticuerpo (gamma globulina) antígeno (virus del jugo de la planta infectada) y conjugado (enzima-gamma globulina), constituye el "sandwich" que le da el nombre de DAS- ELISA a esta técnica.

Adición del sustrato de la enzima (fosfatasa alcalina).

Antes de disolver el sustrato de la fosfatasa alcalina, que es el p-nitrofenilfosfato, es necesario preparar la siguiente solución amortiguadora: disolver 97 ml de dietanolamina en 800 ml de agua destilada; regular el pH a 9.8 con HCl (37%); seguidamente agregar 0.2 g de NaN_3 ; aforar con agua destilada a un litro.

Es importante aclarar que esta solución debe ser preparada en el momento de ser utilizada, ya que no puede ser almacenada.

Disolver el sustrato en la solución amortiguadora hasta alcanzar una concentración de 0.6 o 0.8 mg/ml. El sustrato puede conseguirse en polvo o en pastillas de concentración conocida. Esta última forma es la más conveniente, ya que evita tener que pesar el sustrato cada vez que se necesite. Luego se agregan 200 μ l (0.2 ml) a cada pozo de la placa; por

último, incubar la placa a temperatura ambiente por el tiempo necesario (aproximadamente 30 a 60 min) para observar la reacción.

En esta etapa de la técnica sólo habrá reacción en los pozos de la placa, en los cuales se hayan formado los "sandwichs".

La solución del sustrato que contienen los pozos que fueron llenados con muestras de plantas enfermas adquiere un color amarillo. La intensidad del color es un indicativo de la cantidad de virus presente en la muestra. Los pozos con las muestras testigo (sanas), así como el testigo con solución amortiguadora deben permanecer transparentes. Las lecturas pueden realizarse por el método visual (cualitativo) o con la ayuda de un fotómetro o colorímetro a una longitud de onda de 405 nm (cuantitativo).

PNC-DAS-ELISA

En el Centro Internacional de la Papa (CIP) se ha ensayado la prueba DAS-ELISA para la detección de virus en papa empleando otra enzima, la penicilinasas, de costo comparable al de la fosfatasa alcalina, pero que presenta la ventaja de emplear como sustrato el complejo iodo-almidón-penicilina, que es mucho más económico.

En sí, la prueba DAS-ELISA con penicilinasas, llamada PNC-DAS-ELISA, se basa en el método iodométrico, en el que se utiliza el complejo yodo-almidón como indicador de pH. Este complejo es bastante estable, de color azul, y se forma por el arreglo de los átomos de iodo entre la molécula de almidón, al estar en solución.

Cuando la penicilinasas actúa sobre la penicilina se produce el ácido penicilóico, que opera como reductor del yodo y lo torna totalmente incoloro.

La prueba con penicilinasas tiene una sensibilidad igual y en muchos casos superior a la obtenida con fosfatasa alcalina, al utilizarse con savia de plantas que contienen baja concentración de virus.

Aunque esta prueba sólo sirve para evaluaciones visuales, es una opción económicamente muy ventajosa para ser empleada como técnica rutinaria.

Procedimiento

Sensibilización de la placa.

- Preparar la solución amortiguadora de cobertura, disolviendo en agua destilada 1.59 g de NaCO_3 y 2.93 g de NaHCO_3 ; después aforar a un litro. Solamente si la solución va a ser almacenada, agregar 0.2 g de NaN_3 . Ajustar el pH a 9.6 con HCl 0.1 M o con NaOH 0.1M.
- Diluir la IgG de cobertura en la solución amortiguadora y mezclar bien (la IgG se puede diluir hasta 1/1000).
- Llenar los pozos de la placa con 150 μl de la solución de IgG y colocarla dentro de una bolsa de plástico, sellándola con cinta adhesiva.
- Incubar a temperatura ambiente durante cinco horas o a 37°C durante tres horas.
- Eliminar la solución de IgG de la placa, sacudiéndola y secándola sobre toallas de papel.

Bloqueo de la placa

- Preparar la solución de bloqueo disolviendo 2 % de leche en polvo o albúmina de huevo en solución amortiguadora fosfato salina (PBS) de pH 7.4, que se compone de: NaCl, 8.0 g; KH_2PO_4 , 0.2 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.9 g; y KCl, 0.2 g, disueltos en agua destilada hasta completar un litro. Luego agregar 0.05 % de Tween 20. Si la solución va a ser almacenada, agregar 0.2 g de NaN_3 .
- Llenar los pozos de la placa con 200 μl de solución de bloqueo y sellarla de la forma mencionada anteriormente.
- Incubar la placa durante una hora a 37°C.
- Lavar los hoyos de la placa con solución amortiguadora de lavado (PBS-Tween), tres veces durante tres minutos cada vez.

Preparación y colocación de las muestras

- Colectar las muestras en bolsas de plástico e identificarlas (esto puede hacerse uno o dos días antes, si es que es posible almacenarlas a 4°C). Deben incluirse testigos sanos (muestras que no tienen el virus) y positivos (muestras de plantas en las que previamente se inoculó el virus).

- Preparar la solución amortiguadora de maceración PBS-Tween con 2 % de polivinilpirrolidona (PVP-40) y 1% de leche en polvo o albúmina de huevo.
- Agregar la solución amortiguadora a las muestras, la cual puede diluirse en una proporción de 1:5 (peso de la muestra: volumen de amortiguador).
- Macerar las muestras con la ayuda de un tubo de ensayo o un rodillo de madera.
- Llenar los pozos de la placa con 150 μ l de savia, incluyendo los testigos (sanos y positivos), siguiendo un patrón preestablecido.
- Cubrir la placa e incubarla a 4°C o a temperatura ambiente durante toda la noche.
- Lavar la placa con PBS-Tween hasta eliminar por completo la savia de los pozos. Luego lavar tres veces más durante tres minutos cada vez.

Colocación del conjugado enzimático

- Preparar la solución amortiguadora de conjugado PBS- Tween 20 con 1 % de leche en polvo o albúmina de huevo.
- Diluir el conjugado enzimático en la solución amortiguadora.
- Llenar los pozos de la placa con 150 μ l de la dilución del conjugado enzimático.
- Cubrir la placa e incubarla a 37°C durante tres horas.
- Lavar las placas tres veces durante tres minutos cada vez.

Revelado de la placa

- Preparar una solución de almidón a 2 % en solución amortiguadora fosfato 0.2 M, ajustando el pH a 7.2 con HCl 0.5 M ó NaOH 0.5 M.
- Disolver el almidón calentándolo a fuego directo. Luego dejar enfriar agitando constantemente para evitar la formación de grumos.
- Tomar 5 ml de la solución de almidón y agregar 25 ml de solución amortiguadora fosfato 0.2 M de pH 7.2 y 100 μ l de la solución concentrada de yoduro (200 mg de yodo y 5.32 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua destilada). Ajustar el pH a 7.2. Esta solución es de color azul púrpura.
- Preparar este sustrato empezando una hora antes de que termine el período de incubación de la placa con el conjugado enzimático.
- Mientras se hace el último lavado del conjugado enzimático de la placa, agregar penicilina G a la solución de sustrato. Es importante asegurarse de que la solución esté completamente fría.

- Llenar los pozos de la placa con 150 μ l de la solución de sustrato y esperar la reacción, la cual normalmente comienza 10 minutos después de colocar el sustrato.
- La reacción es positiva cuando la solución en el pozo se torna total o parcialmente incolora, en comparación con el testigo sano que debe permanecer de color oscuro o púrpura.

NCM-ELISA

NCM-ELISA es una prueba inmunoenzimática en la que se utilizan membranas de nitrocelulosa como soporte para los reactivos.

Esta prueba es tan sensitiva como la DAS-ELISA, más fácil de realizar y tiene la ventaja de que las muestras al ser colocadas en una membrana de nitrocelulosa, pueden almacenarse durante varias semanas antes de continuar con el proceso, o enviarse por correo a otro laboratorio para terminar el diagnóstico; otra ventaja importante es que todas las etapas se realizan a temperatura ambiente.

La prueba consiste en aplicar una pequeña cantidad de muestra (2 a 30 μ l) en la membrana, señalando aquellas áreas donde no se coloca la muestra. Las partículas de virus reaccionan con anticuerpos específicos (IgG) para cada virus, y éstos son detectados, a su vez, por anti-anticuerpos conjugados a una enzima.

Esta enzima reacciona con su sustrato, dando una coloración púrpura cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración del virus presente en la muestra. La coloración es estable por largo tiempo y las membranas pueden ser fácilmente almacenadas o enviadas a otro laboratorio nacional o del extranjero.

Al igual que con la prueba DAS-ELISA, varios virus pueden ser detectados al mismo tiempo con esta técnica, utilizando una mezcla de anticuerpos específicos a los virus que se van a probar. Esto es muy útil cuando es necesario procesar una gran cantidad de muestras.

Procedimiento

Recolección de muestras y extracción de los jugos.

- Colectar las muestras en bolsas de plástico e identificarlas correctamente. La recolección debe hacerse el mismo día que se va a hacer la prueba.

