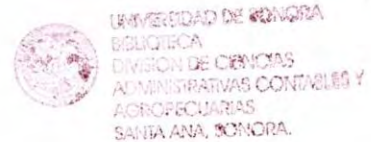


UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS ADMINISTRATIVAS,
CONTABLES Y AGROPECUARIAS



**Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en Sandía (*Citrullus vulgaris*) y
Melón (*Cucumis melo*) en Sonora, México**



TESIS

Ana Gabriela Alvarado Martínez

Santa Ana, Sonora

Enero de 2009

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en Sandía (*Citrullus vulgaris*) y
Melón (*Cucumis melo*) en Sonora, México**

TESIS DE POSGRADO

**Sometida a consideración del Departamento
de Administración Agropecuaria**

de la

**División de Ciencias Administrativas, Contables y Agropecuarias
de la Universidad de Sonora**

por

Ana Gabriela Alvarado Martínez

Como requisito parcial para obtener el grado

de

Maestro en Ciencias Agropecuarias

Santa Ana, Sonora

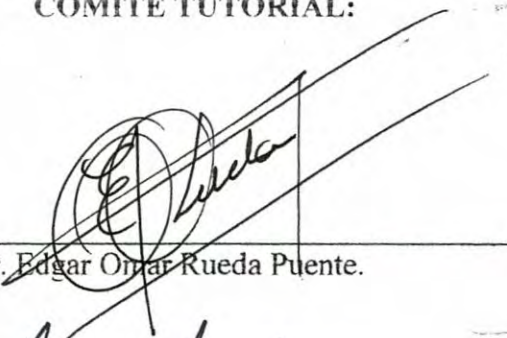
Enero de 2009

ESTA TESIS FUE REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DEL COMITÉ TUTORIAL,
APROBADA Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN
DEL GRADO DE:

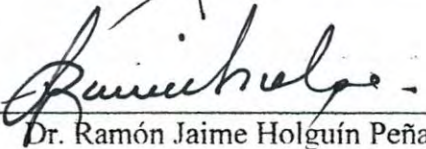
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMITÉ TUTORIAL:

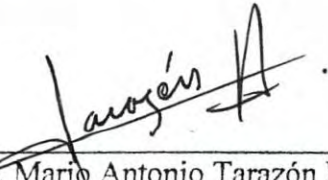
DIRECTOR:


Dr. Edgar Omar Rueda Puente.

ASESOR:


Dr. Ramón Jaime Holguín Peña.

ASESOR:


Ph. D. Mario Antonio Tarazón Heñra.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Edgar O. Rueda Puente y asesores Dr. Jaime Holguín Peña, y al Ph. D. Mario A. Tarazón Herrera, quienes pusieron todos sus conocimientos para que yo pudiera realizar esta investigación.

Así como a la Universidad de Sonora, *Campus Santa Ana* y SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación) y CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) quienes a través del proyecto clave 12067, me fue otorgada una beca parcial durante mis estudios de Maestría.

DEDICATORIA

A Dios:

Porque me ha permitido realizar cada uno de mis deseos, que he anhelado en toda mi vida; para salir adelante y triunfar.

A mis Padres:

José Antonio Alvarado Babuca y Francisca Martínez Rosas.

Porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada una más de mis metas, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis Hermanos:

Daniel Antonio Alvarado Martínez.

Abigail Alvarado Martínez.

Deseándoles triunfo en su vida.

A mis Abuelos:

Socorro Rosas Casillas (+).

Teófilo Martínez Tapia (+).

Guadalupe Babuca Gámez (+).

Jesús Manuel Alvarado Dórame (+).

Gracias por su cariño y por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

A mis Tíos:

Magdalena Martínez y familia.

Isabel Martínez y familia.

María Martínez y familia.

Rosario Martínez y familia.

Rosa Martínez y familia.

Nicolás Martínez y familia.

Julián Martínez y familia.

Teófilo Martínez y familia.

Pedro Martínez y familia.

Irene Alvarado y familia.

Mabel Alvarado y familia.

Silvia Alvarado.

Sergio Alvarado y familia.

Gustavo Alvarado y familia.

Joaquín Alvarado.

Enrique Alvarado.

Ernesto Alvarado y familia.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

Con respeto y admiración a ese compañero que también termina su Maestría en Ciencias Agropecuarias: Hugo Feliciano Alcaraz Lara[†] Q.P.D.

ÍNDICE

	Página
INTODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Cucurbitáceas	4
Sandía.....	4
Variedades de sandía.....	5
Melón.....	6
Variedades de melón.....	6
Siembra y cosecha de sandía y melón en Sonora.....	7
¿Qué es una planta enferma?	8
Fitopatología.....	8
Microbiología.....	9
Beneficios de la microbiología.....	10
Bacterias.....	10
La bacteriología.....	11
Estructuras intracelulares de las bacterias.....	12
Estructuras extracelulares de las bacterias.....	12
Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.....	13
Flagelos, fibrinas y pilis en bacterias.....	13
Clasificación morfológica de las bacterias.....	14
Movimiento de las bacterias.....	14
Patógeno.....	15
Sintomatología.....	15

Mancha bacteriana del fruto (<i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i>)	15
Organismo causal	17
Síntomas ocasionados por fitobacterias.....	17
Ubicación taxonómica del agente causal de la mancha bacteriana del fruto de sandía y melón..	20
Síntomas de la mancha bacteriana del fruto	20
Ciclo de la enfermedad.....	23
Epidemiología.....	23
La bacteria <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> en diferentes países del mundo...	24
Control.....	25
Técnicas de diagnóstico para bacterias.....	26
Tinción de Gram.....	26
Pruebas de Patogenicidad.....	26
Técnica de diagnóstico ELISA.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
Localización del sitio de muestreo.....	29
Caborca.....	29
Cajeme.....	30
Guaymas.....	30
Hermosillo.....	30
Navojoa.....	30
Desarrollo de la investigación.....	30
Primera etapa.....	31
Incremento de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i>	31

Pruebas de patogenicidad.....	32
Segunda etapa.....	36
Obtención de semilla.....	36
Muestreo vegetativo.....	37
Detección de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> en semilla de importación mediante medios de cultivos.....	37
Detección de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica ELISA.....	39
Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas con los diferentes Métodos de detección.....	42
Diseño experimental.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
Primera etapa.....	46
Segunda etapa.....	48
Detección de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> en semilla de sandía.....	48
Detección de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> en semilla de melón.....	49
Detección de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> en plántula, hoja desarrollada y fruto-sandía y melón.....	51
Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas mediante los tres métodos de detección.....	53
CONCLUSIONES.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación de enfermedades causadas por agentes infecciosos en plantas.....	19
Cuadro 2. Clasificación de bacterias fitopatógenas de acuerdo al tipo de ataque.....	20
Cuadro 3. Superficies agrícolas dirigidas a la siembra de melón y sandía en Sonora, México; superficie muestreada para detectar <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> (<i>Aac</i>) en Sonora.....	46
Cuadro 4. Detección de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> en semilla de sandía y melón de importación proporcionada por productores del estado Sonora, México.....	50
Cuadro 5. Detección de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> en plántula, hoja y fruto de sandía y melón, muestreado en áreas agrícolas del estado de Sonora.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Preparación de la solución salina al 0.85% de NaCl con una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias.....	32
Figura 2. Plántulas inoculadas con la solución bacteriana de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i> a una concentración de 10^8 UFC/ml con la ayuda de un cotonete	34
Figura 3. Frutos (previamente desinfectados) se inocularon punzándolos y adicionando con un cotonete 1 ml de suspensión bacteriana de <i>Acidovorax avenae</i> pv. <i>citrulli</i>	35
Figura 4. Cámara de incubación con una humedad relativa entre 80-90% y una temperatura de 35-41 °C por un período de cuatro a siete días.....	36
Figura 5. Muestreo de plántulas, hojas o frutos de sandía y melón.....	38
Figura 6. Medio de cultivo específico por dispersión por varilla.....	39
Figura 7. Maceramiento de las muestras vegetativas con la ayuda de un mortero y un mazo	41
Figura 8. Muestras depositadas en los pozos de la placa ELISA y se incubó la placa en una cámara húmeda por dos horas a temperatura ambiente.....	41
Figura 9. Análisis de datos revelados por el lector de placas ELISA.....	43

RESUMEN

La Agricultura a nivel nacional e internacional en los últimos años se ha visto afectada, debido en gran parte a los problemas fitosanitarios causados principalmente por bacterias, hongos, nemátodos, fitoplasmas, micoplasmas y virus. Con el comercio internacional, se presenta un gran movimiento de material vegetativo y siembras de estos productos vegetales lo que repercute en algunos casos pueden ser portadores de agentes nocivos.

La sandía (*Citrullus vulgaris*) y el melón (*Cucumis melo*) son plantas herbáceas, anuales y clasificadas con frutos carnosos. Ambos cultivos son afectados por enfermedades que merman su producción. La mancha bacteriana del fruto de melón y sandía es causada por *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*; es una bacteria que produce la putrefacción del fruto y que tiene la capacidad de diseminarse por semilla, cuando las condiciones son favorables, se consideran pérdidas de hasta el 100%. La enfermedad apareció por primera vez en los Estados Unidos de América, en 1989 en los campos de sandía comercial de Florida, destruyendo el 90% de aquellos que estaban dirigidos a la producción de semilla.

En la República Mexicana el cultivo de sandía y melón, han aumentado considerablemente en los últimos años y debido a que México no produce su propia semilla obliga a que los productores adquieran semilla de origen extranjero, principalmente de Estados Unidos, ya que las variedades y/o híbridos adquiridos producen frutos que rinden las características preferidas por el consumidor, originando, que los grandes volúmenes de semilla que ingresan al país sea una puerta de entrada para *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*.

El presente proyecto tuvo como objetivos: detectar *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla de melón y sandía de importación, y confirmar que en el estado de Sonora no se manifiesta la enfermedad en el cultivo de sandía y melón. En base a los objetivos de dicha

investigación surgieron dos hipótesis: la bacteria de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* esta presente en semilla de melón y sandía de importación; la enfermedad de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* por las condiciones ambientales que presenta el estado de Sonora, no se manifiesta.

Esta investigación se llevó a cabo en el estado de Sonora, México; inició en enero de 2007 y finalizó en julio de 2008. La investigación se realizó en dos etapas. La primera consistió en el incremento de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (*Aac*) con medios de cultivo específicos, pruebas de patogenicidad en semilla, plántula y fruto con fines de familiarización en los signos de *Aac* y su identificación mediante técnica ELISA; la cepa bacteriana de *Aac* fue proporcionada por la empresa Nunhems USA Inc.

La segunda etapa incluyó la obtención de semilla de importación, un muestreo de plántulas, hojas desarrolladas y frutos de sandía y melón en los municipios de Caborca, Cajeme, Guaymas, Hermosillo y Navojoa, Sonora, y su correspondiente análisis fitopatológico para la detección de la mancha bacteriana del fruto, mediante uso de medios de cultivos específicos y ELISA. Asimismo fueron llevadas a cabo, pruebas de patogenicidad en aquellas muestras (órganos vegetativos muestreados) que resultaron positivas a la presencia de *Aac*. La detección se llevó cabo en la Universidad de Sonora en el *Campus*, Santa Ana.

Los resultados indican que en el estado de Sonora se identificó *Aac* mediante pruebas de patogenicidad y ELISA, en semilla de sandía y melón importada de los Estados Unidos de América. Asimismo, en las áreas agrícolas donde se cultiva la sandía y melón, la detección de la bacteria *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en las diferentes etapas fenológicas del cultivo de melón y sandía resultó ser negativa su presencia. Esto último pudiese deberse principalmente a las condiciones climatológicas donde se siembran los cultivos en estudio,

las cuales son inapropiadas para la manifestación de la misma. Asimismo, es importante que al momento de introducir semilla de hortalizas al estado de Sonora, se realicen diferentes pruebas de detección y se lleven acabo monitoreos en los campos agrícolas durante las diferentes etapas fenológicas de sandía y melón para evitar la introducción de microorganismos fitopatógenos de importancia cuarentenaria.

ABSTRACT

The Agriculture nationally and internationally in recent years has been affected, largely due to phytosanitary problems caused primarily by bacteria, fungi, nematodes, phytoplasms, mycoplasmas, viruses. With international trade, presents a great movement of vegetative material and planting of these plant products which leads to in some cases may be carriers of harmful agents.

The watermelon (*Citrullus vulgaris*) and melon (*Cucumis melon*) are herbaceous plants, annual and classified with fleshy fruits. The bacterial spot of the fruit of melon and watermelon is caused by *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*; is a bacterium that produces a putrefaction and has the ability to spread by seed, when conditions are favorable. With its presence under favorable conditions is considered lost up to 100%. The disease first appeared in the United States of America, in 1989 in the fields of commercial watermelon Florida, destroying 90% of those who were directed to seed production.

In Mexico, watermelon and melon, have greatly increased in recent years, and due to that Mexico does not produce its own seed requires that producers purchase seed of foreign origin, mainly from the United States since varieties and / or hybrids purchased produce fruits that obtain characteristics preferred by the consumer, creating, that large volumes of seed entering the country as a gateway for *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*.

The goals of this research were identify *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* in melon and watermelon seed imported from United States of America and confirm that in Sonora state there is not present the disease into the different stages of growing of watermelon and melon. Based on the goals of that research emerged two hypotheses, the bacterium *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* is present in melon and watermelon seed imported; and the disease *Aac* by environmental conditions that presents the state of Sonora, is not apparent.

This research was carried out in the state of Sonora, Mexico, beginning in January 2007 and ended in July 2008. The investigation was conducted in two phases. The first consisted of increasing *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (*Aac*) with use of media specific and its evidence whit pathogenicity tests on seed, seedling and fruit and identification of *Aac* by Elisa technique. The second stage includes obtaining seed import, a sampling of seedlings, leaves and fruits of developed watermelon and melon in the municipalities of Caborca, Cajeme, Guaymas, Hermosillo and Navojoa in Sonora State; and the corresponding analysis to detect the bacterial spot, through use of growth media specific and ELISA. Was carried out tests on those samples pathogenicity (vegetative organs sampled) that were positive for the presence of *Aac*. The detection took place at the University of Sonora in the Santa Ana *campus*.

The results indicate that *Aac* pathogenicity and ELISA in melon and watermelon seeds imported from the United States of America was positive. Nevertheless, in the areas where watermelon and melon crop are developed in Sonora State the results showed that this State is free of *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*. This one was considering and evidence with pathogenicity tests and ELISA. Also this result is because the conditions climatologic where crops are sown in the study are inappropriate for the manifestation of this disease. However, although the state of Sonora is free of the bacteria *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*, is important that when introducing vegetable seed to the state of Sonora, various tests and screenings has to be carried out in agricultural fields during the different stages of watermelon and melon to prevent the introduction of pathogenic microorganisms of importance quarantine.

