

## INTRODUCCIÓN

El problema de heladas tempranas y tardías en la zona agrícola del noreste del país representa grandes pérdidas económicas, según datos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (I.N.I.F.A.P.) (González *et al*, 1983); así mismo se ha establecido que en el mecanismo de congelación además de las bajas temperaturas participa un factor biológico que puede acentuar aún más el daño por heladas, este factor esta asociado con la sensibilización de los cultivos debido a la presencia de bacterias como *Pseudomonas syringae* (Van Hall) (Hirano *et al*, 1985), y *Erwinia herbicola* entre otras (Lohnis) Dye (Billing *et al*, 1963), que tienen la habilidad de activar la formación de núcleos de hielo (I.N.A.) en hojas y flores de diversos cultivos causándoles su muerte y el consecuente daño económico.

Estas bacterias se encuentran en forma saprófita en su hospedero, las cuales permanecen en poblaciones activas que se reproducen en determinadas épocas de año (Kozloff *et al*, 1991).

Se reporta a las bacterias I.N.A. como catalizadores de la formación de cristales de hielo, actuando cuando el agua se enfría a  $-2^{\circ}\text{C}$  (Maki *et al*, 1974). Así la presencia de estas bacterias puede determinar si las plantas son severamente dañadas por periodos de bajas temperaturas, las cuales de otro modo no serían perjudiciales (Marcellos *et al*, 1979) ya que las hojas sin presentar bacterias I.N.A., contienen núcleos de hielo a temperaturas de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $-11^{\circ}\text{C}$  (Hirano *et al*, 1985) (Lindow *et al*, 1982) (Lindow *et al*, 1982).

Los primeros informes sobre la acción de las bacterias I.N.A. fueron dados en Inglaterra en el año 1963 por Klement y desde ese año hasta la fecha a nivel internacional se han realizado numerosas investigaciones sobre los tipos de bacterias I.N.A. y sus hospederos, sobre las bacterias antagonistas, sobre el componente del sitio de nucleación de las bacterias I.N.A. y el control biológico integral, (Anderson *et al*, 1991) (Bentley *et al*, 1984) (Cody *et al*, 1987) (Kozloff *et al*, 1984) (Kozloff *et al*, 1991) (Lindemann *et al*, 1987) (Mercier *et al*, 1996). En México, en la zona noreste se cuenta solamente con dos trabajos preliminares, en el primero se detectó e identificó la presencia de bacterias I.N.A. en hojas sanas de cítricos en cuatro municipios del estado de Nuevo León (Banda, 1992) y en el segundo se determinó la presencia de microorganismos antagonistas a estas bacterias I.N.A. (López 1992).

La zona citrícola de Nuevo León además de producir naranja y otros cítricos para el consumo nacional y para exportación, representa un importante apoyo para la economía del país proporcionando una fuente de divisas y de empleo para una gran parte de la población, lo que convierte a los cítricos en un cultivo socialmente importante (González *et al*, 1983) (López, 1992) sin embargo se ha visto afectado

por heladas año con año desde 1950; en promedio cada 4 años se han presentado heladas que afectan al árbol y/o la fruta. Presentándose riesgo de heladas tempranas a partir de septiembre a noviembre y heladas tardías hasta fines de febrero dependiendo del área geográfica (Garza, 1996) (Padrón, 1990).

En Nuevo León, en diciembre de 1983, se presentó una onda gélida de  $-8^{\circ}\text{C}$  provocando que de una población de 6,000,000 de árboles de cítricos murieran 2,000,000 y el resto quedó con daños que variaron de leves a muy severos; además del daño directo a la cosecha de ese año, causó que en los siguientes 2 ó 3 años se afectara la producción de la fruta (Padrón et al, 1990), disminuyendo la producción de 1984 a 5,000 toneladas (García, 1992). Gradualmente se fue logrando la rehabilitación de las huertas, y para 1989 se estimaba una producción de 320,000 toneladas, pero una nueva helada siniestró 230,000 toneladas y solo lograron comercializar 90,000 toneladas (García, 1992).

Para 1997 se redujo la superficie cultivada de 40,000 a 24,000 hectáreas y la producción promedio anual estimada en 450,000 a 200,000 toneladas (M.C. Humberto de la Fuente Saucedo, Investigador I.N.I.F.A.P., comunicación personal), por lo que se están buscando técnicas o medidas que disminuyan los daños por heladas y ésta investigación busca proporcionar información que ayude a implementar una estrategia tecnológica que contribuya a reducir los daños causados por las heladas.

