

ICA  
120  
10

# IICA



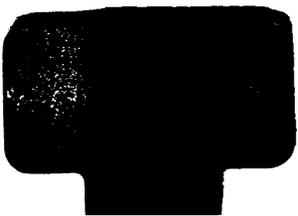
## INTRODUCCION AL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

### Diagnóstico Fitosanitario I



Chelston W. D. Brathwaite  
Carlos Sosa-Moss

AREA DE CONCENTRACION III  
SANIDAD AGROPECUARIA



ISBN 92-9039-276 7 ~~ISSN 0634-5391~~



# INTRODUCCION AL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

## Diagnóstico Fitosanitario I

Chelston W. D. Brathwaite  
Carlos Sosa-Moss

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

1995

00006957

1103

H20

30

1103  
H20  
30  
1103  
H20  
30  
1103  
H20  
30

**INTRODUCCION AL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS**

© CHELSTON W. D. BRATHWAITE

CARLOS SOSA-MOSS

IICA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

Primera edición. 1995.

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 0534-5391

ISBN 92-9039-276 7

IMPRESO EN MEXICO

PRINTED IN MEXICO

## **PRESENTACION**

La apertura comercial en los países de América Latina, es uno de los grandes eventos de finales del presente siglo, que exigirá muchos años de trabajo y esfuerzo para ser comprendido, implementado y consolidado.

Uno de los factores de mayor importancia para garantizar un comercio internacional de productos agrícolas, sin riesgos de diseminar plagas y patógenos de importancia cuarentenaria, dentro y entre los países que intercambien sus productos, es la confiabilidad y la oportunidad en los diagnósticos fitosanitarios.

La Agencia de Cooperación Técnica en México, del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, consciente de la importancia de la fitosanidad en el hemisferio, ofrece a los técnicos relacionados con esta actividad la presente publicación "INTRODUCCION AL DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS", con el deseo de que les sirva como una herramienta de base para el desarrollo de las técnicas de diagnóstico de los principales agentes causantes de enfermedades en las plantas.

**Atentamente**

**Juan José Salazar Cruz**

**Representante de la Agencia de Cooperación Técnica  
del IICA en México.**

**CHELSTON W. D. BRATHWAITE** nació en Barbados donde realizó su educación primaria y secundaria (1948-1962). En 1966 obtuvo su Bachillerato en Agricultura en la Facultad de Agricultura de la Universidad de las Antillas en Trinidad y Tobago. En 1968 obtuvo una Maestría en Ciencias en la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York, y en el mismo centro de enseñanza, el Doctorado en 1970.

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 en Roma. 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 con el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (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 Centroamérica 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. Desde 1995 ocupa el cargo de Director de Administración en la Sede Central del IICA en Costa Rica.

**CARLOS SOSA-MOSS** nació en Juchitepec, Edo., de México. En 1961 obtuvo el grado de Ingeniero Agrónomo Especialista en Parasitología, en la Escuela Nacional de Agricultura (ENA); en 1963, la Maestría en Ciencias Agrícolas en Entomología, en el Colegio de Postgraduados de la ENA; en 1966 se graduó como Doctor en Ciencias Naturales, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de París (Sorbonna), Francia y en 1981 realizó un Postdoctorado en la North Carolina State University en los E.U.A.

Las instituciones en las que se ha desarrollado profesionalmente son: Instituto para el Mejoramiento y la Producción de Azúcar (1961-1962) y en el Colegio de Postgraduados, en donde desde 1967 ha ocupado varios cargos: Presidente de la Rama de Entomología (1967-1971); Presidente de la Rama de Fitopatología (1973-1978); Profesor-Investigador Titular en Entomología, Fitopatología y Genética a nivel de Maestría y Doctorado; Coordinador de Actividades Editoriales (1989-1991) y Editor General de la Revista Agrociencia en sus siete series (1990-1994). Desde 1993 hasta la fecha es el Especialista en Sanidad Vegetal en el IICA-ACT México. Ha sido Profesor en la Escuela Nacional de Agricultura-Universidad Autónoma Chapingo, en el Instituto Politécnico Nacional, en la Universidad Central de Maracay en Venezuela y en el Dept. of Plant Pathology, North Carolina, State University. Ha participado en numerosos congresos y simposios, impartido conferencias, cursos a nivel licenciatura, posgrado y de capacitación a productores y técnicos. Ha sido autor de varios escritos técnicos relacionados con los convenios de libre comercio internacional de México. Ha sido editor, autor y coautor de libros científicos y técnicos, traducciones, artículos científicos, etc. Asimismo ha dirigido tesis de Licenciatura, Maestría y Doctorado. Se le han otorgado numerosas distinciones nacionales e internacionales.

## **PREFACIO**

Las enfermedades de las plantas son indudablemente uno de los factores principales que limitan la productividad de los cultivos agrícolas en todas las regiones del mundo. Para controlar cualquier enfermedad y reducir su impacto en la producción de alimentos, es indispensable hacer un diagnóstico correcto y oportuno, identificando al patógeno involucrado en el problema.

El objetivo principal de esta publicación es el de introducir a estudiantes, técnicos y otras personas a la patología de las plantas, para que aprendan los principios y técnicas básicas que se requieren para el diagnóstico de las enfermedades.

Estamos seguros de que así como la publicación "AN INTRODUCTION TO THE DIAGNOSIS OF PLANT DISEASE" escrita por Chelston W.D. Brathwaite y publicada por el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) en 1985, ha sido muy útil en los países de habla inglesa de nuestro continente, esta obra en español será de utilidad en los países hispano hablantes.

Los autores agradecen la colaboración recibida, por parte de la Srita. Lucinda Aranda, del M.C. Francisco Perdomo R., de la Srita. L. Brenda Espejel Lagunas y del Lic. Mario S. Nájera Figueroa.

**Chelston W.D. Brathwaite  
Carlos Sosa-Moss**

## INDICE

	Pág.
I. Diagnóstico de las enfermedades de las plantas . . . . .	7
II. El microscopio. . . . .	11
III. Esterilización del equipo . . . . .	23
IV. Medios del cultivo para hongos y bacterias . . . . .	29
V. Detección de hongos fitopatógenos en tejidos infectados . . . . .	39
VI. Detección de las bacterias fitopatógenas en tejidos infectados . . . . .	47
VII. Nematodos fitoparásitos . . . . .	55
VIII. Virus causantes de enfermedades en las plantas . . . . .	67
IX. Los micoplasmas como agentes causales de enfermedades en plantas . . . . .	71
X. Espiroplasmas fitopatógenos. . . . .	75
XI. Bibliografía . . . . .	77

# I

## DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

El diagnóstico de una enfermedad en un cultivo está basado principalmente en la observación de los síntomas que presentan las plantas y en la presencia de un agente patógeno dentro o sobre los tejidos enfermos.

Los síntomas de las enfermedades son muy variados y numerosos; dependen del vegetal, del patógeno, e incluso de los factores del medio en que se desarrolla el proceso patológico. No obstante, los síntomas principales pueden agruparse como sigue:

- Necrosis o muerte del tejido infectado (ejemplo: mancha foliar del banano causada por *Micosphaerella musicola*).
- Hiperplasia e hipertrofia, que es el aumento en el número y tamaño de las células, lo que da como resultado la formación de agallas, tumores o "escobas de bruja" (ejemplo: agallas de *Meloidogyne* spp., en tomate; tumores de *Agrobacterium tumefaciens*, en manzano; escoba de bruja causada por *Crinipellis perniciosus*, en cacao).
- Hipoplasia o hipotrofia, que es un crecimiento reducido cuya consecuencia es el enanismo característico de las plantas atacadas por nemátodos fitoparásitos (ejemplo: reducción del crecimiento de los tallos de alfalfa, causados por *Ditylenchus dipsaci*).

Los principales agentes patógenos que producen estos tipos de síntomas pueden ser: hongos, bacterias, virus, micoplasmas, nemátodos, etc.; incluso los insectos y los llamados desórdenes fisiológicos pueden causar enfermedades llamadas no parasitarias o no infecciosas. Dentro de estas últimas deben incluirse los desórdenes causados por condiciones climáticas adversas, carencias o excesos de un nutriente en particular, contaminantes, gases fitotóxicos, etc. (ejemplo: heladas; corazón negro de la papa causado

por deficiencias de boro; anillos cloróticos en las acículas del pino causados por ozono).

Existe la idea errónea de que el diagnóstico es tan simple como observar la planta, reconocer inmediatamente la enfermedad y dar recomendaciones completas para su control. Sin embargo, solamente en algunos casos puede ser así de sencillo; para la mayoría de las enfermedades el diagnóstico es delicado y en algunos casos muy laborioso.

El primer paso para controlar una enfermedad es la determinación del agente causal, esto puede ir de lo simple a lo complejo. Cuando la enfermedad es común y se tiene experiencia en diagnóstico, no siempre es necesario aislar al patógeno, pero en la mayoría de los casos es necesario el aislamiento y la identificación del agente etiológico con toda precisión, sobre todo en la actualidad, con la apertura del libre comercio entre bloques de países.

El diagnóstico basado únicamente en la observación de síntomas puede dar lugar a graves errores. Por ejemplo, una planta de tomate que presenta marchitez en un día soleado puede estar afectada por uno o más de los siguientes patógenos:

- *Pseudomonas solanacearum*, causante de la marchitez bacteriana.
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causante de marchitamiento.
- *Meloidogyne incognita* causante de agallas en las raíces, que impiden el flujo normal de savia.

Pueden, incluso, estar involucrados en la marchitez, daños a la raíz hechos por insectos, falta de agua, compuestos tóxicos en el suelo, etcétera.

Como puede verse, es necesario hacer una evaluación cuidadosa de la situación real, antes de emitir un diagnóstico correcto.

## **A. PASOS BASICOS EN EL DIAGNOSTICO DE UNA ENFERMEDAD**

Es necesario seguir una secuencia para hacer el diagnóstico de una enfermedad, como sigue:

- Examinar detenidamente la planta enferma para observar las partes afectadas (raíces, hojas jóvenes o viejas, ramas, tallos, etc).
- Anotar los tipos de síntomas (necrosis, canchros, tumores, manchas foliares, etc.; en este último caso, es importante observar si son angulosas, coalescentes, rodeadas por un halo, con margen definido, etc.).
- Observar si están presentes los signos del patógeno (conidióforos o conidias, masas de huevecillos de nemátodos, etc.), que pueden ser desprendidos de los tejidos dañados y examinados bajo el microscopio.
- Es muy importante conocer las condiciones en que se está desarrollando el cultivo, así como las prácticas agronómicas a que se le ha sometido.

Hecho lo anterior, debe compararse el síndrome de la enfermedad con la descripción presentada en un texto reconocido. Si no se está seguro de que la descripción coincide con lo señalado en el texto, es necesario aislar al patógeno.

## **B. PRECAUCIONES EN EL DIAGNOSTICO**

Cuando debe aislarse un patógeno para hacer el diagnóstico de una enfermedad, es necesario tomar en cuenta que:

- Nunca debe descartarse la posibilidad de que varios patógenos estén presentes al mismo tiempo en la misma planta o en partes de ella.
- Existen casos en que el daño de insectos chupadores puede ser confundido con síntomas de enfermedades causadas por hongos, bacterias o virus.
- Los nódulos formados por las bacterias nitrificantes en las raíces pueden ser confundidos con agallas inducidas por nemátodos.

## **C. RECOLECCION DE MUESTRAS**

Para diagnosticar la enfermedad es necesario tomar muestras, bien sea para analizarlas en la zona de trabajo o para enviarlas a alguna autoridad competente.

Para el caso de enfermedades de las partes aéreas de las plantas, son útiles las siguientes recomendaciones durante el muestreo:

- Recolectar todas las partes de la planta que muestren evidencia de la enfermedad
- Envolver las muestras en papel húmedo y ponerlas en una bolsa de plástico.
- Conservar las muestras en almacenamiento cuando no se puedan procesar de inmediato; si la conservación debe ser por largo tiempo, poner las muestras en una solución compuesta de formalina-ácido acético-alcohol (FAA). Esta solución se prepara mezclando 100 ml de etanol a 50%, con 10 ml de formalina y 10 ml de ácido acético glacial.
- Fotografiar las partes enfermas de las plantas con una película de color, resulta útil para el diagnóstico.

En el caso de ataque de nemátodos, generalmente es suficiente para el diagnóstico una muestra de suelo y de raíz, de 3 a 5 plantas afectadas, y una muestra similar de plantas sanas. Si las plantas son pequeñas, como zanahorias, lechugas, etc., lo mejor es tomar el sistema radical completo, con el suelo que las rodea (rizosfera), pero si las plantas son grandes, como plátano, papaya, etc., las muestras se toman en la región de las raíces que muestran pelos absorbentes (de 30 a 90 cm de separación de la base del tronco y a una profundidad de 15 a 20 cm).

Normalmente se toman de 6 a 8 sub-muestras de la rizosfera, usando una pala o cualquier otro implemento; después se mezclan las sub-muestras para constituir una muestra compuesta. Al mismo tiempo, se puede obtener una muestra de raíces con pelos absorbentes cortando algunas de ellas; una muestra adecuada es aproximadamente 500 ml de suelo y 100 gr de raíces.

Las muestras deben ser colocadas en bolsas de plástico, etiquetadas y conservadas en un contenedor frío hasta ser procesadas.

Como los nemátodos son muy sensibles al calor y a la desecación, las muestras deben ser procesadas lo antes posible; sin embargo, cuando no es factible su procesamiento inmediato, deben ser conservadas en un refrigerador a 5°C, por más de 10 días.

## **II EL MICROSCOPIO**

Debido a que la mayoría de los organismos que causan la enfermedad de la planta son muy pequeños para ser observados a simple vista, el microscopio es una herramienta importante en la fitopatología.

Existen diferentes tipos de microscopios desde el punto de vista de los detalles de su construcción; sin embargo, los principios fundamentales de su funcionamiento son los mismos.

### **A. EL MICROSCOPIO OPTICO**

#### **a. Estructura**

El microscopio consiste básicamente de dos sistemas:

- Un sistema óptico para ampliación de la imagen.
- Un sistema de iluminación para facilitar la visibilidad del espécimen.

#### **1. El sistema óptico**

La ampliación en un microscopio óptico se obtiene con una serie de lentes. El lente más cercano al espécimen se llama "objetivo" y el más cercano al ojo, "ocular". La ampliación total es el producto de los aumentos del ocular, multiplicados por los del objetivo.

A su vez, el lente objetivo está hecho de una combinación de lentes cóncavos y convexos. Generalmente, las lentes son fabricadas con diferentes tipos de cristal, para corregir las diversas aberraciones cromáticas y esféricas.

El microscopio simple, llamado lupa, de disección o estereoscópico, está compuesto por un ocular y un objetivo; los modelos más avanzados pueden tener dos y hasta tres lentes objetivo que, deslizándose horizontalmente en el tubo del microscopio, permiten incrementar los aumentos; en otros modelos, también recientes, el incremento progresivo de los aumentos se logra girando un tornillo graduado.