- Preparar la solución de extracción de sabia (ver Apéndice).
- Cortar cinco discos de 1 cm de diámetro de cada hoja colectada, y ponerlos en una bolsa de plástico.
- Agregar 1 ml de solución de extracción y macerar el tejido completamente, utilizando un tubo de ensayo o un rodillo de madera. El macerado puede hacerse en una bolsa de plástico.
- Dejar reposar el macerado por 30 a 45 min a 4°C.

Aplicación de las muestras en la membrana de nitrocelulosa.

Es importante señalar que al manipular las membranas de nitrocelulosa es necesario utilizar guantes y pinzas. Las huellas digitales pueden interferir con las reacciones.

- Cortar las membranas de nitrocelulosa al tamaño deseado y marcarlas formando cuadros de 1 cm de lado. Para identificar las membranas, numerarlas en la esquina inferior derecha.
- Humedecer la membrana introduciéndola lentamente en TBS, evitando la formación de burbujas. Al mismo tiempo, humedecer dos papeles filtro tipo Whatman No. 1 o No. 4, de un tamaño mayor al de la membrana; dejarlos remojando de 5 a 10 minutos.
- Colocar dos hojas de papel filtro seco sobre la mesa perfectamente limpia y poner sobre éstos los dos papeles filtro húmedos y luego la membrana, evitando la formación de burbujas. Esperar hasta que el líquido de la superficie de la membrana se haya absorbido (1-2 minutos).
- Aplicar cuidadosamente una gota del jugo sobrenadante (sin tejido vegetal) de la muestra macerada de la bolsa, en el centro del cuadro de un centímetro cuadrado en la membrana de nitrocelulosa, utilizando un pipeta Pasteur limpia, teniendo cuidado de no tocar la membrana con la punta de la pipeta.
- Repetir el proceso hasta que todas las muestras hayan sido colocadas, utilizando una pipeta limpia para cada muestra.
- Identificar la posición de cada muestra en la membrana de nitrocelulosa, utilizando una hoja cuadriculada como guía.
- Transferir la membrana a un papel filtro seco y dejarla secar por 30 minutos a temperatura ambiente, o durante 15 minutos a 37°C.
- Cuando la membrana esté seca, se puede empacar entre dos papeles filtro secos y protegerla con cartón para enviarla, o para almacenarla hasta que se desee continuar la prueba.

Continuación del desarrollo de la técnica

- Agregar 25 ml de la solución de bloqueo a una placa Petri e introducir la membrana lentamente, evitando la formación de burbujas.
- Incubar durante 60 minutos, mientras se prepara la solución de anticuerpos específicos al virus (o la mezcla de anticuerpos, según sea el caso).
- Mezclar la dilución adecuada de IgG a 25 ml de solución de anticuerpos (solución de anticuerpo 1).
- Eliminar la solución bloqueadora y agregar la solución de anticuerpo 1.
- Tapar las placas y sellarlas con parafilm o cinta adhesiva para evitar la evaporación.
- Dejar incubar durante toda la noche.
- Eliminar la solución de anticuerpo 1 y lavar, en agitación, la membrana en 30 ml de T-TBS. Repetir el lavado tres veces durante tres minutos cada vez.
- Simultáneamente al lavado, se prepara la solución de anticuerpo 2 mezclando la dilución adecuada de conjugado enzimático IgG (anticuerpo 2) a 25 ml de solución amortiguadora de anticuerpo. Verter esta solución en una placa Petri limpia.
- Remover la membrana lavada y colocarla en la placa Petri con la solución de anticuerpo 2.
- Dejar incubar durante una hora.
- Descartar la solución de anticuerpo 2 y lavar nuevamente la membrana tres veces en T-TBS y una vez con Solam de sustrato, durante tres minutos cada vez.
- Simultáneamente preparar la solución de revelado en un frasco protegido de la luz, y vaciarla en una placa Petri limpia.
- Transferir la membrana lavada a la placa Petri con la solución de revelado, teniendo cuidado de que quede completamente inmersa en ella.
- Esperar de 15 a 30 minutos para observar la reacción.
- Transcurrido ese tiempo, detener la reacción descartando la solución de revelado y lavando la membrana con agua destilada dos veces, durante 10 minutos cada lavado.
- Secar la membrana sobre papel filtro y almacenarla después entre dos pedazos secos de papel filtro.

Todas las incubaciones y lavados se hacen a temperatura ambiente. Si se dispone de un agitador, las incubaciones se realizan con agitación suave a 50 rpm y los lavados a 100 rpm.

B. VIROIDES

Cuando se descubrieron los virus, los fitopatólogos pensaron que ya no existían patógenos más pequeños. Esto dio como resultado que en muchos estudios etiológicos, al no encontrar hongos, bacterias o nematodos, se le asignara a la enfermedad en estudio una naturaleza viral. Actualmente, nuevas tecnologías han permitido conocer la existencia de patógenos submicroscópicos como los viroides, virusoides, virus satélites y otras partículas infecciosas, en plantas.

En 1971 Diener aísla el agente etiológico de la enfermedad conocida como tubérculo fusiforme de la papa (ViTFP), al cual le asigna el nombre de viroide. Estos nuevos patógenos solamente se han encontrado parasitando plantas superiores, y no son solamente curiosidades científicas, sino causantes de enfermedades muy graves en diferentes plantas cultivadas de gran importancia económica.

Los viroides son los elementos patógenos autorreproducibles más pequeños, conocidos actualmente. En su forma circular (es decir, extendida) tienen una longitud aproximada de 100 nm y en la forma compactada de trenza unos 37 nm. Son simplemente moléculas de ácido ribonucleico monocatenario (cuya cadena está compuesta de 240-380 nucleótidos según del viroide de que se trate) no protegidas por una cápsida. El peso molecular de la mayoría de los viroides fluctúa alrededor de 120,000 daltons.

Los viroides se encuentran en las plantas enfermas en cantidades extremadamente pequeñas, usualmente se puede recuperar de 0.1 - 0.5 µg/g de tejido fresco; el aislamiento de viroides se basa en una eficiente técnica de extracción de ácido nucleico, seguida de un método para concentrar el RNA. Afortunadamente, muchos de los RNA de algunos viroides son muy estables a altas temperaturas y es viable por varios años cuando se almacena a temperatura ambiente o liofilizado. Estas características hacen posible realizar las etapas especiales en el fraccionamiento y concentración de viroides a partir de extractos vegetales (Singh, 1986).

En la actualidad se sabe que los virus y viroides son dos grupos de patógenos completamente diferentes y sin ningún indicio de tener relación filogenética cercana.

Se puede decir que los viroides son patógenos de regiones cálidas, sus hospedantes son plantas tropicales o subtropicales, con excepción de la papa que es un cultivo de clima templado a frío. Este caso anormal parece ser consecuencia de la actividad del hombre y no de la naturaleza.

Los viroides han sido aislados de veinte plantas de importancia en agricultura, en diferentes partes del mundo. Muchas de las referencias sobre la presencia de los viroides se basan sobre los síntomas causados por el patógeno. La infección puede ser de 100% en plantas ornamentales y otros cultivos que son multiplicados asexualmente; esto, aunado a la frecuente ausencia de síntomas en plantas infectadas, favorece la perpetuidad de los viroides (Singh y Singh, 1994)

Para mayor información sobre este grupo de parásitos moleculares, se recomienda consultar a Dienner (1979, 1981), Semancik (1979), Sanger (1982), Maramoroch y Mokevvey (1985), Singh (1986), Galindo (1987), Matthews (1992) y Singh y Singh 1994.

A. PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNOSTICO DE VIROIDES

Si se considera que los viroides no tienen una cápsida protéica, los métodos inmunológicos no pueden ser aplicados para el diagnóstico; igualmente, a causa de que no forman partículas características que puedan ser fácilmente detectadas, las técnicas de microscopía electrónica no son útiles. Por estas razones, los únicos procedimientos de diagnóstico son las pruebas biológicas, aunque para algunos viroides no ha sido perfectamente establecido el grupo de plantas indicadoras; tal es el caso del CCCVd (Coconut Cadang-Cadang viroid).

La electroforesis en gel de poliacrilamida e hibridación de ácidos nucleicos son las principales herramientas de diagnóstico.

1. DETECCION DEL VIROIDE DEL TUBERCULO FUSIFORME DE LA PAPA (PSTVd)

La enfermedad conocida como tubérculo fusiforme de la papa es causada por un viroide (Potato Spindle Tuber Viroid). Este viroide está formado por una pequeña molécula de ARN sin cápside de proteína.

Relación de los viroides descubiertos hasta 1987.