## ANTECEDENTES

Las heladas producen daños de importancia económica en cultivos susceptibles a nivel internacional (Garza, 1996) (Padrón, 1990), nacional (Garza, 1996) (Padrón, 1990) y local (Bauer, 1987) (Garza, 1996). Las plantas difieren en su habilidad para resistir bajas temperaturas de acuerdo con su estado de desarrollo y los diferentes tejidos y órganos que las conforman.

Los factores que determinan la intensidad del daño causado por las heladas son: la variedad y el patrón, grado de actividad del árbol en invierno, el tipo de helada, la temperatura mínima alcanzada y su duración, la interacción de la temperatura con el viento y la humedad, el manejo del suelo y del agua durante otoño e invierno y la presencia de barreras naturales en la huerta (Padrón, 1990).

Las variedades de maduración temprana están menos expuestas al riesgo de heladas que las variedades tardías. En una explotación comercial es conveniente plantar variedades tempranas y tardías asegurándose que los ingresos por concepto de naranja temprana cubran los gastos anuales de la explotación (González *et al*, 1983). Dentro del grupo de naranjas de maduración tardía, la más común es la variedad Valencia que está muy bien adaptada a la región y su período de cosecha es de enero a mayo por lo que esta variedad representa el mayor riesgo al daño por heladas al dejar la fruta en el árbol hasta el final de la temporada buscando el mejor precio en el mercado (González *et al*, 1983).

En México prácticamente todas las plantaciones comerciales de naranja están injertadas sobre naranjo agrio (González *et al*, 1983) el que tiene como característica genética menor tolerancia a las heladas que otros patrones o variedades como serían el naranja trifoliado, el naranja japonesa (Kumquat) y el calamondín (Padrón *et al*, 1990).

Las heladas se clasifican por su época de ocurrencia, proceso físico y efectos visuales, de acuerdo con el primer criterio pueden ser: primaverales (tardías), otoñales e invernales (tempranas); según el proceso físico, las heladas de advección se deben a la invasión de grandes masas de aire frío, provenientes de las regiones polares y cuya acción continúa durante varios días (Bauer, 1987), en este tipo de helada los árboles más dañados por el viento son los localizados en las partes altas (Padrón, 1990). Las heladas de radiación o convección son las más frecuentes, se originan por la pérdida de calor que sufren las plantas y el suelo, que se transfiere a la atmósfera por radiación. Para que la helada se produzca, requiere ciertas condiciones ambientales locales, como ausencia de vientos, cielo despejado y sequía atmosférica. La inversión de temperaturas en el aire próximo al suelo es característico de estas heladas, que causan más daño a las siembras en las partes bajas (Bauer, 1987) (Padrón, 1990).

Las heladas de tipo mixto incluyen los fenómenos de advección y radiación simultáneamente, o en secuencia y causan un daño general a la huerta, ambas heladas ocurren a nivel local (Padrón, 1990). Las heladas por evaporación ocurren en condiciones de baja humedad relativa y presencia de aire seco, que provocan evaporaciones internas del agua que está sobre las plantas.

Por efectos visuales, las heladas son blancas o negras; en las primeras los cultivos y el suelo presentan un aspecto blanquecino o escarcha, debido al hielo depositado sobre ellos, y en las segundas los tejidos vegetales presentan necrosis, lo que les da una apariencia negruzca a los tejidos (Bauer, 1987).

En Nuevo León los inviernos variables son frecuentes por lo que se pueden acentuar los efectos de una helada si éste es precedido por días calientes (González *et al*, 1983). Cabe señalar que a medida que las huertas se establecen cerca de la Sierra Madre Oriental, las heladas son de mayor severidad (Padrón, 1990).

Por otra parte el riego en invierno puede adelantar la brotación si el árbol está activo y se corre el riesgo de que una helada ligera ocurrida en febrero elimine el follaje tierno. También es importante el manejo del suelo, ya que un suelo desnudo se calienta más y pierde calor desde capas más profundas comparado con el suelo que tiene cubierta vegetal.

La mejor alternativa para evitar el daño de heladas es establecer las huertas en lugares protegidos y cubrir los árboles jóvenes desde noviembre hasta que pase el peligro de heladas, lo cual puede hacerse "embancando" los árboles y usando algún material aislante como poliestireno (hielo seco o frigolite), poliuretano, carbón, etc. (González *et al*, 1983).