Un microscopio compuesto está normalmente equipado con tres lentes objetivo, para ir progresivamente incrementando el aumento; estos lentes son llamados "objetivo de bajo poder" (10x), "objetivo de alto poder en seco" (40X) y "objetivo de inmersión en aceite" (95-100X).

A medida que se incrementa el aumento, la distancia focal varía; entre más pequeña sea esta distancia, más cerca está la lente del objeto que se está observando. Algunos microscopios cuentan también con un "objetivo extra de bajo poder" (4X). Las lentes objetivo mencionadas están fijadas a una pieza rotatoria llamada "revólver", que permite rotarlas sobre un mismo eje.

Para poner en foco al objetivo sobre el espécimen, el microscopio está provisto de dos tornillos: el ajuste grueso se obtiene con el "tornillo macrométrico", que mueve el tubo del microscopio (o la platina en algunos modelos) hasta una distancia vertical que acerca el espécimen a un enfoque aproximado; el ajuste fino se hace con el "tornillo micrométrico" que mueve lentamente el tubo hasta lograr el enfoque preciso.

Algunos microscopios compuestos tienen un condensador, que es un sistema de lentes que une los haces de luz y los concentra sobre el espécimen. El condensador por lo general cuenta con un diafragma iris, que regula la cantidad de luz que pasa hacia el objeto que se está observando; puede también estar provisto de filtros de luz.

El objeto más pequeño que puede ser visto con el microscopio de luz es de cerca de  $0.2 \mu$  ( $1\mu=0.001 \text{ mm}$ ). Las bacterias, los hongos y nemátodos son más grandes que  $0.2 \mu$ , pero los virus y micoplasmas, que son más pequeños que  $0.2 \mu$ , sólo pueden ser observados en el microscopio electrónico.

## **2. El sistema de iluminación.**

El sistema de iluminación en un microscopio de disección o estereoscópico, puede estar compuesto de un espejo simple o de una fuente de luz incorporada. Si el microscopio está provisto únicamente de un espejo, éste debe acomodarse de tal manera que refleje la luz de una fuente externa y la proyecte hacia el sistema óptico, lo que permitirá iluminar el objeto que se está observando. Esto se logra gracias a que el espejo está montado en una pieza que permite girarlo en todos los sentidos.

En algunos microscopios de disección, pero sobre todo en los microscopios compuestos, el sistema de iluminación está constituido por una fuente de luz incorporada a la base del microscopio, provista de un sistema que permite regular la intensidad de la luz.

## **3. Iluminación de Köhler**

Para el uso del microscopio con resultados óptimos, es necesario que todo el sistema de iluminación esté enfocado correctamente. Esto permite, además de lograr imágenes más reales, proteger la vista de quien trabaja cotidianamente en el microscopio óptico.

A continuación se citan las ventajas de rectificar el sistema de iluminación, siguiendo las etapas recomendadas por Köhler:

- Campo visual uniformemente iluminado.
- Observación de una imagen brillante, pero sin reflejos que causen deslumbramiento.
- Protección del material que se está observando.

Para que en un microscopio pueda realizarse la iluminación de Köhler, es necesario que tenga: diafragma de campo luminoso (dispuesto en el pie del microscopio); condensador desplazable verticalmente; y lámpara con colector y con diafragma iris.

En seguida se describe el procedimiento:

- Subir completamente el condensador, con la lente frontal alineada.

- Enfocar la preparación con los objetivos a seco de menor aumento (6.3 ó 10x).
- Cerrar el diafragma de campo luminoso.
- Bajar lentamente el condensador, hasta obtener la máxima nitidez de la imagen del diafragma de campo.
- Centrar el diafragma de campo luminoso en el campo visual, utilizando los dos tornillos del condensador.
- Abrir el diafragma de campo luminoso, hasta que quede iluminado el borde del campo visual.

Hecho lo anterior, se habrá calibrado el sistema de iluminación del microscopio. Se recomienda hacer esta calibración regularmente, ya que cuando el equipo es usado por varias personas, el sistema de iluminación puede alterarse.

#### **4. Calibración para micrometría.**

Para medir un objeto o espécimen microscópico, es necesario un microscopio calibrado. Para calibrarlo, se necesita un "micrómetro ocular" que es una pieza circular pequeña, y un "micrómetro objetivo" que está montado sobre un portaobjetos.

El procedimiento es el siguiente:

- Desatomillar la lente superior del ocular y acomodar en el interior el micrómetro ocular, con la superficie donde está grabada la escala hacia arriba.
- Colocar sobre la platina del microscopio el micrómetro objetivo, con la superficie donde está grabada la escala hacia arriba.
- Localizar la escala del micrómetro objetivo, para observarla con un lente objetivo determinado.
- Superponer la escala del micrómetro ocular sobre la del micrómetro objetivo, de tal forma que las graduaciones o divisiones de una queden paralelas con las de la otra.
- Seleccionar en el extremo superior de las escalas dos divisiones (una de cada escala), y moviendo el carro de la platina hacer que coincidan.
- Buscar hacia abajo otra línea del micrómetro ocular, que coincida exactamente con otra del micrómetro objetivo.

- Contar el número de divisiones del micrómetro ocular y las del micrómetro objetivo que se encuentren entre las dos líneas que coinciden.
- Calcular el valor, en mm, de cada una de las divisiones del micrómetro ocular. Ejemplo: Si la escala del micrómetro objetivo es de 1 mm, con divisiones de 0.01 mm y se contaron 45 divisiones del micrómetro ocular y 35 del micrómetro objetivo, entonces cada división del ocular tendrá un valor de  $35/45 \times 0.01 = 0.0077$  mm, o sea  $7.7 \mu$ .
- Repetir este procedimiento con cada uno de los lentes objetivo que posea el microscopio.

Los valores obtenidos en la calibración del microscopio pueden aplicarse únicamente cuando se utilice el mismo micrómetro ocular, en el microscopio que fue calibrado.

Para medir el espécimen que se está observando, se acomoda el micrómetro ocular en un extremo del objeto y se cuenta el número de divisiones que abarca; este número se multiplica por el valor en micras que le corresponda a cada división, según el objetivo que se está usando. Considerando el valor obtenido de  $7.7 \mu$  en el ejemplo anterior, si el objeto abarca 14 divisiones del micrómetro ocular, medirá  $14 \times 7.7 = 80.8 \mu$ .

### **b. Utilización**

- Colocar el portaobjetos en la platina, con la superficie donde está el espécimen hacia arriba.
- Centrar, lo más posible, la sección que va a ser examinada en el orificio de la planta, moviendo los tornillos que desplazan el carro en los dos ejes horizontales.
- Ajustar el sistema de iluminación para que llegue al espécimen la cantidad apropiada de luz.
- Bajar el tubo del microscopio con el objetivo de bajo aumento en posición, girando el tornillo macrométrico hasta que el ocular quede aproximadamente a 0.5 cm del portaobjetos.
- Observar a través del ocular y subir o bajar lentamente el objetivo, hasta que el espécimen esté aproximadamente en foco. Debe tenerse cuidado de no bajar el ocular excesivamente porque se puede romper el portaobjetos y dañarse el lente objetivo
- Observar a través del ocular y mover lentamente el tubo, usando el tornillo macrométrico, hasta que el espécimen esté en foco.

- Obtener el enfoque preciso con el tornillo micrométrico.
- Examinar la preparación a bajo aumento, e ir cambiando los objetivos para obtener mayor aumento, rotando el revólver hasta que la lente entre en su lugar.
- Cuando se use la lente de inmersión en aceite, subir el tubo con el objetivo de inmersión en aceite acoplado. Poner una gota de aceite de inmersión sobre la porción de la preparación que va a observarse. Bajar lentamente el tubo hasta que el objetivo toque el aceite, sin tocar el portaobjetos. Esta operación, que es delicada, se facilita observando el microscopio lateralmente.
- Observar a través del ocular y enfocar lentamente, con el tornillo micrométrico, hasta que la imagen quede perfectamente en foco.

### **c. Cuidados y mantenimiento**

El microscopio es un instrumento óptico cuyos sistemas funcionan con mecanismos de precisión delicados, que requieren de cuidados y mantenimiento permanentes. La vida útil de esta importante herramienta de laboratorio depende de los cuidados con que se use, y de su mantenimiento y limpieza que son siempre necesarios, sobre todo en las regiones tropicales en donde las elevadas temperaturas y la alta humedad relativa provocan un deterioro acelerado, no sólo de las lentes, sino de todo el aparato en general.

Se recomienda tener los cuidados siguientes:

- Antes de usar por primera vez cualquier microscopio, es recomendable leer las instrucciones del manual.
- Nunca tocar las lentes con los dedos, ya que aunque estén limpios quedan huellas de grasa.
- Limpiar las lentes frotándolas cuidadosamente con papel especial seco o ligeramente humedecido con xilol o éter dietílico.
- Conservar la platina del microscopio limpia y seca.
- No incinar el microscopio cuando se trabaje con la lente de inmersión en aceite, para evitar que éste se derrame sobre el condensador y lo dañe.
- No forzar nunca ninguna parte del microscopio, puesto que todos sus componentes deben moverse libremente.

- Tener cuidado de que el objetivo nunca toque el cubreobjetos, ya que si éste se rompe puede rayar irreparablemente la lente del ocular.
- Nunca debe bajar el tubo con el tornillo macrométrico cuando desee ajustar el foco.
- No deben intercambiarse lentes entre diferentes microscopios, ya que cada aparato es ajustado en la fábrica con un juego determinado de ellos, y con otros el sistema óptico se altera.
- Guardar el microscopio en su caja cuando deje de usarse, o cubrirlo con su funda para protegerlo del polvo.

El mantenimiento del microscopio consiste en que a intervalos regulares de tiempo, que dependen del clima de la región en que se trabaja, debe llamarse al técnico de la empresa en la que se adquirió el aparato para que le haga una limpieza general, así como el ajuste y lubricación de todas las partes móviles.

## **B. EL MICROSCOPIO ELECTRONICO**

Los microscopios electrónicos se clasifican, de acuerdo con la forma en que son expuestos los detalles del espécimen, en:

- De transmisión
- De rastreo
- De emisión

En los dos primeros tipos, los electrones libres son disparados a partir de una fuente y actúan sobre los núcleos atómicos del espécimen, mientras que en los de emisión, el espécimen en sí es la fuente de radiación (Agar *et al.*, 1974; Hayat, 1973; Pinto, 1993).

El funcionamiento del microscopio electrónico se basa en dos características de los electrones: primera, los electrones presentan propiedades ondulatorias, asociándose la longitud de onda en forma inversamente proporcional a la velocidad de desplazamiento de éstos; segunda, el rayo de electrones puede ser enfocado pasándolo a través de un campo magnético.

Cuando un haz de electrones en el vacío incide sobre un objeto, las partículas que lo tocan pueden ser absorbidas, transmitidas o modificadas de distinta manera sus frecuencias.

El microscopio electrónico de emisión no es de gran utilidad para estudios biológicos; los que más se utilizan son el de transmisión y el de rastreo.

#### **a. Microscopio Electrónico de Transmisión (MET)**

El desarrollo del MET nace de la necesidad de observar los más diminutos detalles de las estructuras biológicas, lo que se logra por el altísimo poder de resolución que se obtiene con la longitud de onda del flujo iluminado de electrones (Locquin y Langeron, 1985).

El microscopio electrónico de transmisión está constituido básicamente por cuatro sistemas que son:

- Sistema óptico electrónico
- Sistema de haz de electrones
- Sistema de detección y amplificación
- Sistema de exhibición

Este aparato, al igual que los microscopios ópticos, proporciona una imagen en dos dimensiones; la alta resolución y magnificación que se obtiene está en función de la utilización de cortes ultrafinos (50-1000 Å de espesor), debido a que la formación de la imagen depende de los electrones transmitidos.

En fitopatología, el MET se utiliza básicamente para conocer las interacciones entre una planta y sus patógenos, a nivel de ultraestructura. También, con técnicas especiales, permite el estudio de partículas de virus, bacterias, etcétera.

En términos generales, la preparación de muestras para ser observadas en el MET consta de las siguientes fases:

- Selección adecuada de las muestras
- Fijación de las muestras

- Pretinción
- Infiltración
- Inclusión
- Seccionamiento
- Tinción
- Montaje
- Recubrimiento
- Observación

También en este caso los tiempos y concentraciones de todos los compuestos utilizados varían de acuerdo con la naturaleza del material que se va a observar (Glavert, 1974; Reid, 1974; Hayat, 1975; O'brien *et al.*, 1981; Foster, *et al.*, 1983).

#### **b. Microscopio Electrónico de Rastreo (MER)**

La observación de un espécimen en un MER se logra porque el aparato emite una "cortina" delgada de electrones que lo "barren" (scanning), haciendo resaltar con mucha nitidez los detalles de su superficie. Debido a lo anterior, a este tipo de microscopio electrónico se le llama también "de barrido".

El principio del microscopio electrónico de rastreo consiste, como en el caso de la televisión, en hacer coincidir punto por punto la superficie del objeto que se está observando con la de la pantalla fluorescente; las imágenes dadas por los electrones secundarios, los retrodifundidos y los absorbidos, son recogidas por captadores especiales y proyectadas en la pantalla fluorescente del aparato (Locquin y Langeron, 1985).