Nombre del viroide		Descubrimiento Autor y Lugar
Español	Inglés	
Vi. Tubérculo fusiforme de la papa (VTFP)	Potato spindle V. PSTV	Diener, 1971. E.U.A.
Vi. Exocortis de los cítricos (VEC)	Citrus Exocortis V.	Semancik-Weathers, 1972, E.U.A. Sanger, 1972, Alemania
Vi. Enanismo del crisantemo (VECr)	Chrysanthemum Stunt V. CSV	Diener-Lawson, 1972. E.U.A.
Vi. Moteado clorótico del crisantemo (VMCC)	Chrysanthemum Chlorotic mottle (CCMV)	Romaine-Horst, 1975 E.U.A.
Vi. Fruta pálida del pepino (VFPP)	Cucumber Pale Fruit CPFV	Van Dorst-Peters, 1974 Holanda.
Vi. Cadang-Cadang del cocotero (VCCC)	Coconut Cadang-Cadang CCCV	Randles, 1975. Australia.
Vi. Enanismo del húpulo (VEL)	Hop Stunt V.	Sasaki-Shikata, 1979 Japón.
Vi. Latente de la Columnnea (VLC)	Columnnea Latent V. CV	Owens et al., 1978 E.U.A.
Vi. Mancha amarilla del aguacate (VMAA)	Avocado Sunblotch, V. ASBV	Tomas-Mohamed, 1979 Australia
Vi. Enanismo apical del jitomate (VEAJ)	Tomato Apical Stun V.	Walter, 1981. Francia.
Vi. Planta Macho del jitomate (VPMJ)	Tomato Planta Macho V.	Galindo, et. al., 1982 México.
Vi. Enanismo del cadillo (VEB)	Burdock Stunt V.	Chent et al., 1983. China.

Los síntomas de la enfermedad varían en gran medida, de acuerdo con el cultivar infectado y con las condiciones ambientales; en muchos casos, los síntomas foliares son muy difíciles de detectar.

Se tiene conocimiento de que plantas de papa infectadas, dependiendo de la variedad y de la cepa del viroide utilizada, muestran hábitos de crecimiento erecto, enanismo, coloración grisácea de las hojas y reducción y rugosidad del área foliar.

Los tubérculos producidos por las plantas infectadas son elongados y en algunos cultivares se observa el desarrollo de extremos puntiagudos, cuya presencia es una característica típica de la enfermedad. Otros síntomas en tubérculos son: hundimiento de las yemas, presencia de puntos necróticos alrededor de las lenticelas, grietas superficiales y necrosis interna. No todos los tubérculos de una planta infectada muestran todos o algunos de estos síntomas.

EL PSTVd se transmite muy fácilmente en forma mecánica a otro hospedero susceptible; en condiciones de campo, una planta enferma puede infectar a otra cercana por simple contacto. El viroide también puede ser transmitido a otras plantas durante la realización de prácticas culturales y con herramientas contaminadas. También se transmite por semilla botánica.

Como la detección serológica de este viroide no es posible, los síntomas foliares son difíciles de detectar y en muchas variedades el tubérculo no adopta la forma ahusada característica. Por tales razones, la detección del PSTVd requiere de técnicas más sensibles; entre ellas pueden mencionarse:

- Prueba normal del tomate
- Prueba de Yang y Hooker
- Prueba de confrontación
- Prueba de *Scopalia sinensis*
- Electroforesis en gel de acrilamida y poliacrilamida (PAGE).
- Hibridación de ácidos nucleicos(NASH, Nucleic Acid Spot Hybridization).

Prueba normal del tomate

El tejido de la planta que va a ser sometida a la prueba, se macera en agua destilada y luego se inocular mecánicamente a plantas jóvenes de tomate (*Lycopersicon esculentum*

cv. Rutgers). Las plantas inoculadas se colocan en una cámara de crecimiento a 30°C hasta que aparezcan síntomas. Las plantas infectadas muestran inicialmente epinastia, rugosidad y enrollamiento foliar, necrosis de venas y enanismo. Con el tiempo, la necrosis de las venas se extiende a toda la hoja y ésta adquiere una coloración café.

Las cepas severas de PSTVd provocan síntomas muy claros, en tanto que las débiles son difíciles de detectar, ya que los síntomas son leves y las plantas infectadas no se distinguen con claridad de los testigos sanos.

Prueba de Yang y Hooker

Esta prueba se efectúa en forma similar a la anterior, pero es más sensible puesto que detecta tanto la cepa severa como la débil.

Las plantas de tomate inoculadas se mantienen a 24-30°C bajo iluminación fluorescente continua (100 ft-c); las infectadas con cualquiera de las cepas muestran albinismo, pero en el caso de las severas, las plantas muestran también necrosis de venas.

Prueba de confrontación

Es una modificación de la prueba normal que se hace con el propósito de detectar las cepas débiles de PSTVd. Se utilizan tres plantas de tomate (A, B y C) en cada prueba. Primero se inoculan las plantas A y B con savia de la planta de papa que va a ser sometida a la prueba; si muestran síntomas severos de PSTVd, entonces la planta de papa está infectada con la cepa severa del viroide. Si las plantas A y B no muestran ningún síntoma, se inoculan las B y C con la cepa severa de PSTVd y se mantienen a 30°C. Después de 2-3 semanas se observan los síntomas de las tres plantas (A, B y C). La planta C mostrará los síntomas severos de PSTVd, y si la planta B también los muestra, entonces la planta original no estaba infectada por el viroide; pero si la planta B no muestra síntomas, entonces la planta original estaba infectada con la cepa débil de PSTVd, que evitó que la planta B se infectara con la cepa severa del viroide debido a una protección cruzada.

Prueba en *Scopalia sinensis*

Cuando *S. sinensis* (*Solanaceae*) se inocula con PSTVd, se observan lesiones locales necróticas después de la infección. Las plantas a utilizar deben encontrarse en un período

do de crecimiento vigoroso y deben mantenerse en luz tenue (300-400 ft-c) a 18-23°C. La aparición de los síntomas requiere de 8 a 14 días. Esta prueba es poco utilizada debido a la dificultad para obtener semillas de esta especie y a los estrictos requerimientos de temperatura y luz en que se deben mantener las plantas.

En 1986 Singh aseguró que con frecuencia los síntomas provocados por los viroides en su hospedante natural, no siempre son distintivos o característicos, sino que su severidad varía con el cultivar, condiciones ambientales y nutrición de las plantas. Debido a estos factores la identificación de los viroides debe ser confirmada por medio de la transferencia del patógeno a una planta indicadora (Cuadro 1).

Cuadro 1. Algunas plantas indicadoras para la identificación de viroides

VIROIDE	PLANTA INDICADORA
Avocado sunblotch	<i>Persea americana</i> cvs. "Haas" y "Collinson"
Citrus exocortis	<i>Gymura aurantiaca</i>
Chrysanthemum stunt	<i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. "Mistletoe" <i>G. aurantiaca</i>
Chrysanthemum chlorotic mottle	<i>C. morifolium</i> cv. "Deep Ridge"
Coconut cadang-cadang	<i>Cocos mucifera</i>
Cucumber pale fruit	<i>Cucumis sativus</i> cv. "Sporu"
Grapevine	<i>C. sativus</i>
Hop stunt	<i>C. sativus</i> cv. "Suuyou"
Potato spindle tuber	<i>Lycopersicon esculentum</i> cvs. "Sheyenne" y Rutgers" <i>Scopolia sinensis</i> ; <i>Solanum X berthaultii</i>
Tomato apical stunt	<i>L. esculentum</i> cv. "Rutgers"; <i>S X berthaultii</i> , <i>Scopolia sinensis</i>
Tomato planta macho	<i>L. esculentum</i> cv. "Rutgers"

Otras Pruebas

Existen otras técnicas útiles en la detección del PSTVd y otros viroides, tales como la electroforesis en gel de acrilamida y poliacrilamida (Singh y Singh, 1994), la hibridación de ácidos nucleicos (NASH), cuya realización requiere de equipo muy sofisticado. Esta última y otras técnicas más, pueden consultarse en Jayasinghe y Salazar, 1993; Singh y Singh 1994b, Niblett *et. al.*, 1980; Palukaitis y Symonds, 1980; Raudles, 1975; Singh *et. al.* 1976, Singh *et. al.* 1988.

C. VIRUS SATELITES

Estas entidades patogénicas fueron descritas en 1962 por Kassanis como pequeñas partículas asociadas a ciertos ácidos nucleicos de algunas cepas de virus de la necrosis del tabaco (VNT). EL término "satélite" ha sido utilizado para designar los ácidos nucleicos que se encuentran en ciertos virus, pero estos ácidos nucleicos no codifican por sí mismos ninguna cubierta protéica, encapsidando en el mismo tipo de partícula que el (o los) RNA viral (es) genómico. Dependen del virus para su replicación y son serológicamente diferentes de las partículas virales.

Cornuet (1989) indica el nombre de 26 virus adscritos a más de seis grupos virales, conocidos por poseer un satélite, los cuales se enlistan en el siguiente cuadro. Más información concerniente a estos patógenos puede ser consultada en Robertson *et al.* (1983).

