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 su Detección en el Cultivo de Sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad.) en la Comarca Lagunera, México

Edgar Omar Rueda-Puente, Mario Antonio Tarazón-Herrera, Universidad de Sonora, Campus Santa Ana, Carr. Internacional y 16 de septiembre s/n, Santa Ana, Sonora, México CP 84600; **José Luis García-Hernández, Bernardo Murillo-Amador, Ramón Jaime Holguín-Peña**, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo Santa Rita, La Paz, Baja California Sur, México CP 23090; **Arnoldo Flores-Hernández**, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Apdo. Postal 8, Bermejillo, Durango, México CP 35230; **Abiel Sánchez-Arizpe, Alberto Flores-Olivas**, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Depto. de Parasitología Agrícola, Apdo. Postal 342, km 7.5 Carr. a Zacatecas, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México CP 25315; y **Pablo Preciado-Rangel**, Instituto Tecnológico de Torreón, km 7.5 Carr. Torreón-San Pedro, Apdo. Postal 42, Torreón, Coahuila, México CP 27070.
Correspondencia: erueda04@santana.uson.mx

(Recibido: Marzo 6, 2006 Aceptado: Junio 6, 2006)

Rueda-Puente, E.O., Tarazón-Herrera, M.A., García-Hernández, J.L., Murillo-Amador, B., Holguín-Peña, R.J., Flores-Hernández, A., Sánchez-Arizpe, A., Flores-Olivas, A. y Preciado-Rangel, P. 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 su detección en el cultivo de sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad.) en la Comarca Lagunera, México. Revista Mexicana de Fitopatología 24:129-136.

Resumen. 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, y 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. La Comarca Lagunera es una de las regiones productoras más importantes de sandía y otras cucurbitáceas en México. Por lo anterior, se realizó la presente investigación, teniendo como objetivos: a) La producción de antisuero para la bacteria *Aac* y b) diagnosticar *Aac* en semilla de importación y durante el desarrollo vegetativo de sandía en la Comarca Lagunera. Se analizó semilla, plántula, hoja y fruto, mediante tres métodos de detección: medios específicos, ELISA y antisuero producido. Los resultados indicaron que el agente causal está presente en la semilla de importación que se siembra en la Comarca Lagunera. Sin embargo, la enfermedad no se detectó en las diferentes etapas vegetativas en el área de estudio.

Palabras clave adicionales: Métodos de detección, enfermedad, diseminación.

Abstract. In recent years, the bacterium *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (*Aac*), causal agent of bacterial fruit blotch of watermelon, has been detected in some regions of the United States (USA). This microorganism causes rotting of fruits, stems, and leaves, and it is disseminated by seed. Since Mexico imports seed from the USA, the eventual introduction of the disease is significant, especially for areas where watermelon production is important. Comarca Lagunera is one of the most important producing areas of watermelon and other cucurbits in Mexico. For that reason, this investigation had two objectives: a) the production of antibodies for *Aac*, and b) the detection of *Aac* in imported seed and during the phenologic development of watermelon in Comarca Lagunera region. Seed, seedlings, leaves, and fruits, were analyzed by

three detection methods: specific media, ELISA, and by antibodies. The results indicated that the microorganism is present in imported seed which is grown in Comarca Lagunera. However, the disease was not detected during the different phenologic stages of watermelon in the area of study.

Additional keywords: Detection methods, disease, dissemination.