El área cítrica de Nuevo León comprende los municipios de Montemorelos, General Terán, Linares, Hualahuises, Allende y Cadereyta Jimenez. El Campo Experimental de General Terán realizó muestreos en los municipios antes mencionados para evaluar el daño que sufrieron los árboles durante la helada que se presentó en 1983, reportándose que los daños a las huertas fueron variables.

En las huertas de Montemorelos bajo condiciones de riego se encontró mayor porcentaje de árboles muertos (Padrón, 1990) que en las huertas de Hualahuises, General Terán y Linares, las huertas de Montemorelos bajo condiciones de temporal, presentaron mayor pérdida de plantas que en las huertas de Allende y Cadereyta. Estas variaciones de daño entre localidades probablemente se deban a intensidad y duración de las heladas, condiciones de humedad, edad y grado de actividad de los cítricos y manejo de las huertas (Padrón, 1990).

El daño por heladas en las plantas es el resultado de la formación intercelular o en casos extremos, intracelular de cristales de hielo en los tejidos; la ruptura de las membranas y la desorganización celular, son los productos de dicha formación de hielo y de la consecuente descomposición de las proteínas, fenómenos que culminan con la muerte celular.

Lo anterior ocasiona una gran variedad de daños en las plantas; que incluyen daños al follaje, a los ápices meristemáticos jóvenes de las plantas herbáceas; y la muerte de las yemas de árboles frutales, así como la muerte de las flores y los frutos jóvenes y en ocasiones, de las ramitas suculentas de la mayoría de los árboles, manifestándose con la aparición de un aspecto acuanoso en los tejidos, seguido de una epinastia y finalizando con una necrosis. Bandas heladas, que constan de tejido suberoso y decolorado localizado en una banda o en una amplia zona de la superficie, se presentan en los frutos (Bauer, 1987).

Investigaciones realizadas en Estados Unidos y en Europa en los últimos doce años han determinado la presencia de bacterias epífitas en plantas sensibles a heladas, las cuales se reportan como catalizadores activos para la formación de núcleos de hielo, aumentando la posibilidad de que sean estas bacterias, las que limiten el enfriamiento de esas plantas, influyendo en la sensibilización de los cultivos a las bajas temperaturas, que al ser estimuladas por éstas y otros factores, como son el viento y la humedad relativa elevada, promueven el congelamiento de las partes aéreas de la planta (Lindow, 1983a) (Lindow, 1983b).

Los catalizadores para la transición de agua a hielo son conocidos como núcleos de hielo, existiendo dos tipos: homogéneos y heterogéneos. Los homogéneos son importantes a bajas temperaturas, mientras que los heterogéneos son más importantes a temperaturas aproximadas a 0°C (Lindow, 1983).

Se ha comprobado que el núcleo de hielo bacteriano tiene un papel importante en este tipo de daño, reportándose que el sitio nucleador de hielo está presente en la pared celular, conformado por dos componentes: una proteína y un compuesto semejante a un carbohidrato, posiblemente un glucósido o un monósido; observándose que el hidroxilo que forman es una estructura compatible con la de rejilla que presenta el hielo, suponiéndose que el azúcar es un componente del sitio nucleador (Deininger *et al*, 1988) (Kozloff *et al*, 1984)(Kozloff *et al*, 1991).

El daño a plantas sensibles bajo condiciones naturales ocurre entre -2 y -5°C, se ha observado que los núcleos de hielo no están distribuidos uniformemente en una hoja dada y que varían en cantidad dependiendo de la madurez de las hojas y la especie de planta (Modlibowska, 1962).

Actualmente y desde 1973 se tienen reportes de la presencia de bacterias I.N.A. en Inglaterra (Bentley *et al*, 1984), en España (Modlibowska, 1962), Israel (Yankofsky *et al*, 1981), Japón (Lindow, 1983), y los Estados Unidos en: California (Anderson *et al*, 1991), Oregon (Gross *et al*, 1984), Washington (Andrews *et al*, 1986), Virginia (Anderson and Ashworth, 1985), Wisconsin (Lindow *et al*, 1978), Sur de Carolina (Bentley and Zehr, 1984), Montana (Kim *et al*, 1987), y Georgia (Olive *et al*, 1988).

En la actualidad se sabe que la sensibilización al congelamiento en diversos cultivos básicos, es debida a la presencia de bacterias I.N.A. (Lindow *et al*, 1982) como en el maíz que al ser asperjado con suspensiones de *Erwinia herbicola* fue severamente dañado a  $-4^{\circ}\text{C}$ , mientras que las plantas control que carecían de poblaciones de *Erwinia herbicola* en las hojas no fueron dañadas (Lindow *et al*, 1978).