INTRODUCCIÓN

La Agricultura a nivel nacional e internacional en los últimos años se ha visto afectada, debido en gran parte a los problemas fitosanitarios causados principalmente por bacterias, hongos, nemátodos, fitoplasmas y virus.

Con el comercio internacional, se presenta un gran movimiento de material vegetativo y siembras de estos productos vegetales, debido a la rapidez con que en la actualidad se transportan; existen grandes cantidades de material vegetal que se moviliza y que en algunos casos pueden ser portadores de agentes nocivos.

Los aspectos negativos antes mencionados, han originado pérdidas y grandes trastornos en algunas regiones en la agricultura nacional, por lo que es conveniente contar con medidas apropiadas para evitar el ingreso de agentes nocivos.

La mancha bacteriana del fruto de melón y sandía es causada por *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*, es una bacteria que produce la putrefacción del fruto, se consideran pérdidas de hasta el 100%. La enfermedad apareció por primera vez en los Estados Unidos de América, en 1989 en los campos de sandía comercial de Florida, la cual se presentó posteriormente, en Carolina del Sur, Carolina del Norte, Maryland, Delaware e Indiana, Alabama, Arkansas, California, Iowa, Mississippi, Missouri, Oklahoma, Texas y Georgia a partir de 1992; causando pérdidas de un 90% de fruta comercializable.

En el año 2001, la mancha bacteriana del fruto se presentó en Australia, Venezuela, Costa Rica y Brasil, causando pérdidas de producción en un 70 y 100% del fruto. Sin embargo, el efecto de esta enfermedad no radica únicamente en el daño producido al fruto, sino que también tiene la capacidad de diseminarse por semilla, de ahí la importancia de que algún país importador de semilla de sandía y melón de esas áreas debe de tener métodos de diagnóstico con una sensibilidad capaz de detectar al organismo.

En la República Mexicana el cultivo de sandía *Citrullus vulgaris* y melón *Cucumis melo*, ha aumentado considerablemente en los últimos años y debido a que México no produce su propia semilla, obligando a que los productores adquieran semilla de origen extranjero, principalmente de Estados Unidos, ya que las variedades y/o híbridos adquiridos producen frutos que obtienen las características preferidas por el consumidor, originando, que los grandes volúmenes de semilla que ingresan al país sean una puerta de entrada para *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*.

México presenta leyes, reglamentos, cuarentenas y se basa en el principio que cada gobierno tiene el derecho y la responsabilidad de proteger la salud de la gente, así como también de los múltiples cultivos que proveen alimento. Además, la Dirección General de Sanidad Vegetal es la autoridad encargada de vigilar la importación de productos y subproductos de origen vegetal.

Los principales estados productores de sandía a nivel nacional son: Jalisco, Chihuahua, Sonora, Veracruz, Nayarit; y los principales estados productores de melón a nivel nacional son: Coahuila, Guerrero, Durango, Michoacán y Sonora, cuya producción es destinada a la exportación.

Sonora, es la región comprendida en la parte Noroeste de la República Mexicana y se caracteriza por ser una de las principales áreas productoras de sandía y melón debido a su alto potencial de rendimiento.

El presente proyecto tiene como objetivos: detectar *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla de melón y sandía de importación y confirmar que en el estado de Sonora no se manifiesta la enfermedad en estos cultivos. En base a los objetivos de dicha investigación surgieron dos hipótesis: la bacteria de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* está presente en semilla de melón y sandía de importación; la enfermedad de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*

no se manifiesta en el estado de Sonora por las condiciones ambientales a (una temperatura de 35 °C y baja humedad relativa que varia entre 40 y 55 %) que prevalecen en el año.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cucurbitáceas.

La familia de las cucurbitáceas comprende varias especies de importancia económica. Se puede citar la sandía, el pepino, el melón, el calabacín y las calabazas. Todas estas plantas son originarias de países cálidos (zona mediterránea o intertropical) y necesitan temperaturas relativamente elevadas. El melón y sobre todo la sandía se adaptan mejor a lugares con temperaturas elevadas y se desarrollan perfectamente en condiciones muy secas. Las cucurbitáceas son en general plantas monoicas, es decir, que se encuentran sobre la misma planta flores masculinas y femeninas. La polinización está asegurada por insectos, esencialmente por las abejas pero también por los abejorros (Blancard *et al.*, 2000).

Sandía.

La sandía (*Citrullus vulgaris*) es una planta herbácea, anual, rastrera o trepadora, propia de cultivos intensivos de secano y regadío. La sandía está clasificada como fruto carnoso por tener en su parte comestible mucho más del 50% de agua. Su nombre procede del árabe “syndiyya”, propia o perteneciente al “sind” o indostón, se le conoce también por guguria, zandía, albudeca o albudega. Los tallos son herbáceos (blandos y verdes), tendidos, trepadores y largos con zarcillos. Las hojas son partidas, con segmentos redondeados, en la axila de cada hoja nacen unos zarcillos que utiliza la planta para sujetarse al suelo, con el fin de que los vientos no la vuelquen (Mármol, 1988).

Las flores son de color amarillo, además pueden ser masculinas o estaminadas y femeninas o pistiladas, es decir, los dos sexos coexisten en esta planta monoica, pero en flores distintas. El fruto es una baya grande con placenta carnosa y epicarpio quebradizo, generalmente lisos, de color, forma y tamaño variables, con la pulpa más o menos dulce y

color que va del rosa claro al rojo intenso; en su interior se encuentra un gran número de semillas. Las semillas son de tamaño variable, aplastadas, ovoides, duras, de peso y colores también variables (blancas, marrones, amarillas, negras, etc.), algunas moteadas y otras no (Mármol, 1988).

Las sandías (*Citrullus vulgaris*) son populares en todo el mundo y deben cultivarse solo en lugares de poca altitud, donde existe calor suficiente para su desarrollo normal, el mejor suelo es el arenoso, aunque pueden desarrollarse en suelos más pesados, si el tiempo reinante es lo suficientemente caliente. La fructificación depende de la cantidad de hojas; cortando las sandías defectuosas y limitando el número de frutos. La cosecha se realiza de muchas maneras; el tiempo que transcurre desde la floración hasta la maduración es de 45 días (Moertensen y Bullard, 1985).

Al final de este período, puede empezar la prueba de madurez. Con frecuencia, se golpean con los dedos; cuando están maduras se escucha un sonido apagado y cuando están verdes, uno agudo, al golpeteo con el dedo. Después de cortadas, se deberá aplicar al extremo del pedúnculo una pasta hecha con sulfato de cobre, para evitar la pudrición de dicha parte (Moertensen y Bullard, 1985).

El cultivo de sandía debe permanecer libre de maleza a lo largo de su ciclo, principalmente los primeros 50 días, ya que en esta etapa la competencia por luz, agua y nutrientes es mayor. El control se puede realizar con una aplicación inicial de herbicida y posteriormente, con un azadón ligero, el herbicidas más utilizado con frecuencia y éxito es Trifluralina (Quiroz y García, 2005).

Varietades de sandía. Las variedades de sandía Españolas son: Catalana, Valenciana, Valenciana del rey, principalmente. Entre las variedades de origen Americano figuran: Sugar baby, Stone montain, All sweet, Peacok, Cal sweet, Charleston, King of Heart y

Liberty. En Francia las principales variedades figura la Marsowszky y, entre de las variedades Italianas sobresales: Frontarengo, Romana, Romana redonda, Mora de milán (González, 1998).

De las variedades americanas, la All sweet es de cáscara gruesa, su fruto es de buen peso con forma oblonga. Cal sweet: su fruto es muy dulce y de buen rendimiento. Peacock: buena para embarque; popular en Arizona, California, México. King of hearths: excelente para embarque. Tritón: de excelente sabor, su color es amarillo. Liberty: alto rendimiento y su cáscara es gruesa, su pulpa roja. Valdoria: sin semilla excelente para el transporte. Sugar baby: vigorosa y de gran rendimiento (Moran, 2006).

Melón.

El melón (*Cucumis melo*) es originario de África. Los frutos de esta especie se consumen como postre; se siembra directamente de 2 ó 3 semillas, aclarando a una sola planta inmediatamente después de su nacencia. La distancia entre plantas las líneas son de 30 cm en las líneas densas y de 90 cm en las líneas más amplias. La polinización es realizada por abejas. Los melones tienden a separarse del tallo por la base del fruto cuando esta maduro; los productores de semilla de melón esperan a que todo el cultivo se separe de esta forma antes de pasar por el campo una cosechadora de semilla o recogen los frutos a mano llevándolos en cestos hasta el extractor de semillas; después de lavado se secan (Raymond, 1989).

Variedades de melón. Existe un gran número de especies y variedades de melón o *Cucumis melo*. Se diferencian en la forma y tamaño del fruto y la tersura de su cáscara. Sin embargo, puede decirse que generalmente el melón es una planta rastrera, vellosa y de ciclo vegetativo anual. El tallo es duro, sus hojas tienen un diámetro de ocho a 15 cm y su tamaño varía de acuerdo a la variedad. Los frutos, también varían en forma, tamaño y tipo

de cáscara, según la variedad. El melón chino, su cáscara es reticulada, con líneas de superficie rugosa que forma una red en la superficie del fruto. El melón cantalupo es de forma redonda, su cáscara es estirada, formando grandes gajos pronunciados. Melón liso, es de forma oval, alargado y redondo; su cáscara es más tersa (Parsons, 1999).

Entre las principales variedades a nivel mundial sobresalen la Honey brew que tiene un alto rendimiento durante las siembras tempranas y tardías; su tamaño uniforme de buena calidad, su interior firme y dulce. La variedad Temptation, su pulpa es de color naranja y verde la cual puede comerse toda hasta la cáscara. Top mark, sus frutos son excelentes, su semilla es pequeña. Cantaloupe, sus frutos son esféricos, ligeramente aplastados, de pesos comprendidos entre 700 gr y 1,200 kg; piel fina y pulpa de color naranja, dulce y de aroma característico. Una vez cosechado, el melón cantaloupe no continúa su maduración, así que son cortados cuando ésta es alcanzada (Parsons, 1999).

La variedad Honey dew, es un fruto redondo, ligeramente oval, por lo general mide 15-22 cm de longitud. La pulpa es de color verde pálido, jugoso y dulce. La piel es lisa o ligeramente estriada, libre de cicatrices y con una superficie cerosa. Esta variedad se desarrolla mejor en climas semi-áridos y es cosechado basándose en su madurez (Peterson, 1998).

Siembra y cosecha de sandía y melón en Sonora.

Acorde a Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2006), se estima que la sandía en el ciclo otoño-invierno tiene una superficie sembrada de 2,825 ha, llegándose a cosechar alrededor de 2,737 ha. En el ciclo primavera-verano se tiene registrada una superficie sembrada de 2,618 ha y una superficie cosechada de 2,116 ha. En el cultivo de melón, se tiene una superficie sembrada de 1,866.5 ha con una superficie cosechada es de 2,115.5 ha, en el ciclo primavera-verano.

¿Qué es una planta enferma?.

La definición de planta enferma varía de acuerdo a la persona que la diagnostique; para un patólogo vegetal una planta enferma es aquella cuya anatomía y morfología es lo suficientemente anormal como para causar síntomas visibles, o presentar una disminución del crecimiento, producción o calidad. Los tres grupos de agentes patógenos vegetales están representados por las bacterias, hongos, virus. Las bacterias son plantas microscópicas unicelulares, cuya forma varía de esférica a espiritada e incluso de disco. Casi todas las bacterias patógenas de la plantas tienen forma cilíndrica, normalmente de 0.4 a 0.7 μ m de diámetro y entre uno y tres de longitud. Los hongos pertenecen al reino vegetal; generalmente, tienen las paredes celulares rígidas, falta de clorofila, reproducción por medio de esporas. Los virus son partículas microscópicas infecciosas; los virus vegetales contienen proteínas y ácidos ribonucleicos (RNA) en partes iguales (Agrios, 1989).

Fahy y Persley (1983) reportan que el desarrollo de las enfermedades son el resultado de la interacción del parásito, huésped y medio ambiente y para que se manifieste una enfermedad, es necesario que además de la presencia del patógeno, las condiciones sean favorables y la hospedera susceptible.

Fitopatología.

Es la ciencia de diagnóstico y control de las enfermedades (patologías) de las plantas. Cubre el estudio de los agentes infecciosos que atacan plantas y desórdenes abióticos o enfermedades fisiológicas, pero no incluye el estudio de daños causados por herbívoros como insectos o mamíferos. Se calcula que en el mundo se pierden alrededor del diez por ciento de la producción de los alimentos debido a las enfermedades de las plantas. Además la fitopatología estudia las enfermedades causadas por bacterias, hongos, micoplasmas, virus, etc. También utiliza las técnicas como la micología, bacteriología,

virología, nematología, anatomía vegetal, bioquímica, horticultura, etc. La fitopatología tiene que desarrollar métodos de control para todas las enfermedades de las plantas (López, 1982).

Microbiología.

Es la encargada del estudio de los microorganismos, seres vivos pequeños (de mikros "pequeño", bios, "vida" y logos, "estudio"), también conocidos como microbios. Es la rama de la biología dedicada a estudiar los organismos que son solo visibles a través del microscopio (virus, procariontes y eucariontes simples). Son considerados microbios todos los seres vivos microscópicos consistentes en una sola célula, es decir unicelulares, así como aquellos que forman agregados celulares en los cuales todas las células son equivalentes (en los cuales no existe diferenciación celular) (Agrios, 1989).

Los microorganismos pueden ser eucariotas (las células poseen núcleo), tales como los hongos y los protistas, o procariotas (células carentes de núcleo), como las bacterias y los virus (aunque los virus no son considerados seres vivos estrictamente hablando). Los tipos de microbiología son: microbiología médica, microbiología veterinaria, microbiología ambiental, microbiología evolutiva, microbiología industrial, microbiología de los alimentos, aeromicrobiología, fisiología microbiana (Pelezar, 1981).

El descubridor del mundo microbiano fue un holandés, Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723). Era comerciante en la pequeña ciudad de Delf, Leeuwenhoek, quien se diferenciaba de los científicos contemporáneos suyos en un aspecto: tenía muy poca formación básica y nunca asistió a la universidad. Las dificultades más serias surgieron al momento que trató de comunicar sus descubrimientos, dado que solo hablaba el idioma holandés. Sin embargo, Leeuwenhoek transmitió sus descubrimientos a la Royal Society en forma de una larga serie de cartas escritas en holandés. Estas cartas, traducidas al inglés, se

publicaron en los proceedings of the Royal Society, con lo cual fueron rápida y ampliamente difundidas (Díaz *et al.*, 1999).