Acidovorax avenae pv. *citrulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley (*Aac*) es la bacteria causante de la mancha bacteriana del fruto (MBF) en el cultivo de sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad.) y otras cucurbitáceas (Walcott *et al.*, 2000; Walcott y Gitanis, 2000). Esta enfermedad se detectó por primera vez en Estados Unidos (EUA) en 1987 (Somodi *et al.*, 1991; Wall y Santos, 1988), y desde entonces ha causado pérdidas económicas significativas en ese país. Por el grado de devastación que esta enfermedad ha alcanzado en diversos lugares productores de EUA, esta bacteria ha 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). La comercialización mundial se ha expandido y con ello el intercambio internacional de todo tipo de especies y materiales biológicos, lo cual incrementa las posibilidades de la diseminación de fitopatógenos. Dada la cercanía con los EUA, México ha tenido que establecer aranceles y barreras en contra de la probable entrada de materiales vegetativos que pudieran estar contaminados con *Aac*, la cual ha sido ya reportada en otros países del Continente Americano, como Costa Rica y Brasil (Mora, 2005). Esta enfermedad puede causar pérdidas del 90 al 100% de la cosecha (Walcott y Gitanis, 2000). Una de las características de mayor riesgo es la capacidad de transmisión por semilla (Kucharek *et al.*, 1993); de ahí la importancia de que los países importadores de semilla de sandía de los EUA, como México, tengan métodos de diagnóstico que detecten al organismo (Fahy y Persley, 1983; Hopkins *et al.*, 1992). El riesgo de entrada de este patógeno a México se acentúa debido a que puede transmitirse también en semilla de diversas cucurbitáceas y solanáceas (Assouline *et al.*, 1997). Uno de los métodos de diagnóstico para la detección de *Aac* es el convencional basado en pruebas bioquímicas; sin embargo, en comparación con el DAS-ELISA, no presenta la sensibilidad y reproducibilidad que se requieren para fines cuarentenarios. No obstante, aún cuando se utilice el método serológico ELISA para procesar grandes cantidades de muestras de semillas de importación, se requiere un número alto de kits, lo cual es económicamente incosteable. Por lo que resulta de gran importancia la producción de un antisuero contra *Aac* basado en el principio de inmunización e interacción antígeno-anticuerpo. En México, el cultivo de sandía ocupa una superficie de 42,000 ha (INEGI, 1992) y presenta una gran aceptación en mercados nacionales e internacionales. Los principales estados productores son: Sinaloa, Sonora, Jalisco, Nayarit, Coahuila, Durango, Michoacán, Tamaulipas, Veracruz, Oaxaca y Yucatán. Los primeros cuatro destinan el 100% de su producción a la exportación (INEGI, 1993; Sastre, 1992). La Comarca Lagunera, región comprendida de la parte noreste de Durango y suroeste de Coahuila, es una de las principales áreas productoras de sandía debido a su alto potencial de rendimiento. Esta región cuenta con una superficie de 3,500 ha de sandía, lo que origina que sea un significativo importador de semilla de los EUA. En plantas de sandía de algunos predios de esta región se han observado síntomas similares a los reportados para la MBF, lo que motivó esta investigación con los siguientes objetivos: a) Producción de antisuero para la bacteria *Aac*, b) determinar la presencia de *Aac* en semilla de sandía de importación, y c) determinar la presencia de MBF en la Comarca Lagunera.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en dos fases: a) Incremento de *Aac* en medios de cultivo específicos, producción de antisuero (inmunización), pruebas de patogenicidad en semilla, plántula y fruto con fines de familiarización en los signos de *Aac*, y su identificación mediante ELISA; b) obtención de semilla de importación, muestreo de plántulas, hoja desarrollada y fruto de sandía en la Comarca Lagunera, y su análisis fitopatológico para la detección de la MBF mediante la técnica de Randhawa (1996), consistente en el uso de medios de cultivo específicos, antisuero producido y ELISA. Asimismo, se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad en las muestras (órganos vegetativos muestreados en la Comarca Lagunera), que resultaron positivas a la presencia de *Aac*. La detección se realizó en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México. La cepa bacteriana de *Aac* la proporcionó el Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario (CNRDF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), México.

Primera fase: Incremento de *Aac*. La primera etapa inició con el incremento de *Aac* siguiendo el protocolo de Randhawa (1996), donde se utilizaron los medios de cultivo específicos T125 y MS-153 proporcionados por la Universidad de California, EUA. Ambos medios fueron proporcionados en concentraciones de nutrientes no descritos (protegidos por leyes de secrecía) en sobres sellados para su preparación en mezcla con 1 L de H_2O destilada. De acuerdo con la técnica descrita por Kiraly (1974), se obtuvieron 100 tubos de ensaye en solución salina al 0.85% de NaCl con una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias UFC/mL, verificada con un hematocímetro (Kiraly, 1974). Las suspensiones bacterianas en tubos se almacenaron a 4°C para estabilizar la bacteria y evitar un shock en la inmunización.