Anderson *et al*, en (1985) realizaron un trabajo sobre el congelamiento del tomate (*Lycopersicon esculentum*) en presencia y en ausencia de bacterias epífitas (I.N.A.), obteniendo un incremento en el peso a una temperatura de congelación de  $-10.5$  a  $-2^{\circ}\text{C}$  en ausencia de bacterias I.N.A., pero varía de  $-3$  a  $-2^{\circ}\text{C}$  en muestras inoculadas con dichas bacterias.

Sule *et al*, en (1987) estudiaron el modo de ingreso de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y su papel en la formación de hielo en cerezas agrias (*Prunus cerasus*), demostrando que las hojas son infectadas solamente cuando ha sido formado en los espacios intercelulares el hielo, esto ocurre entre  $-2$  y  $-3^{\circ}\text{C}$ .

Gross *et al*, en (1984) aislaron 82 cepas de bacterias I.N.A., *Pseudomonas syringae* de peras (*Pyrus communis*), manzano (*Malus domestical*, Borkh), cereza dulce (*Prunus avium*), durazno (*Prunus persica* L) de 1980 a 1982, en las huertas localizadas en Washington y Oregón.

Olive *et al*, en (1988) estudiaron la ocurrencia natural de cepas de bacterias I.N.A. (*Pseudomonas syringae*) en árboles de manzanos y duraznos en Georgia. Encontrando que en las 2 huertas de manzanos analizadas se aislaron de un 60 a un 80% de bacterias I.N.A. respectivamente y en una huerta de duraznos, las bacterias I.N.A. fueron detectadas en un 20% de las muestras.

Hirano *et al*, en (1988) determinaron la variación en el tamaño de la población y la actividad de nucleación del hielo de *Pseudomonas syringae* en frijoles secos (*Phaseolus vulgaris* L.) de acuerdo a las condiciones de campo.

Yankofsky *et al*, en (1981) investigaron la asociación entre los cítricos y las bacterias I.N.A. y su posible rol como agentes causantes del daño por heladas.

Kim *et al*, en (1987) correlaciono la actividad de nucleación de hielo de las cepas de *Xanthomona campestris pv. translucens* a  $-5^{\circ}\text{C}$  y el daño por heladas en plantas de trigo inoculadas con esas cepas.

Los microorganismos que se han encontrado implicados son: *Pseudomonas syringae* (Van Hall), (Lindow, 1983) (Lindow *et al*, 1978) (Maki *et al*, 1974) y varias de sus cepas que tienen actividad I.N.A. (Lindow *et al*, 1978) (Gross *et al*, 1984), *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye (Lindow *et al*, 1978) (Lindow *et al*, 1978) (Maki *et al*, 1974) reportadas como las más comunes en Estados Unidos (Hirano, 1985) (Klement, 1963). *Pseudomonas fluorescens* (Migula) biotipo G es poco frecuente encontrarla en las hojas, ya que su hábitat es el agua (Maki *et al*, 1974). *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dawson (Paulin *et al*, 1978) citado por Olive *et al*, en (1982) y *Erwinia ananas* (Goto, 1992).

También han sido reportadas otras cepas con actividad de nucleación de hielo como *Xanthomonas campestris pv. translucens* (Jones,Johnson,Reddy) (Kim *et al*, 1987), *Erwinia stewartii* (Smith) Dye (Goto,1992) y otras especies de *Pseudomonas* (Deomonger *et al*,1988).

Las bacterias I.N.A. se encuentran generalmente como epífitas en las plantas (Lindow,1983), la presencia de tales bacterias está influenciada por las condiciones ambientales que prevalecen en el hábitat al que parecen estar específicamente adaptadas (Gross *et al*, 1984). *Pseudomonas syringae* sobrevive como epífita en asociación con el hospedero y permanece igual durante su latencia (Gross *et al*, 1984).

La temperatura a la que puede presentarse daños en las plantas puede ser predecible, sobre la base de la presencia de las bacterias *Pseudomonas syringae* o *Erwinia herbicola* (Lindow, 1983 a) (Lindow, 1983 b), ya que éstas tienen un rango de temperatura en el que sensibilizan las plantas a las heladas limitando su habilidad para evitar la formación de hielo y el subsecuente daño por heladas (Hirano *et al*, 1985) (Lindow *et al*, 1983).

Se ha observado que la actividad de las bacterias I.N.A. se ve influenciada por la temperatura imperante en el campo antes de presentarse el descenso de la misma, reportándose que a la temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$ , el rango decreciente de núcleos de hielo se incrementa logarítmicamente, ocurriendo lo contrario a  $24^{\circ}\text{C}$  (Lindow, 1983).