Beneficios de la microbiología.

Históricamente, los microorganismos han sido vistos de manera negativa a causa de su asociación con muchas enfermedades humanas. Sin embargo, los microorganismos patológicos son un porcentaje muy minoritario dentro del total de microorganismos, la mayoría de los cuales desempeñan papeles absolutamente imprescindibles y que de no existir harían poco viable la vida en la tierra. Algunos ejemplos son las bacterias que fijan nitrógeno atmosférico (posibilitando la vida de los organismos vegetales), las bacterias del ciclo del carbono (indispensables para reincorporar al suelo la materia orgánica) o la multitud de microorganismos que viven de manera simbiótica en nuestro tubo digestivo, sin los cuales la digestión no sería viable (Agrios, 1989).

Así pues, los "organismos superiores" (animales, plantas) no podrían vivir de no ser por las funciones desempeñadas por estos seres microscópicos. Además, tienen amplias aplicaciones en el terreno industrial, como las fermentaciones (para la producción de bebidas alcohólicas o productos lácteos), la producción de antibióticos o la de otros productos de interés farmacéutico o biotecnológico (hormonas, enzimas, etc.). Finalmente, cabe también destacar el papel esencial que los microorganismos juegan en los laboratorios de investigación biológica de todo el mundo como herramientas para la clonación de genes y la producción de proteínas (<http://es.Wikipedia.org/wiki/Microbiolog>).

Bacterias.

Son microorganismos unicelulares, tienen típicamente algunos micrómetros de largo (entre 0.5 y 5 μm) y se presentan en diversas formas incluyendo esferas, barras, y espirales. Generalmente, poseen una pared celular, pero compuesta por peptidoglicanos. Las bacterias

disponen de cilios o flagelos, son móviles y son procariotas. Las células bacterianas no tienen núcleo ni membranas que delimiten sus orgánulos internos. Aunque el término bacteria incluye tradicionalmente a todos los procariotes, actualmente la taxonomía y la nomenclatura científica los divide en dos grupos. Estos dominios evolutivos se denominan Bacteria y Archaea. La división se justifica en las grandes diferencias que presentan ambos grupos a nivel bioquímico (Woese *et al.*, 1990).

La bacteriología.

Las primeras bacterias fueron observadas por Antony van Leeuwenhoek en 1683 usando un microscopio de lente simple diseñado por él mismo. Inicialmente las denominó animálculos y publicó sus observaciones en una serie de cartas que envió a la Royal Society. El nombre de bacteria fue introducido más tarde, en 1828, por Ehrenberg. Deriva del griego βακτήριον *-α*, bacterion *-a*, que significa bastón pequeño. Años más tarde, Pasteur, al igual que su contemporáneo y colega Robert Koch, fueron uno de los primeros defensores de la teoría germinal de las enfermedades infecciosas (Bulloch, 1960).

Robert Koch fue pionero en la microbiología médica, trabajando con diferentes enfermedades. Además Paul Erlich recibió el premio Nobel en 1908 por sus trabajos en el campo de la inmunología y por ser pionero en el uso de tintes y colorantes para detectar e identificar bacterias, base fundamental de las posteriores tinción de Gram. También un gran avance en el estudio de las bacterias fue el descubrimiento realizado por Carl Woese en 1977, de que las arqueas presentan una línea evolutiva diferente a la de las bacterias. Esta nueva taxonomía filogenética se basaba en la secuenciación del ARN ribosómico 16S y dividía a los procariotas en dos grupos evolutivos diferentes, en un sistema de tres dominios: Arquea, Bacteria y Eukarya (Bulloch, 1960).

Estructuras intracelulares de las bacterias.

La célula bacteriana está rodeada por una membrana lipídica denominada membrana celular. Esta membrana actúa como barrera de contención para los nutrientes, proteínas y demás componentes esenciales del citoplasma celular. Puesto que las bacterias son procariotas, no tienen membranas que limiten los orgánulos citoplasmáticos y por ello presentan pocas estructuras intracelulares. Carecen de núcleo celular, mitocondrias, cloroplastos y de los otros orgánulos presentes en las células eucariotas, tales como el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático (Bullock, 1960).

Las bacterias no tienen membranas que delimiten un núcleo. El material genético está típicamente organizado en un solo cromosoma circular situado en el citoplasma dentro de un cuerpo de forma irregular denominado nucleoide. El nucleoide contiene el cromosoma junto con las proteínas asociadas y ARN. Como todos los organismos vivos, las bacterias contienen ribosomas para la producción de proteínas, pero su estructura es diferente al de los ribosomas de Eukarya y Archea (DeLong y Pace, 2001).

Estructuras extracelulares de las bacterias.

Las bacterias disponen de una pared celular que rodea a su membrana celular. Las paredes celulares bacterianas están hechas de peptidoglicano (llamado antiguamente mureína). Esta sustancia está compuesta por cadenas de polisacárido enlazadas por péptidos inusuales que contienen aminoácidos D. Estos aminoácidos no se encuentran en las proteínas, por lo que protegen a la pared de la mayoría de las peptidasas. Las paredes celulares bacterianas son distintas de las que tienen plantas y hongos, que están hechas de celulosa y quitina, respectivamente. Son también distintas a las paredes celulares de Archaea, que no contienen peptidoglicano. El antibiótico penicilina puede matar a muchas bacterias inhibiendo un paso de la síntesis del peptidoglicano (Van, 2001).

Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Existen dos diferentes tipos de pared celular bacteriana, denominadas Gram-positiva y Gram-negativa, respectivamente. Estos nombres provienen de la reacción de la pared celular a la tinción de Gram, un método tradicionalmente empleado para la clasificación de las especies bacterianas. Las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular gruesa que contiene numerosas capas de peptidoglicano y ácido teicoico. En cambio, las bacterias Gram-negativas tienen una pared relativamente fina consistente en unas pocas capas de peptidoglicano rodeadas por una segunda membrana lipídica que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas (Engelhardt and Peters, 1998).

Flagelos, fibrinas y pilis en bacterias.

Los flagelos son estructuras rígidas hechas de proteínas usados para el movimiento y tienen un diámetro aproximado de 20 nm y una longitud de hasta 20 μm . Los flagelos son impulsados por la energía obtenida de la transferencia de iones; esta transferencia es impulsada por el gradiente electroquímico que existe entre ambos lados de la membrana celular. Las fimbrias son filamentos finos de proteínas que se distribuyen sobre la superficie de la célula (Bardy y Jarrell, 2003).

Tienen un diámetro aproximado de 2-10 nm y una longitud de hasta varios μm . Cuando se observan a través del microscopio electrónico se asemejan a pelos finos. Las fimbrias ayudan a la adherencia de las bacterias a las superficies sólidas o a otras células y son esenciales para la virulencia de algunos patógenos. Los pilis son apéndices celulares ligeramente mayores que las fimbrias y se utilizan para la transferencia de material genético entre bacterias en un proceso denominado conjugación bacteriana (Bardy y Jarrell, 2003).

Clasificación morfológica de las bacterias.

La forma de las bacterias es muy variada, a menudo, una misma especie adopta distintos tipos morfológicos, lo que se conoce como pleomorfismo. De cualquier manera se pueden distinguir tres tipos fundamentales de bacterias: Coco: de forma esférica: diplococo: cocos en grupos de dos, tetracoco: cocos en grupos de cuatro, estreptococo: cocos en cadenas, estafilococo: cocos en agrupaciones irregulares o en racimo. Bacilo: en forma de bastoncillo. Formas helicoidales: Vibrio: ligeramente curvados y en forma de coma, espirilo: en forma helicoidal rígida, espiroqueta: en forma de tirabuzón (helicoidal flexible) (Funke *et al.*, 2004).

Movimiento de las bacterias.

Las bacterias pueden moverse mediante flagelos, deslizamientos, contracciones (twitching) o por cambios en la flotabilidad. En el movimiento de tipo twitching, la bacteria usa su pili como gancho de ataque, primero extendiéndolo, anclándolo y después contrayéndolo con una fuerza notable. Según el número y disposición de los flagelos en la superficie de la bacteria, se distinguen los siguientes tipos: un solo flagelo (monótrico), un flagelo en cada extremo (anfítrico), grupos de flagelos en cada extremo (lofótrico) y flagelos distribuidos sobre toda la superficie de la célula (perítricos). Los flagelos bacterianos son la estructura de movilidad mejor comprendida de cualquier organismo. Los flagelos están compuestos por cerca de 20 proteínas, con aproximadamente otras 30 proteínas para la regulación y coordinación. Las bacterias móviles son atraídas o alejadas por ciertos estímulos del comportamiento denominados *taxis*: éstos incluyen quimiotaxis, fototaxis y magnetotaxis (Lux y Shi, 2004).

Patógeno.

Un patógeno (del griego pathos, enfermedad y genein, engendrar), es cualquier microorganismo capaz de producir una enfermedad infecciosa. Incluye a los virus, bacterias, hongos y protozoos. La capacidad de un patógeno para producir enfermedad se conoce como patogenicidad. El mecanismo de la patogenicidad ha sido muy estudiado y tiene varios factores, algunos de los cuales son dependientes del agente patógeno y otros del huésped (Calderón, 1986).

Sintomatología.

El hospedante del cual se aísla una bacteria y los síntomas de la enfermedad, son considerados como puntos necesarios para la identificación de bacterias a nivel de especie. Sin embargo, las bacterias fitopatógenas ocasionan un gran número de síntomas entre los cuales se mencionan: tizones foliares, pudrición blanda, marchitamientos, sarnas, cánceres, etc. Lo que dificulta con gran certeza su identificación. Los síntomas de origen bacteriano, en contraste a los inducidos por virus y hongos en el tejido atacado se presenta una apariencia húmeda o grasosa y en las partes afectadas frecuentemente se desarrollan exudados, constituidos básicamente por células bacterianas (Rodríguez, 1991).

Mancha bacteriana del fruto (*Acidovorax avenae* pv. *citrulli*).

La mancha bacteriana del fruto fue detectada por primera vez en las islas Marianas en 1988. En 1989 apareció en los Estados Unidos en campos comerciales de sandía, con brotes graves aislados en Florida, Carolina del Sur e Indiana. Desde entonces, la enfermedad ha sido observada en otros estados al este de Estados Unidos (Wall *et al.*, 1990).

Es la bacteria causante de la mancha bacteriana del fruto (MBF) en el cultivo de Sandía (*Citrullus Vulgaris* Schard.) y otras cucurbitáceas Goth y Webb publicaron un

artículo en 1975, en el cual indicaron haber trabajado nuevamente con el microorganismo bacteriano, concluyendo que esta bacteria pertenece al género *Pseudomonas* y es negativa a la fluorescencia sobre KB, además que podía ser transmitida por semilla. Sin embargo esto último quedó inconcluso (Walcott y Gitanis, 2000).

Diez años después de lo que Crall y Schenck habían publicado, otra descripción fue publicada en el “Journal of Plant Disease” en Queensland, Australia en 1978, reafirmando que el patógeno pertenece al género *Pseudomonas*, originando que el mismo año, Schaad y colaboradores en la estación experimental de introducción de plantas en Georgia nombraran científicamente al agente casual de la mancha bacteriana del fruto como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subs. *citrullia* partir de ahí, la mancha bacteriana del fruto fue asociada con el género antes descrito (Latin y Hopkins, 1995).

Posteriormente Wall y colaboradores mediante un trabajo realizado con el mismo microorganismo bacteriano, concluyeron que la bacteria es un patógeno diseminado por semilla. Mas adelante, Wall presentó en 1979 la presencia por primera vez de la mancha bacteriana del fruto en campos comerciales de Florida. En el año de 1991, Somodi y colaboradores, describieron las características bioquímicas de el patógeno, originando que, en 1992 Willems y colaboradores reclasificaran al organismo como *Acidovorax avenae* subs. *citrulli* (Latin y Hopkins, 1995).

En años recientes, se ha detectado en algunas regiones de Estados Unidos (EUA) la bacteria *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (*Aac*), agente causal de la mancha bacteriana del fruto (MBF) en el cultivo de sandía. Esta bacteria ocasiona una pudrición en el fruto, tallos y hojas, tiene la particularidad de diseminarse por semilla. Dado que México es un país importador de semilla de los EUA, la introducción potencial de este patógeno es

significativa, especialmente en áreas donde la producción de sandía es importante (Rueda *et al.*, 2006).

Organismo causal.

La taxonomía del agente causal de la mancha bacteriana del fruto sigue siendo incierta. El patógeno es una bacteria con un único flagelo polar, Gram-negativa, con forma de bastoncillo y móvil. Fue descrita como que era muy similar pero no idéntica a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Stainer subs. *citrulli*, un patógeno de las plántulas de sandía identificado en 1979, que actualmente es clasificado taxonómicamente como *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Sowell y Schaad, 1979).

Síntomas ocasionados por fitobacterias.

Las bacterias fitopatógenas, causan enfermedades similares a las incitadas por otros patógenos, como son los hongos a virus. En forma general, en los estados iniciales de desarrollo de las enfermedades causadas por bacterias, los tejidos afectados son de aspecto húmedo o grasoso, cuando se observan a contra luz y pueden detectarse o diseminarse en formación de exudados. Los síntomas más comunes causados por bacterias son: las manchas, las cuales son necrosis limitadas y muy raramente provocan la muerte de la planta (Bardy y Jarrell, 2003).

Los síntomas se pueden presentar a nivel del tallo, hojas o frutos y la bacteria puede penetrar por estomas, heridas y una vez dentro, se multiplican y dispersan en la cavidad sub-estomática o espacios intercelulares y a la vez sintetiza sustancias que ocasionan plasmólisis de las células del tejido invadido y se desarrollan manchas de aspecto acuoso translúcido. Generalmente las manchas que se forman en las hojas, se encuentran delimitadas por las nervaduras. La marchitez, algunas bacterias tienen preferencia por invadir tejidos internos como el xilema e inducir marchitez (Anónimo, 1997).

Dependiendo del número haces vasculares infectados la flacidez o pérdida de turgencia puede ocurrir, en toda la planta al mismo tiempo. Los tizones: se inician como pequeñas lesiones necróticas y pueden llegar a invadir todo el tejido. Si la bacteria penetra por las flores o brotes, estos puntos mueren y la infección progresa hacia abajo, por lo que el síntoma es referido como muerte descendente (Anónimo, 1997).