Producción de antisuero. Posterior al incremento de inóculo de *Aac*, se desarrolló una inmunización en conejo (*Oryctolagus cuniculis* Linnaeus) de raza Nueva Zelanda con un peso promedio de 3 kg, una edad de 9-24 meses y evitando

que las hembras estuviesen embarazadas (Bolox, 1980; Valdés, 1995; Villarreal, 1980). Previo a la inmunización, se obtuvo suero normal para que sirviera como testigo con relación al suero a producir. Para llevar a cabo este paso, el conejo debió haber estado en ayunas no menos de 24 h para evitar la lipemia. Se colectaron 15 mL por conejo, el suero se recuperó mediante centrifugación durante 15 min a 5000 rpm, y se conservó en congelación. Una semana después se llevó a cabo el plan de inmunización en tres esquemas, con cinco conejos por esquema (Cuadro 1). A los 24 días después de la última serie de inyecciones se realizó una nueva aplicación de dosis de antígeno (2 mL vía intramuscular), denominada dosis de recuerdo. Los conejos se sangraron de nuevo, antes y seis días después de inyección del recuerdo, y la titulación de los anticuerpos presentes se llevó a cabo mediante aglutinación según se indica en el Cuadro 2. Esta aglutinación fue corroborada obteniendo 0.1 mL de la solución de los tubos y depositándola por separado en portaobjetos y así proceder a observar la microaglutinación al microscopio óptico. Cabe indicar que una titulación (formación de anillo) se considera positiva para un determinado antígeno si presenta un título mayor o igual a 1:640 con el antisuero homólogo.

Pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad (PP) se desarrollaron con la finalidad de familiarizarse con la sintomatología que produce *Aac*, las cuales se llevaron a cabo en semilla, plántula y fruto de sandía, variedad Peackock WR124. Se embebieron 20 semillas durante 15 min en 200 mL de una suspensión bacteriana de 10^8 UFC/mL y se sembraron en vasos de vidrio por separado, los cuales contenieron sustrato estéril tipo peat-moss (Sunshine, Sun Gro Horticulture Canada, Ltd.); asimismo, otras 20 semillas se consideraron como testigos negativos al pasar por el mismo proceso, pero haciendo uso de agua estéril en la imbibición. Respecto a las PP en plántulas, 40 semillas previamente desinfectadas, fueron germinadas en placas de germinación con sustrato estéril peat-moss; las condiciones en las 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, se inocularon 20 plántulas con la suspensión bacteriana a una concentración de 10^8 UFC/mL con un cotonete de algodón sobre los cotiledones; las resultantes 20 plántulas fueron consideradas como testigo negativo al pasar por el mismo proceso con cotonete con agua destilada estéril. Las PP en fruto se desarrollaron con aquéllos maduros entre 2 y 3 kg y no más después de 10 días 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 la suspensión bacteriana de 10^8 UFC/mL. Un fruto más se utilizó como testigo negativo al ser punzado e inoculado con agua destilada estéril. La semilla, plántulas y frutos utilizados para 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 a 35-41°C en un período de cuatro a siete días, condiciones que acorde a Randhawa (1996), son las apropiadas para inducir los signos de la enfermedad.

Identificación de *Aac* en material vegetativo de las pruebas de patogenicidad. La identificación de *Aac* se realizó mediante la técnica serológica ELISA, siguiendo el protocolo para la identificación de bacterias AGDIA, empresa la cual donó el kit de detección para *Aac*. En cada prueba se incluyó una muestra de Aac como testigo positivo. Como testigo negativo se utilizaron tres pozos por placa (Testigos 1, 2 y 3) de solución amortiguadora de extracción. Las placas se evaluaron en un lector ELISA a 405 nm. Para decidir si las muestras fueron positivas a la presencia de *Aac*, se usó el criterio que utiliza el CNRDF de la DGSV, el cual consistió en considerar los valores obtenidos del lector ELISA de los tres testigos negativos, aplicando la siguiente fórmula: VD = T1 + T2 + T3 / 3 = *2 (VD = Valor de decisión; T1 = Testigo negativo uno; T2 = Testigo negativo dos; T3 = Testigo negativo tres). Se obtuvo una media de los tres valores de los testigos negativos y el resultado se multiplicó por dos. Por arriba del valor obtenido de esa operación (VD), fueron consideradas positivas, las celdas con muestras procesadas que lo manifestaron.