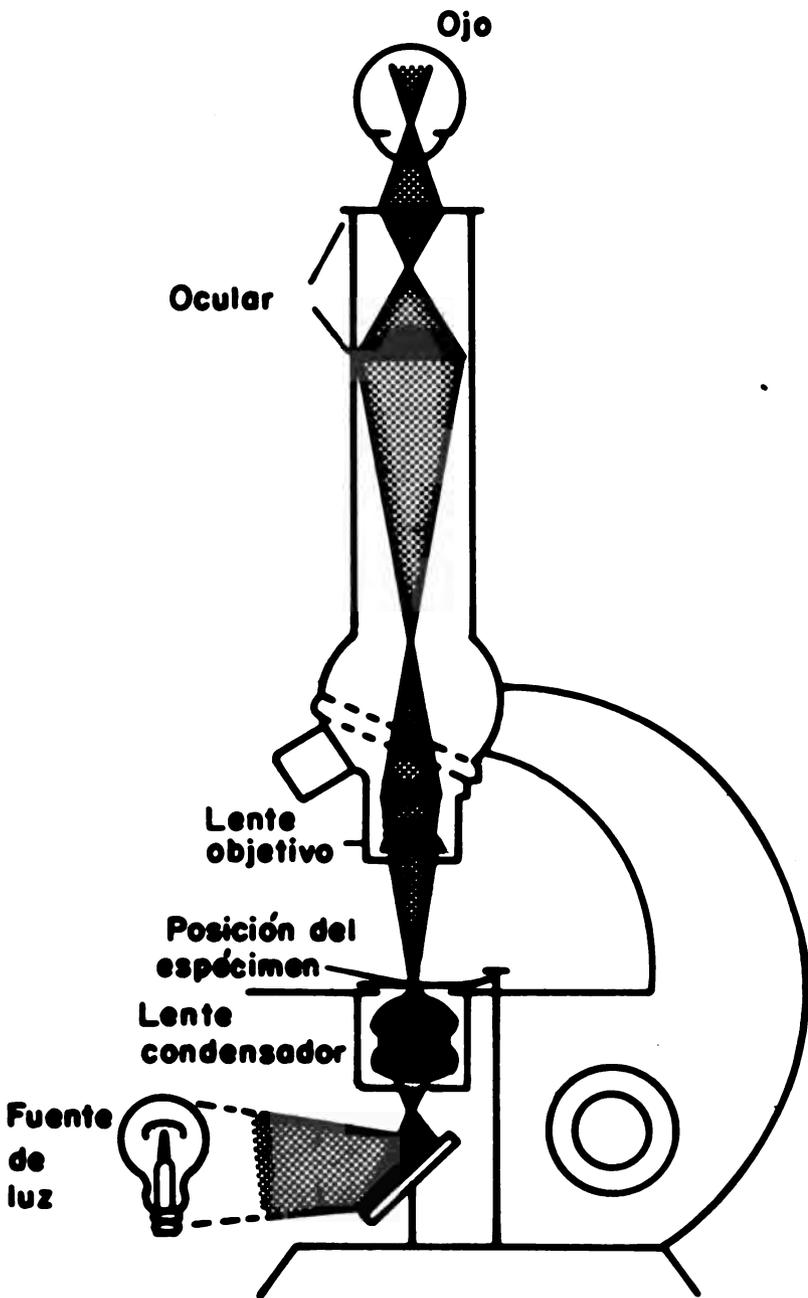
Se llaman electrones secundarios a los que son sacados de sus órbitas por el bombardeo incidente; permiten formar una imagen completa y no selectiva de tal o cual objeto, o bien dar una curva espectral de análisis. La "metalización" de la superficie de la muestra permite mejorar la emisión de electrones, porque equilibra las tensiones de polarización superficial y compensa los valores débiles de masa atómica de algunos componentes del objeto que se está observando; por otra parte, los componentes de la emisión secundaria hacen variar el contraste de la imagen.

Todo lo anterior da como resultado la formación de una imagen en relieve, análoga a la que se observa en un microscopio óptico estereoscópico; es decir, el microscopio electrónico de rastreo proporciona una imagen en tres dimensiones, debido a que los electrones no pasan a través del objeto, lo que permite observar muestras más gruesas que en el microscopio electrónico de transmisión (MET); además, la profundidad de campo es mayor que en el de transmisión, donde es considerablemente afectada por el grosor de la muestra.

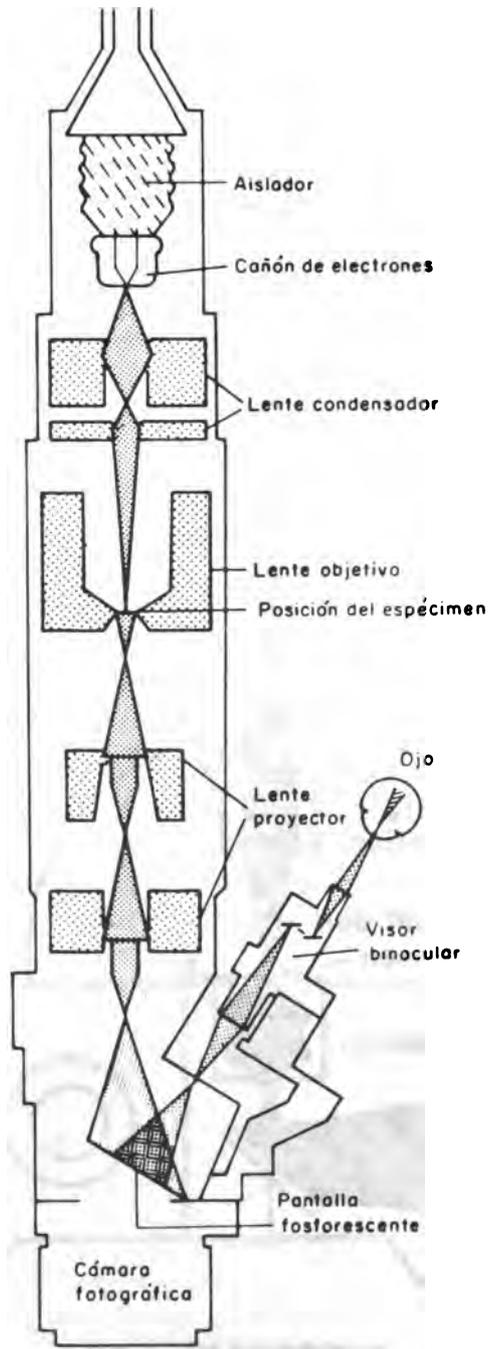
La preparación del material biológico para ser observado en el MER, consiste básicamente de los siguientes pasos:

- Fijación
- Postfijación con tetraóxido de osmio
- Deshidratación en una serie graduada de alcohol etílico a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 y 100%
- Secado por punto crítico en CO<sub>2</sub> líquido
- Metalización con oro, oro-paladio u otros metales preciosos
- Observación al MER para seleccionar los detalles de la muestra
- Fotografiar los detalles que interesan

Los tiempos y concentraciones de las diferentes soluciones que se utilizan, dependen de la naturaleza del material que se desea observar (O'Brien y McCully, 1981; Foster *et al.*, 1983; Hollenberg y Erickson, 1973; Bole y Parsons, 1973; Hayat, 1973 y 1974; Campbell y Porter, 1982).



**MICROSCOPIO DE LUZ**



**MICROSCOPIO ELECTRONICO**

### **III ESTERILIZACION DEL EQUIPO**

Para hacer el diagnóstico preciso de una enfermedad, es necesario aislar el (o los) patógeno causante y, en muchos casos, obtener cultivos puros del mismo para realizar pruebas de patogenicidad.

Todo este procedimiento se desarrolla en condiciones asépticas, por lo que es indispensable que los utensilios, recipientes de vidrio y otros materiales estén libres de cualquier microorganismo contaminante. También la mayoría de los medios de cultivo deben ser esterilizados; esto se tratará en el capítulo siguiente.

Uno de los aparatos más utilizados para la esterilización es la autoclave, por su eficiencia para destruir los microorganismos; esto se debe a que el calor húmedo causa la coagulación irreversible de las proteínas de las células vivas, a temperaturas de alrededor de 120°C, con una presión de cerca de 15 a 20 libras (psi).

#### **A. LA AUTOCLAVE**

La autoclave es un aparato que sirve para esterilizar con calor generado por vapor caliente en una cámara de presión; de esta manera se destruyen los microorganismos. Es un equipo esencial en fitopatología para esterilización del equipo, secado del material esterilizado y preparación de medios.

Estos aparatos presentan ciertos riesgos en su uso por la alta presión que se genera dentro de ellos; si no se manejan correctamente, pueden explotar causando daños a las instalaciones del laboratorio y quemaduras graves o la muerte a las personas presentes.

Las autoclaves son de dos tipos:

- Las que utilizan un flujo de vapor continuo generado fuera del aparato.
- Las convencionales en los que el vapor es generado dentro del aparato.

La eficiencia de los dos tipos de autoclave no debe compararse; sin embargo, al de flujo continuo, al ser de mayor capacidad, se utiliza para esterilizar grandes volúmenes de material, incluido suelo. En este último caso, se recomienda humedecerlo previamente y envasarlo en sacos de manta.

Por otra parte, sólo en algunos laboratorios se cuenta con una autoclave de flujo continuo, mientras que el otro tipo, que puede ser una olla de presión, llamada también olla express, es de fácil adquisición por su costo más bajo.

Para obtener los mejores resultados es necesario considerar las siguientes recomendaciones:

- Asegurarse que haya suficiente agua en la autoclave.
- Meter en ella lo que va a esterilizarse y cerrar perfectamente la tapa.
- Abrir la válvula de vapor y conectar el suministro de electricidad o encender el quemador de gas.
- Dejar salir por la válvula el aire caliente y vapor, durante 5 minutos.
- Pasado ese tiempo cerrar la válvula .
- Esperar a que se alcance la temperatura y presión de esterilización, que generalmente son 120 grados centígrados 20 libras.
- Dejar que la autoclave funcione por el tiempo requerido, que es alrededor de 15 minutos.
- Cortar el suministro de electricidad o apagar el gas.
- Esperar a que el aparato se enfríe para que la presión dentro de la autoclave baje a cero.
- Solamente en esas condiciones puede abrirse completamente la válvula de vapor.
- Esperar 5 minutos antes de abrir la tapa. Esto evitará que por los cambios bruscos de presión se rompan los materiales de vidrio que se están esterilizando.

## **B. OTROS METODOS DE ESTERILIZACION**

Dhingra y Sinciair (1987) describen los siguientes métodos de esterilización:

### **a. Esterilización por calor**

Este método es ampliamente utilizado en diferentes formas; la muerte de los microorganismos se logra por la temperatura elevada, tiempo de exposición y presencia o ausencia de humedad. A mayor temperatura se requiere menor tiempo de exposición y la presencia de humedad acelera considerablemente el proceso de esterilización; por ejemplo: la esterilización con calor seco requiere de 60 minutos a una temperatura de 160 °C, mientras que con humedad sólo 15 minutos a 121 °C son suficientes.

#### **1. Calor seco**

El aire caliente seco se usa frecuentemente en el laboratorio para la esterilización del equipo, siendo el mejor método para material de cristalería, como tubos de ensayo, matraces, cajas Petri, etc.; la temperatura más comúnmente usada es de 160°C durante una hora.

Para esterilizar la cristalería requerida, como pipetas, cajas Petri, matraces, etc., deben lavarse previamente con detergente, enjuagarse muy bien con agua corriente, luego con agua destilada y dejarse secar.

Antes de ser esterilizados, los matraces necesitan ser taponados con algodón o papel de aluminio; las pipetas deben ser seleccionadas por tamaño y luego envueltas en periódico o en otro tipo de papel similar; las cajas Petri se separan en lotes de 6 ó 12 y se meten en bolsas de papel de tamaño adecuado, o se envuelven en papel periódico o papel aluminio, fijando los paquetes con cinta adhesiva (masking-tape). La esterilización se realiza en un horno a 160°C por un mínimo de 2 horas.

Si se trata de otro tipo de materiales, para evitar el daños a los recipientes o equipo con partes de hule o de plástico, la esterilización debe hacerse en un autoclave, por sólo 20 minutos.

## **2. Incineración**

La incineración es el método más eficaz de esterilización, pero su aplicación es limitada. La esterilización a la flama se emplea en el laboratorio en forma corriente para agujas, asas, objetos de vidrio, como matraces, tubos de ensayo, portaobjetos y la superficie de ciertos materiales plásticos.

## **3. Ebullición intermitente**

Se utiliza para esterilizar medios de cultivo delicados que pueden ser dañados por una exposición prolongada a temperaturas muy altas. En estos casos, puede utilizarse el método llamado de tindalización, el cual es un proceso de ebullición intermitente con exposiciones de 20 a 45 minutos, durante 3 días consecutivos. El aparato utilizado se conoce como "vaporizador de Arnold", pero también se puede utilizar una autoclave provista con un sistema para programar el tratamiento.

### **b. Esterilización por filtración**

La filtración no es únicamente un método mecánico de cribado que depende sólo de la porosidad y espesor del filtro, sino que es un proceso en el que intervienen fenómenos fisicoquímicos complejos en que están involucrados la naturaleza y pH del fluido, la carga del filtro y el tipo de organismo que se quiere eliminar. Es un método recomendable para esterilizar sustancias termolábiles, particularmente fluidos biológicos, como sueros, vitaminas, enzimas, antibióticos, reguladores de crecimiento, entre otros.

### **c. Esterilización con radiaciones**

Las radiaciones electromagnéticas son utilizadas para la esterilización de materiales que no soportan el calor. El principio se basa en el efecto que ejercen sobre los microorganismos, causando daños en el ANA, ATP y/o coenzimas; también inducen la formación de radicales libres altamente reactivos, los que reaccionan con los constituyentes esenciales de las células, siendo éste el efecto más destructivo sobre los microorganismos.

La esterilización por radiaciones se emplea para sustancias termolábiles e incluso suelo, ya que produce poco calor.

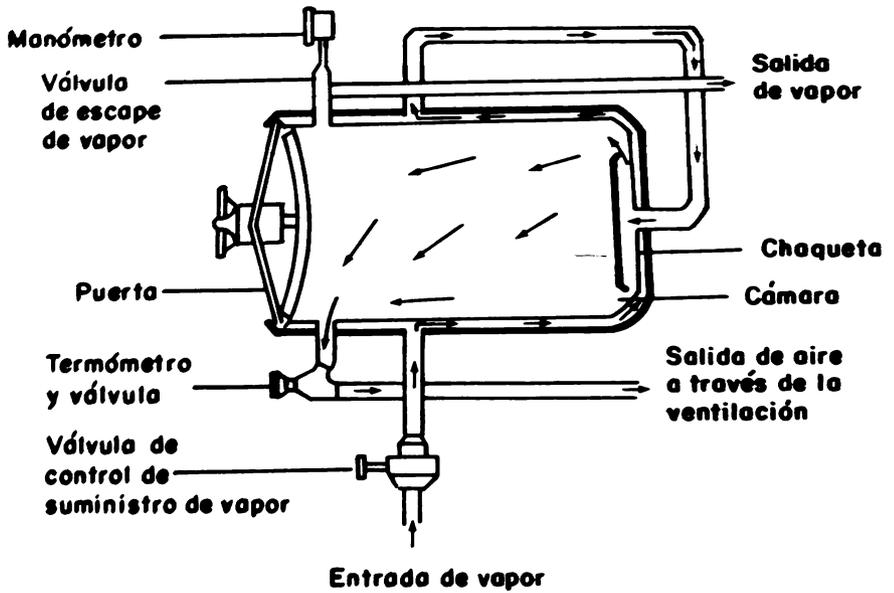
#### **d. Esterilización con gases**

Este tipo de esterilización es usado comúnmente con objetos que no pueden ser esterilizados por calor o por filtración.

Uno de los gases esterilizantes más eficientes y comúnmente usado es el óxido de etileno. Sin embargo, es altamente explosivo cuando se mezcla con el aire, tóxico aun a bajas concentraciones y es irritante al contacto con la piel. La flamabilidad se elimina mezclándolo con gases inertes, y se encuentra disponible en el comercio en forma de mezcla de 10% de óxido de etileno y 90% de dióxido de carbono o 19% de óxido de etileno y 81% de freón; además, este gas requiere de refrigeración.