Los cánceres son lesiones localizadas, resultantes en una herida abierta, generalmente en tejidos leñosos. Se inicia como mancha de tejido muerto, el cual puede circundar tallos o troncos. El síntoma típico es un debilitamiento general de la planta. La hipertrofia: es un crecimiento excesivo de tejido vegetal, debido a una elongación celular normal. La hiperplasia: es un crecimiento excesivo de tejido vegetal, debido a un aumento en su división celular (Villareal, 1980).

La pudrición: cuando la bacteria avanza rápidamente a través del tejido del hospedante desintegrándolo se dice que se trata de una pudrición. El reblandecimiento, decoloración y con frecuencia desintegración de los tejidos de una planta suculenta como resultado de una infección de un patógeno. La clorosis: amarillamiento de los tejidos normalmente verdes ocasionados por la destrucción de la clorofila o al no poder sintetizarla. Las roñas: son lesiones localizadas de aspecto áspero, que afecta principalmente al tejido epidérmico y únicamente se presenta en la parte subterránea de la planta. Los canchales: son necrosis de la epidermis o corteza, tanto de tallos y raíces, en algunas ocasiones se pueden desarrollar en venas foliares (Villareal, 1980).

A continuación se indican en el Cuadro 1 y 2, la clasificación de enfermedades causadas por agentes infecciosos en plantas y la clasificación de bacterias fitopatógenas de acuerdo al tipo de ataque acorde a Rueda y Sánchez (1997).

Cuadro 1. Clasificación de enfermedades causadas por agentes infecciosos en plantas.

Alteración	Nombre del síntoma	Nombre técnico
Cambio celular	Cambio de coloración	CLOROSIS (amarillamiento, anular, angular, ojo de pájaro, mosaicos, bandeados punteados, rayados)
Muerte celular	Pudrición, Enegrecimiento, Antracnósis, Cancros (chancros)	NECROSIS
Desbalance hídrico	Flacidez, Deshidratación, Acame.	MARCHITEZ
Superdesarrollo o supercrecimiento	Tumores, Agallas, Verrucósis, Gigantismo, Pústulas, Ampollas, Enchinamiento, Chahuistle.	HIPERPLASIA HIPERTROFIA

Cambio o alteración fisiológica de las plantas	Síntoma asociado	Órgano principal
Alteración del proceso Embrionario	Tejido principal	
Alteración de la absorción	Parénquima y epidermis	Raíz, pelos absorbentes
Alteración del transporte ascendente	Marchitez y necrosis (tallo, raíz, pecíolo-xilema) Subdesarrollo de la hoja	Raíz, Tallo, Pecíolo, Nervadura foliares
Alteración de la fotosíntesis Alteración de la respiración Alteración de la transpiración Alteración en el almacenamiento de nutrientes Reproducción Destrucción de reservas Alteración de la translocación		Movimiento de nutrientes a donde se necesite

(Rueda y Sánchez, 1997).

Cuadro 2. Clasificación de bacterias fitopatógenas de acuerdo al tipo de ataque.

	Parenquimatosas (mesófitas)	Vasculares o Sistémicas	Meristemáticos o hiperplásticos
Tejido	PARENQUIMA (esponjoso o empalizado)	Xilema y Floema	Meristemáticos (apical, cofia, procambium, cambium, embrión, proxilema-floema)
Órgano	HOJA, FLOR, FRUTO.	Tallos, Pecíolos, Nervaduras de hoja.	Raíz, Tallos, Flor, Fruto (semilla)
Síntoma	Cambio de color, necrosis (muerte celular)	Raíz (marchitez)	Yemas (superdesarrollo, subdesarrollo, cambio de coloración, Necrosis)
Géneros	<i>Erwinia</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Clavibacter</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Agrobacterium</i> <i>Pseudomonas</i>

(Rueda y Sánchez, 1997).

Ubicación taxonómica del agente causal de la mancha bacteriana del fruto de sandía y melón.

La clasificación taxonómica de la especie *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* es la siguiente:

Reino	Procariote
División	Gracillicutes
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Acidovorax</i>
Especie	<i>avenae</i>
Patovar	<i>citrulli</i>

(Hopkins *et al.*, 1992).

Síntomas de la mancha bacteriana del fruto.

El síntoma característico de la mancha bacteriana del fruto (MBF) en sandía es una mancha de color verde olivo oscuro en la superficie superior del fruto. La mancha es

perceptible primero como una pequeña área acuosa, con menos de 1 cm de diámetro, pero se expande rápidamente hasta cubrir gran parte de la superficie del fruto en siete a 10 días (Latin y Hopkins, 1995). Los mismos autores indican que, cuando aumenta de tamaño, el área alrededor del sitio inicial de la infección se hace necrótica. En fases avanzadas de desarrollo de lesión, la epidermis de la corteza se agrieta, y frecuentemente es exudada una sustancia transparente o de color ámbar.

Las lesiones del fruto raramente se extienden a la carne de la sandía, pero cuando esto ocurre, las bacterias contaminan a las semillas. La MBF también afecta al melón teniendo a menudo como resultado unos agujeros acuosos en la superficie del fruto (Latin y Hopkins, 1995).

La MBF infecta también las hojas, aunque el follaje alrededor del fruto infectado puede aparecer sano aun para quien sea un experto. Las lesiones foliares son pequeñas, de color pardo oscuro. Debido a que el patógeno es portado por semilla, y a que una parte considerable de los campos de melón se plantan con plántulas cultivadas en invernadero u otras instalaciones de transplantes, es importante el reconocimiento de los síntomas en las plántulas, en estas el síntoma inicial es la presencia de un área acuosa en la parte inferior de los cotiledones, las lesiones se hacen necróticas y se extiende por el nervio central (Zitter *et al.*, 2004).

Con respecto al agente casual de la mancha bacteriana del fruto los primeros síntomas en la planta de sandía, aparece como la absorción de agua oscura, en la superficie más baja de los cotiledones y hojas, seguidos por lesiones necróticas, frecuentemente con halos cloróticos. En las plantas jóvenes, las lesiones pueden ocurrir en el hipocotilo (Hopkins *et al.*, 1992).

La bacteria entra a la fruta a través de pequeñas aberturas (estomas), y una pequeña lesión en el lugar de la absorción de agua, se desarrolla de tres a siete días más tarde. Los síntomas en la superficie de la fruta, comienzan como pequeñas áreas de apariencia grasosa, con problemas en el proceso de absorción de agua de unos cuantos milímetros de diámetro, dichas manifestaciones aumentan rápidamente a un color verde oscuro y se amplían a varios centímetros de diámetro, teniendo márgenes irregulares. En unos cuantos días, estas lesiones pueden extenderse rápidamente, hasta cubrir por entero la superficie superior de la fruta, dejando solamente la porción que hace contacto con el suelo, sin síntomas (Somodi *et al.*, 1991).

Los síntomas de la mancha bacteriana del fruto (*Acidovorax avenae Subs citrulli*) se presenta cuando las condiciones de temperatura de 30 °C y 90% de humedad relativa son las indicadas para su desarrollo (Walcott *et al.*, 2004). Por el grado de devastación de esta enfermedad de *Acidovorax* ha alcanzado en diversos lugares productores de EUA, que esta bacteria haya sido catalogada como de importancia cuarentenaria, dando lugar a una suspensión de venta de semilla de sandía en 1995, misma que amenazó con la eliminación definitiva de este cultivo en ese país (Latin y Hopkins, 1995).

Según Maude (1996), los mecanismos por los que *Acidovorax avenae pv citrulli* tiene acceso a la semillas de sandía. Las semillas pueden ser infestadas por tres mecanismos generales, en primer lugar, las semillas se contaminan por contacto accidental con tejidos infectados de ovario durante las etapas de pre y post extracción. En segundo lugar, las semillas también pueden ser infestadas por la circulación de agentes patógenos de plantas infectadas. Por último, las semillas pueden llegar a ser infestadas por las invasiones de las estructuras florales.

Ciclo de la enfermedad.

El patógeno de la mancha bacteriana del fruto es portado por las semillas. Puede aparecer contaminación interna y externa de la envoltura de la semilla; sin embargo, no existe evidencia de infección dentro de las semillas. Las semillas contaminadas producen plántulas infectadas, que sirven como fuente importante de inoculó secundario, especialmente en las instalaciones de producción de trasplantes, donde las condiciones cálidas y húmedas, el riego aéreo y una cubierta de tejido vegetal susceptible favorecen la dispersión del patógeno y aumenta la enfermedad (Latin y Hopkins, 1995).

Aparecen infecciones secundarias después de que las bacterias consigan entrar en los tejidos vegetales a través de aperturas naturales, como los estomas. En el campo, las bacterias producidas en las superficies de las lesiones son dispersadas por las salpicaduras de lluvia a las hojas recién desarrolladas y a las plantas próximas. Las lesiones foliares son mas importantes como fuente primaria de bacterias para la infección del fruto (Rane y Latín, 1992).

La fuente primaria de inoculó más importante para la MBF es la semilla de sandía contaminada, y el riesgo de brote de enfermedad es alto cuando los trasplantes de plántulas son empleados para promover el establecimiento de cosecha rápido y uniforme. Esto porque las condiciones en las instalaciones de producción de trasplante, incluye la alta densidad de plantas, gastos generales de irrigación, la alta humedad relativa y altas temperaturas son propicias para el desarrollo de la MBF (Lessl *et al.*, 2007).

Epidemiología.

El incremento y la propagación de la mancha del fruto están asociados con las condiciones cálidas y húmedas en las áreas de producción de sandía y en las instalaciones para producción de trasplantes en el este de los Estados Unidos. Debido a que la

enfermedad ha sido descubierta recientemente, todavía se están llevando a cabo investigaciones sobre su epidemiología (Hopkins, 1989).

Los resultados preliminares sugieren que el patógeno es dispersado por salpicaduras de agua y que puede aparecer una infección positiva con períodos de humedad foliar de sólo 30 minutos a temperaturas rondando los 26 °C. La tasa de transmisión de la enfermedad puede ser especialmente elevada en instalaciones para producción de transplantes donde las condiciones ambientales y la falta de resistencia del huésped favorezcan el rápido avance de la enfermedad (Hopkins, 1989).

La bacteria *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en diferentes países del mundo.

Desde 1996, la mancha bacteriana del fruto ha sido responsable de pérdidas económicas significativas en cucurbitáceas cultivadas incluyendo los melones, las sandías, etc. en varios tipos de tierras en los Estados Unidos, Australia, Costa Rica, Nicaragua, China, Japón y Brasil (Walcott *et al.*, 2004).

La bacteria aislada de plántulas enfermas mostró ser agresiva sobre la sandía, y en varios ensayos bioquímicos mostró la mayor similitud a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* pv. *citrulli*. Más tarde *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* fue interceptado en semillas de sandía importadas en los años 1992 a 1994. Los brotes naturales de la mancha bacteriana del fruto ocurrieron en varios campos de sandía y melón e invernaderos de diferentes regiones Israelíes durante 2000 a 2003, causando pérdidas económicas, sobre todo en 2002 (Burdman *et al.*, 2005).

Actualmente, no está claro cómo la semilla se infesta con *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*. En investigaciones preliminares, la semilla de sandías, se muestra sin síntomas próximos a la fruta, pero que muestra los síntomas de la mancha bacteriana del fruto. En

campos comerciales en Georgia en 1996 y 1997 fueron determinados para ser infestados con la bacteria (Walcott *et al.*, 1999).

Debido a las costosas demandas presentadas por los productores en contra de las empresas de semillas de sandía. La mancha bacteriana del fruto representa una grave amenaza para la industria de la sandía. Por ejemplo, a mediados de los 1990, a fin de evitar costosas demandas, varias empresas de semillas en los Estados Unidos suspendieron la venta de semillas de sandía en varios estados del sudeste que se consideraban de alto riesgo de brotes de MBF (Schaad *et al.*, 2003).

Control.

El control de la mancha bacteriana del fruto depende de la disponibilidad de semillas no contaminadas de sandía. Los tratamientos con agua caliente y lejía no son eficaces para eliminar la contaminación de las semillas infestadas. Los campos infestados con el patógeno de la mancha del fruto se deben arar en otoño, y se deben controlar las plántulas voluntarias de sandía durante el siguiente año para eliminar las fuentes de inóculo (Hopkins, 1989).

Se debe hacer la rotación de los campos donde se hayan cultivado cucurbitáceas durante tres o más años. Se deben seguir los procedimientos sanitarios normales de los invernaderos, especialmente en estructuras donde hayan aparecido brotes de esta enfermedad. Si los programas de pulverización del campo se inician antes del cuajado del fruto, las aplicaciones periódicas de productos a base de cobre pueden ocasionar una reducción de la tasa de transmisión de la enfermedad, pero pueden ser de un valor mínimo en condiciones altamente favorables para el desarrollo de la enfermedad (Hopkins, 1990).

Técnicas de diagnóstico para bacterias.

Tinción de Gram. La tinción de Gram fue desarrollada en 1883 por Christian Gram en Dinamarca. Además uno de los pasos de mayor importancia para la identificación de una bacteria desconocida, es por medio de la tinción de Gram o frotis preparado de cultivo jóvenes. El resultado de esta tinción es necesario para la decisión de criterio a usar en la identificación posterior. La capacidad de las bacterias Gram positivas son las de retener el colorante cristal violeta y esto se debe a que sus paredes celulares son más espesas y de apariencia relativamente amorfa, mientras que las bacterias Gram negativas son mucho más complicadas presentando una estructura de muchas capas (Manovsky, 1982).

También existen diferencias en la composición química de las membranas y en la localización de los polímeros, principalmente que en las Gram positivas poseen mayor cantidad de Ribonucleato Magnésico que las bacterias Gram negativas; el complejo violeta de genciana yodo, es retenido en la pared celular por un compuesto lipoproteico. Según esta reacción las bacterias Gram (+) se tiñen de un color violeta oscuro y las Gram (-) se tiñen de un color rojo (Manovsky, 1982).

Pruebas de Patogenicidad. Para realizar la prueba de patogenicidad es necesario seleccionar un método de inoculación adecuado para el hospedante, el cual dependerá de varios factores como son el tipo de síntomas, órgano o tejido afectado y la vía de entrada del patógeno al hospedante; además para tratar de reproducir los síntomas típicos a nivel invernadero, también se debe de considerar las condiciones ambientales que permiten la manifestación de los síntomas en el campo (Manovsky, 1982).

Es preciso también señalar, que para realizar estas pruebas es necesario que los cultivos bacterianos estén puros y tengan unas 24-48 h de edad. La penetración de las bacterias, a sus hospedantes generalmente es pasiva, esto es, entran a través de heridas o

aberturas naturales, por lo que al hacer la inoculación artificial se debe de favorecer su penetración, por este motivo se han ideado diferentes métodos de inoculación que son por aspersión, la cual es una técnica recomendable para aquellas bacterias que causan manchas foliares o tizones, porque penetran principalmente por los estomas. Esta prueba puede hacerse manual. La punción: es el método más apropiado de inoculación artificial de bacterias causantes de marchitamiento o pudriciones blandas. Los tallos u órganos carnosos se pinchan con una aguja, navaja o palillos sumergidos previamente en una suspensión bacteriana (Manovsky, 1982).