Segunda fase: Obtención de semilla de importación, muestreo de plántula, hoja desarrollada y fruto de sandía en la Comarca Lagunera, y su análisis fitopatológico para la detección de la MBF. Para la obtención de los diversos órganos vegetativos, se contó con la colaboración de la Confederación Nacional de Productores Hortícolas (CNPH) Comarca Lagunera; para el la obtención de semilla, cada uno de los productores de cuatro municipios (Cuadro 3) facilitó una cantidad de 100-150 semillas para el análisis. En el muestreo de plántula, se

Cuadro 1. Esquemas de inmunización utilizados en la producción de antisuero contra *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en conejos tipo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculis*).

Día	Vacuna (mL)	Vía de la inyección
	Esquema 1	
1	1	Intramuscular
7	1	Intramuscular
14	2	Intramuscular
	Esquema 2	
1	0.1	Intramuscular
3	0.3	Intramuscular
7	0.3	Intramuscular
10	1.0	Intramuscular
15	2.0	Intramuscular
	Esquema 3	
1	0.1	Intravenosa
3	0.3	Intravenosa
6	0.5	Intravenosa
10	1.0	Intramuscular
15	2.0	Intramuscular
20	2.0	Intravenosa

Cuadro 2. Preparación de tubos con solución salina al 0.85% (NaCl) con adición de antígeno y antisuero para titulación.

Tubo	Solución salina mL	Dilución antisuero mL	Dilución	Dilución antígeno	Dilución final
1	0.9	0.1	1:10	0.5	1:20
2	0.5	0.5 T-1	1:20	0.5	1:40
3	0.5	0.5 T-2	1:40	0.5	1:80
4	0.5	0.5 T-3	1:80	0.5	1:160
5	0.5	0.5 T-4	1:160	0.5	1:320
6	0.5	0.5 T-5	1:320	0.5	1:640
7	0.5	0.5 T-6	1:640	0.5	1:1280
8	0.5	0.5 T-7	1:1280	0.5	1:2560
9	0.5	0.5 T-8	1:2560	0.5	1:5120
10	0.5	0.5 T-9	1:3120	0.5	1:6240

Si la titulación del suero resulta superior a 640 ó 1280 (sexto o séptimo tubo) significa que el antisuero producido es rico en anticuerpos.

obtuvieron aquéllas que no presentaban la primera hoja verdadera durante los primeros 15 días después de su emergencia. Para el caso de hojas desarrolladas, se consideraron aquéllas entre las 5 y 15 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 aquéllas plántulas, hojas o frutos de plantas que mostraron una sintomatología similar a la producida por *Aac*, también fueron colectados. El muestreo de lotes se reprodujo al considerado en el muestreo nacional de papa (*Solanum tuberosum* L.) por la SARH (1994), cubriendo el 10% del total de la superficie cultivable de cuatro de los municipios productores de sandía de la Comarca Lagunera (Cuadro 4). En el 10% de la superficie de cada municipio se hicieron divisiones de 5 ha consideradas como parcelas hipotética a muestrear. Se obtuvo la colaboración de 24 productores. Cada lote se dividió a su vez en hectáreas, y cada ha se consideró como un punto de muestreo. En cada punto se trazó 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 muestra colectada e identificada se envolvió con papel húmedo y se colocó en una hielera para trasladarse al laboratorio para su análisis.