Se determinó para *Erwinia herbicola* en hojas de maíz, que el daño por heladas es directamente proporcional al logaritmo de la población de bacteria I.N.A. presentes, indicándose también en estudios *in vitro* con *Pseudomonas syringae* que una célula de cada diez contiene un núcleo de hielo, a una temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  o menos (Lindow *et al*, 1978).

Es importante también indicar que en pruebas hechas a nivel de laboratorio se ha establecido que para que se presente el daño por estas bacterias, el número de células requerido es de  $1 \times 10^8$  células/gramo de peso fresco, mientras que si éste es de  $1 \times 10^6$  células/gramo de peso fresco, el efecto no alcanza a manifestarse (Lindow, 1983) (Lindow *et al*, 1982).

A pesar de la considerable cantidad de trabajos hechos sobre bacterias I.N.A. en los años recientes, relativamente poco se ha reportado sobre su ocurrencia *in vivo*, su naturaleza y la importancia de la sensibilización de las plantas a las heladas en el sureste de los Estados Unidos. En el sur de Carolina y el oeste de Virginia (Bentley *et al*, 1984), su rol en la producción del daño por heladas esta en discusión.

En México en el noreste del país se han reportado dos trabajos preliminares, en 1991, Banda detectó la presencia de bacterias activadoras de núcleo de hielo (I.N.A.) en cítricos en los municipios de Monterrey, el Cercado, Santiago y General Terán Nuevo León estableciendo que las poblaciones I.N.A. se ven influenciadas por la localización geográfica de las huertas, las condiciones ambientales y el período de crecimiento de los árboles, identificándose *Xanthomonas sp.* y otros géneros bacterianos no reportados como *Citrobacter sp.* y *Alcaligenes sp.* con capacidad I.N.A.

Esta investigación pretende establecer los géneros de bacterias I.N.A. que se localizan en la zona citrícola de Nuevo León, los rangos de temperatura en los que se efectúa la nucleación, cuál es su distribución, como fluctúan las poblaciones y con esto contribuir al entendimiento del papel de las bacterias I.N.A. en el daño por heladas.



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Las poblaciones de bacterias activadoras de núcleos de hielo están presentes en el follaje de los árboles de naranja dulce (*Citrus sinensis*) de la variedad Valencia, fluctúan en base al clima y las patovariedades son específicas de los árboles frutales con los que se asocian.

## **OBJETIVOS**

1. Caracterizar e identificar los aislamientos de las bacterias I.N.A. hasta especie y patovariedad.
2. Determinar el patrón de distribución geográfica de los diferentes géneros de bacterias I.N.A. en cultivos de naranja dulce (*Citrus sinensis*) variedad Valencia en los municipios de Linares, Hualahuises, General Terán, Montemorelos, Allende y Cadereyta del estado de Nuevo León.
3. Estimar cuantitativamente las fluctuaciones poblacionales de bacterias I.N.A. en base a las variaciones estacionales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Localización de la investigación

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Micología y Fitopatología sección Fitopatología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el período comprendido de septiembre de 1997 a septiembre de 1998.

### Origen de las muestras

Se utilizaron muestras de hojas sanas de naranja dulce (*Citrus sinensis*) variedad Valencia, que se colectaron en las localidades de Montemorelos, General Terán, Linares, Hualahuises, Allende y Cadereyta, municipios del estado de Nuevo León, en los meses de octubre de 1997 a febrero de 1998.

Para estandarizar la metodología empleada se realizó un muestreo preliminar en septiembre de 1997 obteniendo las muestras de la huerta del Campo Experimental de General Terán (CEGET) ubicado en General Terán, Nuevo León.

Se muestrearon dos huertas por municipio, dos veces al mes; la muestra consistió de hojas tomadas de cinco árboles de cada huerta escogidos por el muestreo en Z, siguiendo los puntos cardinales del árbol, obteniendo posteriormente una muestra compuesta (Olive *et al*, 1988).

### Huertas muestreadas

1. Linares-El Refugio (L-Re).
2. Linares-La Amistad (L-Am).
3. Hualahuises-El Roble (H-Ro).
4. Hualahuises-El Refugio (H-Re).
5. General Terán-CEGET (T-CE).
6. General Terán-Soledad de la Mota (T-SoM).
7. Montemorelos-Ojo de Agua (M-OJA).
8. Montemorelos-García Jiménez (M-GJ).
9. Allende-Altamira (A-A).
10. Allende-Diego López (A-DL).
11. Cadereyta-El Castillo (C-C).
12. Cadereyta-Santa Fé (C-SF).