La inmersión en suspensión bacteriana, es cuando se trabaja con una inmersión de plántula o semilla en una suspensión bacteriana durante 10-18 h, seguida del transplante o se siembra en suelo esterilizado; puede ser suficiente para reproducir síntomas en unas tres ó cuatro semanas (Bradbury, 1986).

Técnica de diagnóstico ELISA. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Es una prueba confiable y rápida para la detección de bacterias fitopatógenas, ya que permite detectar, en órganos de plantas, cantidades muy pequeñas de estos agentes y además permite estimar su concentración en el tejido enfermo. La sensibilidad de ELISA es superior a otras pruebas de diagnóstico, por lo que ha sido extensamente utilizada para la detección de patógenos en humanos, animales y plantas (Flores, 1997).

Los procedimientos generales de la técnica ELISA son: dispensar muestras y conjugado, incubar a 37 °C ó a temperatura ambiente, lavar los pozos, dispensar cromógeno/sustrato, incubar a 37 °C ó a temperatura ambiente, dispensar solución de parada, leer en lector de tiras ó placas de ELISA. Los equipos se requieren para montar las técnicas ELISA son: Pipetas P20, P100, P200 y P1000 para servir la muestra, y además de baño maría o baño seco, agitador de placas, lavador automático, pipeta multicanal ó

distribuidoras (repetidora), lector de tiras ó placa de ELISA y opcionalmente un procesador automatizado de placas de ELISA (Singh y Somerville, 1992).

Las pruebas serológicas como Elisa, están basadas en la capacidad que tienen las bacterias (antígeno) para desencadenar la producción de inmunoglobulinas (anticuerpo) cuando son inyectados en organismos de sangre caliente. Estos anticuerpos reaccionan específicamente con la proteína del patógeno inyectado. La sensibilidad de ELISA es superior a otras pruebas serológicas, por lo que ha sido extensamente utilizada para la detección de patógenos en humanos, animales y plantas.

El ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas o ELISA, es una prueba confiable y rápida para la detección de organismos fitopatógenos como bacterias, virus, hongos, ya que permite detectar, en órganos de plantas, cantidades muy pequeñas de estos agentes y además permite estimar su concentración en el tejido enfermo. El ensayo denominado sándwich de doble anticuerpo (DAS) es la variante más comúnmente utilizada de ELISA y constituye en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno, los antígenos o fitopatógenos reaccionan con los anticuerpos adheridos a la placa (Cruz, 1997).

MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el estado de Sonora, México; inició en enero de 2007 y finalizó en Julio de 2008.

Localización del sitio de muestreo.

El estado de Sonora esta ubicado al Noroeste de la República Mexicana, colinda al Norte con Estados Unidos de América; al este con Chihuahua; al Sur con Sinaloa y el Golfo de California; Además Sonora tiene una elevación de 210 msnm promedio; posee una superficie de 184,934 km²; ocupando el segundo lugar en superficie de entre todas las entidades federativas de la República Mexicana, de la cual comprende al 9.2% del total de la superficie del País. Su clima predominante es seco, semi-cálido; con precipitación promedio anual de 369.38 milímetros. Los valores medios que acontecen de humedad relativa en el estado de Sonora van de 40 a 75% de humedad relativa (INEGI, 2007).

Tradicionalmente, la economía sonorenses ha estado basada en el sector económico primario, aunque ahora está muy diversificada. El desarrollo de la agricultura juega un papel muy importante en la economía del país, razón por la que se le ha denominado 'granero nacional'; destaca el cultivo de trigo, cártamo, soya, algodón y alfalfa; y de maíz, chile, y frutales como melón, sandía, vid, naranja, limón agrio, manzana y perón (INEGI, 2007).

Caborca. Colinda con los siguientes municipios: al norte con Estados Unidos, al Sur con Pitiquito, al Este con Altar y al Noroeste con Puerto Peñasco y al Suroeste con el Golfo de California. Cuenta con una superficie de 10,721 km², altura de 289 msnm, se localiza en el paralelo 30° 42' de Latitud Norte y el meridiano 112° 09' de Longitud al Oeste de Greenwich, su clima seco semicálido extremo, con temperatura de 41°C (INEGI, 2007).

Cajeme. Este municipio está ubicado en el Suroeste del estado de Sonora, su cabecera es la población de Ciudad Obregón y se localiza en el paralelo 27° 29' de Latitud Norte y a los 109° 56' de Longitud al Oeste del meridiano de Greenwich, a una altura de 46 msnm. Posee una superficie de 3,312.05 km² (INEGI, 2007).

Guaymas. Este municipio colinda al Norte, con La Colorada; al Sur con San Ignacio Río Muerto; al Este, con Suaqui Grande, Cajeme y Bácum; al Noroeste, con Hermosillo y al Suroeste, con el Golfo de California y Empalme. Posee una superficie de 12,208.18 km², una altitud de 10 msnm, Latitud: 27° 55' 6" N, Longitud: 110° 53' 56" W. Se localiza en un área semiárida plana. El clima es seco y muy caliente, su temperatura media 31 °C (INEGI, 2007).

Hermosillo. Colinda al Noreste con Carbó y San Miguel de Horcasitas; al Este con Ures y Mazatán; al Sureste con La Colorada y Guaymas; Noroeste con Pitiquito y al Suroeste con el Golfo de California. Tiene una altura de 210 msnm. Posee una superficie 14,880.2 km². Se localiza en el paralelo 29° 05' de Latitud Norte y el meridiano 110° 57' de Longitud Oeste de Greenwich, su clima es caluroso y extremo, su temperatura en ocasiones supera los 45°C. Su récord es de 48 °C (INEGI, 2007).

Navojoa. Colinda al Norte con los municipios de Cajeme y Quiriego, al Este con Álamos, al Suroeste con Huatabampo y al Oeste con Etchojoa. Posee una superficie de 4,381 Km², su Altitud es de 50 msnm, Latitud 27° 04' 51" N, Longitud 109° 26' 43" O, su clima es semiseco, temperatura de 32.7 °C (INEGI, 2007).

Desarrollo de la investigación.

La investigación se realizó en dos etapas. La primera consistió en el incremento de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Aac) con medios de cultivo específicos, pruebas de patogenicidad en semilla, plántula y fruto con fines de familiarización de los signos de Aac

y su identificación mediante técnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay); la segunda etapa incluyó la obtención de semilla de importación, un muestreo de plántulas, hojas desarrolladas y frutos de sandía y melón en los municipios en estudio del estado de Sonora, y su correspondiente análisis fitopatológico mediante el uso de medios de cultivo específicos y ELISA. Asimismo se llevaron a cabo, pruebas de patogenicidad en aquellas muestras (órganos vegetativos muestreados) que resultaron positivas a la presencia de *Aac*. La cepa bacteriana de *Aac* fue proporcionada por la empresa Nunhems USA Inc.

Primera etapa.

Incremento de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*. Se inició con el incremento de *Aac* y fue desarrollada según el protocolo establecido por Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.* (2006): para ello se utilizaron medios de cultivos específicos T125 y MS-153, proporcionados por la Universidad de California, EUA.

De acuerdo con la técnica descrita por Delaat (2001), se obtienen 10 tubos de ensayo en solución salina al 0.85% de NaCl con una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias UFC/ml (Figura 1) verificada con ayuda de un hematocímetro, confirmación que fue desarrollada de la siguiente manera: se utilizó una cámara de recuento de Petroff-Hauser: La cámara también es conocida como contador de células o hematocímetro (contador de glóbulos). Consiste en un portaobjetos especial con una graduación en superficie y unas medidas muy concretas: a) excavación con 0.02 mm de profundidad; b) área de 1 mm^2 , dividida en un retículo de 25 cuadrados grandes; c) cada cuadrado grande está subdividido a su vez en $4 \times 4 = 16$ cuadrados pequeños.

La muestra se distribuye en $16 \times 25 = 400$ celdillas (cuadros pequeños) y una vez dispensada entre el porta y el cubre objeto, se deja reposar sobre la plataforma del microscopio durante unos minutos, y se cuenta el número de células en varias celdillas

(normalmente en 16, equivalentes a uno de los cuadros grandes). Se anota el número n de células observadas en esas 16 celdillas. Entonces, la concentración celular es fácil de establecer:

$$n \times 25 \times 50 \times 1000 = \text{concentración en células/ml.}$$

Posteriormente, después del conteo bacteriano, las suspensiones bacterianas en tubos fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C para su conservación.



Figura 1. Preparación de la solución salina al 0.85% de NaCl con una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias.

Pruebas de patogenicidad. Las Pruebas de Patogenicidad (PP) Se desarrollaron con la finalidad de familiarizarse con la sintomatología de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*, las

cuales, fueron realizadas en semilla, plántula y fruto de sandía y melón. En el caso de semilla, 20 semillas fueron sumergidas en 200 ml durante 15 minutos en una suspensión bacteriana de 10^8 UFC/ml sembrándose, en vasos de vidrio por separado y conteniendo sustrato estéril tipo peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canadá, Ltd.); asimismo, otras 20 semillas se consideraron como control negativo al pasar por el mismo proceso, pero haciendo uso de agua destilada estéril en la imbibición.

Respecto a las PP en plántulas, 40 semillas previamente desinfectadas, fueron germinadas en placas de germinación con sustrato estéril (mismas características usadas en las pruebas de patogenicidad de semillas); las condiciones en que se produjeron las plántulas fueron a 25 °C haciendo uso de agua corriente de llave estéril para el riego; al cabo de 20 días después de la emergencia, 20 plántulas fueron inoculadas con la solución bacteriana de *Aac* a una concentración de 10^8 UFC/ml con la ayuda de un cotonete de algodón sobre los cotiledones de las plántulas; las restantes 20 plántulas fueron consideradas como control negativo al pasar por el mismo proceso con cotonete más agua destilada estéril (Figura 2).

Las Pruebas de Patogenicidad en fruto, se desarrollaron con aquellos maduros entre dos y 3 kg y no más de 10 días después de su corte de la planta madre y obtenidos para su venta. Tres frutos (previamente desinfectados) se inocularon punzándolos primeramente y adicionando con un cotonete 1 ml de suspensión bacteriana a una concentración de 10^8 UFC/ml de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Figura 3). Un fruto más fue utilizado como control negativo al ser punzado e inoculado con agua destilada estéril.

Las semillas, plántulas y frutos utilizados las PP, posterior a la inoculación, fueron cubiertas con bolsas de polietileno y ubicadas en una cámara de incubación con una humedad relativa entre 80-90% y una temperatura de 35-41 °C por un período de cuatro a

siete días (Figura 4); condiciones según Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (2006). las cuales son apropiadas para inducir los signos de la enfermedad.



Figura 2. Plántulas inoculadas con la solución bacteriana de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* a una concentración de 10^8 UFC/ml con la ayuda de un cotonete.



Figura 3. Frutos (previamente desinfectados) se inocularon punzándolos y adicionando con un cotonete 1 ml de suspensión bacteriana *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*.

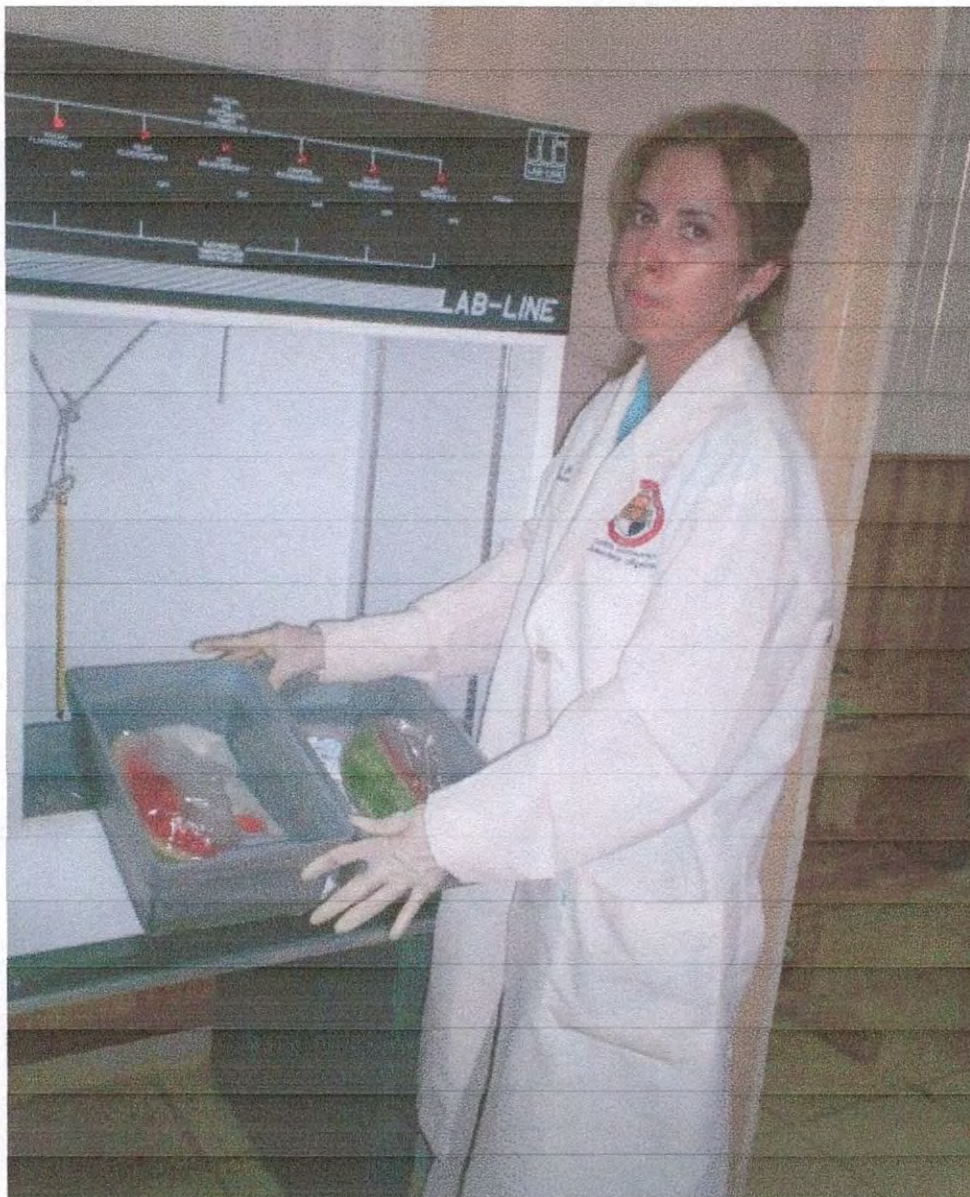


Figura 4. Cámara de incubación con una humedad relativa entre 80-90% y una temperatura de 35-41 °C por un período cuatro a siete días.