Detección de *Aac* en semilla de importación mediante la técnica de Randhawa (1996). 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 min y se colocó en charolas de plástico con capacidad de 2 L. En cada charola con su respectiva muestra de semilla se agregó una cantidad de 100 mL de agua destilada, y luego se le añadieron 2 mL de solución amortiguadora fosfatasa con un pH = 7. A la mezcla de agua con fosfatasa conteniendo cada muestra de semilla se le llamó suspensión madre. Las charolas se incubaron durante 12 h a 4°C con la finalidad de que se liberara *Aac* a la suspensión madre. Luego se tomaron 10 mL de suspensión madre de cada una de las charolas, se hicieron cuatro diluciones (10:1, 10:2, 10:3, 10:4), y de la última se tomó 0.1 mL el cual se sembró en medio de cultivo específico MS153 en cajas de Petri por el método de dispersión por varilla (Roger *et al.*, 1981) y se incubaron durante siete días a 34°C. La coloración original del medio es verde y en caso de presencia de *Aac* ocurre un cambio a color azul (Randhawa, 1996). A las colonias desarrolladas en MS153 se les realizó una prueba de oxidasa; de las colonias positivas se extrajo una muestra la cual se sembró en medio de cultivo específico T-125 por la técnica de estría en cuadrante (Díaz *et al.*, 1999) e incubándose a 35°C durante 7 días. Las colonias bacterianas de *Aac* sobre este medio presentan una zona de hidrólisis. Las colonias bacterianas positivas se sembraron en medio de cultivo BDK donde *Aac* no presenta fluorescencia.

Detección de *Aac* en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto con el antisuero producido. Previo a la detección con el antisuero producido, las plántulas, hojas desarrolladas y frutos obtenidos en cada lote, se sometieron por un proceso de cortes de 0.5 a 1 cm de diámetro y se introdujeron directamente en una solución salina al 0.85% de NaCl, denominada solución madre. Para la detección de *Aac* se desarrolló la técnica de aglutinación en portaobjeto (Kiraly, (1974), la cual consiste en colocar 0.1 mL de antisuero producido en un portaobjetos cóncavo, y posteriormente disolver 0.1 mL de la soluciones madres obtenidas de semilla, plántula, hoja y fruto. Las preparaciones se observaron al microscopio con la finalidad de detectar la reacción de aglutinación.

Detección de *Aac* en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica ELISA. Para la detección de *Aac* mediante la técnica serológica ELISA, se consideró el protocolo descrito en la detección en semilla.

Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas con los diferentes métodos de detección. Para la confirmación de las bacterias *Aac* que fueron positivas en los métodos de

detección anteriores, las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo mediante la técnica de Randhawa (1996). Las PP se aplicaron en plántulas de 25-30 días después de la emergencia, como se describió en la primera fase. Se re-aisló *Aac* de tejido enfermo mediante la técnica de Randhawa y confirmándose el patógeno por ELISA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Incremento de *Aac* y producción de antisuero. A incrementar el inóculo, se observó que las colonias que crecieron manifestaron características similares a las reportadas por Randhawa (1996), las cuales consisten en un cambio de coloración de verde a azul del medio MS153, mientras que en T-125 se produce una zona de hidrólisis en la periferia de las colonias crecientes. Por otra parte, debido a que no todos los animales de sangre caliente reaccionan igual a un antígeno, sólo el esquema 3 (Cuadro 1) fue eficiente para producir un alto contenido de anticuerpos, ya que una vez que se realizó la prueba de título antes de la inyección del recuerdo, la aglutinación y precipitación se observó en la dilución 1:1280, lo que no ocurrió con los conejos tratados con los esquemas 1 y 2 (Cuadro 1). La aglutinación fue verificada realizando lecturas bajo el microscopio compuesto donde se obervó una microaglutinación (Bokx, 1980). Después de la inyección del recuerdo en los conejos bajo tratamiento con este esquema, la aglutinación se observó hasta la dilución 1:5120 lo que indicó un alto contenido de anticuerpos. Las pruebas de confirmación por aglutinación fueron positivas, obteniendo que diluciones bacterianas de 1 x 10^3 fueran las más bajas para su detección. Una vez realizada esta actividad, se obtuvo la sangre total, se separó el suero del plasma y el antisuero rico en anticuerpos contra *Aac* se almacenó en tubos de ensaye bajo congelamiento.