Principales satélites conocidos

Virus	Grupo
Virus mosaico del pepino (Cucumber Mosaic Virus)	Cucumovirus
V. achaparramiento del cacahuete (Peanut Stunt Virus)	Cucumovirus
V. necrosis del tabaco (Tobacco Necrosis Virus)	Tobamovirus
V. mosaico del panicum (Panicum Mosaic Virus)	

Continúa. Principales satélites conocidos

Virus	Grupo
V. mosaico línea blanca del maíz (Maize Whiteline Mosaic Virus)	
V. mosaico del tabaco (Tabacco Mosaic Virus)	Tobamovirus
V. vena necrótica amarilla de la remolacha (Bet Necrotic Yellow Vein Virus)	Furovirus
V. anillado amarillo de la achicoria (Chicory Yellow Ringspot Virus)	Nepovirus
V. mosaico del arabis (Arabis Mosaic Virus)	Nepovirus
V. anillo negro del tomate (Tomato Black Ring Virus)	Nepovirus
V. mancha anular latente de la fresa (Strawberry Latent Ringspot Virus)	Nepovirus
V. mancha anular latente del myrobolano (Myrobolan Latent Ringspot Virus)	Nepovirus
V. hoja de abanico de la vid (Grape Vine Fanleaf Virus)	Nepovirus
V. bulgaro latente de la vid (Grape Vine Bulgarian Latent Virus)	Nepovirus
V. mancha anular del tabaco (Tobacco Ringspot Virus)	Nepovirus
V. mosaico del pepino (Cucumber Mosaic Virus)	Cucumovirus
V. achaparramiento del cacahuete (Peanut Stunt Virus)	Cucumovirus
V. rallado transicante de la alfalfa (Lucerne Transicat Streak Virus)	Sobemovirus
V. moteado veloso del tabaco (Velvet Tobacco Mottle Virus)	Sobemovirus
V. moteado del <i>solanum modiflorum</i> (Solanum Modiflorum Mottle Virus)	Sobemovirus
V. moteado subterráneo del trébol (Subterranean Clover Mottle Virus)	Sobemovirus
V. enchinamiento del nabo (Turnip Crinkle Virus)	Tombusvirus
V. enanismo arbustivo del tomate	Tombusvirus

Continúa. Principales satélites conocidos

Virus	Grupo
(Tomato Bushy Stunt Virus) V. moteado amarillo de la alcachofa	Tombusvirus
(Artichoke Mottle Crinkle Virus) V. mancha anular italiana del clavel	Tombusvirus
(Carnation Italian Ringspot Virus) V. mancha anular del <i>Cymbidium</i>	Tombusvirus
(Cymbidium Ringspot Virus) V. mosaico asteriode de la petunia	Tombusvirus
(Petunia Asteroid Mosaic Virus) V. de la hoja enrollada del <i>Pelargonium</i>	Tombusvirus
(Pelargonium Leaf Curl Virus)	

D. APENDICE

COLORANTES

Rodamina o Pironina B-Verde de metilo

Preparación:

Antes de preparar el colorante, se debe preparar una solución de acetato de sodio, como sigue:

Acetato de sodio	1.65 g
HCl	10.00 ml
Agua destilada	100.00 ml

Una vez preparada se diluye a 1:10 v/v con agua destilada. El pH debe ajustarse a 4.7.

La fórmula del colorante es:

Verde de metilo	0.15 g
Rodamina o Pironina B	0.25 g
Solución de Acetato de Sodio	100.00 ml

Floxina

Preparación:

Floxina	1.00 g
Agua destilada	100.00 ml

Disolver perfectamente

Rosa de Bengala

Preparación:

Rosa de bengala	0.05 g
Agua destilada	100.00 ml

Disolver perfectamente

Azul de Bromofenol-Mercurio

Preparación:

HgCl ₂	10.00 g
Azul de bromofenol	100.00 mg
Agua destilada	100.00 ml

Mezclar todo perfectamente, teniendo mucho cuidado porque los compuestos de mercurio son muy tóxicos.

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS (SOLAM) PARA LA PRUEBA ELISA

Soluciones amortiguadoras (SOLAM).

PBS de pH 7.4

Preparación:

NaCl	8.0 g
KH_2PO_4	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
KCl	0.2 g
NaN_3	0.2 g
Agua destilada	1.0 L

Para fines prácticos, se puede preparar una solución más concentrada que la descrita; en este caso el pH varía, siendo generalmente más bajo, pero al diluirse la solución a la concentración indicada se ajusta a 7.4.

PBST

Se prepara mezclando por litro de PBS, 0.5 ml de surfactante Tween 20.

Solam de cubrimiento de pH 9.6.

Preparación:

Na_2CO_3	1.59 g
NaHCO_3	2.93 g
NaN_3	0.20 g
Agua destilada	1.00 L

Disolver perfectamente los compuestos en el agua destilada.

Solam de extracción (fosfatos de potasio 0.25 M y de pH 7.5 + 0.1 M EDTA),**Preparación:**

$K_2 HPO_4$	43.54 g
$K HPO_4$	34.02 g
Agua destilada	1.00 L

Preparar independientemente las soluciones de fosfatos y por combinación de ellas, equilibrar el pH a 7.5.

Finalmente, agregar 37.23 g de EDTA (etilendinitrilotetracetato) a un litro de la solución de fosfatos con pH 7.5, para tener preparado el Solam de extracción.

Solam de conjugado**Preparación:**

PBST	98.00 ml
PVP (Polyvinilpyrrolidinona al 2%)	2.00 g
Ovoalbúmina (0.2%)	0.20 g

Mezclar perfectamente los tres componentes.

Solam sustrato**Preparación:**

Diethanolamina	97.00 ml
NaN_3	0.20 g
Agua destilada	1.00 L

Se disuelven los componentes en 800 ml de agua y después se afora a un litro.

Debe ajustarse el pH a 9.8 con HCl al 37%. Esta solución amortiguadora debe ser preparada justo antes de usarla; no puede ser almacenada.

Solam tris**Preparación:**

Tris (0.05 M)	6.06 g
Agua destilada	1.00 L

Disolver el Tris en 800 ml de agua y aforar a un litro. Agregar HCl hasta que el pH sea de 9.8.

Para desgasificar la celulosa, una vez que el pH del líquido drenado está cercano al neutro, pasarla el PBS a la mitad de su concentración

	PBS	PBS de 1/2 conc.
NaCl	8.0 g	4.00 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g	0.10 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	2.9 g	1.45 g
KCl	0.2 g	0.10 g
NaN ₃	0.2 g	0.10 g
Agua destilada	1.0 L	1.00 L

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS PARA LA PRUEBA NCM-ELISA**TBS DE pH 7.5****Preparación:**

Tris (0.02 M)	4.84 g
NaCl (0.5 M)	58.44 ml
HCl	10.00 ml
Agua destilada	2.00 L

Todos los ingredientes se disuelven en 1990 ml de agua destilada y el pH se ajusta a 7.5 con el HCl; después se completa el volumen total de 2000 ml, con agua destilada. Si la

solución amortiguadora va a ser almacenada por varios días, agregar 0.4 g de azida de sodio (NaN_3 al 0.01%).

Solución de extracción

Preparación:

DIECA	0.01 M
EDTA	0.01 M
TBS	100.00 ml

El EDTA tarda en disolverse en el TBS.

Esta solución se utiliza solamente si se sospecha que se trata del virus PLRV de la papa.

Para preparar muestras de camote, la extracción es la siguiente:

NaSO_3 (0.2%)	0.2 g
TBS	100.0 ml

Solución de bloqueo

Preparación:

Leche en polvo	0.5 g
Tritón X-100	0.5 ml
TBS	25.0 ml

La leche en polvo se disuelve en un pequeño volumen de TBS que luego se completa a 25 ml; se agrega el Tritón X-100 y se mezcla bien. Esta solución debe prepararse justo antes de usarse.

Solución de anticuerpos

Preparación:

Leche en polvo	1.00 g
TBS	50.00 ml

La leche se disuelve en una pequeña cantidad de TBS y después se completan los 50 ml.

Solución de lavado T-TBS

Preparación:

Tween-20	1.00 ml
TBS	2.00 L

Mezclan ambos componentes perfectamente.

Solución de sustrato a pH 9.5

Preparación:

Tris (0.1 M)	6.05 g
NaCl (0.1 M)	2.92 g
MgCl ₂ .6H ₂ O (5mM)	0.51 g
NaN ₃ (0.01 %)	0.05 g
HCl (5N)	5.00 ml
Agua destilada	500.00 ml

Se disuelven los ingredientes en poca agua destilada, a excepción del HCl (5N) que va a servir para ajustar la solución a pH de 9.5. Completar después los 500 ml de agua destilada.

SOLUCION DE REVELADO

Para esta solución, previamente deben prepararse los dos componentes siguientes:

NBT

NBT	40.00 mg
DMF (N-N dimetil formamide) 70%	2.00 ml

BCIP

BCIP	20.00 mg
DMF (N-N dimetil formamide) 70%	2.00 ml

Las dos mezclas deben manejarse con guantes porque son compuestos altamente tóxicos. Una vez preparados deben almacenarse a 4 °C en frascos que los protejan del efecto de la luz.

La solución de revelado se prepara mezclando:

NBT	100.00 µl
BCIP	100.00 µl
Solución de sustrato	25.00 ml

Agregar 100 µl de la solución NBT a 25 ml de solución de sustrato. Mezclar bien y agregar gota a gota 100 µl de la solución BCIP, agitando constantemente con un vórtex (agitador de tubos). Para esto utilizar guantes. La solución de revelado debe prepararse al momento de usarla.