La huerta del Campo Experimental de General Terán (CEGET) sirvió como control. Las muestras de hojas se conservaron en bolsas de plástico y se mantuvieron en refrigeración (5°C) hasta su procesamiento (Olive *et al*, 1988) (Banda, 1992).

## Procesado de las muestras

Se colocaron 10 g de hojas jóvenes sanas, cortadas en pedazos de 1 a 2 cm en 200 mL de amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.1 estéril y se dejaron en agitación rotatoria a 250 rpm durante 2 h para posteriores pruebas (Olive *et al*, 1988).

## Aislamientos secuenciales de las bacterias I.N.A.

De las suspensiones de hojas de naranjo en amortiguador de fosfatos, con una micropipeta se tomó una muestra de 200 microlitros para realizar el aislamiento por vertido en placa y se tomó una asada para el aislamiento por estría (Olive *et al*, 1988).

Debido a que se tenían antecedentes en las investigaciones realizadas para detectar poblaciones I.N.A., que las bacterias activadoras de núcleos de hielo más comúnmente encontradas eran: *Pseudomonas syringae* y *Erwinia herbicola* (Billing *et al*, 1963) (Klement, 1963); para su aislamiento se utilizaron los siguientes medios selectivos y diferenciales (Buchanan *et al*, 1984) (Schaad, 1988).

### Aislamiento por vertido en placa

El agar nutritivo glucosa o glicerol (NGA) cuya composición por litro de agua es la siguiente: extracto de carne 3 g, peptona 5 g, agar 15 g y glucosa o glicerol 2.5 g (Schaad, 1988) (Lindow *et al*, 1978).

El medio B de King (KB) cuya composición por litro de agua es la siguiente: Peptona 20 g, fosfato ácido de dipotasio ( $K_2HPO_4$ ) 1.5 g, sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 1.5 g, agar 15 g y glicerol 15 mL, al cual se le agregó 8.0 mL por litro de cefalexina (10 mg/mL de agua) y en algunos casos 100 mg de cicloheximida para inhibir el crecimiento fungal (Olive *et al*, 1988) (Schaad, 1988).

### Aislamiento por estría

El agar extracto de levadura caldo nutritivo (NBY) cuya composición por litro de agua es la siguiente: caldo nutritivo 8 g, extracto de levadura 2 g, fosfato ácido de dipotasio ( $K_2HPO_4$ ) 2 g, fosfato diácido de potasio ( $KH_2PO_4$ ) 0.5 g, glucosa 2.5 g y agar 15 g. Después de esterilizar, se añadió 1 mL de solución estéril de sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 1M (Schaad, 1988).

El extracto de levadura dextrosa-carbonato de calcio (YDC) cuya composición por litro de agua es la siguiente: extracto de levadura 10 g, dextrosa 20 g, carbonato de calcio, polvo ligero. Q.P. 20 g y agar 15 g (Schaad, 1988) (Buchanan *et al*, 1984).

El medio (D<sub>3</sub>) es selectivo para especies de *Erwinia*, cuya composición por litro de agua es la siguiente: sacarosa 10 g, arabinosa 10 g, caseína hidrolizada 5 g, cloruro de litio (LiCl) 7 g, glicina 3 g, cloruro de sodio (NaCl) 5 g, sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 0.3 g, fosfato ácido de disodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0.1 g, dodecil sulfato de sodio 0.05 g, azul de bromotimol 0.06 g, fuscina ácida 0.1 g y agar 15 g. Se adicionan 6 mL de azul de bromotimol al 1% en NaOH 0.02M y 10 mL de fuscina ácida al 1%, ajustando el pH del medio con NaOH a 8.2. Este medio debe estar con su pH ajustado a 6.8 después de esterilizado (Schaad, 1988).

Posteriormente las cajas sembradas se incubaron a 25°C por 24 a 48 h. Como control se utilizaron cepas de referencia de *Pseudomonas syringae* y *Erwinia herbicola*.

### **Medida cuantitativa del crecimiento por vertido en placa**

Para determinar la población total de bacterias I.N.A. se utilizó la técnica de recuento en placa con diluciones de hasta 10<sup>-4</sup> y se inocularon 200 microlitros de cada una de las diluciones en el medio agar nutritivo glucosa (NGA) y el medio B de King (KB) por duplicado (Olive *et al*, 1988).