Pruebas de patogenicidad y detección de *Aac* mediante ELISA. De las semillas embebidas en la suspensión bacteriana de 10^8 UFC/mL, el 14% no germinó, y las que lograron germinar entre los 7 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. Las semillas que no lograron germinar presentaron la testa acuosa, blanda y abierta con presencia del epicótilo. 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 obscuras y de aspecto grasoso, y al cabo de siete a diez días la muerte, mientras que las plántulas consideradas como testigo negativo se desarrollaron adecuadamente. Para el caso de 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 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 (1992); en los frutos considerados como testigo negativo, las lesiones mostraron un aspecto áspero, seco y rugoso. 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

Cuadro 3. Presencia de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla de sandía (*Citrullus vulgaris*) proporcionada por productores de la Comarca Lagunera, México.

Municipio	Ejidos	Técnica Randhawa					Antisuero
		T125	MS153	BDK	POX	ELISA	producido
Gómez Palacio, Dgo.	6 de Octubre, Providencia y Lázaro cardenas	+	+	+	+	+	+
Tlahalilo, Dgo.	Lucero, Pompella, Jauja y Horizonte	+	+	+	+	-	+
Matamoros Coah.	Matamoros y Congregación Hgo.	+	+	+	-	-	+
Viesca, Coah.	Lázaro, Cardenas	+	+	+	-	-	-
Testigo positivo	Plántula	+	+	-	+	+	+
	Hoja	+	+	-	+	+	+
	Fruto	+	+	-	+	+	+
Testigo negativo	Plántula	-	-	-	-	-	-
	Hoja	-	-	-	-	-	-
	Fruto	-	-	-	-	-	-

+ = Prueba positiva,
- = Prueba negativa,
T125 y MS153 = Medios de cultivo específicos para *A.a.*pv. *citrulli*.
BDK = Medio de cultivo selectivo de la serie Schaad.
POX = Prueba de oxidasa.

Cuadro 4. Presencia de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en plántula, hojas y frutos de sandía (*Citrullus vulgaris*) muestreados en lotes de la Comarca Lagunera, México.

Municipio	Órgano vegetal	Técnica de Randhawa				ELISA	Antisuero producido
		T125	MS153	BDK	POX		
Gómez Palacio, Dgo.	Plántula	+	+	-	-	-	-
	Hoja	+	+	-	-	-	-
	Fruto	+	+	-	-	-	-
Tlahalilo, Dgo.	Plántula	+	+	-	-	-	-
	Hoja	+	+	-	-	-	-
	Fruto	+	+	-	-	-	-
Matamoros Coah.	Plántula	+	+	-	-	-	-
	Hoja	+	+	-	-	-	-
	Fruto	+	+	-	-	-	-
Viesca Coah.	Plántula	+	+	-	-	-	-
	Hoja	+	+	-	-	-	-
	Fruto	+	+	-	-	-	-
Testigo positivo	Plántula	+	+	-	+	+	+
	Hoja	+	+	-	+	+	+
	Fruto	+	+	-	+	+	+
Testigo negativo	Plántula	-	-	-	-	-	-
	Hoja	-	-	-	-	-	-
	Fruto	-	-	-	-	-	-

+ = Prueba positiva.
- = Prueba negativa.
T125 y MS153 = Medios de cultivo específicos para *A.a.* pv. *citrulli*.
BDK = Medio de cultivo selectivo de la serie Schaad.
POX = Prueba de oxidasa.

en la Comarca Lagunera. En lo que respecta a la identificación de *Aac* en los órganos obtenidos de las PP mediante ELISA, se obtuvo un resultado positivo. Asimismo, esta prueba fue aprovechada para verificar la cepa donada por la DGSV, obteniendo un resultado positivo contra *Aac*.