NOTA: Todas las soluciones Amortiguadoras (Solams) deben conservarse en refrigerador, excepto cuando se indique otra cosa.

E. BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, N.G. 1969. Plant pathology. Academic Press. New York.
- AVRAMEAS, S. 1969. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Inmunochimistry*. 6:43-52.
- BAWDEN, F. C. 1964. Plant virus and virus disease. 4 ed. Ronald. New York.
- BAR-JOSEPH, M. S.; GONSALVES, D. G.; MOSCOVITZ, M.; PURCIFULL, D. E.; CLARK, M. F.; LOEBENSTEIN, G. 1978. The use of enzyme linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190-194.
- BRATHWAITCH, W. D. 1984. An introduction to the diagnosis of plant diseases. IICA. San José, Costa Rica.
- BRATHWAITCH, W. D.; SOSA-MOSS, C. 1995. Introducción al diagnóstico de las enfermedades de las plantas-Diagnóstico fitosanitario I. IICA. San José, Costa Rica.
- CARDENAS, S. E. 1986. Diagnóstico de virus mediante inclusiones virales. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- CARDENAS, S. E., GALINDO, O.J. A. 1980. Inclusiones producidas por el virus jaspeado del tabaco (tabacco etch) en tabaco. *Agrociencia* 34:49-57.
- CIP (PERU). 1993. Prueba de Látex. Ed. por Jayasinghe, U.; Salazar, L.F. Manual de Técnicas en Virología de Plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- CIP (PERU). 1993. Ensayos inmunológicos con conjugados enzimáticos: Doble anticuerpo "sandwich" (DAS-ELISA). Ed. por Jayasinghe, U.; Salazar, L.F. Manual de Técnicas en Virología de Plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

- CIP (PERU). 1993. Ensayos inmunológicos con conjugados enzimáticos en membranas de nitrocelulosa (NCM-ELISA). Ed. por Jayasinghe, U.; Salazar, L.F. Manual de Técnicas en Virología de Plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- CIP (PERU). 1993. Ensayos serológicos con conjugados enzimáticos: Conjugado enzimático de penicilinas (PNC-DAS-ELISA). Ed. por Jayasinghe, U.; Salazar, L.F. Manual de Técnicas en Virología de Plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- CIP (PERU). 1993. El viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd). Ed. por Jayasinghe, U.; Salazar, L.F. Manual de Técnicas en Virología de Plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- CIP (PERU). 1993. Fundamentos de la purificación de virus de plantas. Ed. por Jayasinghe, U.; Salazar, L.F. Manual de Técnicas en Virología de Plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- CIP (PERU). 1993. Protocolos de purificación de virus de plantas. Ed. por Jayasinghe, U.; Salazar, L.F. Manual de Técnicas en Virología de Plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- CHRISTIE, R. G.; EDWARDSON, J. R. 1987. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Florida Agricultural Experiment State Monog. Serie 9. 150 p.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. M. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal Genetic Virology. 34:475-483.
- C.M.I./A.A.B. 1970-1981. Description in plant virus. Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists. Kew.
- CONVERSE, R.H. 1978. Detection of tomato ringspot virus in red raspberry by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plant Disease Reporter. 62:189-192.

- CORNUET, P. 1989. Elementos de Virología general. Ed. Mundiprensa.
- CROWLE, A. J. 1973. Inmunodiffusion. Academic Press. N.Y.
- DIENER, T. O. 1979. Viroids and viroid diseases. Wiley Co. N.Y. 210 p.
- DIENER, T. O. 1981. Viroids. Scientific American. Vol. 244. (1):65-73.
- DUNCAN, J. M.; TORRANCE, L. 1992. Techniques for the rapid detection of plant pathogens. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. 1971. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of inmuno globulin G. Immunochemistry. 8:871-874.
- GALINDO, A. J. 1987. Generalidades sobre los viroides y sus enfermedades que causan. Ed. por Alvizo V., H.F.; Lozoya Z., H. Temas en Virología II. Sociedad Mexicana de Fitopatología. México. 78-104 p
- GERA, A.; LOEBENSTEIN, G.; RACCAH, B. 1978. Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay. Virology 86 542-545.
- HAMPTON, R.; BALL, E.; BOER, S. De. (eds.) 1990. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. APS. Press.
- HARRIS, K.F.; MARAMOROSCH, K. (eds) 1977. Aphidas virus vectors. Academic Press.
- HARLOW, E.; LANE, D. 1981. Antibodies: A laboratory manual. Gold Spring Harbor Laboratory Press. Gold Spring Harbor, N.Y.
- HILL, S.A. 1984. Methods in plant virology. Vol. 1. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 167 p.
- JAYASINGHE, V.; SALAZAR, L.F. (Eds). 1993. Manual de técnicas en virología de plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.

- KOENING, R. 1978. ELISA in the study of homologous and heterologous reactions of plant viruses. *Journal Genetic Virology*. 40:309-318.
- KURSTAK, E. 1981. *Handbook of plant virus infections*. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam. 943 p.
- LISTER, R. M. 1977. Detection of viruses in soybean seed by enzyme-linked immunosorbent assay. *Proceeding American Phytopathology Society* 4:132.
- MARAMOROSH, K.; MOKELVEY, J. J. (eds). 1985. *Subviral pathogens of plants and animals: Viroid and prions*. Academic Press.
- MATTHEWS, R. E. F. 1992. *Fundamentals of plant virology*. Academic Press. N.Y.
- MILSTEIN, C. 1990. Antibodies; a paradigm for the biology of molecular recognition. *Proceeding Royal Society London* B239. p. 1-16.
- NIBLETT, C. L.; DICKSON, E.; HORST, R. K.; ROMAINE, C. P. 1980. Additional host and an efficient purification procedure for four viroids. *Phytopathology*. 70: 610-615.
- OUCHTERLONY, O. 1968. *Handbook of Immunodiffusion and immunoelectrophoresis*. Annual Arbor Scientific Publication: Michigan.
- OUCHTERLONY, O.; NILSSON, L.A. 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In Weir, D.M. (ed). *Handbook of experimental immunology*. Blackwell: Oxford.
- PALUKAITIN, P.; SYMONDS, R. H. 1980. Purification and characterization of the circular form of chrysanthemum stunt viroid. *Journal Genetic Virology*. 46: 477-489.
- PINTO, C.B. 1991. *Virología agrícola*. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
- PINTO, C. B. 1993. *Manual de prácticas de virología agrícola*. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo 134 p.

- RAUDLES, J. W. 1975. Association of two ribonucleic acid species with cadang-cadang disease of coconut palm. *Phytopathology*. 65:163-167.
- ROBERTSON, H. D. 1983. Plant infection agents virus, viroids, virusoids and satellites. *Current Communication in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory. 230 p.
- SANGER, H. L. 1982. Biology, structure, functions and possible origin of viroids. In: *Nucleic acids and proteins in plant*. Vol. II. Springer Verlag. Berlin. p. 358-454.
- SEMANCIK, J. S. 1979. Small Pathogenic RNA in plants the viroids. *Annual Review Phytopathology* 17:461-484.
- SINGH, P. R.; SINGH, M. 1994a. Viroids in ornamental plants: examples of modular evolution. Ed. por Rish, N. ; Ahuaja, K.L.; Singh, B.P. *Virology in the Tropic*. Malhotra Publishing House. New. p. 199-21 Delhi p.199-21
- SINGH, P. R.; SINGH, M. 1994b. Polyacrilamide gel electrophoresis and mechanism of viroid strain separation. pag 185-198. Ed. por Rishi, N.; Ahuja, K.L.; Singh, B.P. *Virology in the Tropics*. Malhotra Publishing House. New Delhi. p. 185-198.
- SINGH, R. P. 1986. Viroids-their nature and biology. Ed. por Varma, A.; Verna, J.P. *Vistas in Plant Pathology*. Malhotra Publishing house. New Delhi. p. 549-566.
- SINGH, R. P.; BOUCHER, A.; SEABROOK, J.E.A. 1988. Detection of the mils strain of potato seed by return electrophoresis. *Phytopathology*. 78:663-667.
- SINGH, R. P.; MICHNIEWICZ, J. J.; NARANG, S. A. 1976. Separation of potato spinde tuber viroid ribonucleic acid from *Scopolia sinensis* into three infections froms and the purification and oligonuclotide patterns of fraction IIRNA. Part IX. *Canadian Journal Biochemistry*. 54:600-608.
- STEVENS, W. A. 1983. *Virology of flowering plants*. Tertiary level biology. Blackie, Glasgow and London. 183 p.