Segunda etapa.

Obtención de semilla. Para la detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*, la obtención de semilla de importación, se obtuvo la colaboración de la Confederación Nacional de Productores Hortícolas (CNPH); para el caso de obtención de semilla cada uno de los productores, facilitaron una cantidad de 100-150 semillas para el análisis.

Muestreo vegetativo. En el muestreo en plántulas, se obtuvo en aquellas que no presentaron la primera hoja verdadera durante los primeros quince días después de su emergencia. Para el caso de hojas desarrolladas, se consideraron aquellas entre las cinco y quince hojas a partir del tronco de la base del tallo de la planta en fase de floración. Para la obtención de fruto, se consideraron los más próximos a corte y de posterior venta. Cabe indicar que aquellas plántulas, hojas o frutos de plantas que mostraron una sintomatología similar a la de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* también fueron colectados.

El muestreo se realizó en el 10% del total de la superficie cultivable de los municipios de Caborca, Cajeme, Guaymas, Hermosillo y Navojoa productores de sandía y melón. Para el desarrollo de toma de muestras se consideró lo siguiente: En el 10% de la superficie de cada municipio se hizo una divisiones de 5 ha que fue considerada como parcela hipotética a muestrear (se obtienen donaciones de productores).

En los lotes se realiza lo siguiente: cada lote se dividió en hectáreas, cada ha de superficie fue considerada un punto de muestreo. En cada punto se trazo una línea diagonal imaginaria de esquina a esquina, y en esa recta trazada se colectaron 10 muestras. Terminado el muestreo en cada punto, la colecta se repitió en los puntos restantes hasta completar el número de hectáreas (puntos) del lote. Cada una de las muestras colectadas, previamente identificada, se envolvió con papel húmedo y se colocaron en una hielera para ser trasladada al laboratorio para su análisis (Figura 5).

Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla de importación mediante medios de cultivos. La técnica desarrollada fue siguiendo la de Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.* (2006), la cual consistió en lo siguiente.



Figura 5. Muestreo y traslado de plántulas, hojas o frutos de Sandía y melón.

Cada muestra de semilla; consistente en 20 semillas provenientes de cada uno de los lotes de los productores cooperantes, se pesó por separado, se lavó en agua corriente durante 30 minutos y se colocó en charolas de plástico con capacidad de 2 L. Cada charola, con su respectiva muestra de semilla se deja con una cantidad de 100 ml de agua destilada, y a cada una de estas charolas se le añaden 2 ml de solución amortiguadora fosfatasa con un $\text{pH} = 7$. A la mezcla de agua con fosfatasa conteniendo cada muestra de semillas se le llamó “suspensión madre”.

Las charolas se incubaron durante 12 h en refrigeración a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la finalidad de que se libere la bacteria a la suspensión madre. Después de la incubación, se tomó 10 ml de suspensión madre de cada una de las charolas, se le realizó cuatro diluciones a tal suspensión (10:1, 10:2, 10:3, 10:4), y de la última dilución se tomó 0.1 ml que se sembró en medio de cultivo específico en cajas de Petri por el método de dispersión por varilla (Roger

et al., 1981) (Figura 6). Los medios se incubaron durante siete días a 34 °C. Posteriormente, se incubaron los medios inoculados a una temperatura de 35 °C durante siete días.



Figura 6. Medio de cultivo específico por dispersión por varilla.

Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica ELISA. Para el proceso de identificación de *Aac* se aplicó la técnica serológica ELISA, siguiendo el protocolo general de identificación de bacterias AGDIA (compañía americana líder en el diagnóstico de patógenos de plantas). El kit de *Aac* fue donado por el mega-proyecto al que pertenece esta investigación y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Secretaría de Agricultura.

La técnica consistió en hacer uso de pipetas estériles y depositando a cada pozo de la placa, 100 µl de anticuerpo del kit con una solución amortiguadora de cubierta a 1X. La placa fue incubada en una cámara húmeda durante la noche en el refrigerador a 4 °C.

Posteriormente, se lavó la placa vaciando el contenido de los pozos en un recipiente para residuos. Se llenaron los pozos hasta desbordar de una solución amortiguadora a 1X denominada PBST, después se vació la placa rápidamente una y otra vez. Se repitió la acción de cuatro a ocho veces. Las placas se colocaron boca abajo y se golpearon ligera y firmemente en una toalla de papel doblada para secar los pozos. Posteriormente, segmentos de 5 cm² de material vegetativo (considerando parte sana y enferma) de las pruebas de patogenicidad, se maceraron con la ayuda de un mortero y un mazo hasta obtener suficiente extracto, utilizando bolsas de polietileno para macerar tejido en el interior de ellas (Figura 7).

Se obtuvo el líquido total de cada muestra macerada; se diluyó el extracto en tubos Ependorf con un almacenador intermediario de extracción de la muestra en un cociente de 1:10 (volumen de extracto: volumen de almacenador intermediario). De cada muestra, se extrajo 100 µl de la muestra y se depositaron en cada pozo de la placa (Figura 8). En esta fase y acorde al diagrama realizado, se depositaron en tres celdas 100 µl del control positivo de *Aac* y del control negativo –solución amortiguadora de extracción (SAE)-. Tres celdas con SAE fueron consideradas como controles o testigos negativos (Control 1 =C₁=, Control 2 =C₂= y Control 3 =C₃=).

Se incubó la placa dentro de una cámara húmeda durante la noche en el refrigerador a 4 °C. Se lavó la placa realizando movimientos de un tirón rápido para descargar el contenido de los pozos en un recipiente para residuos, sin mezclar el contenido. Se llenaron todos los pozos de una solución amortiguadora de lavado, y se vaciaron al instante. Utilizando nuevas pipetas estériles para cada muestra y prevenir la contaminación, se depositaron 100 µl en los pozos de la enzima conjugada y se mezcló.



Figura 7. Maceramiento de las muestras vegetativas con la ayuda de un mortero y un mazo.



Figura 8. Muestras depositadas en los pozos de la placa ELISA y se incubó la placa en una cámara húmeda por dos horas a temperatura ambiente.

contenido de cada celda. Se incubó la placa en una cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente

Posteriormente, la placa al revés se golpeó ligera y firmemente en una toalla de papel doblada para que los pozos fueran secados. Esta acción se repite de cuatro a ocho veces. En condiciones de oscuridad se añaden a cada pozo 100 µl de solución reveladora denominada PNP. Se incubó la placa por 30 a 60 minutos en una cámara húmeda y para la reacción agregando 50 µl a 3M de hidróxido de sodio en cada pozo.

Los resultados fueron interpretados hasta 60 minutos después de la incubación y mientras los pozos con control negativos permanecieran claros. Las placas fueron evaluadas en un lector ELISA a 405 nm. Para decidir si las muestras son positivas a la presencia de *Aac* se llevó a cabo el criterio que utiliza el Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección General de Sanidad Vegetal, la cual consiste en considerar los valores obtenidos del lector ELISA de los tres testigos o controles negativos de la placa en estudio (C_1 , C_2 , y C_3), aplicando la siguiente fórmula:

$$VD = C_1 + C_2 + C_3 / 3 * 2$$

(VD= Valor de decisión; C_1 = control o testigo negativo uno; C_2 = control o testigo negativo dos; C_3 = control o testigo negativo tres).

Se obtuvo una media de los tres valores de los controles y/o testigos negativos y el resultado se multiplica por dos. Por arriba del valor obtenido de esa operación (Valor de decisión), fueron consideradas positivas, aquellas celdas que lo manifiesten (Figura 9).

Pruebas de patogenicidad (PP) a bacterias positivas con los diferentes métodos de detección. Para la reafirmación de las bacterias *Aac* que resultaron ser positivas en los anteriores métodos de detección, fueron llevados a cabo pruebas de patogenicidad con la técnica de Randhawa, acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.*

(2006). Las PP fueron aplicadas en plántulas de 25-30 días después de la emergencia, como se describió anteriormente en las PP de la primera fase. Se reaisló la bacteria de tejidos

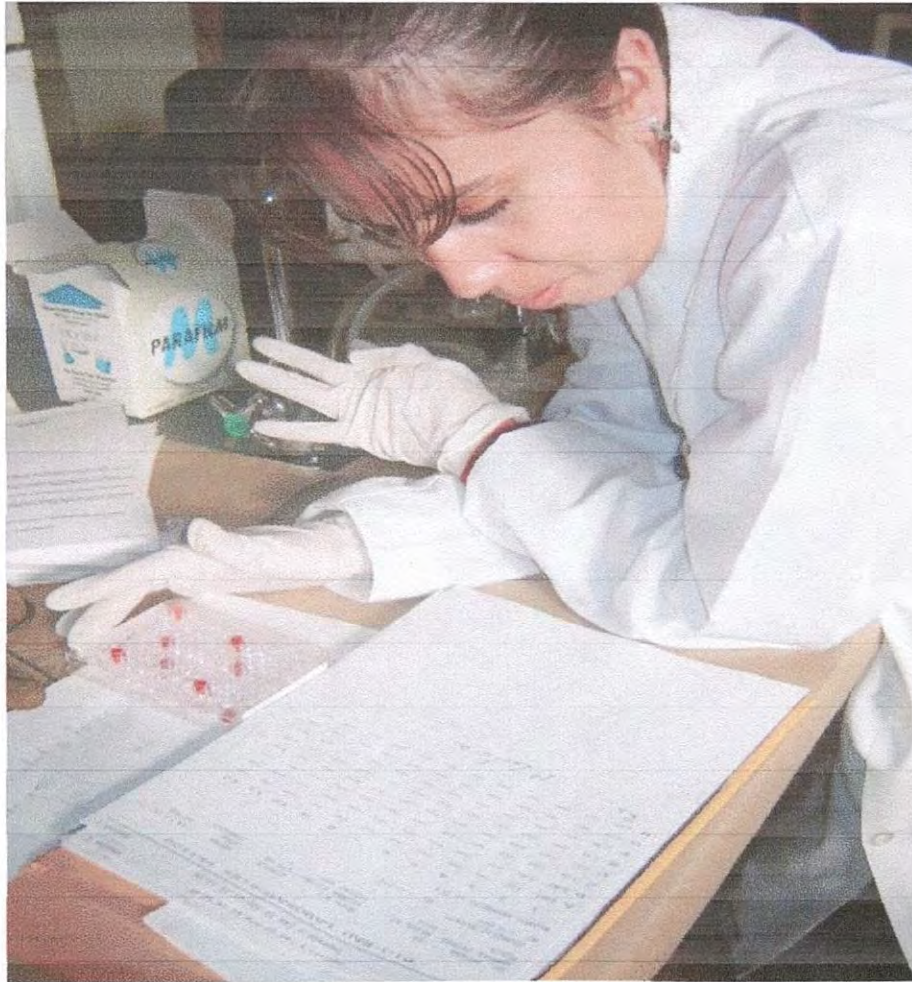


Figura 9. Análisis de datos revelados por el lector de placas ELISA.

enfermos mediante la técnica de Randhawa, acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.* (2006), confirmándose el patógeno por ELISA.

Diseño experimental.

El diagnóstico de enfermedades como ciencia práctica, incluye varias técnicas para identificación del agente causal de determinada enfermedad (Dhingra *et al.*, 1985).

Históricamente, las técnicas de diagnóstico han sido acotadas en base a síntomas, medios selectivos, caracterización morfológica y biológica, pruebas bioquímicas (ELISA), microscopía y plantas diferenciales entre otras (Livens *et al.*, 2003).

Actualmente con los avances en investigación se han establecido métodos nuevos de biología molecular para establecer la identidad de un patógeno. Técnicas tales como PCR, hibridación molecular y marcadores moleculares han sido de gran ayuda en los métodos de diagnóstico, aunque cabe mencionar que siempre es recomendable establecer al menos dos métodos independientes en la realización de un buen diagnóstico (Ronai y Yakubovskaya, 2005).

Normalmente, en los estudios relacionados con el diagnóstico en fitosanitario, no se usa un diseño experimental determinado (Jain *et al.*, 1998; Mesquita *et al.*, 1998; Kamel *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2004; Schena *et al.*, 2006; Emilie *et al.*, 2006), dado que el principal interés de este tipo de estudios está en la aportación científica que tengan que ver con la ampliación del conocimiento-aportación, validación, y complementación de las técnicas (Holguín-Peña, 2008). El diseño experimental *per se*, siempre será un complemento importante siempre y cuando sea de particular interés la comparación de tratamientos (Lelliott *et al.*, 2004; Dardon *et al.*, 2006; Rodríguez, 2008; Holguín-Peña, 2008). En este caso lo que es recomendable cuando se implementan experimentos en campo, son métodos de muestreo adecuados según sea el caso (Lelliott *et al.*, 2004). Por lo anterior y debido a que el presente estudio de investigación es de caracterización-diagnóstico y no de cohorte, no se utilizó un diseño experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Indudablemente la introducción de cepas virulentas de *Acidovorax* al país va a ser inevitable, ya que Bouzar *et al.* (1994), reportan que tan sólo el grupo de *Pseudomonas* ha sido introducido en México, al importar el 100% de la semilla de de sandía y melón de otros países, y es probable que en pocos años la especie *avenae* del género *Acidovorax* se encuentre causando serios problemas en las regiones productoras del país.

En Florida, Cox (1966), menciona que tan sólo una semilla contaminada de cada 100, es suficiente para causar una epifitía. En México la mayoría de las regiones productoras presentan condiciones favorables para el desarrollo de la mancha bacteriana del fruto, de ahí la importancia de desarrollar técnicas para su detección a fin de poder evitar daños innecesarios, así como la introducción al país de cepas más virulentas.

De los resultados obtenidos en el presente estudio, se muestra que en el estado de Sonora, no se manifiesta la enfermedad en el cultivo de sandía y melón dado a las condiciones climatológicas que muestra el estado de Sonora. No obstante aún cuando el microorganismo en estudio se encuentre presente en semilla de importación.