Detección de la mancha bacteriana del fruto en la Comarca Lagunera. Detección en semilla de importación mediante la técnica de Randhawa (1996), antisuero producido y ELISA. Usando la técnica de Randhawa se demostró la presencia de *Aac* en la semilla, únicamente en la que se obtuvo de productores de los municipios de Gómez Palacio y Tlahualilo, Durango (Cuadro 3); 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 (1996). Un resultado similar ocurrió con la semilla obtenida de Matamoros y Viesca, Coahuila, 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 (1996), indicativo para considerar negativa la presencia de *Aac*. Los resultados obtenidos mediante la técnica de aglutinación y microaglutinación en portaobjeto con el antisuero producido indicaron positiva su detección en semilla proporcionada de productores de todos los ejidos (6 de Octubre, Providencia, Lázaro Cárdenas, Lucero, Pompella, Jauja, Horizonte, Matamoros y Congregación de Hidalgo). En los municipios muestreados, con excepción de aquéllos pertenecientes al municipio de Viesca (Cuadro 3), los resultados variaron de acuerdo a la técnica de Randhawa y el antisuero producido; asimismo, éstas presentaron variación en relación a ELISA. Para esta última, los resultados indicaron que la semilla obtenida de productores del municipio de Gómez Palacio resultó ser positiva a la presencia de *Aac*. Por otra parte, las muestras provenientes de agricultores de los municipios de Tlahualilo, Matamoros y Viesca fueron negativas a la presencia de la MBF.

Detección de la mancha bacteriana del fruto en plántula, hojas desarrollada y fruto en lotes comerciales en la Comarca Lagunera, mediante la técnica de Randhawa (1996), antisuero producido y ELISA. Los cuatro municipios muestreados fueron negativos a la presencia de la bacteria bajo las técnicas usadas (Cuadro 4). La comparación de los resultados obtenidos en el diagnóstico de semilla con los de plántula, hojas y fruto, indicaron que la semilla viene infectada por *Aac*; sin embargo, las condiciones adversas al patógeno en la región, como alta temperatura (35-44°C) y baja humedad relativa que varía entre 40 a 55% (Maeda, 1992), pudiese causar que el patógeno no tenga la capacidad de sobrevivir y por lo tanto no producir una infección en la planta de sandía; esto podría traer como consecuencia que al procesar las muestras vegetativas mediante diferentes métodos de detección para *Aac* resulten negativas.

Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas mediante los tres métodos de detección. Estas pruebas solamente se realizaron en colonias bacterianas positivas obtenidas de la semilla procedente de lotes de Gómez Palacio y Tlahualilo, Durango, y Matamoros, Coahuila. Las pruebas mostraron que al incrementar las colonias bacterianas e inocular plántulas de 25-30 días bajo condiciones favorables para la enfermedad, dieron resultados positivos acorde a las características descritas por Randhawa (1996). Es importante señalar que se trataron de llevar a cabo pruebas de patogenicidad de la solución madre de la semilla proveniente de Viesca, Coahuila y 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, tal vez debido a la contaminación con bacterias saprófitas que inhibieron el crecimiento de *Aac* después de 7 días de incubación sobre los medios específicos. Este 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 éstas no se multiplicaran en los primeros 7 días que es cuando deben de crecer en los medios utilizados; de lo contrario, el crecimiento de bacterias saprófitas se ve favorecida (Dr. Randhawa, comunicación personal, 1995). Posterior a la pruebas de patogenicidad, la bacteria se aisló de tejido enfermo en los medios T-125 y MS153 y se confirmó mediante ELISA, el cual fue positivo.

CONCLUSIONES

Sólo uno de los esquemas de inmunización utilizados fue apropiado para la producción de antisuero contra *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*, generándose después de la inyección del recuerdo un alto contenido de anticuerpos y con capacidad de detectar a la bacteria (antígeno) en una concentración de 1×10^3. Se confirmó la identificación de *Aac* mediante pruebas de patogenicidad y ELISA y se detectó en semilla de sandía importada de los EUA para siembra en la Comarca Lagunera, mediante la técnica de Randhawa (medios específicos), antisuero producido, ELISA y pruebas de patogenicidad. Sin embargo, no se detectó en plántula, hoja desarrollada y fruto obtenidas de lotes comerciales, debido quizás a las condiciones climatológicas de la región. Es importante que las diferentes pruebas de detección se utilicen como complemento, y que se lleven a cabo monitoreos en los lotes de importación durate las diferentes etapas fenológicas del cultivo para evitar la introducción de fitopatógenos en la Comarca Lagunera.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo de la Confederación Nacional de Productores Hortícolas de la Comarca Lagunera, México; a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, la Universidad de Sonora y el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Así mismo, al Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuacultura, Agrobiotecnología y Recursos Filogenéticos del CONACYT y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por la propuesta aprobada 12067