Para que la esterilización con gas sea eficiente, la concentración debe variar entre 400 a 1000 mg por litro de volumen de la cámara, con un equivalente de 20 a 50% de la presión atmosférica. La esterilización requiere un tiempo mínimo de 3 horas; el tiempo a una temperatura fija está correlacionado inversamente con la concentración del gas.

El método tiene las ventajas siguientes: pueden eliminarse los microorganismos a baja temperatura y con baja humedad; los materiales pueden ser esterilizados dentro de recipientes donde los gases puedan difundir; requiere de equipo simple como cajas de plástico o caucho y cilindros metálicos o de plástico. Sus más grandes desventajas son: el largo tiempo requerido, que incrementa los costos, y que los gases usados son flamables y altamente tóxicos.



**AUTOCLAVE**

## **IV**

# **MEDIOS DE CULTIVO PARA HONGOS Y BACTERIAS**

Una vez que se han aislado los hongos o bacterias presentes en los tejidos infectados de las plantas enfermas, deben purificarse eliminando aquellos que son saprófitos y obtener cepas puras para hacer las pruebas de patogenicidad necesarias.

Para realizar lo anterior, es indispensable contar con medios de cultivo que permitan desarrollar las especies de hongos o bacterias que se deban identificar para hacer el diagnóstico de una enfermedad.

El cultivo de los microorganismos es necesario en la mayoría de los casos, ya que para su identificación hasta especie se requiere de las esporas u otras estructuras reproductivas, que generalmente es difícil obtener en condiciones naturales.

### **A. PREPARACION DE UN MEDIO**

A continuación se describen algunos de los aspectos fundamentales en la elaboración de los medios.

#### **a. Componentes de un medio**

Un medio adecuado para el cultivo de estos patógenos deberá incluir, dependiendo del organismo, desde fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas, hasta vitaminas y otras sustancias complejas de crecimiento. Estos compuestos pueden ser aportados por productos naturales tales como: partes de plantas (hojas, retoños, raíces, semillas, etc.) o infusiones o extractos de éstas; o por mezclas de determinadas sustancias químicas sintéticas de composición conocida.

Los medios líquidos generalmente tienen la misma composición que los sólidos, excepto que el agar, que es el elemento solidificante (también aporta nutrientes), no se incluye como componente.

El agar es un complejo de polisacáridos que se obtiene de un alga marina; es soluble en agua caliente a punto de ebullición y solidifica a 40°C para formar una gelatina relativamente clara. Normalmente se adiciona a los medios en 1.5 a 2% (15-20 g por litro de medio).

La mayoría de los medios usados comúnmente para hacer el diagnóstico de las enfermedades de las plantas se preparan fácilmente.

El procedimiento general es el siguiente:

- Colocar los ingredientes en las cantidades indicadas en la fórmula o receta, en un vaso de precipitados o matraz Erlenmeyer que pueda contener de una a dos veces el volumen final del medio que se va a preparar.
- Medir el volumen requerido de agua y añadir una parte poco a poco a los ingredientes, agitando constantemente para evitar que se formen grumos.
- Añadir el resto del agua cuando los ingredientes estén bien mezclados.
- Tapar con papel aluminio el recipiente.
- Calentar para que los ingredientes se disuelvan perfectamente y la mezcla quede lista para ser esterilizada.

Cuando el agar es componente de un medio, la mezcla debe calentarse hasta el punto de ebullición para disolverlo. Por el contrario, si debe agregarse un antibiótico u otra sustancia termolábil, primero debe ser esterilizada por filtración y después añadirse al medio ya esterilizado, frío.

### **b. El pH del medio**

Un factor importante en la preparación de los medios de cultivo es el pH. Los hongos generalmente crecen mejor en condiciones ácidas (pH de 5.5 a 5.8), a diferencia de las bacterias que se desarrollan mejor en medios casi neutros (pH de 6.8 a 7.0). El pH del medio puede ser conocido fácilmente con métodos colorimétricos, bien sea con tintes o papeles indicadores; sin embargo, cuando se requiere mayor precisión en la medida del pH, debe usarse un potenciómetro.

La acidez o alcalinidad del medio puede ser controlada al nivel requerido añadiendo, al medio todavía caliente, NaOH o HCl, según se desee subir o bajar su valor. El pH de un medio puede controlarse mejor si se prepara con una solución buffer en lugar de agua.

### **c. Distribución del medio**

En el caso de un medio de cultivo con agar, la mezcla caliente pero aún no esterilizada se vacía en tubos de ensayo; generalmente se vacían 12 ml del medio en cada tubo; los tubos más comúnmente usados son de 6 pulgadas de largo con un diámetro de 3/4 de pulgada.

Si el medio va a ser almacenado o usado en placas Petri, antes de ser esterilizado debe vaciarse en matraces Erlenmeyer de 300 ml o en botellas de la misma capacidad con tapa de rosca; se vacía un poco menos de 250 ml del medio, con ayuda de un embudo de 500-1000 ml de capacidad, al que se le adapta un tramo de tubo de látex con una pinza en el extremo distal para controlar el flujo.

### **d. Esterilización del medio**

Para evitar que se desarrollen microorganismos ajenos a aquellos que se pretende cultivar, debe eliminarse cualquier contaminación microbial, por lo que se recomienda esterilizar el medio de cultivo el mismo día en que se prepara. La esterilización se hace en una autoclave de vapor que puede ser una olla de presión.

Los tubos, con aproximadamente 12 ml del medio, se colocan holgadamente en canastillas de metal o en recipientes de otro tipo, que soporten temperaturas altas. Los matraces o botellas se meten directamente al esterilizador, acomodándolos de tal manera que permitan libremente la circulación del vapor entre ellos.

Para la esterilización se taponan los recipientes con algodón, sin apretar fuertemente, y después se tapan con una "capucha" de papel aluminio; esto permitirá la expansión del medio y del aire dentro del matraz o botella durante la operación. Transcurrido el tiempo de esterilización, antes de sacar los recipientes se aprietan bien los tapones.

La esterilización se completa en 20 minutos a una presión de 15 libras y 121°C de temperatura. Después de que este tiempo ha transcurrido, se debe permitir que la presión baje gradualmente a cero, antes de sacar del esterilizador los recipientes con el medio, porque si la presión es liberada rápidamente, el medio puede derramarse fuera de los recipientes y perderse. También puede derramarse y causar quemaduras graves si se sacuden o agitan los tubos o matraces mientras están siendo sacados del esterilizador, por lo que se recomienda manejarlos con mucho cuidado durante esta operación, hasta que se hayan enfriado.

#### **e. Preparación de medio inclinado o en placa**

Después de esterilizar tubos con un medio con agar, se colocan en posición inclinada, de tal manera que al enfriar y solidificar el medio, y dependiendo del grado de inclinación, quede una superficie de 1.25 a 8.5 cm de longitud, donde se cultivará el microorganismo. Si el cultivo va a hacerse en placas Petri, para vaciar en ellas el medio ya esterilizado, se debe dejar enfriar hasta cerca de los 50°C (a esta temperatura el matraz puede ser tolerado contra la cara o el antebrazo). Para realizar esta operación, en las cajas Petri previamente esterilizadas en grupos de 5 ó 6, se va añadiendo a cada una el medio aún derretido; esto se hace levantando la tapa apenas lo suficiente para vaciar el medio del matraz o botella. Se debe añadir suficiente medio para que cuando el agar solidifique quede una capa de aproximadamente 5 mm de profundidad; la cantidad que se requiere para esto es de 15 a 20 ml para las cajas Petri estándar.

Todo lo anterior debe realizarse en condiciones asépticas, que pueden lograrse con un mechero Bunsen; sin embargo, los riesgos de contaminación se reducen casi por completo si se hace la transferencia del medio a las cajas Petri en un Microboid o en una cámara de flujo laminar.

### **B. CLASIFICACION DE LOS MEDIOS**

Los medios de cultivo pueden ser clasificados, de acuerdo con su composición, en sintéticos, semisintéticos y naturales. También pueden clasificarse en básicos o selectivos, tomando como base su efecto sobre el microorganismo que se pretende cultivar.

**a. Medios sintéticos, semisintéticos y naturales.**

Los medios sintéticos son aquéllos cuya composición química es conocida exactamente; los semisintéticos, aquéllos en los cuales sólo la composición de unos pocos de los ingredientes se conocen; en tanto que los naturales son elaborados con partes de vegetales o productos animales, de naturaleza compleja y cuya composición exacta es desconocida.

Como ejemplo de un medio sintético puede citarse al de HANGLUND Y KING; de un semisintético, al EXTRACTO DE MALTA-DEXTROSA-PEPTONA-AGAR; y de un natural, al agar-harina de avena, cuya composición dependerá de la calidad de la avena usada, que a su vez depende de la variedad, el estado de madurez del grano y otros factores desconocidos.

**b. Medios básicos**

Los medios básicos o de uso general son aquellos que permiten el cultivo de varias especies de microorganismos, bien sean hongos, bacterias o ambos.

Ejemplos de medios de cultivo básicos.

**- Papa-Dextrosa-Agar (PDA)**

Ingredientes:

Papa pelada y rebanada	.....	200 g
Agar	.....	17 g
Dextrosa	.....	20 g
Agua destilada o de la llave	.....	1 000 ml

Preparación:

Hervir la papa en 500 ml de agua por 20 a 30 minutos a fuego lento.

Filtrar el caldo de papa a través de 2 o 3 capas de gasa para quitar los residuos de papa.

Derretir el agar en otros 500 ml de agua, en autoclave u olla de presión.

Añadir 20 g de dextrosa al agar derretido.

Mezclar el caldo caliente de papa y el agar derretido.

Agregar agua destilada hasta completar un litro. Mezclar todo cuidadosamente y vaciar el medio en tubos de ensayo o matraces, taparlos con algodón.

Esterilizar en autoclave.

- Agar Nutritivo (AN).

Ingredientes:

Extracto de carne (beef extract) .....	3 g
Peptona .....	5 g
Agar .....	15 g
Agua destilada o de la llave .....	1000 ml

Preparación:

Colocar en el agua el extracto de carne, la peptona y el agar.

Calentar hasta que todo quede bien disuelto.

Vaciar el medio en tubos, matraces o botellas.

Taponar los recipientes con algodón o con otro material adecuado como papel aluminio.

Esterilizar en autoclave.

El pH del medio deberá ser de cerca de 6.8.

Si en lugar de un medio sólido se desea un caldo nutritivo, se prepara con los mismos ingredientes, omitiendo el agar.

- Agar-agua (AA).

Ingredientes:

Agua destilada .....	1000 ml.
Agar .....	15-20 g.

Preparación:

Disolver el agar en el agua, calentándola.

Medir el pH con un indicador colorimétrico o con un potenciómetro.

Adicionar HCl 1N o bien NaOH para ajustar el pH. Vaciar el medio en tubos, matraces o botellas.

Taponar los recipientes con algodón o con otro material.

Esterilizar en autoclave.

**- Agar-frijol**

**Ingredientes:**

Frijol	.....	200 g
Agar	.....	15 g
Agua destilada	.....	1000 ml

**Preparación:**

Licuar el frijol congelado, en una licuadora de cocina, añadiéndole agua hasta que la pasta quede fina y suave.

Añadir el agar a la mezcla y calentar para disolver el agar.

Vaciar el medio en tubos, matraces o botellas.

Tapar los recipientes con algodón u otro material adecuado.

Esterilizar en autoclave.

**- Agar-harina de avena**

**Ingredientes:**

Harina de avena	.....	100 g
Agar	.....	15 g
Agua destilada	.....	1000 ml

**Preparación:**

Mezclar la harina de avena en el agua a 70°C, aproximadamente.

Mantener la mezcla a 60°C por cerca de una hora.

Completar el volumen con agua destilada a un litro.

Añadir el agar y calentar para que se disuelva.

Vaciar el medio en tubos, matraces o botellas.

Tapar los recipientes con algodón u otro material apropiado.

Esterilizar en autoclave.

### **b. Medios de cultivo selectivos**

Los medios de cultivo pueden hacerse selectivos de dos maneras; añadiendo algunas sustancias químicas o modificando el pH a un medio básico puede inhibirse el crecimiento de ciertos microorganismos, mientras que permite el crecimiento de algún organismo deseado; o hacerlos selectivos con base en los ingredientes específicos utilizados en su elaboración.

Esta propiedad selectiva de los medios de cultivo es muy útil para aislar algunos hongos de tejidos infectados o que están en el suelo.

#### **1. Medios básicos transformados en selectivos**

Existen varias maneras de hacer selectivos a los medios básicos; a continuación se mencionan algunos ejemplos.

La adición de antibióticos a un medio de cultivo elimina muchas bacterias, facilitando el crecimiento y aislamiento de hongos fitopatógenos (100 ppm de estreptomycin inhiben el crecimiento de la mayoría de bacterias).

Alterar el pH, puede también ser utilizado eficazmente para impedir el desarrollo de bacterias, cuando se pretende aislar a ciertos hongos fitopatógenos. Como es sabido, las bacterias crecen mejor en medios con pH de 6.8 a 7.0, y la mayoría de los hongos, en pH de 5.0 a 5.8, por lo que un medio con pH bajo inhibirá el desarrollo de bacterias y favorecerá el crecimiento de hongos.

Añadiendo una o dos gotas de una solución de ácido láctico, a 25%, a 10 ml de agar derretido, se inhibe el crecimiento de bacterias en un medio para aislar hongos.

Como ejemplo de un medio de cultivo básico transformado en selectivo, tenemos la HARINA DE MAIZ-AGAR, que al agregarle 10 mg de Piramicina, 200 mg de Vancomicina y 100 mg de Pentacloronitrobenzeno se transforma en el medio selectivo PVP, que permite separar especies del género *Phytophthora*.

## **2. Medios selectivos desarrollados como tales**

Se han desarrollado también medios específicos que son selectivos porque sólo permiten el crecimiento a ciertas especies de microorganismos o inducen a éstos a formar sus estructuras reproductivas.

Un ejemplo de medios selectivos *per se* es el de RAYMUNDO Y YOUNG, desarrollado en 1974 específicamente para obtener crecimiento y producción de uredosporas de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*.



## V

# **DETECCION DE HONGOS FITOPATOGENOS EN TEJIDOS INFECTADOS**

El diagnóstico de las enfermedades causadas por hongos puede ser relativamente fácil, cuando se tiene experiencia y cuando los síntomas son tan claros y tan específicos que no existe posibilidad de cometer un error. En los casos en que no es posible hacer esto, pero se sospecha de alguna especie en particular como responsable de causar la enfermedad, se puede hacer un diagnóstico preliminar en corto tiempo, inoculando plantas susceptibles y observando el desarrollo del patógeno dentro de sus tejidos.