El muestreo de sandía y melón se realizó en los municipios de Caborca, Cajeme, Guaymas, Hermosillo y Navojoa (Cuadro 3). Como se puede observar, el municipio de Cajeme es el mayor productor de sandía con 2,027 hectáreas y melón con 1,679 hectáreas mientras que, Navojoa es el que dirige menor superficie de sandía con (10 hectáreas) y melón con otras 10 hectáreas. Además el cultivo de sandía y melón en Guaymas es desarrollado mediante un sistema de producción de riego y de temporal; para el caso de melón sobresale el de riego. La importancia de estas cucurbitáceas en el estado de Sonora, radica en sus bajos costos de producción, facilidad de manejo técnico durante el ciclo vegetativo, a su alta redituabilidad, y una gran demanda de mano de obra.

Cuadro 3. Superficies agrícolas dirigidas a la siembra de melón y sandía en Sonora, México; superficie muestreada para detectar *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (*Aac*) en Sonora.

Tipo de cultivo	Distrito	Superficie sembrada (ha)				
		Total	Riego	Temporal	Superficie muestreada de tipo riego 10%	Superficie muestreada tipo temporal
Sandía	Cajeme	2,027	2,027	0	202	0
	Guaymas	883	829	54	88	5.4
	Hermosillo	628	628	0	62	0
	Caborca	117	117	0	11	0
	Navojoa	10	10	0	1	0
	Total	3,684	3,645	54	368	5.4
Melón	Cajeme	1,679	1,679	0	167	0
	Guaymas	500	500	0	50	0
	Hermosillo	150	150	0	15	0
	Caborca	167	167	0	16	0
	Navojoa	10	10	0	1	0
	Total	2,535	2,535	0	253	0

Primera etapa. De las semillas embebidas en la suspensión bacteriana de 10^8 UFC/ml. El 14% no germinó, y las que lograron germinar entre los siete y 15 días bajo condiciones favorables de la enfermedad, presentaron una acuosidad en tallo y marchitez. Los cotiledones mostraron manchas irregulares de aspecto más oscuro y grasoso con relación al área sana, y finalmente se presentó la muerte de la plántula. Estos resultados concuerdan con Lessl *et al.* (2007), donde semilla de sandía fueron inoculadas al vacío con *Aac*, obteniendo como resultados que las semillas que no lograron germinar presentaron la testa acuosa, blanda y abierta con presencia del epicotilo, aspecto que indica que una fuente primaria de inoculó más importante para la mancha bacteriana del fruto, es la semilla de sandía contaminada, y el riesgo de brote de enfermedad es alto cuando los trasplantes de plántulas son empleados para promover el establecimiento de cosecha rápido y uniforme.

Esto último, porque las condiciones en las instalaciones de producción de trasplante, incluye la alta densidad de plantas, gastos generales de irrigación, la alta humedad relativa (hr) y altas temperaturas son propicias para el desarrollo MBF (Lessl *et al.*, 2007).

Acorde a las pruebas de patogenicidad en plántula, también se utilizó el mismo número que en semillas; los síntomas en esta etapa fueron manchas irregulares, en un principio claras y posteriormente oscuras y de aspecto grasoso, y al cabo de siete días la muerte, mientras que las plántulas consideradas como testigo negativo se desarrollaron adecuadamente. Estos resultados concuerdan con Hopkins *et al.* (1992) donde indican que en las plantas jóvenes, las lesiones pueden ocurrir en el hipocotilo.

Con respecto al agente casual de la mancha bacteriana del fruto, los primeros síntomas en la planta de sandía, aparece como la absorción de agua oscura, en la superficie más baja de los cotiledones y hojas, seguidos por lesiones necróticas, frecuentemente con halos cloróticos.

Para el caso de las pruebas de patogenicidad en fruto, al cabo de 15 días los inoculados mostraron en un principio exudados bacterianos y posteriormente manchas grasosas que con el paso del tiempo fueron coalesciendo (unión) y agrietando la superficie del fruto.

A los frutos se les hizo un corte transversal en el cual se observó un avance de la enfermedad hacia el interior, lo cual concuerda con Hopkins (1990); en los frutos considerados como testigo negativo, las lesiones mostraron un aspecto áspero, seco y rugoso. Para el caso de los inoculados con la bacteria en estudio, la bacteria entró a la fruta a través de pequeñas aberturas (estomas), y una pequeña lesión en el lugar de la absorción de agua, que se desarrolló de tres a siete días más tarde. Los síntomas en la superficie de la fruta, comenzaron como pequeñas áreas de apariencia grasosa, con problemas en el proceso

de absorción de agua de unos cuantos milímetros de diámetro, dichas manifestaciones aumentaron rápidamente a un color verde oscuro y se ampliaron a varios centímetros de diámetro, teniendo márgenes irregulares. En unos cuantos días, estas lesiones se extendieron rápidamente, hasta cubrir por entero la superficie superior de la fruta, dejando solamente la porción que hace contacto con la superficie donde estaban ubicados, sin síntomas; resultados que conforme a Somodi *et al.* (1991), concuerdan con el estudio.

Asimismo, los síntomas de la mancha bacteriana del fruto (*Acidovorax avenae* pv. *citrulli*) se presentaron cuando las condiciones de temperatura de 30 °C y 90% de humedad relativa estuvieron presentes en las pruebas de patogenicidad (Walcott *et al.*, 2004).

El efecto producido en semilla, plántula y frutos, confirman que el grado de devastación que esta enfermedad de *Acidovorax* ha alcanzado en diversos lugares productores de EUA, y que haya sido catalogada como de importancia cuarentenaria, dando lugar a una suspensión de venta de semilla de sandía en 1995, misma que amenazó con la eliminación definitiva de este cultivo en ese país (Latin y Hopkins, 1995).

Otra de las finalidades de la confirmación de la bacteria mediante pruebas de patogenicidad, fue el familiarizarse con los síntomas, ya que sería de gran utilidad para el muestreo y detección de la bacteria en Sonora, actividad que repercutió positivamente para el desarrollo de la segunda etapa.

Segunda etapa.

Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla de sandía. Usando la técnica de Randhawa se demostró la presencia de *Aac* en la semilla de sandía, únicamente en la que se obtuvo de productores de los municipios de Cajeme, Guaymas y Hermosillo y Navojoa (Cuadro 4); las características que presentaron las colonias, los medios específicos, el

selectivo y la reacción en la prueba de oxidasa fueron similares a las indicadas por Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.* (2006).

Un resultado similar ocurrió con la semilla obtenida de Caborca pero con la diferencia de que al llevar a cabo la prueba de oxidasa, las colonias no presentaron una reacción positiva al cabo de 10-15 seg como lo menciona Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.* (2006), indicativo para considerar negativa la presencia de *Aac*. Para la técnica ELISA, los resultados indicaron que la semilla obtenida de productores de Cajeme, Guaymas y Hermosillo resultó ser positiva a la presencia de *Aac*. Por otra parte, las muestras provenientes de agricultores de los municipios de Caborca y Navojoa fueron negativas a la presencia de la mancha bacteriana del fruto.

Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla de melón. Respecto a la semilla de melón, usando la técnica de Randhawa se demostró la presencia de *Aac*, únicamente en la que se obtuvo de productores de los municipios de Guaymas, Hermosillo y, Navojoa (Cuadro 4); las características que presentaron las colonias, los medios específicos, el selectivo y la reacción en la prueba de oxidasa fueron similares a las indicadas por Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.* (2006).

Un resultado similar ocurrió con la semilla obtenida de Caborca y Cajeme pero con la diferencia de que al llevar a cabo la prueba de oxidasa, las colonias no presentaron una reacción positiva. Los resultados obtenidos mediante la técnica de de ELISA indicaron resultados positivos excepto para los municipios de Navojoa y Cajeme.

Este resultado confirma la presencia de posibles mecanismos por los que *Acidovorax avenae* pv *citrulli* tiene acceso a la semillas de melón durante su ciclo vegetativo. Según Maude, las semillas pueden ser infestadas por tres mecanismos generales, en primer lugar, las semillas se contaminan por contacto accidental con tejidos

infectados de ovario durante las etapas de pre y post extracción. En segundo lugar, las semillas también pueden ser infestadas por la circulación de agentes patógenos de plantas infectadas. Por último, las semillas pueden llegar a ser infestadas por las invasiones de las estructuras florales (Maude, 1996).

Cuadro 4. Detección de *Acidovorax avenae pv. citrulli* en semilla de sandía y melón de importación proporcionada por productores del estado Sonora, México.

Tipo de cultivo	Municipio	BDK*	POX	Prueba ELISA
Sandía	Cajeme	+	+	+
	Guaymas	+	+	+
	Hermosillo	+	+	+
	Caborca	+	-	-
	Navojoa	+	+	-
Melón	Cajeme	-	-	-
	Guaymas	-	+	+
	Hermosillo	-	+	+
	Caborca	-	-	+
	Navojoa	+	+	-

* BDK= Medio de cultivo selectivo. POX= Prueba de oxidasa.

Detección de *Acidovorax avenae pv. citrulli* en plántula, hoja desarrollada y fruto-sandía y melón. Respecto a la detección de *Aac* en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto, los municipios muestreados fueron negativos a la presencia de la bacteria bajo las técnicas utilizadas (Cuadro 5). La comparación de los resultados obtenidos en el diagnóstico de semilla con los de la plántula, hojas, fruto, indicaron que la semilla viene infectada por *Aac*.

Cuadro 5. Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en plántula, hoja y fruto de sandía y melón, muestreado en áreas agrícolas del estado de Sonora.

Tipo de cultivo	Municipio	Órgano vegetal	T125*	MS153	BDK	POX	Prueba ELISA
Sandía	Cajeme	Plántula	-	-	+	-	-
		Hoja	-	-	-	+	-
		Fruto	-	-	-	+	-
	Guaymas	Plántula	+	-	+	-	-
		Hoja	-	-	+	+	-
		Fruto	-	-	+	-	-
	Hermosillo	Plántula	-	-	+	-	-
		Hoja	-	-	+	+	-
		Fruto	-	-	+	-	-
	Caborca	Plántula	-	-	-	-	-
		Hoja	-	-	-	+	-
		Fruto	+	-	-	+	-
Melón	Navojoa	Plántula	+	+	+	+	-
		Hoja	+	-	+	+	-
		Fruto	-	-	+	-	-
	Cajeme	Plántula	-	-	-	-	-
		Hoja	-	-	+	+	-
		Fruto	-	-	+	+	-
	Guaymas	Plántula	+	-	-	-	-
		Hoja	-	-	+	+	-
		Fruto	-	-	+	-	-
	Hermosillo	Plántula	-	-	+	-	-
		Hoja	-	-	+	+	-
		Fruto	-	-	+	-	-
	Caborca	Plántula	-	-	-	-	-
		Hoja	-	-	-	+	-
		Fruto	+	-	-	+	-
	Navojoa	Plántula	+	+	+	+	-
		Hoja	+	-	+	+	-
		Fruto	-	-	+	-	-

*T125 y MS153= Medios de cultivo específico. BDK= Medio de cultivo selectivo. POX= Prueba de oxidasa.

No obstante lo anterior, las condiciones adversas al patógeno en la región, como una media alta temperatura (35 °C) y baja humedad relativa que varía entre 40 y 55%, pudiese causar que el patógeno no tenga la capacidad de sobrevivir y por lo tanto no producir una infección en la planta de sandía y melón; esto podría traer como consecuencia que al procesar las muestras vegetativas mediante diferentes métodos de detección para *Aac* resultaran negativas. Estos resultados concuerdan con Gitaitis *et al.* (1987; 1992) indicando que las actividades pectolíticas por otros agentes causantes de enfermedades pueden enmascarar a alguno de ellos en particular.

Asimismo, es importante hacer notar que, no obstante lo anterior, entre los métodos utilizados, el serológico ha sido más eficiente en el diagnóstico de microorganismos, ya que se basan en reacciones de precipitación y aglutinación que se producen entre antígenos y anticuerpos. Los antígenos son sustancias extrañas que se introducen en la sangre de los animales y los anticuerpos son sustancias que se producen en la sangre de los animales para su defensa. Además los anticuerpos contenidos en el antisuero preparado con la sangre de los animales a los que se les a inyectado bacterias fitopatógenas, puede servir para la detección de bacterias existentes en las semillas (Cruz, 1997).

Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas mediante los tres métodos de detección. Estas pruebas únicamente se realizaron en colonias bacterianas positivas obtenidas de la semilla de sandía y melón que fueron utilizadas como testigos positivos en la primera fase. Las pruebas mostraron que al inocular plántulas de 25-30 días bajo condiciones favorables para la enfermedad, dieron resultados positivos acorde a las características descritas por Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (1998), Rueda *et al.* (2006).

No obstante lo anterior, las condiciones adversas al patógeno en la región, como una media alta temperatura (35 °C) y baja humedad relativa que varía entre 40 y 55%, pudiese causar que el patógeno no tenga la capacidad de sobrevivir y por lo tanto no producir una infección en la planta de sandía y melón; esto podría traer como consecuencia que al procesar las muestras vegetativas mediante diferentes métodos de detección para *Aac* resultaran negativas. Estos resultados concuerdan con Gitaitis *et al.* (1987; 1992) indicando que las actividades pectolíticas por otros agentes causantes de enfermedades pueden enmascarar a alguno de ellos en particular.

Asimismo, es importante hacer notar que, no obstante lo anterior, entre los métodos utilizados, el serológicos ha sido más eficiente en el diagnóstico de microorganismos, ya que se basan en reacciones de precipitación y aglutinación que se producen entre antígenos y anticuerpos. Los antígenos son sustancias extrañas que se introducen en la sangre de los animales y los anticuerpos son sustancias que se producen en la sangre de los animales para su defensa. Además los anticuerpos contenidos en el antisuero preparado con la sangre de los animales a los que se les a inyectado bacterias fitopatógenas, puede servir para la detección de bacterias existentes en las semillas (Cruz, 1997).

Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas mediante los tres métodos de detección. Estas pruebas únicamente se realizaron en colonias bacterianas positivas obtenidas de la semilla de sandía y melón que fueron utilizadas como testigos positivos en la primera fase. Las pruebas mostraron que al inocular plántulas de 25-30 días bajo condiciones favorables para la enfermedad, dieron resultados positivos acorde a las características descritas por Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996), Sánchez *et al.* (1998), Rueda *et al.* (2006).

Posterior, a las pruebas de patogenicidad, la bacteria se aisló de tejido enfermo en los medios T-125 y MS153 y se confirmó mediante ELISA, el cual resultó positivo. Es importante señalar que se trataron de llevar a cabo pruebas de patogenicidad de la solución madre de la semilla de sandía procedente de Cajeme, Guaymas y Hermosillo, Navojoa, además en semilla de melón, procedente de Guaymas, Hermosillo y Navojoa, Sonora, que resultaron positivas a la presencia de *Aac*. Sin embargo, al tratar de crecer las bacterias en los medios T-125 y MS153, no se obtuvieron crecimientos bacterianos para su posterior prueba de patogenicidad, esto último tal vez debido a la contaminación con bacterias saprófitas que inhibieron el crecimiento de *Aac* después de siete días de incubación sobre los medios específicos.