- SWENSON, K.G. 1967. Plant virus transmission by insects. Ed. por Maramorosch, K.; Koprowski, H. Methods in virology. Vol. 1 Academic Press. New York and London. p 267-307.
- TELIZ, O. D.; AGUILERA, M. G. 1986. Inmunosorbencia con enzimas conjugadas. Revista Mexicana de Fitopatología. 4:133-141.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V. 1982. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic Press. New York.
- VILLANUEVA, J. J. A. 1980. Obtención de una colonia de *Myzus persicae* Sulzer libres de virus como fase inicial para la búsqueda de resistencia en chile (*Capsicum annuum* L.) Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.
- VOLLER, A.; BARTLETT, D. E. ; BIDWELL, M. F.; CLARK, A. M.; ADAMS, A. M. 1976. The detection of viruses by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Journal Genetic Virology. 33: 163-167.

VI. MICOPLASMAS Y ESPIROPLASMAS

A. MICOPLASMAS

En años recientes se ha demostrado que muchas enfermedades de plantas, que se creía eran causadas por virus, son causadas por pequeños agentes semejantes a bacterias, llamados micoplasmas.

El conocimiento de los micoplasmas no es nuevo; en el siglo XIX Louis Pasteur describió el primer micoplasma (*Mycoplasma mycoides*), como el agente causal de la pleuroneumonía en el ganado. Desde ese tiempo, los micoplasmas han sido considerados como la causa de enfermedades del hombre, ganado, aves y roedores.

En cuanto a su clasificación, los micoplasmas se agrupan dentro de la clase Mollicutes con un sólo orden, los Mycoplasmatales, agrupados en dos familias; si el organismo requiere esterol para su desarrollo en un medio artificial, pertenece a la familia Mycoplasmataceae y si no lo requiere, es de la familia Acholeplasmataceae (Freundt, 1974; Razin y Freundt, 1984).

En relación con plantas, en 1967 Doi e Ishie en Japón llevaron a cabo un estudio de una enfermedad llamada "enanismo de la mora" (Mulberry dwarf disease) y encontraron que agentes parecidos a micoplasmas estaban presentes en los tubos cribosos y ocasionalmente en el parénquima del floema; no encontraron cuerpos similares en plantas sanas. Los autores demostraron que la enfermedad se curaba aplicando a las plantas enfermas antibióticos a base de tetraciclina, lo que confirmó que la enfermedad era causada por el micoplasma y no por un virus.

Desde que se realizó ese trabajo en Japón, se ha demostrado que cerca de otras 40 enfermedades de plantas son causadas por micoplasmas.

Las características de los micoplasmas pueden resumirse como sigue: son los organismos vivos más pequeños que se conoce que pueden crecer en un medio artificial. Su tamaño varía entre 0.2 a 0.8 milimicras en diámetro, por lo que sólo pueden ser observados al microscopio electrónico y pasan a través de filtros con poro de 450 nm de diámetro. Carecen de pared celular y sus células están limitadas solamente por una membrana unitaria gruesa (10 nm) de tres capas; tienden a ser pleomórficos, variando su forma como consecuencia de pequeños cambios en la concentración osmótica del medio. Son gram negativos. Contienen ribosa de tipo bacteriano y están formadas por DNA y RNA. Son resistentes a la penicilina y sensibles a la tetraciclina.

Los micoplasmas son muy similares a los protoplastos bacterianos o formas L. Estas últimas son bacterias a las que se les ha eliminado la pared celular o que han sido cultivadas en medios con penicilina que evitan la formación de la misma; sólo se pueden producir en laboratorio y son muy inestables, por lo que retoman su forma original inmediatamente después de que la penicilina se elimina del medio de cultivo. A diferencia de las formas L de las bacterias; los micoplasmas no revierten a la forma bacteriana cuando crecen en un medio sin penicilina.

Los micoplasmas se reproducen emitiendo largos filamentos que se rompen, dando lugar a cuerpos primarios.

Los micoplasmas casi en todos los casos son transmitidos por pulga saltona (Cicadellidae) y psilidos (Psillidae); por ejemplo, los vectores de la "escoba de bruja" o "purple top" y del "latebreaking virus" de la papa son las pulgas saltonas *Ophiola (Scleroracus) flavopictus*, *S. dasidus* y *S. balli*. En muchas otras partes del mundo el vector es aún desconocido.

Por otra parte, los vectores son incapaces de adquirir los micoplasmas a partir de plantas de papa enfermas. Algunos micoplasmas pueden transmitirse transováricamente y generalmente, los insectos infectados permanecen infectivos por el resto de su vida.

Los micoplasmas tienen un amplio rango de hospedantes silvestres; con frecuencia la infección del cultivo se establece mediante la migración de chicharritas desde la maleza a las plantas cultivadas.

Todos los micoplasmas fitopatógenos pueden ser controlados con antibióticos a base de tetraciclina, como la aureomicina; sin embargo, existen informes que señalan que la aplicación de tetraciclina no "cura" a la planta enferma, ya que los síntomas reaparecen rápidamente una vez que se suspende el tratamiento con el antibiótico.

Debido a que los micoplasmas son sensibles a las temperaturas altas, pueden ser eliminados de plantas infectadas, partes de ellas u órganos propagativos en dormancia, mediante termoterapia (30 a 37 °C). EL tratamiento debe durar semanas o meses, dependiendo del micoplasma de que se trate.

Los síntomas de las plantas enfermas son invariablemente: follaje amarillento, enanismo, arrosamiento y formación de "escoba de bruja" (fasciación). Existen síntomas inducidos en las plantas por ciertos micoplasmas, que son característicos y rara vez producidos por otros fitopatógenos, entre ellos la "escoba de bruja", virescencia o cambio de color de las flores a verde, y filodia, que es la transformación de los pétalos en estructuras foliares. Sin embargo, la sintomatología como herramienta de diagnóstico de estos patógenos debe ser usada con mucha reserva.

Dentro de las enfermedades que se conoce son causadas por micoplasmas, se incluyen: el enanismo amarillo del arroz, la hoja blanca de la caña de azúcar, el ensanchamiento de la yema del tomate, la hoja pequeña del camote y el "potato purple top", entre otras.

Todos los micoplasmas fitopatógenos se encuentran confinados a las células del floema de la planta infectada, y son morfológicamente similares cuando se observan al microscopio electrónico secciones ultrafinas de tejido infectado.

Un procedimiento estándar para detectar la presencia de micoplasmas, es el examen de cortes ultrafinos de material vegetal enfermo, en microscopio electrónico, teniendo cuidado de no confundir los patógenos con organelos de las células; una evidencia adicional es la remisión de síntomas después de someter el material enfermo a una terapia con tetraciclina.

a. IDENTIFICACION

Aunque en enfermedades causadas por micoplasmas la sintomatología no es definitiva en el diagnóstico, sí es de utilidad como paso preliminar. La identificación precisa requiere de

la transmisión del agente causal a partir de plantas sospechosas, mediante injertos a otra hospedante. El uso de vectores para transmitirlos de plantas de papa enfermas a plantas sanas resulta imposible, dado que los vectores son incapaces de adquirir el inóculo.

Se tiene conocimiento de que las especies *Datura stramonium*, *D. metel*, *Lycopersicon esculentum*, *Cyphomandra betacea*, *Nicotiana tabacum*, *Medicago sativa*, *Mellilotus alba* y *Trifolium repens* son hospedantes alternas y pueden ser utilizadas como plantas indicadoras. Cuando se intenta transmitir micoplasmas a estas plantas, mediante injertos a partir de plantas de papa que crecen en el campo, es necesario tener mucho cuidado, ya que éstas suelen estar infectadas con otros patógenos, principalmente con virus, los cuales pueden infectar a muchos de estos hospedantes produciendo síntomas que pueden conducir a un diagnóstico erróneo.

Para conocer si está sucediendo lo anterior, Jayasinghe y Salazar (1993) recomiendan el uso de técnicas serológicas para detectar la presencia de virus después de realizar los injertos. Si alguno estuviera presente infectando a la planta diferencial, es necesario injertar una parte de la planta infectada con el micoplasma en otro cultivar de papa que sea inmune al virus. También se pueden utilizar otras plantas hospedantes inmunes al virus, pero susceptibles al micoplasma.

El objetivo básico de la transmisión por injerto es obtener en invernadero, un aislamiento puro del micoplasma, para estudios subsecuentes.

El siguiente paso es probar la sensibilidad del micoplasma a los antibióticos. Para esto es importante tener muchas plantas infectadas con el micoplasma y testigos suficientes para obtener resultados confiables.

Se debe tratar un grupo de plantas semanalmente, con una solución de tetraciclina, otro con una solución de penicilina y otro únicamente con agua destilada. Es importante tomar en cuenta, que los antibióticos a concentraciones altas, son fitotóxicos para algunas plantas, por lo que en la prueba deben usarse tres niveles de concentración de ellos (100, 500 y 1000 ppm). Para detectar el nivel fitotóxico, se debe dar el mismo tratamiento con las tres concentraciones de antibióticos a un grupo de plantas sanas. Si no resulta fitotóxica la concentración mayor del antibiótico, es posible utilizar concentraciones más elevadas.

Si están presentes micoplasmas, las plantas que recibieron el tratamiento de tetraciclina mostrarán remisión de síntomas, o éstos desaparecerán completamente de los tejidos jóvenes, y las que recibieron el tratamiento de penicilina no mostrarán ningún cambio en la severidad de los síntomas.