### **A. DIAGNOSTICO PRELIMINAR**

La esporas son las entidades o unidades infectivas de los hongos fitopatógenos. Cuando existen las condiciones ambientales para su desarrollo y están en una planta susceptible, germinan en la superficie de la hoja o en cualquier otro órgano sensible, y penetran a los tejidos para causar la infección. Esta fase del proceso infectivo puede observarse fácilmente mediante la técnica llamada de montaje total.

Como es indispensable conocer de manera precisa el momento en que se inicia la infección, esto no puede hacerse en material enfermo procedente del campo, sino que se realiza después de que una planta ha sido inoculada con las esporas de un hongo fitopatógeno.

Después de la inoculación se recolectan las hojas o partes afectadas a intervalos regulares de tiempo (6, 18, 32 y 48 horas) y se colocan en una solución llamada de Carnoy, que no es más que una mezcla de dos partes de ácido acético glacial y una parte de alcohol etílico absoluto. Se dejan

en la solución durante 24 horas, y se transfieren a lactofenol claro en donde se dejan por otras 24 horas; transcurrido ese tiempo, se tifican durante 8 a 10 h en lactofenol-fucsina ácida a 0.1%. Finalmente, se enjuagan con lactofenol claro y se montan en la misma solución.

Esto permite observar al microscopio las hifas e incluso los cuerpos fructíferos y esporas de los hongos, si están presentes, ya que el colorante tifican de rosa a estas estructuras, pero no a los tejidos de la planta, pudiendo identificarse el género y la especie a la que pertenece, estableciéndose así la relación entre el patógeno y la enfermedad.

En la mayoría de los casos el reconocimiento y la identificación del hongo fitopatógeno no es tan fácil, sobre todo cuando están presentes otras especies tanto patógenas como saprófitas que hacen más complejo el problema, lo que obliga a utilizar otras técnicas más elaboradas para hacer el diagnóstico de la enfermedad.

## **B. DETECCION DEL HONGO EN LOS TEJIDOS INFECTADOS**

En algunos casos, la existencia de un hongo patógeno es revelada por la observación a simple vista de sus estructuras reproductivas o vegetativas en la superficie de los tejidos infectados (ejemplo: las esporas de mildew polvoriento en hojas de varias especies de plantas, se ven fácilmente). Sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario observar los tejidos con lentes de aumento, lo que puede hacerse con una simple lupa de mano (aumento 10-20x), con un microscopio estereoscópico o con uno compuesto.

Muchos hongos producen sus esporas sobre unas estructuras que semejan tallos y que emergen de los tejidos enfermos de la planta. Las esporas varían en forma, tamaño y color; como ejemplos pueden mencionarse: las esporas largas, oscuras, en forma de cigarro, de *Helminthosporium* spp, causantes de lesiones en hojas de cereales y pastos; las pequeñas esporas hialinas, ovales o redondas de *Botrytis* spp, que son producidas en conjuntos que semejan racimos de uvas sobre los tejidos de flores y otros órganos de las plantas, durante períodos húmedos; las esporas hialinas en forma de barril de *Erysiphe* spp, causantes del mildew,

que se presentan formando cadenas en las hojas de cereales, lechuga y otras plantas.

Numerosos hongos producen sus esporas en diminutas estructuras en forma de recipiente, llamadas picnidios. Cuando predominan condiciones húmedas, las esporas son liberadas en una matriz mucilaginosa que aparece como unas gotitas brillantes alrededor del estoma del diminuto picnidio.

Algunas veces el hongo patógeno no es aparente cuando el tejido enfermo se examina al microscopio. En tales casos, el material vegetal debe lavarse con una solución detergente, enjuagando bien con agua; luego se coloca en un recipiente cerrado (caja Petri, tubo de ensayo, frasco, etc.) que contenga papel filtro o toallas de papel humedecidos; el patógeno normalmente emergerá de los tejidos enfermos y en la superficie presentará sus estructuras reproductivas.

El micelio de un hongo es fácilmente distinguible de los tejidos vegetales cuando se emplea un colorante diferencial, como azul de algodón en lactofenol. Para elaborar este colorante se debe preparar primero la solución de lactofenol, mezclando 20 ml de ácido láctico, 30 ml de glicerina, 20 ml de agua destilada y 20 g de fenol, calentando hasta que este último se derrita. A una mitad de la solución de lactofenol se le añaden 2.5 ml de una solución a 1.0% de azul de algodón en agua destilada. Para obtener mejores resultados se recomienda filtrar antes la solución de azul de algodón, para eliminar los grumos. La otra mitad del lactofenol preparado se deja sin colorante y se le llama "lactofenol claro".

Es importante señalar que se debe tener cuidado de que los objetivos del microscopio no entren en contacto con la solución de lactofenol porque puede dañarlos. También debe tenerse mucho cuidado al manejar el fenol, ya que puede causar quemaduras serias en la piel.

Para observar al hongo, se hacen trozos pequeños o cortes muy finos del tejido enfermo, se colocan en un portaobjetos y se añaden unas cuantas gotas del colorante. El portaobjetos se calienta sobre la flama hasta que la solución comience a vaporizar. Se enjuaga entonces el material vegetal con unas gotas de lactofenol claro, y se pasa a un nuevo portaobjetos con 1 ó 2 gotas de esta misma solución; se coloca el cubreobjetos y se observa al microscopio.

El micelio del hongo se colorea de azul mientras que los tejidos de la planta permanecen sin tefirse.

### **C. AISLAMIENTO DEL HONGO**

Las bacterias y los hongos se encuentran siempre presentes como contaminantes de los tejidos vegetales; por tal razón, cuando se trata de aislar un hongo fitopatógeno y cultivarlo puro, es importante eliminar las bacterias y otros hongos que estén contaminando el área de trabajo, el equipo que se va a usar y la superficie del tejido enfermo.

Se debe limpiar la superficie de la mesa de trabajo con un trapo humedecido con agua o con una solución desinfectante de cloruro de mercurio (1:1000 ) o de hipoclorito de sodio.

Antes de usar instrumentos como bisturís, pinzas, agujas de disección, etc, éstos deben ser sumergidos en etanol a 70% y luego flameados, para evitar la contaminación del tejido enfermo; después de esterilizarlos, deben dejarse enfriar por aproximadamente un minuto, para no quemar los tejidos.

#### **a. Desinfección del tejido enfermo**

En la superficie de las partes leñosas de las plantas, los microorganismos contaminantes se destruyen fácilmente si se sumergen las muestras en etanol a 70%, se pasan por la flama y se deja que el alcohol se queme. Este tratamiento no debe aplicarse a tejidos carnosos tales como hojas, yemas, partes florales o algunas semillas, porque es muy drástico; se recomienda tratarlos con cloro de uso doméstico (blanqueador de ropa).

El ingrediente activo del cloro casero es el hipoclorito de sodio y generalmente está a una concentración de aproximadamente 5.25%. Este blanqueador se diluye en agua (1:9) para obtener una solución a 0.5% del ingrediente activo que es el desinfectante.

Si la superficie del tejido vegetal es difícil de mojar, para asegurar su desinfección es necesario tratarlo con etanol a 70% o con una solución de un agente humectante (1-2 gotas de Agral en 1000 ml de agua o solución de Decon 90 a 2%), antes de sumergirlo en el desinfectante.

Cuando la zona afectada es pequeña (manchas foliares o lesiones en el tallo) se corta un poco del tejido sano adyacente y que rodea a la parte enferma, se enjuaga con un agente humectante y se sumerge en el desinfectante.

Si el área afectada abarca una porción grande de la hoja, tallo, etc., como sucede con algunos tizones, se remueve una porción del órgano vegetal que incluya tejido enfermo y parte del sano, adyacente al margen de la zona enferma, luego se enjuaga en un agente humectante y se sumerge en el desinfectante. Una porción de tejido de 1 cm<sup>2</sup> puede ser manejado fácilmente de esta manera; además de proporcionar suficiente material para el diagnóstico, se puede estar seguro de que el desinfectante eliminó a los organismos contaminantes.

El tiempo que debe estar el material en el desinfectante varía de acuerdo con el tipo de tejido de que se trate; puede variar de 1 a 2 minutos si es delgado o muy camoso, y de 10 a 15, si son semillas duras.

Además de los desinfectantes mencionados, pueden usarse los siguientes:

Alcohol a 95%. Sumergir los tejidos por 3 segundos.

Peróxido de hidrógeno a 50%. Sumergir los tejidos por 15 segundos a 5 minutos.

Formalina a 0.4%. Sumergir los tejidos de 15 segundos a 5 minutos.

#### **b. Siembra del tejido infectado en el medio de cultivo**

El tejido desinfectado es secado en toallas de papel, luego se corta en pedazos pequeños de 1 a 2 mm<sup>2</sup> que se depositan en la superficie de un medio con agar en placas Petri. La tapa de la placa Petri debe levantarse apenas lo suficiente para que los trocitos de tejido puedan ser colocados fácilmente en el medio. Se colocan cuatro o cinco pedazos de tejido, espaciados equidistantemente en la superficie del medio.

En el caso de tejido leñoso, se elimina la corteza usando pinzas esterilizadas, antes de cortar y acomodar los pequeños trozos en el medio de cultivo de las cajas Petri como se describió anteriormente.

Una vez sembradas las cajas Petri, se mantienen a una temperatura de 25 a 30°C por algunos días para permitir que el patógeno emerja de los tejidos y se desarrolle sobre el medio. Cuando el crecimiento fungal originado en varios pedazos de tejido es homogéneo, se puede considerar que el patógeno ha sido aislado.

### **D. OBTENCION DE CULTIVOS PUROS**

Una vez aislado el hongo, es necesario obtener cultivos puros del mismo para realizar las pruebas de patogenicidad que conduzcan a un diagnóstico confiable. Para lograr los cultivos puros, se transfieren fragmentos de cada una de las colonias del hongo obtenidas en las cajas Petri, a tubos individuales con el mismo medio.

El paso del hongo de la caja Petri a los tubos puede hacerse fácilmente con una aguja de transferencia que se calienta sobre una flama hasta que se pone roja, luego se enfría tocando una zona del medio de agar que esté libre del crecimiento del hongo y se translada una porción pequeñísima de la colonia fungal, al centro de la superficie inclinada del medio en el tubo.

Normalmente el hongo patógeno puede mantenerse en cultivo puro por largos períodos, almacenándolo a 5°C aproximadamente y transfiriéndolo a tubos con medio fresco cada 2 a 3 meses. Es conveniente señalar que con este método se pierde gradualmente la patogenicidad, y se presentan variaciones en la forma de las esporas, lo que da lugar a errores.

Para evitar lo anterior, se han desarrollado técnicas de preservación específicas para grupos de hongos; dentro de ellas pueden mencionarse, además de la liofilización, la preservación en aceite mineral, sílica gel, en suelo, en agua esterilizada, en seco, etcétera.

### **E. OBSERVACION DE LAS CARACTERISTICAS DE LOS HONGOS AISLADOS**

Las características de una colonia de hongos cultivados en un medio de agar en caja Petri, pueden ser observadas al microscopio poniendo la

caja destapada en la platina del microscopio y colocando cuidadosamente un cubreobjetos sobre el margen de crecimiento de la colonia. Para observar en detalle las características del micelio y de las esporas, se transfieren con una aguja de disección pedacitos del cultivo del hongo a una gota pequeña de agua en un portaobjetos; se coloca el cubreobjetos lentamente sobre la gota y se inspecciona el material a través del microscopio.

La técnica de cultivo en un portaobjetos es especialmente útil para determinar la forma de esporulación de un hongo patógeno. Para esto se prepara una caja Petri con dos piezas de papel filtro de 9 cm de diámetro, un pedazo de varilla de vidrio doblada, un portaobjetos estándar y un cubreobjetos de 22 - 30 mm. La caja Petri y su contenido son esterilizados a una presión de 15 libras y a una temperatura de 121°C por 15 a 20 minutos.

Cuando se tiene preparada esa caja Petri, de otra que contenga Agar-Agua o PDA esterilizado, se cortan con un bisturí, también esterilizado, cuadritos de medio más pequeños que el cubreobjetos. Se pasa un bloquecito de medio al portaobjetos esterilizado de la primera caja Petri y se coloca el cubreobjetos con pinzas previamente también esterilizadas. Hecho esto, se inocula el pequeño bioque de medio colocando pedacitos de micelio y/o esporas de un cultivo del hongo, al centro de cada uno de los cuatro lados del bloque. En las piezas de papel filtro que se acomodaron en la caja Petri, se agrega una solución acuosa de glicerina a 5% para mantener la humedad dentro de la caja una vez tapada.

Las cajas Petri así preparadas se conservan a 25-30°C por varios días para permitir el crecimiento y la esporulación del hongo.

El portaobjetos con el cultivo que se desarrolló en el bioque de medio se acomoda en la platina del microscopio para observarlo, determinando así las características del micelio y otras estructuras del hongo, tales como la manera en que las esporas son producidas, su forma, tamaño, etcétera.

Las estructuras de los hongos pueden ser más claramente visibles si se tiñen con una solución a 1% de fucsina ácida o azul de algodón en lactofenol. Se añaden 1 o 2 gotas del colorante a un portaobjetos, luego se transfiere un poco de micelio del hongo a la gota y se cubre con un cubreobjetos, para observar al microscopio.

Si el micelio se colocó en agua, se puede colorear añadiendo tinte al montaje, colocándolo en el borde del cubreobjetos. Para que el colorante penetre a la preparación, se pone un pedazo de papel absorbente en contacto con el agua en la orilla opuesta del cubreobjetos.

Las características morfológicas del hongo permiten identificar a los hongos involucrados en el proceso patogénico. Para establecer con precisión la relación planta-patógeno, es necesario conducir una serie de pruebas para cumplir con los postulados de Koch.

## VI DETECCION DE BACTERIAS PATOGENAS EN TEJIDOS INFECTADOS

No es muy difícil reconocer si una enfermedad es causada por bacterias, debido a que los síntomas en los vegetales atacados son muy característicos; sin embargo, en algunos casos los tejidos afectados muestran necrosis o manchas, tan similares a las causadas por hongos, que hasta científicos con experiencia han emitido diagnósticos erróneos con consecuencias graves. Como ejemplo de esto último, puede citarse a la falsa bacteriosis de los cítricos en México, que se aseguró por expertos bacteriólogos extranjeros de muy alto nivel, que era causada por *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, cuando en realidad el patógeno responsable es el hongo *Alternaria limicola*.

Lo anterior demuestra que el diagnóstico de las enfermedades de las plantas es una actividad delicada que debe estar a cargo de personas responsables y bien preparadas.

### A. DETECCION DE LAS BACTERIAS

La presencia de bacterias fitopatógenas en el tejido vegetal infectado así como la determinación de su tamaño y forma, puede ser detectada mediante la técnica llamada "Tinción Negativa o de Fondo".