Este último resultado, pudo deberse al tiempo prolongado que estuvieron sometidas las células bacterianas de *Aac* en la solución salina al 0.85%, que pudo repercutir para que estas no se multiplicaran en los primeros siete días que es cuando deben de crecer en los medios utilizados; de lo contrario, el crecimiento de bacterias saprófitas se ve favorecida (Rueda *et al.*, 2006).

Muchas bacterias fitopatógenas pueden identificarse por el uso de medios de cultivo artificiales. El medio Tween B se usa para la identificación de *X. c. pv. vesicatoria*; en este medio el bromuro de potasio (KBr) aumenta la pigmentación de la colonia amarilla lipólisis. Otras bacterias contaminantes que no logran morir con los detergentes y tienen actividad lipolítica pueden inhibir o enmascarar la presencia de *X. c. pv. vesicatoria* en dado caso que este presente en la semilla; estos resultados obtenidos por Mc Guire *et al.*, (1986), señalan que también existen otros contaminantes que pueden ser distinguidos por el color de sus colonias y concordando con Peterson (1963) y (Poplawsky y Chun, 1995).

Con los resultados obtenidos en la presente investigación, en el ámbito de las ciencias agronómicas y la fito-protección, el panorama que se ofrece a la profesión va más allá de la relación simplista patógeno-químico o patógeno-variedad resistente. Ya que el diagnóstico se puede definir como el arte científico de reconocer por observaciones, estudio o experimentación, la naturaleza de la causa de un problema y los factores que inciden en su desarrollo. El diagnóstico es una etapa fundamental en el ámbito de la fitoprotección (Schaad, 2003).

Para realizarlo se deben analizar las condiciones en que se presenta el problema, en especial el manejo del cultivo y las interacciones planta-agente causal-organismos benéficos-condiciones agroclimáticas, es decir, se requiere de un análisis integral que conlleve a un acertado juicio sobre la etiología del problema y los factores que lo favorecen. Este enfoque tiene gran aceptación en la actualidad, donde la protección del ambiente y la salud humana son una exigencia de primer orden y la producción sostenible y el Manejo Integrado de Plagas son incorporados a los programas agrícolas a nivel mundial (Zitter *et al.*, 2004).

El diagnóstico se puede llevar a cabo a través de diferentes niveles, de acuerdo con su objetivo y la experiencia, recursos físicos y técnicos a disposición del profesional. Los dos principales niveles son: a) nivel de campo; se puede realizar en condiciones precisas que permitan identificar la plaga por sus síntomas, signos, distribución en el campo u otros factores. En este caso, la experiencia con el cultivo y sus plagas es fundamental. Muchos asistentes técnicos en cultivos específicos no solo pueden identificar el problema principal, sino también otros de incidencia económica importante; y b) diagnóstico de confirmación, cuando se presentan condiciones de campo que no permiten establecer la identidad de los

organismos causales, es necesario reunir información de campo y recolectar muestras para análisis de laboratorio (Holguín *et al.*, 2005).

Lo anterior permite además de una clasificación más exacta y útil, la elaboración de las listas y mapas de distribución de plagas de una región. Es importante recordar que diferentes organismos o factores abióticos pueden ocasionar un síntoma similar en la planta; por lo tanto, se deben evitar los diagnósticos precipitados carentes de información.

CONCLUSIONES

La importación de semilla mejorada para la siembra en cucurbitáceas, ha aumentado en México. Dicha semilla en su mayoría es proveniente de Estados Unidos de América. Se identificó *Aac* mediante pruebas de patogenicidad y ELISA y se detectó en semilla de sandía y melón importada de los Estados Unidos de América. El estado de Sonora es libre de la bacteria *Acidovorax avenae pv. citrulli* en las diferentes etapas fenológicas de los cultivos en estudio. Esto último puede deberse principalmente a las condiciones climatológicas del estado de Sonora. No obstante ello, es importante que se realicen diferentes pruebas de detección y además que se lleven acabo monitoreos en semillas de importación y durante las diferentes etapas fenológicas de sandía y melón para evitar la introducción de fitopatógenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. 1989. Fitopatología. Ed. Noriega editores. México. pp. 19-21.
- Anónimo. 1997. Aspectos generales síntomas ocasionados por fitobacterias. En: manual de métodos de detección e identificación de fitopatógenos. Departamento de fitopatología. Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural.
- Bardy, S. and K. Jarrell. 2003. Prokaryotic motility structures. *Microbiology*. 2: 295-304.
- Blancard, D., H. Lecoq y M. Pitrat. 2000. Enfermedades de las cucurbitáceas. Observar, identificar, luchar. Ed. Centre impresión-limoges. Francia. p. 275.
- Bouzar, H., B. J. Jones, E. R. Stall, C. N. Hodge, V. G. Minsavage, A. A. Benedict and M. A. Alvarez. 1994. Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Strains. *Phytopathology* 84: 663-671.
- Bradbury, J. F. 1986. Wide to Plant Pathogenic Bacteria. United Status of America, Internacional Mycological Institute. pp. 144-146.
- Bulloch, W. 1960. The History of Bacteriology. Ed. University Press. Nueva York, Oxford. pp. 20-30.
- Burdman, S., N. Kost, G. Kritzman and J. Kopelowitz. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* pv *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Dis.* 89: 1339-1317.
- Calderón, S. 1986. Fitopatología. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México, D. F. p. 45.
- Cox, R. S. 1966. The role of bacterial spot in tomato production in south Florida. *Plant Disease Reporter*. 50: 699-700.
- Cruz, F. M. 1997. Ensayo de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas (ELISA) para la detección de virus fitopatógenos. En: manual de métodos de detección e identificación de fitopatógenos. Departamento de fitopatología. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- Delaat, A. 2001. Microbiología. Ed. Interamericana, S. A. Segunda edición. México. pp. 40-41
- DeLong, E. and N. Pace. 2001. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol.* 50: 470- 478.
- Díaz, R., C. Gamazo y G. López. 1999. Manual Práctico de Microbiología. Segunda edición. Ed. Masson, S. A. Barcelona, España. p.243.

- Engelhardt, H. and J. Peters. 1998. Structural research on surface layers: a focus stability, surface layer homology domains, and surface layer- cell wall interactions. *Struct Biology*. 3: 276-300.
- Fahy, P. C. and J. G. Persley. 1983. *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academia Press. New York, USA. p. 124.
- Flores, M. C. 1997. Ensayo de Inmunoadsorción de Enzimas Ligadas (ELISA). México. p. 1.
- Funke, B. R., J. G. Tortora and C. Case. 2004. *Microbiology*. 8th ed. San Francisco, USA. pp.10-25
- Gitaitis, R. D., J. M. Sasser, W. R. Beaver, B. T. McInnes and E. R. Stall. 1987. Pectolytic Xanthomonads in mixed infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper transplants. *Phytopathology* 77: 611-615.
- Gitaitis, R., S. Mc Carter and J. Jones. 1992. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. *Plant Disease* 76: 651-656.
- González, J. F. 1998. Sandía. En: *Revista Hortalizas frutas y flores*. Número 1. México. pp. 1-11.
- <http://es.Wikipedia.org/wiki/Microbiolog%C3%ADa>.
- Holguín-Peña, R. J., R. Vázquez-Juárez, and R. F. Rivera-Bustamante. 2005. A New Begomovirus Causes Tomato Leaf Curl Disease in Baja California Sur, México. *Plant Disease*. 89:341.
- Hopkins, D. L. 1989. Bacterial fruit blotch of watermelon: A new disease in the eastern USA. pp. 74-75. in: *Proc Cucurbitaceae*. 89: Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm. C. E. Thomas, Ed. U. S. Vegetable Laboratory, Charleston, SC. p. 75.
- Hopkins, D. L. 1990. Differences in cultivar resistance to bacterial fruit blotch of watermelon. (Abstr.) *Phytopathology*. 80:435.
- Hopkins, D.L., D. Gay and W. Cook. 1992. *Bacterial Fruit Blotch of Watermelon*. The Hybrid Vegetable Seed Company. Gainesville, Florida, USA. p.4.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2007. *Anuario estadístico*. México. D.F. pp. 4-6

- Latín, R. X. and D. L. Hopkins. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical question becomes reality. *Plant Disease*. 79:761-765.
- Lessl, J. T., A. Fessehale and R. R. Walcott. 2007. Colonization of Female Watermelon Blossoms by *Acidovorax avenae* pv. *Citrulli* and the Relationship between Blossom Inoculum Dosage and Seed Infestation. *Journal Phytopathology*. 155: 114-121.
- López, F. 1982. *Fitopatología*. Universidad Autónoma Chapingo (UACH), México, D. F. p. 43.
- Lux, R. and W. Shi. 2004. Chemotaxis guided movements in bacteria. *Rev. Biology*. 15: 207-210.
- Manovsky, E. C. 1982. *Identificación de Bacterias Fitopatógenas*. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México, D. F. p. 84.
- Mármol, R. M. 1988. *La sandía*. Ed. Mundi-Prensa. Tercera edición. España. pp. 29-68.
- Maude, R. B. 1996. *Seedborne Disease and Their Control: Principles and practice*. *Plant Dis.* 60:15-28.
- Mc Guire, R. G., B. J. Jones and M. Sasser. 1986. Tween Media for the semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. *Plant Disease* 70: 887-891.
- Moertense, E. y E. Bullard. 1985. *Horticultura tropical y subtropical*. Ed. Galve, S. A. Primera edición. México. p. 108.
- Moran, H. 2006. Variedades de sandía. En: *Revista Productores de Hortalizas*. Número 5. México. pp. 30-41.
- Parsons, D. B. 1999. *Cucurbitáceas*. Ed. Trillas, S. A de C. V. México. pp. 16-20.
- Pelezar, M. J. 1981. *Elementos de Microbiología*. México, D. F. Ed. McGreaw Hill. pp. 427-430.
- Peterson, G. H. 1963. Survival of *Xanthomonas vesicatoria* in soil and diseased tomato plants. *Phytopathology* 53: 765-767.
- Peterson, B. 1998. Melón. En: *Revista Hortalizas frutas y flores*. Número 2. México. p. 19.
- Poplawsky, A. R. and W. Chun. 1995. Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* with atypical pigmentation Isolated from commercial crucifer seeds. *Plant Disease* 79: 1021-1024.

- Quiroz, P. F. y M. A. García. 2005. Labores culturales en la producción de sandía. En: Revista de Riego. Número 22. Ed. Comunica y diseña. México. pp. 6-7.
- Randhawa, P. 1996. Fruit Blotch Testing Protocol. California Seed and Plant Lab. Roseville, California, USA. p. 5.
- Rane, K. K. and X. R. Latín. 1992. Bacterial Fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. Plant Disease. 76: 509-512.
- Raymond, A. T. 1989. Producción de semillas de plantas hortícolas. Ed. Mundi-prensa. España. pp. 169-184.
- Rodríguez, M. 1991. Manual de Bacterias Fitopatógenas. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México, D. F. p. 91.
- Roger, Y., S. Doudoroff y E. Adelberg. 1981. Microbiología. Ed. Prentice_Hall Inc. Segunda edición. Madrid, España. p. 932.
- Rueda, P. E. O., M. A. H. Tarazón, F. A. Hernández y J. L. García. 2006. Producción de antisuero contra la mancha bacteriana del fruto [*Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley] y detección en el Cultivo de Sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad.) en la Comarca Lagunera, México. Revista Mexicana de Fitopatología 24: (2) 129-135.
- Rueda, P. E. 1996. Producción de antisuero contra *Acidovorax avenae* pv. *Citrulli* y su detección en La Comarca Lagunera; Tesis de Maestría en ciencias. Departamento de parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. p. 87.
- Rueda, P. E. O. y A. A. Sánchez. 1997. Manual de reconocimiento de bacterias fotopatógenas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. p. 17.
- Sánchez, A. A., E. M. C. Galindo, L. G. Bustamante y L. J. G. Salazar. 1998. Métodos para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en semilla de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Rev Agraria. 14 (2) 1-17.
- Schaad, N. W., E. Postnikova and P. Randhawa. 2003. Emergente of *Acidovorax avenae* Subs. *citrulli* as a crop threatening disease of watermelon and melon. p. 573-581.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2006. Avances de siembra y cosecha de riego + temporal. Situación al 30 de noviembre de 2006. <http://w2.siap.sagarpa.gob.mx:8080/Brio/inhtml/Request?Command=OpenDoc&DocInsta.20/01/2007>.

- Singh, R. P. and T. H. Somerville. 1992. Evaluation of the enzyme- amplified ELISA for the detection of viruses. *American potato Journal*. 69: 21-30.
- Somodi, G. C., B. J. Jones, L. D. Hopkins, E. R. Stall, A. T. Kuchareck, C. N. Hodge and C. J. Watterson. 1991. Occurrence of bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Florida. Plant Disease*. 75:1053-1056.
- Sowell, G. and N. W. Schaad. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *Citrulli* on watermelon: Seed transmission and resistance of plant introductions. *Plant Disease. Rep.* 63:437-441.
- Van, H. J. 2001. Formation of the glycan chains in the síntesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*. 11: 25-36.
- Villareal, G. L. 1980. Bacterias Fitopatológicas. Tesis M. C. Chapingo, Escuela Nacional de Agricultura, Colegio de Postgraduados. México. P.92.
- Walcott, R. R., H. F. Sanders., R. M. Hall and D. R. Gitaitis. 1999. Detection of *Acidovorax avenae* Subs. *Citrulli* in watermelon seeds from symptomless watermelons using immunomagnetic separation and PCR. (Abstr.) *Phytopathology* 89: 96.
- Walcott, R. R., and D. R. Gitanis. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Disease*. 84:470-474.
- Walcott, R. R. and D. R. Gitanis. 2003. Role of Blossoms in Watermelon Seed Infestation by *Acidovorax avenae* Subs. *citrulli*. *Phytopathology*. 93: 528-534.
- Walcott, R. R., A. Fessehale and C. A. Castro. 2004. Differences in Pathogenicity between two Genetically Distinct Groups of *Acidovorax avenae* Subs. *citrulli* on Cucurbit Hosts. *Journal of Phytopathology* 152:277-285.
- Wall, G. C., V. M. Santos, F. J. Cruz and D. A. Nelson. 1990. Outbreak of watermelon fruit blotch in the Marianas Islands. *Plant Disease*. 74:80.
- Woese, C., O. Kandler and y M. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 87: 457-459.
- Zitter, A. T., D. L. Hopkins y L. Claude. 2004. Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas. Ed. Mundi-prensa. México. p. 74.