Al suspender la aplicación semanal de tetraciclina, se podrá observar que las plantas comenzarán a mostrar nuevamente los síntomas de la enfermedad. La sensibilidad del patógeno a la tetraciclina y la ausencia de reacción a la penicilina, es un buen indicador de que un micoplasma está asociado a la enfermedad.

Existen algunas técnicas para el microscopio de luz, que facilitan el estudio de los micoplasmas en tejidos enfermos.

Para lograr mayor contundencia en el diagnóstico, se recomienda tefir secciones de pecíolos y tallos de las plantas enfermas con el método Dienes. La presencia en el floema, de estructuras granulares de color azul oscuro, es la evidencia de la asociación de micoplasmas con la enfermedad.

Este método consiste en:

- Hacer cortes longitudinales del tejido enfermo con el micrótopo de congelación, para observar los vasos del floema y detectar las acumulaciones de micoplasmas.
- Fijar los cortes en agua hirviendo por 3 a 4 minutos, o en glutaraldehído a 3% en solución fosfatos 0.1 M de pH 7.2, por 30 minutos.
- Colocar los cortes en la solución Dienes a 0.5% por 5 a 10 minutos. La fórmula de la solución Dienes se presenta en el Apéndice,
- Lavar con agua destilada y montar los cortes en glicerina.
- Observar al microscopio compuesto de luz.

Con esta técnica el xilema se tiñe de azul turquesa, la corteza de azul pálido, el floema enfermo de azul oscuro y el sano no se tiñe.

También puede usarse el método de rodamina-verde metilo que es el siguiente:

- Cortar longitudinalmente el tejido enfermo con el micrótopo de congelación.

- Fijar los cortes en agua hirviendo por 3 a 4 minutos, o en glutaraldehído a 3% en solución de fosfatos 0.1M de pH 7.2, por 30 minutos.
- Transferir los cortes a rodamina-verde de metilo por 15 minutos.
- Lavar con agua destilada y montar los cortes en glicerina.
- Observar al microscopio compuesto de luz.

Cuando el tejido está infectado con micoplasmas, en el floema enfermo se observa un precipitado color rosa.

La prueba más confiable para detectar micoplasmas es su observación en el microscopio electrónico de transmisión. Los patógenos se obtienen de las venas principales, pecíolos o tallos de la planta infectada, que se cortan en piezas pequeñas de 2 a 3 mm de largo y se embeben en solución fijadora Karnowsky, o en una solución de glutaraldehído al 2 %, en solución amortiguadora de fosfato 0.01 M de pH 7.0. La muestra así preparada puede enviarse a un laboratorio donde se tenga microscopio electrónico.

Otra técnica para observación de micoplasmas es utilizando el método del azul de anilina.

- Cortar longitudinalmente el tejido enfermo con el microtomo de congelación.
- Fijar los cortes en agua hirviendo por 3 a 4 minutos, o en glutaraldehído al 3% en solución de fosfatos 0.1M con pH de 7.2, por 30 minutos.
- Transferir los cortes a azul de anilina por 30 minutos y dejarlos escurrir. La fórmula del colorante se presenta en el apéndice.
- Montar los cortes en azul de anilina.
- Observar al microscopio compuesto de fluorescencia.

Con esta técnica, dentro de los vasos del floema enfermo se observa un precipitado fluorescente.

Para una comprensible descripción de los métodos usados en el aislamiento de micoplasmas, en los medios para su cultivo y su caracterización, se recomienda consultar las obras de Razin y Tully (1983), Tully y Whitcomb (1982), Tully y Razin (1983) y Davis et. al. (1988).

B. ESPIROPLASMAS

Los espiroplasmas son organismos típicamente helicoidales (3-12 x 0.22 μm) que durante alguna fase de su crecimiento requieren de esterol para su desarrollo; son sensibles a la digitonina a 1.5%; el tamaño de su genoma es de 1.0×10^9 daltons y la NADH está localizada en el citoplasma.

Los espiroplasmas también pueden ser cultivados en medio artificial, pero siempre requieren de esterol; su desarrollo en medio sólido provee las bases para su caracterización, que es complementada con diversas pruebas bioquímicas y serológicas (Freundt, 1981).

En el cultivo *in vitro* de los espiroplasmas se han usado diferentes medios de cultivo (Daniels et. al., 1973; Fudl-Allah et. al., 1972; Markhan et. al., 1977; Saglio et. al., 1973; Townsed et. al., 1977 y Whitcomb, Tully, Bove y Saglio, 1973).

En medio sólido las colonias exhiben el crecimiento típico de los micoplasmas, que es una apariencia de "huevos fritos" de 0.1 a 0.2 mm de diámetro.

Dos de los espiroplasmas patógenos de plantas más estudiados son el *Spiroplasma citri* y el espiroplasma del achaparramiento del maíz, los cuales han sido aislados de sus hospedantes y de los insectos vectores correspondientes, habiéndose logrado cultivos puros de ellos en medios nutritivos.

Para el aislamiento de espiroplasmas, el procedimiento es el siguiente:

- Desinfectar superficialmente los tejidos enfermos, por inmersión en alcohol a 70% (V/V), o en hipoclorito de sodio a 1%, durante un minuto.
- Hacer varios lavados con agua esterilizada.
- Moler la muestra de tejido en un mortero esterilizado, con alrededor de 1 ml de medio de crecimiento; una vez molido agregar 4 ml del medio. Si el extracto contiene trozos grandes de material vegetal, centrifugar a baja velocidad (500 g por 1 min).
- Pasar el sobrenadante a través de un filtro miliporo estéril de tipo HA, con diámetro de poro de 0.45 Mm, en un adaptador Swinnex syringe. Es preferible filtrar bajo gravedad que por medio de presión. Si la muestra molida no es filtrada con miliporo, la esterilización es esencial.

- Incubar el filtrado en pequeñas botellas de vidrio, selladas.
- Hacer subcultivos (1:50) después de dos días de crecimiento, cuando se pretenda aislar los espiroplasmas de ciertas plantas, para evitar la inhibición por productos como los polifenoles, que se producen con el macerado de los tejidos.

a. MEDIO DE CRECIMIENTO

Usualmente *Spiroplasma citri* se cultiva en medio completo SMC (Saglio *et al.*, 1971, citado por Markhan y Townsend, 1984) y en el MEDIO-T; en cambio el espiroplasma del achaparramiento del maíz se desarrolla en MEDIO C-3 y en un medio simplificado (Liao y Chen, 1975). Las fórmulas de los medios de cultivo aparecen en el Apéndice.

Spiroplasma citri se incuba a 32°C (el rango de temperatura de crecimiento es de 27-35°C) y el espiroplasma del achaparramiento del maíz requiere de 29°C para desarrollarse. Los espiroplasmas pueden ser examinados utilizando técnicas de microscopía de campo oscuro, contraste de fase y por observación al microscopio electrónico de transmisión, de savia enferma previamente sometida a la técnica de tinción negativa. Los detalles de la técnica pueden ser consultados en Cole *et al.*, 1973.

Otro criterio práctico usado como herramienta para la clasificación de organismos pertenecientes a la clase Mollicutes, es su capacidad de pasar a través de filtros con poro de 220 a 450 nm de diámetro.

En el estudio de los micoplasmas se han empleado diferentes técnicas para la comparación de cepas; dentro de ellas, la electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida es la más usada (Freund, 1981). Otras metodologías para la identificación de micoplasmas y espiroplasmas puede ser consultada en Davis, Lee y Fletcher, 1988.

C. APENDICE

AZUL DE ANILINA

Preparación:

H₂HPO₄

3.420 g

Azul de anilina	0.001 g
Agua destilada	100.000 ml

Filtrar con papel No. 1 y conservar en refrigeración. Esta solución debe tener un pH de 8.0.

SMC (SORBITOL)**Preparación:**

Caldo PPLO (Difco)	21.00 g
Triptona (Difco)	10.00 g
Sorbitol	70.00 g
Fructosa	3.00 g
Glucosa	1.00 g
Sucrosa	10.00 g
Rojo de fenol (indicador)	20.00 mg
Agua destilada	700.00 ml

Una vez mezclados los componentes, el medio debe pasarse por el autoclave (120°C/ 20 min); después suplementarlo con los siguientes aditivos estériles:

Suero de caballo	200.00 ml
Extracto fresco de levadura 5% peso/volumen	100.00 ml
Solución de acetato de Thallous	10.00 ml
Penicilina G	10 ⁶ unidades por L de medio

Para preparar medio sólido, el PPLO puede ser reemplazado por 34.00 g de caldo PPLD agar (Difco), o 10.00 g de agar purificado y deben ser adicionados al medio antes de someterlo al autoclave. El medio no sólido debe ser enfriado a 50°C antes de agregar el suero de caballo.