Esta técnica consiste en colocar una gota de solución del tinte Rojo Congo a 2% en agua destilada, sobre un portaobjetos limpio. En seguida, con un bisturí esterilizado se corta un trozo pequeño (1-2 mm<sup>2</sup>) de tejido enfermo, en el límite entre éste y el sano, se coloca en la gota de colorante y se tritura con el bisturí. Después de 1 a 2 minutos se retiran los fragmentos de tejido del portaobjetos y la solución se esparce sobre el portaobjetos. Se deja secar el tinte sin calentarlo y luego se depositan sobre él 2 ó 3

gotas de alcohol ácido que se prepara agregando 3 gotas de HCl concentrado en 30 ml de etanol a 95%; el alcohol ácido vira la tinción de rojo a azul. Cuando el alcohol se evapora, se añade una gota de aceite de inmersión sobre la porción teñida del portaobjetos y se examina directamente bajo el microscopio con la lente de inmersión o con la de alto aumento en seco; en este último caso se coloca una gota de aceite mineral sobre la porción teñida y se cubre con un cubreobjetos.

Con esta técnica las bacterias aparecen como pequeñas células blancas en forma de barra, sobre un fondo azul.

Es importante señalar que si el tinte no se esparce en una capa fina sobre el portaobjetos, el fondo aparecerá negro o azul muy oscuro y no se podrán ver las bacterias. También, si se usa mucho tejido vegetal para hacer la preparación, el tinte puede precipitar y no dará el resultado deseado.

Otra metodología para detectar bacterias fitopatógenas es la citada por Mayea y Padrón (1983), la cual se describe enseguida:

- Hacer cortes muy finos en los tejidos afectados, con el micrómetro o con una navaja a mano.
- Teñir los tejidos durante 5 minutos con azul-tionina a 0.19% en disolución acuosa de fenol a 5%.
- Lavar el colorante con agua corriente.
- Transferir los cortes a alcohol de 95°.
- Teñir durante unos minutos con el colorante Naranja G, saturado en alcohol absoluto.
- Lavar con alcohol absoluto, para eliminar el colorante.
- Transferir los cortes a xilol y observar al microscopio.

Las bacterias se verán de color azul oscuro, las paredes de las células de los tejidos vegetales, de amarillo o verde, por consistir de celulosa, y el tejido lignificado, azul brillante.

La observación del tejido afectado proporciona una serie de datos útiles en la caracterización de las bacterias fitopatógenas responsables de alguna enfermedad.

## **B. AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS.**

Un procedimiento sencillo para aislar las bacterias fitopatógenas en cultivo puro, necesita la preparación de una serie de diluciones a partir de las altas poblaciones de estos microorganismos en los tejidos de las plantas enfermas.

Las muestras tomadas en campo deben envolverse en papel y después empaquetarse en bolsas de polietileno; además, deben llegar al laboratorio y analizarse en el menor tiempo posible; esto evitará el desarrollo de microorganismos saprófitos que pueden interferir en los resultados del análisis.

La serie de diluciones se prepara de la manera siguiente:

- Colocar en una fila 6 placas Petri estériles.
- Numerar las cajas del 1 al 6.
- Poner 4 gotas de agua esterilizada, separadas equidistantemente, en la caja número 1.
- Colocar una sola gota de agua en las cajas Petri restantes.
- Cortar con un bisturí esterilizado un pedazo pequeño de tejido enfermo de la planta afectada y colocarlo en una de las gotas de la primera caja Petri.
- Triturar con el bisturí el tejido enfermo en la gota de agua.
- Permitir durante 5 a 10 minutos que las bacterias se separen del tejido vegetal.
- Transferir con una asa flameada y enfriada, una gota de agua con bacterias, de la primera a la segunda gota de la misma caja Petri.
- Mezclar bien las bacterias con el asa en la segunda gota y, sin flamearla, transferir una asada de suspensión bacteriana de la segunda gota a la tercera.
- Repetir esta operación sucesivamente de gota a gota y de caja a caja, lo que resulta en una dilución progresiva del número de bacterias, a partir de la suspensión original de la primera gota.
- Añadir agar nutritivo derretido y frío a cada caja y agitar para distribuir las bacterias uniformemente en el agar.
- Almacenar las cajas Petri a temperatura ambiente (25-30°C).
- En las cajas con las diluciones más altas (las últimas), las bacterias se multiplicarán formando colonias bien diferenciadas, debido probablemente a que provienen de una sola célula bacteriana.

- Transladar bacterias de una sola colonia a un tubo inclinado con un medio con agar o con caldo nutritivo.
- Agregar, después de 24 a 48 horas de crecimiento, agua destilada esterilizada al agar nutritivo inclinado, y con una aguja de inocular flameada, preparar una suspensión de bacterias de las colonias formadas.
- Extender en forma estriada la suspensión bacteriana en 2 ó 3 cajas Petri con agar y observar las colonias que se formen después de 24 a 48 horas de incubación a temperatura ambiente.

Después de realizar las operaciones anteriores, si todas las colonias que se desarrollan en las cajas Petri son idénticas en apariencia, desarrollo, características morfológicas, etc., se considera que se ha obtenido un cultivo puro de la bacteria, con el cual se pueden realizar las pruebas de patogenicidad y otras necesarias para confirmar la identidad de la bacteria aislada.

Una de las primeras observaciones debe conducir a conocer las características y la motilidad que presentan las bacterias vivas.

### **C. OBSERVACION DE LAS BACTERIAS VIVAS**

Es un poco difícil observar las bacterias vivas porque las células son pequeñas y contrastan muy poco con su medio ambiente. Sin embargo, pueden ser observadas y estudiar su motilidad haciendo una preparación en "gota suspendida".

El procedimiento es el siguiente:

- Aplicar un poco de vaselina alrededor de la depresión de un portaobjetos excavado.
- Transladar con una asa, bajo condiciones asépticas, una gota pequeña del cultivo de bacterias, al centro de un cubreobjetos cuadrado limpio.
- Invertir el portaobjetos excavado y acomodarlo sobre el cubreobjetos, centrando la gota de cultivo en la depresión.
- Presionar hacia abajo en las orillas del cubreobjetos, para que se pegue y la vaselina selle firmemente.

- Voltrear el portaobjetos con un movimiento rápido, para que la gota quede suspendida sobre la excavación del mismo, sin que toque el fondo.
- Examinar las bacterias al microscopio, enfocando primero en la orilla de la gota con un objetivo de bajo poder. Cambiar después a mayor aumento en seco y volver a enfocar; las bacterias deben ser ahora visibles moviéndose en la gota.

#### **D. DETERMINACION DE LA POBLACION BACTERIAL EN TEJIDOS INFECTADOS**

En un tejido vegetal infectado se puede determinar la población bacteriana, modificando la técnica de diluciones sucesivas. Se mide el tejido (por peso o por área), se desinfecta y se muele en un mortero o licuadora con una cantidad pequeña de agua destilada esterilizada. Se transfiere un mililitro de esta suspensión de bacterias a 9 ml de agua destilada esterilizada y se mezcla cuidadosamente. A su vez 1 ml de esta suspensión se transfiere consecutivamente a 9 ml de agua destilada esterilizada, hasta obtener una dilución de células bacterianas de  $10^6$  de la suspensión original.

Hecha la serie de diluciones, tomar 1 ml de suspensión de cada una y colocarlo en una caja Petri esterilizada. Añadir 15 ml de medio con agar a cada caja e incubar a temperatura ambiente; pasadas de 48 a 72 horas contar el número de colonias de bacterias en cada placa.

Para determinar el número de bacterias vivas en la muestra original, se multiplica el número de colonias que tiene la caja Petri (entre 30 y 300 colonias) por el factor de dilución. Los resultados son dados como número de bacterias por gramo o por  $\text{cm}^2$  de tejido enfermo.

#### **E. IDENTIFICACION DE LAS BACTERIAS**

Para identificar las bacterias fitopatógenas, una vez obtenidos los cultivos puros y hechas las observaciones de forma, tamaño, motilidad (ausencia o presencia de flagelos, posición de éstos), etc., es necesario

realizar la tinción de Gram, ya que esta prueba permite separar a las bacterias en dos grandes grupos.

### a. Tinción de Gram

La tinción de Gram es una técnica de coloración diferencial que permite dividir a las bacterias en dos grandes grupos. Las del primero se tiñen de morado y son llamadas "Gram Positivas", mientras que las del segundo se colorean de rosa y son llamadas "Gram Negativas". La técnica es muy útil en fitopatología porque casi todos los géneros de bacterias que atacan plantas, excepto *Clavibacter* y *Nocardia*, son Gram Negativas.

Para la tinción de Gram se utilizan las soluciones: Cristal violeta, Yodo de Gram y Safranina. La manera de preparar las tres soluciones se describe a continuación:

**Violeta Cristal.** Se mezcla un volumen de solución alcohólica saturada de cristal violeta, en cuatro volúmenes de oxalato de amonio acuoso a 1%, preparado previamente. Después de preparar la solución de oxalato de amonio, se debe dejar reposar toda la noche o calentar lentamente hasta que los cristales se disuelvan.

**Yodo de Gram.** Se mezclan juntos 1.0 g de cristales de yodo, 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada y 2.0 g de yoduro de potasio.

**Safranina.** Se mezclan en un litro de agua destilada, 100 ml de una solución de alcohol saturado de Safranina-O.

El procedimiento para la tinción de Gram es el siguiente:

- Colocar con una asa una gota de cultivo de bacterias en un portaobjetos limpio.
- Untar la gota formando una capa fina.
- Dejar que seque al aire.
- Pasar rápidamente el portaobjetos sobre la flama de un mechero Bunsen (hacer esto tres veces, siempre con la capa de bacterias del lado superior), para que las bacterias se fijen en el portaobjetos.
- Teñir la capa de bacterias con cristal violeta por 30 segundos, añadiendo gotas del colorante o sumergiendo el portaobjetos dentro de la solución.

- Lavar con agua corriente hasta que deje de escurrir colorante del portaobjetos.
- Cubrir la capa de bacterias con Yodo de Gram y dejarlo reaccionar únicamente por 30 segundos.
- Enjuagar nuevamente con agua corriente; después con alcohol a 95% por 10 a 20 segundos, hasta que del portaobjetos ya no escurra colorante; y otra vez con agua corriente.
- Teñir enseguida con Safranina por 10 segundos.
- Enjuagar con agua corriente y secar con papel.
- Examinar bajo la lente de inmersión del microscopio.

Para conocer el resultado de la tinción de Gram sobre las bacterias tratadas, se debe observar el color de la pared celular de las bacterias.

#### **b. Técnicas para la identificación**

Para identificación de las bacterias, deben hacerse pruebas de patogenicidad, entre las cuales destaca por su importancia la de Klement, que permite separar a las patogénicas de las saprófitas. Una vez realizada esta prueba, con las bacterias patogénicas se debe realizar una serie de pruebas bioquímicas que permitan identificar, hasta niveles subespecíficos, las involucradas en la enfermedad bajo estudio; lo anterior debe ser llevado a cabo por especialistas (Sosa-Moss, *et al.*, 1994).

No obstante lo anterior, existen técnicas sencillas que permiten identificar de manera rápida algunas bacterias fitopatógenas. Una de estas técnicas es la recomendada por Rodríguez (1991).

El procedimiento es como sigue:

Con los resultados de la tinción de Gram se seleccionan las cepas de bacterias que posiblemente están relacionadas con la enfermedad que se pretende diagnosticar, y se inoculan en partes de algunos vegetales, observando la reacción de éstos después de un tiempo, (ver Cuadro siguiente).

## PRUEBAS RAPIDAS DE PATOGENICIDAD

PARTE VEGETAL INOCULADA	METODO	OBSERVACION	ORGANISMO
Rebanada de zanahoria bacteriana	Gotas de una suspensión suave	Raíces adverticias. Pudrición	<i>A. tumefaciens</i> <i>E. carotovora</i>
Rebanada de papa cebolla pepino	Cultivo bacteriano	Pudrición suave	<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 agujas	Lesiones	<i>P. syringae</i> pv. <i>lisi</i>
Vaina de frijol	Punción con agujas	Lesiones	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Hojas de tabaco bacteriana	Infiltración de suspensión	Reacción de hipersensibilidad	P. grupo fluorescente Grupo <i>E. amylovora</i>
Plántulas o semillas de chícharo dulce	Suspensión bacteriana	Fasciación	<i>C. fascians</i>

Como puede observarse, esta prueba permite identificar de manera rápida y con una precisión aceptable, algunas especies de cuatro de los principales géneros de bacterias fitopatógenas, lo que es muy útil cuando el diagnóstico es urgente.

## **VII NEMATODOS FITOPARASITOS**

Los nemátodos fitoparásitos son animales pequeñísimos, con apariencia de lombrices; viven principalmente en el suelo y se alimentan de las raíces de las plantas.

### **A. SINTOMAS MAS COMUNES CAUSADOS POR NEMATODOS**

Como resultado del parasitismo de los nemátodos, se pueden presentar los síntomas siguientes:

- Agallas en la raíz y en tubérculos.
- Lesiones en la raíz, rizomas, tubérculos, etc.
- Pudriciones en la raíz, tubérculos, bulbos, etc.
- Momificación de bulbos.
- Ramificación excesiva de la raíz.
- Marchitamiento de las plantas.
- Destrucción de las raicesillas laterales, por lo que la raíz se ve formada por tocones.
- Poca resistencia de las plantas al acame.
- Enanismo.
- Amarillamiento del follaje.
- Distorsión de tallos, hojas, flores y espigas.
- Avanzamiento de granos.
- Formación de falsos granos en las espigas de gramíneas.
- Coloraciones en tejidos internos de troncos.

Como todos estos síntomas no son específicos para los nemátodos y pueden ser causados por otros agentes como insectos, hongos, etc., y dado que los nemátodos parásitos de plantas no son visibles a simple vista, con frecuencia es difícil diagnosticar en el campo un problema

causado por estos parásitos, por lo cual, es necesario hacer análisis de laboratorio.

## **B. OBTENCION DE MUESTRAS PARA ANALISIS**

La recolección de muestras de suelo, raíces y partes aéreas de las plantas, y la extracción de los nemátodos y su identificación, es la única manera de conocer con certeza si una enfermedad en particular es causada por nemátodos fitoparásitos de plantas.

Cuando se muestrea suelo, raíces o partes de ellas, debe hacerse en tres a cinco plantas enfermas. También deben tomarse muestras en plantas sanas para establecer con seguridad la relación entre la enfermedad y los nemátodos encontrados.

Si las plantas son pequeñas, como zanahoria, fresa, lechuga, etc., se toma la raíz completa, incluyendo suelo de la rizosfera; pero si las plantas son grandes como árboles frutales, plátano, banano, etc., se toman las muestras de raíz en la región donde los pelos absorbentes están activos, ya que es ahí donde se concentra el ataque de nemátodos; esta región de la raíz se encuentra aproximadamente entre los 35 cm y 1 metro de separación del tronco y a una profundidad de 20 a 40 cm, aunque varía con la especie vegetal de que se trate, tipo de suelo y época del año.