Se seleccionaron las diluciones que se pensó darían placas contables, aplicando el protocolo se registraron las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias. Se utilizó un contador de colonias Quebec para el conteo de las mismas. El resultado es el promedio del conteo de colonias presentes en todas las placas de la misma dilución.

### **Frecuencia de nucleación de hielo**

A las bacterias aisladas y purificadas se les realizó la prueba para determinar su actividad de nucleación de hielo, la que se expresa como frecuencia de nucleación (F.N.), núcleos/células (Schaad, 1988).

Después de 4-6 días fueron removidas colonias de 24 h de incubación de placas con el medio selectivo empleado para su desarrollo, con una asa y se suspendieron en 0.1mL de agua destilada y la turbidez de la suspensión produjo 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (ufc/mL). En una hoja de aluminio de un diámetro de 5.7 cm se colocaron cinco gotitas de 100 microlitros de las suspensiones de cada colonia. La hoja de aluminio se puso a flotar en un baño de

metanol-agua manteniéndose a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Una colonia contiene un núcleo activado a  $-10^{\circ}\text{C}$  en 1 ó mas de 5 gotitas congeladas en 30 seg. (Schaad, 1988). Se utilizó un control de agua bidestilada, un control positivo y un control negativo y la frecuencia de nucleación se obtuvo por la siguiente fórmula :

$$\text{F.N.} = \frac{\text{Células / mL}}{\text{Núcleos / mL}}$$

$$\text{Núcleos / mL (a temp. T)} = \frac{\text{el \# total de gotas}}{\text{\# de gotas no congeladas}} \times \text{volúmen de las gotas}$$

### Prueba de patogenicidad a los aislados I.N.A.

Las bacterias I.N.A. aisladas, fueron sometidas a pruebas para determinar su patogenicidad usando la prueba de pudrición de la papa y la reacción de hipersensibilidad en tabaco. Estas pruebas sirvieron para diferenciar parcialmente los géneros de bacterias fitopatógenas.

#### Pudrición de la papa

Se utilizaron rebanadas de papa, las cuales se esterilizaron superficialmente flameándolas con etanol al 96%.

En condiciones estériles se colocaron en las cajas de Petri, discos de papel empapados con agua destilada y sobre éstos, las rebanadas de papa. Posteriormente se hicieron incisiones con palillos de dientes estériles y con ayuda de un asa se inoculó una incisión con la suspensión bacteriana de 24 h a probar, se hizo lo mismo con los testigos, solo que éstos se inocularon con agua destilada estéril. Todas las cajas se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  por 24 a 72 h procurando mantener las cajas siempre húmedas.

A partir de las primeras 24 h se palpó con una asa bacteriológica el tejido de cada una de las rebanadas inoculadas y si se sentía blando, indicaba que la bacteria probada sintetizaba enzimas pectolíticas y se reportaba positiva (Schaad, 1988) (Olive *et al*, 1984).

## Reacción de hipersensibilidad en tabaco

Se preparó una suspensión bacteriana, en tubos con agua destilada estéril a una concentración de  $3 \times 10^8$  bacterias por mL. Con una jeringa hipodérmica para insulina se tomó la suspensión y se procedió a infiltrarla en las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), las plantas se mantienen a temperatura ambiente promedio de 28°C.

## Caracterización e identificación de los aislados I.N.A. hasta especie y patovariedad

La identificación precisa de los microorganismos fue complicada y requirió de una combinación de pruebas fisiológicas-bioquímicas, medios selectivos y pruebas de patogenicidad descritas anteriormente (Buchanan *et al*, 1984) (Holt *et al*, 1994) (Schaad, 1988).

Los aislados I.N.A. purificados en tubos con agar nutritivo glicerol (Lindow *et al*, 1978), se sometieron a exámenes morfológicos, microscópicos (tinción de Gram) y pruebas bioquímicas.

Las pruebas que se realizaron para diferenciar e identificar especies y patovariedades del género *Pseudomonas* fueron: Producción de pigmento fluorescente en KB, ensayos LOPAT (producción de levana, reacción de la oxidasa, pudrición de la papa, dihidrolasa de la arginina e hipersensibilidad en tabaco), liquefacción de la gelatina, crecimiento en: m-inositol, sorbitol, glicerol, D-tartrato, catalasa y motilidad en el medio de SIM (Tabla 1).

Las pruebas que se realizaron para diferenciar e identificar especies del género *Erwinia* fueron: Producción de pigmentos en el medio KB y YDC, pudrición de la papa, hipersensibilidad en tabaco, producción de ácido sulfhídrico, producción de ureasa, producción de indol, liquefacción de la gelatina, motilidad en el medio SIM, reducción de nitratos, crecimiento en: m-inositol, sorbitol, glicerol y catalasa (Tabla 2).