SOLUCION DE DIENES**Preparación:**

Azul de metileno	2.50 g
Azufre II	1.25 g
Maltosa	10.00 g
Carbonato de sodio	0.25 g
Agua destilada	100.00 ml

Filtrar con papel No. 1, diluir de 0.5 a 0.1% v/v en agua destilada. Esta solución debe mantenerse bajo refrigeración

SOLUCION DE KARNOWSKY**Preparación:**

Solución de paraformaldeído al 8%	12.00 ml
Solución de cacodilato 0.1M	33.00 ml
Solución de glutaraldeído al 70%	2.00 ml
Agua destilada hasta completar	100.00 ml

Mezclar bien todos los componentes

MEDIO-T**Preparación:**

PPLO (Difco)	21.00 g
Sorbitol	70.00 g
Fructosa	1.00 g
Suero de caballo	20% v/v
Agua destilada hasta completar	1.00 L

Mezclar bien todos los componentes.

MEDIO C-3

Preparación:

Medio 199 (GIBCO)	1.00 ml
Medio Schenider's Drosophila (GIBCO)	0.50 ml
Medio CMRL 1066 (GIBCO)	0.50 ml
Caldo PPLO (Difco)	1.50 g
Sucrosa	16.00 g
Extracto fresco de levadura	10.00 ml
Suero de caballo	20.00 ml
Rojo fenol	1.00 mg
Agua destilada	100.00 ml

Si se desea el medio sólido, debe agregarse 0.8 peso/volumen de Oxoid Ionagar No. 2.

MEDIO SIMPLIFICADO PARA EL ESPIROPLASMA DEL ACHAPARRIMIENTO DEL MAIZ.

Preparación:

Caldo PPLO	1.50 g
Sucrosa	16.00 g
Suero de Caballo	20.00 ml
Agua destilada	74.00 ml

Mezclar todo perfectamente.

D. BIBLIOGRAFIA

CHEN, T. A.; LIAO, C. H. 1975. Corn stund spiroplasma: isolation, cultivation and proof of pathogenicity. *Science*, 180:1015-1017.

- COLE, R. M.; TULLY, J. B.; POPKIN, T. J.; BOVE, J. M. 1973. Morphology, ultrastructure, and bacteriophage infection of the helical mycoplasma-like organism (*Spiroplasma citri* gen. nov. sp. nov.) cultured from "Stubborn" disease of citrus. *Journal Bacteriology* 115: 367-386.
- DANIELS, M. J.; MARKHAM, P. G.; MEDDINS, B. M.; PLASKITT, A. K.; TOWSSSEND, R.; BAR-JOSEPH, M. 1973. Axenic culture of plant pathogenic epiroplasma. *Nature (London)* 244:523-524.
- DANIELS, M. J.; MARKHAM, P. G.; MEDDINS, B. M.; PLASKITT, A. K.; TOWSSSEND, R.; BAR-JOSEPH, M. 1973. Axenic culture of a plant pathogenic spiroplasma. *Nature (London)* 244:523-524.
- DAVIS, R. E.; LEE, I. M.; FLETCHER, J. 1986. Cell wall free prokaryotes. Ed. por Sehaad, N.W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS. Press. ST. Paul Minnesota. p 140-158.
- FREUNDT, E. A. 1974. The mycoplasmas. Ed. por Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8 ed. Williams y Wilkins Co., Baltimore. p. 926-955.
- FREUNDT, E. A. 1981. Isolation, characterization, and identification of spiroplasmas and MLOs. Ed. por Maramoroch, K.; Raychaudhuri, S.P. *Mycoplasma diseases of tree and shrubs*. Academic Press. New York. p. 1-34
- FUDL-ALLAH, A.E.S.A.; CALAVAN, E. C.; IGWEGBE, E.C.K. 1972. Culture of mycoplasma-like organism associated with stubborn disease of citrus. *Phytopathology*. 62:729-731.
- JAYASINGNE, V.; SALAZAR, L. F. (Eds). 1993. *Manual de Técnicas en Virología de Plantas*. Unidad Técnica de Capacitación 1(TTU). Centro Internacional de la papa (CIP), Lima, Perú.
- LIAO, C. H.; CHEN, T. A. 1975. A simple medium for the isolation and cultivation of corn stunt spiroplasma. *Proceedings of the American Phytopathological Society*. 2:100.
- MARKHAM, P.G.; TOWNSEND, R.; PLASKITT, K.; SAGLIO, P. 1977. Transmission of corn stunt to dicotyledonous plants. *Plant Disease Reporter*. 61:342.

- MARKHAM, P. G.; TOWNSEND, R. 1984. Mycoplasma-like organisms as plant pathogens. In: Plant pathologist's pocketbook 2 ed. Commonwealth Mycological Institute. p. 78-89.
- RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Eds.) 1983. Methods in mycoplasmaology. Vol. I. Mycoplasma characterization. Academic Press. New York.
- RAZIN, S.; FREUNDT, E. A. 1984. The mycoplasmas. Ed. por Krieg, N.R.; Holt, J. E. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 1. Williams & Wilkins Co. Baltimore. p. 740-793.
- SAGLIO, P.; LAFLECHE, D.; BONISSOL, C.; BOVE, J. M. 1971. Isolement et culture in vitro des mycoplasmes associés au "stubdom" des agrumes et leur observation au microscope electronique. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences D 272:1387-1390.
- SAGLIO, P.; L. HOSPITAL; LAFLECHE, D.; DUPONT, G.; BOVE, J.M.; TULLY, J.G.; FREUNDT, E.A. 1973. *Spiroplasma citri* gen. and sp. n: Anycoplasma-like organism associated with "stubborn" disease of citrus. International Journal System Bacteriology. 23:191-204.
- TOWNSEND, R.; MARKHAM, P.G.; PLASKITT, K. A.; DANIELS, M. J. 1977. Isolation and characterization of a nonhelical strain of *Spiroplasma citri*. Journal Genetic Microbiology. 100:15-21.
- TULLY, J. G.; RAZIN, S. 1983. Methods in mycoplasmaology, Vol. 11. Diagnostic mycoplasmaology. Academic Press New York.
- WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G.; BOVE, J. M.; SAGLIO, P. 1973. Spiroplasmas and acholeplasma: multiplication. In: Insect Science 182: 1251-1253.

VII. AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este libro fué recibido el apoyo invaluable de los siguientes especialistas:

Asesores Técnicos

Dr. Leopoldo Fucikovsky Zak
M.C. María de Lourdes Rodríguez
Dr. Rafael Rodríguez Montessoro
M.C. Jorge E. López Nolasco
M.C. Cristian Nava Díaz
M.C. Carlos Zapote Martínez

Diseño de la portada

Lic. Ma. Isabel González Lago

Tipografía Computarizada e Ilustraciones

Téc. Eduardo Martínez Hernández

Apoyo Logístico

Lic. Mario Salvador Nájera Figueroa
Biól. Laura Rincón Alcántara
Téc. Brenda Espejel Lagunas

CHELSTON W.D. BRATHWAITE.

Nació en Barbados. Obtuvo su Bachillerato en Agricultura en la Facultad de Agricultura de la Universidad de las Antillas en Trinidad y Tobago; más tarde, logró una Maestría en Ciencias en la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York, y en el mismo centro de enseñanza, el Doctorado en Fitopatología.

En Cornell trabajó como Asistente de Enseñanza e Investigación en el Departamento de Patología Vegetal. En 1970 ocupó el cargo de Oficial de Protección Vegetal para Asuntos Tropicales, para la FAO. Desde 1971 hasta 1982 trabajó como Investigador y Profesor para la Facultad de Agricultura en la Universidad de las Antillas. Durante 1981 y 1982 ocupó el cargo de Especialista Regional de Protección Vegetal para la Región Caribe en el IICA. En 1982 fue designado Director y Representante de la agencia de Cooperación Técnica del IICA en Trinidad y Tobago y en 1988 fue nombrado Director Asistente de Operaciones para Centro América y el Caribe. En 1992 fue trasladado por el IICA a México como Representante Adjunto. En 1994 obtuvo un Diploma en Economía en el Wye College, Universidad de Londres. Actualmente ocupa un cargo en la Sede Central del IICA en San José, Costa Rica.

JUAN JOSÉ SALAZAR CRUZ.

Oriundo de Colombia. Se graduó en Medicina Veterinaria y Zootécnica en la Universidad Nacional de Bogotá; posteriormente obtuvo la Maestría en Ciencias de la Universidad de Carolina del Norte y el Doctorado de la Universidad de Florida; en la Facultad de Administración de Empresas de la Universidad de los Andes en Bogotá, alcanzó el título de Alta Gerencia.

Inició su carrera profesional como Investigador en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en el Depto. de Ciencias Animales; más tarde ocupó los cargos de subgerente de Fomento de la Caja de Crédito Agrario y de Gerente General de Vecol, empresa colombiana de productos biológicos. En 1980, fue nombrado Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de la Salle y de 1981 a 1990 se desempeñó como Director General del Fondo Financiero Agropecuario del Banco de la República de Colombia. A partir de 1991 se incorporó al IICA como Representante de la ACT en México, cargo que desempeña hasta la fecha.

Ha sido Asesor del Ministro de Agricultura de Colombia; consultor en varios Organismos Internacionales; profesor de la Universidad Nacional y de la Universidad de la Salle; miembro de varias Juntas Directivas y autor de publicaciones a nivel Nacional e Internacional.

IICA