Para hacer una muestra compuesta, se recomienda tomar de 6 a 8 submuestras alrededor del árbol, con una pala, e incluir no sólo suelo, sino también trozos de raíces con pelos absorbentes activos.

Medio kilogramo de suelo y 100 g de raíces son suficientes para el análisis de laboratorio. Las muestras se recogen en bolsas de plástico, suficientemente fuertes para que no se rompan, y se etiquetan correctamente. Como los nemátodos son muy susceptibles al calor y la desecación, se transportan en cajas, cuidando que no se calienten, y deben procesarse lo más pronto posible; sin embargo, se pueden conservar en un refrigerador a 5 grados centígrados por una semana, mientras no se hacen los análisis.

## **C. EXTRACCION DE NEMATODOS DE LAS MUESTRAS**

Para hacer el diagnóstico de una enfermedad causada por nemátodos, es indispensable extraerlos del suelo o de los tejidos afectados.

### **a. Extracción de nemátodos filiformes del suelo**

Se han desarrollado varias técnicas para separar los nemátodos de las partículas minerales del suelo. Algunas son muy simples, baratas y prácticas, aunque no muy precisas, y otras, aunque más precisas, son caras y muy laboriosas.

A continuación se describen algunas de las técnicas más sencillas y útiles en nematología.

#### **1. Embudo de Baermann**

La técnica del embudo de Baermann tiene la gran ventaja de requerir de materiales muy baratos que pueden encontrarse fácilmente en cualquier laboratorio y que pueden incluso ser transportados a cualquier lugar donde se tenga que trabajar. Además, su mejor cualidad es que los nemátodos que se obtienen están completamente libres de impurezas, facilitándose su observación al microscopio, ya que el papel sanitario que se utiliza retiene las partículas de suelo o de tejidos vegetales.

Estas características compensan con creces la poca precisión cualitativa y cuantitativa que se obtiene con este método. El embudo de Baermann debe ser considerado como un método selectivo de extracción de nemátodos, puesto que se obtienen los individuos que son móviles, mientras que aquéllos de movimientos lentos o de cuerpo obeso o con la cutícula muy ornamentada, no atraviesan el papel y no pueden recuperarse.

Respecto a la precisión cuantitativa, se reduce al utilizar una submuestra muy pequeña de suelo o tejido infestado, porque no se recuperan todos los nemátodos y porque algunos mueren por falta de oxígeno (anoxia) en el agua.

La técnica es tan sencilla que requiere de un embudo de vidrio o plástico (la superficie interna debe ser lisa), al cual se le acopla en el extremo del

tallo un pedazo de tubo de hule de aproximadamente 10 cm de longitud, que se cierra con una pinza Mohr.

Este embudo así preparado, llamado de Baermann, se acomoda en un soporte circular para que mantenga la verticalidad, pudiendo prepararse un conjunto de ellos para trabajar simultáneamente varias muestras y porque deben hacerse repeticiones de cada una.

Cuando se van a extraer nemátodos del suelo, el procedimiento es como sigue:

- Llenar el embudo con agua corriente.
- Abrir la pinza Mohr para drenar un poco de agua y expulsar las burbujas de aire del tallo del embudo.
- Acomodar en la boca del embudo una rejilla de tela de alambre ligeramente cóncava.
- Colocar sobre la rejilla de alambre, un trozo cuadrado de papel sanitario o pañuelo desechable, de un tamaño ligeramente mayor a la boca del embudo.
- Depositar sobre el papel sanitario aproximadamente 25 ml de suelo previamente homogeneizado.
- Cubrir el suelo con las cuatro puntas angulares del papel sanitario que desbordan del embudo.
- Agregar agua al embudo con una pizeta, hasta que el nivel toque al papel sanitario y lo moje, permaneciendo siempre húmedo el suelo.
- Vigilar que el nivel del agua nunca deje de tocar al papel sanitario, porque si el suelo se seca no pueden obtenerse los nemátodos.
- Dejar transcurrir de 6 a 8 horas para que por sus propios movimientos los nemátodos del suelo pasen a través de las fibras del papel, y por gravedad se asienten en el tallo del embudo.
- Recuperar los nemátodos depositando en un vidrio de reloj o a una caja Petri un poco de agua del embudo, abriendo la pinza Mohr, y observar al microscopio.

Con raíces y otro tipo de tejidos vegetales, los pasos a seguir son:

- Lavar con cuidado las raíces para eliminar el suelo adherido a ellas.
- Cortar las raíces en trozos pequeños.

- Seleccionar una pequeña cantidad de trozos de raíz que muestren indicios de estar infestadas.
- En el caso de otros órganos vegetales, cortar en pedazos pequeños los tubérculos, bulbos, rizomas, hojas, tallos, etc., sospechosos de estar infestados.
- Colocar las raíces o trozos de otros tejidos, sobre el papel sanitario del embudo de Baermann, preparado como se indicó previamente.
- Cubrir los materiales con las puntas angulares del papel sanitario.
- Agregar agua al embudo de Baermann hasta que toque los tejidos para mantenerlos húmedos.
- Dejar transcurrir de 3 a 8 horas para que los nemátodos salgan de los tejidos, pasen a través del papel y se asienten en el tallo del embudo.
- Vigilar que no se sequen los materiales.
- Recuperar los nemátodos sacando un poco de agua por el tallo del embudo.
- Observar al microscopio.

Existe un buen número de modificaciones a la técnica básica de los embudos de Baermann, que también se utiliza en combinación con otros métodos de extracción.

#### **b. Extracción de quistes de nemátodos del suelo**

Los quistes de las especies de nemátodos, como las pertenecientes a los géneros *Punctodera*, *Globodera*, *Cactodera* y *Heterodera*, se separan del suelo aprovechando su característica de que al estar secos, flotan.

##### **1. Método rápido para la extracción de quistes.**

Existe una técnica rápida para extraer los quistes cuando están secos, que es la siguiente:

- Pasar por un tamiz de 40 mallas el suelo secado previamente a temperatura ambiente.
- Colocar en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml una submuestra de 50 ml de suelo seco.
- Agregar agua, agitar vigorosamente y dejar reposar por 10 minutos.
- Colectar los quistes que flotan en la superficie del agua con una pipeta, o en un papel filtro colocado en un embudo sobre el cual se vierte un

poco de agua, girando el matraz para que los quistes y otras partículas orgánicas que flotan sean arrastradas.

- Examinar los quistes al microscopio estereoscópico y separarlos con un pincel.

**Técnica de las charolas.** Esta técnica es en sí una modificación de la del embudo de Baermann, ya que está basada en el mismo principio; puede utilizarse para extraer nemátodos del suelo y es una de las más sencillas.

Se requiere de dos charolas comunes que pueden ser de plástico o de aluminio, de aproximadamente 20 cm de diámetro, colocadas una dentro de la otra. El fondo de la charola superior se quita y se reemplaza con una malla metálica de 3 mm de abertura, sobre la que se coloca una toalla facial de papel. En la charola inferior se pone agua suficiente para mantener húmedos los materiales de los cuales se desea extraer los nemátodos.

La muestra se mezcla perfectamente y una fracción de aproximadamente 50 ml se coloca sobre la toalla de papel de la charola superior, la cual se introduce en la charola inferior. Los nemátodos se recolectan de la charola inferior, después de 24 horas.

Cuando no se dispone de charolas, se procede como se describe a continuación:

- Colocar aproximadamente 100 ml de suelo infestado, en una maceta de plástico de 10 cm de diámetro.
- Colocar, asegurando en la boca de la maceta, un pedazo de tela de muselina o de tul puesto sobre una capa de papel sanitario doble o de toalla facial.
- Invertir la maceta en una charola que contenga agua corriente, suficiente para que la tela quede sumergida pocos centímetros. La maceta puede ser invertida también sobre un embudo de Baermann grande, con agua. Los nemátodos pasarán del suelo al agua de la charola o embudo, se recolectan y se examinan bajo el microscopio.

### **3. Otras técnicas de extracción de nemátodos del suelo**

Las otras técnicas de separación de los nemátodos del suelo a que se ha hecho referencia, son la de elutriación y la de centrifugación y flotación

en una solución azucarada, ambas basadas en el propio peso de los nemátodos.

En la primera de las técnicas mencionadas, los nemátodos son arrastrados fuera de los tubos del elutriador, por microcorrientes de agua cuya velocidad depende del diámetro de los pequeños tubos de salida.

El método de centrifugación-flotación es el más preciso y rápido, pero desafortunadamente de los más caros, porque requiere de una centrífuga grande. Los nemátodos son separados de las partículas minerales del suelo por la diferencia de peso, que se acentúa con la fuerza centrífuga. Los nemátodos se recuperan en un tamiz de 325 mallas y la suspensión se obtiene libre de partículas orgánicas y minerales.

Se han hecho modificaciones a estas dos técnicas, a partir de las básicas descritas.

## **b. Extracción de nemátodos de raíces y otros tejidos vegetales**

También se han desarrollado muchos métodos para separar los nemátodos de las raíces, bulbos, tubérculos, rizomas, hojas, tallos, flores y semillas enfermas.

### **1. Tinción de nemátodos en las raíces**

La tinción de nemátodos que están como endoparásitos en las raíces de las plantas, es una buena técnica que permite observarlos con facilidad y hacer el diagnóstico de enfermedades causadas por estos organismos. La tinción de tejidos radicales funciona para todos los tipos de nemátodos fitoparásitos endoparásitos, incluidos los formadores de agallas.

Los tejidos vegetales pueden ser teñidos por diversos métodos, pero el más comúnmente utilizado es el de fuccina ácida en lactofenol.

Esta técnica es muy sencilla, no es costosa y permite obtener resultados altamente satisfactorios. La fórmula del colorante es la siguiente:

Fenol	.....	20 g
Acido láctico.....		20 ml

## 62 Introducción al diagnóstico de las enfermedades de las plantas

Glicerina	.....	30 ml
Agua	.....	20 ml

Una vez mezclados estos ingredientes, se obtiene la solución de lactofenol. Después se agregan 5 ml de una solución compuesta por 1 g de fuccina ácida en 100 ml de agua y queda listo el colorante; la solución de fuccina ácida puede ser substituida por anilina azul, llamada azul de algodón. En la técnica se utiliza también la solución de lactofenol sin colorante, a la que se le llama lactofenol claro.

El procedimiento para colorear las raíces se describe a continuación:

- Lavar las raíces con cuidado para eliminar el suelo.
- Sumergir las raíces en una solución caliente de fuccina ácida-lactofenol por 1 a 3 minutos, dependiendo de lo grueso del tejido.
- Retirar las raíces del colorante y lavarlas con agua fría corriente, para eliminarlo lo más posible.
- Pasar las raíces al lactofenol claro, lo que elimina el colorante de las raíces pero no del cuerpo de los nemátodos, que aparecen de color rosa al observarlos bajo el microscopio. Si se usó azul de algodón, los nemátodos quedarán teñidos de azul tenue.
- Extraer con una aguja de disección los nemátodos de las raíces.

### 2. Extracción de nemátodos de raíces con el embudo de Baermann

Una modificación a este procedimiento para extraer los nemátodos de tejidos vegetales, es depositar sobre el papel sanitario, en la boca del embudo, trozos muy pequeños de los materiales enfermos o licuarlos ligeramente, antes de depositarlos sobre el papel sanitario. Cuando se trata de hojas o tallos verdes, debe drenarse totalmente la primera agua del embudo para eliminar lo más posible la clorofila, y después agregar agua limpia con una pizeta.

### 3. Extracción con la técnica de las charolas

Esta técnica, que se describió en detalle al tratar la extracción de los nemátodos filiformes, se utiliza sobre todo para extraer nemátodos de tejidos vegetales.

Preparado el sistema de charolas, se procede de la manera siguiente:

- Lavar las raíces para eliminar el suelo.
- Cortar las raíces u otro tipo de tejido en pedazos pequeños de 1 a 2 cm de largo, usando un bisturí bien afilado o una navaja de rasurar.
- Colocar los trozos de raíces u otros tejidos con 100 ml de agua destilada esterilizada en una licuadora, y molerlos durante 10 a 20 segundos.
- Vaciar el material licuado sobre la toalla de papel de la charola superior.
- Dejar transcurrir 24 horas para que los nemátodos pasen de la charola de arriba y se junten en el agua limpia de la charola inferior.
- Recoger el agua con nemátodos en una placa Petri y examinar al microscopio.

#### **4. Otras técnicas de extracción de nemátodos de tejidos vegetales**

El método de centrifugación y flotación en solución azucarada se utiliza también con mucha eficiencia para extraer los nemátodos de las raíces y de otros tejidos atacados. Los materiales se trituran un poco en una licuadora de cocina, antes de someterlos a la centrifugación.

### **D. MATADO Y FIJADO DE NEMATODOS**

Para evitar que los nemátodos se descompongan durante la identificación, con la suspensión obtenida por cualquiera de los métodos descritos, se procede como sigue:

Para matarlos, se pasa la suspensión a un vaso de precipitados y se deja reposar a temperatura ambiente por lo menos una hora. Decantar después con cuidado el exceso de agua, dejando los nemátodos concentrados en aproximadamente 5 ml; en seguida se agregan 5 ml de agua hirviendo y se mezcla rápidamente. La temperatura de la suspensión se eleva a cerca de 70°C y los nemátodos mueren. Otra manera de matar los nemátodos es colocar el vaso de precipitados que los contiene en agua hirviendo, por 2 minutos, agitando constantemente. Si los nemátodos son sometidos a temperaturas muy altas, no servirán para la identificación porque se distorsionan.

Para fijar los nemátodos muertos y evitar que se pudran, se añade igual volumen de un fijador que se prepara mezclando 14 ml de formaldehido comercial (a 38%) y 86 ml de agua. También pueden fijarse con igual volumen de TAF caliente, que se prepara mezclando 14 ml de formalina, 4ml de trietanolamina y 82ml de agua.

Los nemátodos fijados pueden conservarse en un tubo con tapa de rosca, pero debe tomarse en cuenta que la formalina los oscurece con el tiempo.

## **E. IDENTIFICACION DE NEMATODOS PARASITOS DE PLANTAS**

Es posible distinguir entre un nemátodo fitoparásito y un saprófito, ya que los fitoparásitos poseen un estilete retráctil en la parte anterior del cuerpo y los saprófitos no tienen esta estructura.

## **F. DIAGNOSTICO DE UN PROBLEMA DE NEMATODOS FORMADORES DE AGALLAS**

En los trópicos, los nemátodos formadores de agallas como *Meloidogyne* sp. son muy comunes. Atacan a un gran número de hospedantes y su densidad de población en el suelo es generalmente alta. La presencia de agallas en las raíces sirve como indicador de la existencia de estos nemátodos en el suelo.