LITERATURA CITADA

Assouline, I., Milshtein, H., Mizrahi, M., Levy, E., and Ben-Ze'ev, I.S. 1997. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* transmitted by solanaceous seeds. Phytoparasitica 25:117-118.

Díaz, R., Gamazo, C. y López-Goñi, I. 1999. Manual Práctico de Microbiología. Segunda Edición. Editorial Masson, S.A. Barcelona, España. 243 p.

Bokx, J. 1980. Virosis de la Papa y de la Semilla de Papa. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. 303 p.

Fahy, P.C., and Persley, G.J. 1983. Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide. Academic Press. New York, USA. 124 p.

Hopkins, D., Gay, D., and Cook, W. 1992. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon. The Hybrid Vegetable Seed Company. Gainesville, Florida, USA. 4 p.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática). 1992. Aspectos de Producción Agrícola. Saltillo, Coahuila, México. 808 p.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática). 1993. Aspectos de Producción Agrícola. Saltillo, Coahuila. México. 904 p.

Kiraly, G.Z. (ed.). 1974. Methods in Plant Pathology. Elsevier Scientific Publishing Company. New York, USA. 509 p.

Kucharek, T., Pérez, Y., and Hodge, C. 1993. Transmission of the watermelon fruit blotch bacterium from infested seed to seedlings. Phytopathology 83:466-447.

Latin, R.X., and Hopkins, D.L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical question becames reality. Plant Disease 79:761-765.

Maeda, R.R. 1992. Caracterización de 14 Genotipos de Sandía [*Citrullus lanatus* (Thunb.) (ansf)]. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Torreón, Coahuila, México. 89 p.

Mora, F. 2005. Mancha bacterial del fruto en cucurbitáceas (Bacterial fruit blotch) (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*). Millar Plant Sci. Bldg Athens, GA, USA. Enero 10, 2005. http://apep-cr.tripod.com/Public/Problemas.htm.

Randhawa, P. 1996. Fruit Blotch Testing Protocol. California Seed and Plant Lab. Inc. Roseville, California, USA. 5 p.

Roger, Y., Stainer, Doudoroff, M. y Adelberg, E. 1981. Microbiología. Segunda Edición. Ed. Prentice Hall Inc. Madrid, España. 932 p.

Sastre, F. 1992. Efectos de Dos Reguladores del Crecimiento Vegetal de la Sandía (*Citrullus lanatus*). Tesis Profesional. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. 87 p.

SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos). 1994. Manual de Muestreo y Procesamiento para la Identificación de los Principales Patógenos de la Papa. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, D.F. 16 p.

Somodi, G.C., Jones, J.B., Hopkins, D.L., Stall, R.E., Kucharek, T.A., Hodge, N.C., and Watterson, J.C. 1991. Occurrence

of bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Disease 75:1053-1056.

Valdés, D.R. 1995. Cría y Explotación del Conejo. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Secretaría de Fomento Agropecuario de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 115 p.

Villarreal, G.L.A. 1980. Supervivencia, Dispersión y Patogenicidad de *Erwinia carotovora* y su Relación con *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México, México. 92 p.

Walcott, R.R., and Gitanis, R.D. 2000. Detection of *Acidov avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed u immunomagnetic separation and the polymerase c reaction. Plant Disease 84:470-474.

Walcott, R.R., Langston, Jr., D.B., Sanders, Jr., F.H., and G R.D. 2000. Investigating intraspecific variation of DNA fingerprinting and whole cell fatty acid ana Phytopathology 90:191-196.

Wall, G.C., and Santos, V.M. 1988. A new bacterial disea watermelon in the Mariana Islands. Phytopathc 78:1605.