Al realizar el diagnóstico del problema, se debe observar con cuidado lo siguiente:

- Las agallas inducidas por nemátodos se pueden confundir con los nódulos nitrificantes de las plantas leguminosas. Sin embargo, pueden diferenciarse fácilmente porque los nódulos nitrificantes se presentan a los lados de la raíz, a la cual están adheridos por un istmo o cuello, y las agallas forman parte del eje de la raíz.
- Las agallas son también inducidas en las raíces por insectos y nemátodos del género *Nacobbus*.

- La forma y tamaño de las agallas inducidas por nemátodos varía con el cultivo, variedad, condiciones ambientales y la especie misma del nemátodo.
- La presencia de estos nemátodos dentro de las agallas puede ser demostrada tiñendo el tejido, o rompiéndolo bajo el microscopio, lo que permite observar las hembras maduras, que son esféricas.

## **G. PREPARACION DE PATRONES PERINEALES DE *Meloidogyne* spp**

Para la identificación de especies de *Meloidogyne* es necesario observar porciones de cutícula de las hembras maduras, que contengan la región del perineo (ano y vulva).

El procedimiento para hacer las preparaciones es como sigue:

- Obtener raíces o tubérculos infectados, bien sea frescos o preservados.
- Separar de las raíces las hembras maduras con una aguja de disección, y colocarlas en una gota de lactofenol-fuccina ácida para teñir la cutícula; también puede utilizarse azul de algodón como colorante. Muchos investigadores 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 cortarlas cerca del 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 minutos 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 cuadrado de cutícula en donde está el patrón perineal.
- Transferir de 5 a 10 patrones perineales a un portaobjetos limpio con una gota de glicerina.
- Colocar el cubreobjetos evitando la formación de burbujas.
- 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 y etiquetar adecuadamente.**

## **VIII**

# **VIRUS CAUSANTES DE ENFERMEDADES EN LAS PLANTAS**

Los virus son entidades submicroscópicas que causan enfermedades en plantas y animales; no pueden ser cultivados en medios sintéticos, como los hongos o bacterias, porque al igual que los nemátodos, son parásitos obligados. Su presencia como fitopatógenos se intuye cuando por diversos métodos se pueden reproducir los síntomas que inducen de una planta enferma a otra sana. Pueden ser detectados observando las inclusiones que forman en las células de las plantas infectadas, o viendo sus partículas en el microscopio electrónico.

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 susceptible, pero viva.

Frecuentemente se usa la inoculación mecánica, y el ejemplo clásico es el virus del mosaico del tabaco (VMT). Para asegurar la transmisión del virus, se esparce polvo abrasivo de Carborundum en la superficie de la hoja de una planta sana, y se talla suavemente con una gasa humedecida con la savia de las hojas de una planta enferma con mosaico del tabaco; las partículas de Carborundum dañarán las vellosidades foliares y las células epidérmicas de la hoja sana, penetrando el virus por las heridas.

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 infeccioso puede expresarse en forma de pequeñas lesiones necróticas visibles a simple vista.

Otros mecanismos de transmisión de partículas de virus de plantas enfermas a plantas sanas, es por medio de insectos chupadores, como los

áfidos, o por injerto; en ambos casos se propicia la unión adecuada entre los elementos de translocación entre las dos plantas. La cúscura (planta parásita) puede ser también un agente eficaz en la transferencia de virus, ya que lo transporta de una planta enferma a una sana a través de su propio floema vascular.

Dentro de los agentes biológicos de transmisión de virus fitopatógenos, además de los insectos, deben incluirse los ácaros, nemátodos y por lo menos a un hongo, que también son capaces de transmitir ciertos virus de una planta a otra.

Para observar las partículas de virus en el microscopio electrónico de transmisión, se hacen preparaciones especiales que se exponen a un haz de electrones. La transmisión diferencial de los electrones a través de la preparación de virus crea una imagen que puede ser amplificada y vista directamente en una pantalla, o reproducida en una placa fotográfica. Con esta técnica se ha obtenido mucha información sobre el tamaño, la forma y la estructura de las partículas de los virus más comunes.

## **A. CONCENTRACION Y PURIFICACION DE UN VIRUS**

Es posible, con ultracentrifugación, concentrar y purificar muchos de los virus, a partir de la savia de plantas enfermas; esto equivale a la obtención de un cultivo puro de hongos o bacterias. Una vez obtenido el virus purificado, se evalúa el grado de pureza y su homogeneidad, para hacer estudios de la estructura, composición y propiedades de las partículas.

Para determinar si las partículas de cada virus obtenido en el proceso de purificación son fitopatógenas, deben someterse a varios procedimientos para conocer sus diferentes propiedades químicas y físicas, y deben inocularse a plantas sanas. Si la infección está siempre asociada con un tipo de partícula en especial, la evidencia indica que el virus ha sido "aislado" y obtenido en "cultivo puro".

## **B. IDENTIFICACION DE UN VIRUS**

Las técnicas más utilizadas para identificar los virus responsables de una enfermedad en un cultivo son: uso de plantas diferenciales, observación

de inclusiones en las células de las plantas afectadas, microscopía electrónica de transmisión, y pruebas serológicas, como la doble difusión en agar y la de inmunoabsorbencia con enzimas conjugadas, conocida como ELISA.

La más sencilla de estas técnicas es la de "transmisión mecánica y el uso de plantas diferenciales", que afortunadamente puede utilizarse con muchos de los virus fitopatógenos.

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 annum*, *Lycopersicon esculentum*, *Physalis floridiana* y *Cucumis melo*.

Pueden utilizarse todas o solamente algunas de las plantas diferenciales, lo que dependerá del virus de que se trate o del objetivo del estudio.

Las plantas diferenciales se inoculan frotando las hojas con savia de una planta enferma; previamente se esparce Carborundum de 600 mallas sobre las hojas que se van a inocular, para que al frotar se causen lesiones y las partículas virales entren en contacto con las células sanas.

Pasado un tiempo, se observa la reacción de las plantas, manifestarse como: lesiones locales cloróticas, lesiones locales necróticas, enchinamientos, manchas anulares, mosaicos, etc. Este tipo de reacciones, ligadas con las plantas diferenciales, permiten hacer una identificación preliminar de los virus, que generalmente es suficiente para diagnosticar una enfermedad.

La observación de inclusiones en las células de las plantas enfermas es otra técnica relativamente sencilla, y se basa en el hecho de que la infección de los virus fitopatógenos induce la formación de ciertas estructuras microscópicas, llamadas "inclusiones", en las células afectadas; y que pueden ser detectadas con el microscopio óptico compuesto.

Dependiendo del virus y de la planta de que se trate, las inclusiones pueden formarse en el núcleo o en el citoplasma, y pueden ser amorfas o cristalinas, presentándose en ambos grupos muchas variantes. La

localización, tipo y forma de las inclusiones permiten conocer de qué virus se trata.

Las otras técnicas de identificación mencionadas son más precisas y rápidas, pero requieren de aparatos y de antisueros que son costosos y deben ser realizadas por técnicos especializados.

### **C. CARACTERIZACION DE UN VIRUS**

De la misma manera en que se hace referencia a ciertas características de las bacterias (Gram (+) o (-), número y posición de flagelos, etc.), hongos (tipo de cuerpo fructífero, tamaño, forma y número de esporas, etc.) o nemátodos (forma y tamaño del estilete u otras estructuras morfológicas), también en el caso de los virus existen ciertas características que son muy útiles para su identificación precisa.

Estas características son:

- Punto final de dilución, que es el número mínimo de partículas virales que se requiere para que ese virus cause infección.
- Punto de inactivación térmica, que permite conocer algunas características físicas y químicas que le confieren al virus la propiedad infecciosa.
- Longevidad *in vitro*, que es el tiempo, en horas, días o semanas, durante el cual la savia con virus sigue siendo infecciosa a temperatura ambiente.

## IX

# LOS MICOPLASMAS COMO AGENTES CAUSALES DE ENFERMEDADES EN PLANTAS

En años recientes se ha demostrado que muchas enfermedades de plantas que se creía eran causadas por virus, son producidas 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 entonces, los micoplasmas han sido considerados como la causa de enfermedades del hombre, ganado, pájaros y roedores.

En cuanto a su clasificación, los micoplasmas pertenecen a la clase Mollicutes con un solo orden, los Mycoplasmatales, que comprende dos familias: Mycoplasmataceae y Acholeplasmataceae.

En relación con plantas, en 1967 Doi e Ishiie, 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 los tejidos de las plantas sanas. Los autores demostraron que la enfermedad se curaba aplicando antibióticos a base de tetraciclina a las plantas enfermas, lo que demostró que la enfermedad era causada por un micoplasma y no por un virus.

Desde que se realizó ese trabajo en Japón, se ha encontrado que aproximadamente otras 20 enfermedades de plantas son causadas por micoplasmas.

Las características de los micoplasmas pueden resumirse como sigue:

- Son los organismos vivos más pequeños que se conocen, que pueden crecer en un medio artificial.
- Su tamaño varía entre 125 y 250  $\mu\text{m}$  de diámetro, por lo que sólo pueden ser observados con el microscopio electrónico.
- Carecen de pared celular y tienden a ser pleomórficos, pudiendo variar su forma como consecuencia de cambios en la presión osmótica de las células en que se desarrollan.
- Son Gram negativos.

Se reproducen emitiendo largos filamentos que se rompen, dando lugar a cuerpos primarios. Son muy similares a los protoplastos bacterianos o formas L (bacterias a las que se les ha eliminado la pared celular o que han sido cultivadas en medios que evitan la formación de la misma).

Dentro de las características de las enfermedades causadas por micoplasmas, pueden citarse:

- Casi siempre son transmitidos por chicharritas (insectos chupadores de la familia *Cicadellidae*).
- Están presentes en el floema de las plantas afectadas.
- Pueden ser controlados por antibióticos a base de tetraciclina, como la Aureomicina.
- Los síntomas de la planta enferma son invariablemente amarillamiento, enanismo, arrosetamiento de hojas y fasciaciones conocidas como "escoba de bruja".

Dentro de las enfermedades causadas por micoplasmas, se incluyen: el enanismo amarillo del arroz, la hoja blanca de la caña de azúcar, el engrosamiento de las yemas del tomate, la punta morada de la papa, el amarillamiento letal del cocotero, la hoja pequeña del camote y el amarillamiento del Aster, entre otras.

Para detectar los micoplasmas es necesario hacer preparaciones con cortes ultra finos de los tejidos vegetales enfermos y observarlos en el microscopio electrónico de transmisión, lo que debe ser realizado por especialistas, ya que fácilmente pueden confundirse los micoplasmas con los organelos de las células.

Sin embargo, existen técnicas que han sido desarrolladas para observar los micoplasmas al microscopio de luz, algunas de las cuales requieren de colorantes que hacen más fácil la diferenciación de estos organismos. Dentro de estos métodos puede citarse el de Dienes, el de Rodamina-Verde de Metilo y el del Azul de Anilina.



## **X**

# **ESPIROPLASMAS FITOPATOGENOS**

Los espiroplasmas son microorganismos helicoidales que cuando se cultivan en un medio sintético sólido, sus colonias presentan el aspecto típico de las de los micoplasmas. Los medios de cultivo de los espiroplasmas deben contener siempre esterol, ya que en alguna fase de su crecimiento requieren de este compuesto.

Una de las enfermedades más conocidas causada por espiroplasmas, es el "Achaparramiento del Maíz", habiéndose aislado el patógeno tanto de las plantas enfermas como de los insectos vectores.



## BIBLIOGRAFIA

- BARNET, H.L. 1960.** Illustrated genera of the imperfect fungi. Burgess Publishing Co. 218 p.
- BRATHWAITE, CH. W. D. 1984.** An introduction to the diagnosis of plant disease. Editorial IICA. San José, Costa Rica.
- BRATHWAITE, CH. W. D. 1985.** An introduction to the diagnosis of plant diseases. IICA. Edseational Tesits and matinials series W 47. 39 p.
- CARDENAS, S. E. 1986.** Diagnóstico de virus mediante inclusiones virales. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 69 pp.
- C.M.I. 1968.** Plant pathologist's pocketbook. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 267 p.
- DHINGRA, D. O., and B. J. SINCLAIR. 1987.** Basic plant pathology methods. C.R.C. Press. Inc., Boca Raton, Florida. 355 pp.
- FOX, R. T. V. 1993.** Principles of diagnostic techniques in plant pathology. Cab International. UK University Press, Cambridge. 213 pp.
- LELLIOT, R. A., and D. E., STEAD. 1987.** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Methods in plant pathology. Vol. 2. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- MAI, W.F. and H.H. LYON. 1975.** Pictorial key to genera of plant parasitic nematodes. Cornell University Press. 219 p.
- MAYEA, S.S., y J. PADRON S. 1983.** Bacterias y hongos fitopatógenos. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 233 pp.
- MILLAR, R.L. 1986.** General laboratory procedures. Amer. Biol. Teacher 28, 493-502.
- NICKLE, W. R. (ED.). 1991.** Manual of agricultural nematology. Marcel Deker, Inc. N.Y. 1064 pp.

- RODRIGUEZ, M. MA. DE L. 1991. Manual de Identificación de Bacterias Fitopatógenas. Depto. de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. MEXICO. 91 pp.**
- ROMERO C., S. 1988. Hongos fitopatógenos. Dirección del Patronato Universitario, A.C. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 347 pp.**
- SOSA-MOSS, C., CH. W.D. BRATHWAITE y F. PERDOMO-ROLDAN. 1994. Técnicas para la Identificación de las Enfermedades de las Plantas. Editorial IICA. San José, Costa Rica.**
- STARR, M.P. (ed.). 1982. Phytopathogenic bacteria. In: Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schlegel. (Eds.) Selections from the prokaryotes a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Springer-Verlag, N.Y.**
- SEELEY, H.W. and P.J. VANDERMARK. 1962. Microbes in action. W.H. Freeman and Co. 383 p.**
- STREETS, R.B. 1969. The diagnosis of plant diseases. Cooperative Extension Service Agricultural Experiment Station, University of Arizona, Tucson, Arizona. 118 p.**
- TUITE, J. 1969. Plant pathological methods. Burgess Publishing Co. 239 p.**
- TULLY, J. G. and RAZIN. (EDS.) 1983. Methods in micoplasmology, Vol. II. Diagnostic Micoplasmology. Academic Press. New York.**

**ESTE LIBRO FUE IMPRESO EN LOS TALLERES  
DE EDITORIAL FUTURA, S.A. PROLONGACION  
DE ALDAMA No. 129, BARRIO LA CONCHITA,  
TEXCOCO, EDO. DE MEXICO, TEL.: 447-32.  
EL TIRAJE CONSTA DE 1000 EJEMPLARES,  
OCTUBRE DE 1995**





**INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA**  
Sede Central / Apdo. 55-2200 Coronado, Costa Rica / Tel.: 229-02-22/  
Cable: IICA SAN JOSE/Télex: 2144 IICA CR / FAX (506) 229-47-41, 229-26-59 IICA COSTA RICA