Además se realizaron otras pruebas para descartar otros posibles géneros de bacterias como *Xanthomonas* y *Citrobacter* reportadas en el trabajo realizado por Banda en 1991 (Tabla 3 y 4).

Todas estas pruebas se basan en la metodología que indica el Manual de Bergey's (Buchanan *et al*, 1984) (Holt *et al*, 1994) y en Schaad, 1988.

**Tabla 1 . Pruebas para diferenciar e identificar las especies y patovarietades de *Pseudomonas***

Pruebas fisiológicas-bioquímicas	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. syringae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Biov. 3</i>	<i>Pseudomonas viridiflava</i>
Nucleación de hielo	(+)	(+)	(+)
Tinción de Gram	(-)	(-)	(-)
Prod. de pigm. fluorescente en KB	(- / +)	(+)	(+)
Pigm. no fluorescente no diluible	(-)	(-)	(+)
<b>Ensayos LOPAT :</b>			
Producción de levana	V	(-)	
Oxidasa	(-)	(+)	(-)
Putrición de la papa	(-)	(-)	(+)
Dihidrolasa de arginina	(-)	(+)	(-)
Hipersensibilidad en tabaco	V	V	(+)
Liquefacción de la gelatina	d	(+)	(+)
<b>Crecimiento en:</b>			
m-Inositol	(+)	d	(+)
Sorbitol	(+)	d	(+)
Glicerol	(+)	d	(+)
D-Tartrato	V (-)	(-)	(+)
Catalasa	(+)	(+)	(+)
Motilidad en el medio de SIM	(+)	(+)	(+)
Fitopatógenos	(+)	(-)	(+)

**Simbología:** (+) positivo, (-) negativo, (+/-) significa que hay cepas que producen pigmento fluorescente en el medio B de King y otras cepas no, d = reacción que algunas cepas la dan positiva y otras negativa y V = reacción variable.

**Tabla 2 . Pruebas para diferenciar e identificar especies y variedades de *Erwinia***

Pruebas fisiológicas-bioquímicas	<i>E. herbicola</i> <i>var. herbicola</i>	<i>Erwinia</i> <i>ananas</i>	<i>Erwinia</i> <i>uredovora</i>	<i>Erwinia</i> <i>rubrifaciens</i>
Nucleación de hielo	(+)	(+)	(+)	(+)
Tinción de Gram	(-)	(-)	(-)	(-)
Prod. de pígm. rosados en YDC	(-)	(-)	(-)	(+)
Crecimiento mucoso	d	(+)	(-)	(+)
Putrición de la papa				
Hipersensibilidad en tabaco	V	(-)	ND	(-)
Prod. de ác. sulfhídrico	(+)	d	(-)	(+)
Producción de ureasa	(-)	(-)	(-)	(-)
Producción de indol	(-)	(+)	(+)	(-)
Liquefacción de la gelatina	(+)	(+)	(+)	(-)
Pigmentos amarillos en KB	(+)	(+)	(+)	(-)
Motilidad en el medio de SIM	(+)	(+)	(+)	(+)
Reducción de nitratos	V	(-)	(+)	(-)
Crecimiento en :				
m-Inositol	(-)	(+)	(+)	(-)
Sorbitol	(+)	(+)	(+)	(+)
Glicerol	(-)	(+)	(+)	d
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)

**Simbología:** (+) positivo, (-) negativo, d = reacción que algunas cepas la dan positiva y otras negativa, V = reacción variable y ND = no da la reacción.



**Tabla 3. Pruebas diferenciales de especies del género *Xanthomonas***

Pruebas fisiológicas-bioquímicas	<i>Xanthomonas campestris</i>
Crecimiento mucoso en agar con un 5% de glucosa	(+)
Producción de pigmento xanthomonadino, amarillo insoluble en agua	(+)
Liquefacción de la gelatina	d
Producción de ácido de leche tomasolada	(-)
Asparagina	(-)
Máximo porcentaje de tolerancia al NaCl	2 a 5 %
Máximo crecimiento (T = °C)	35 a 39 °C

Simbología: (+) positivo, (-) negativo, d = reacción que algunas cepas la dan positiva y otras negativa.

**Tabla 4. Pruebas diferenciales de especies del género *Citrobacter***

Pruebas fisiológicas-bioquímicas	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
Indol	(+)	(-)
Rojo de metilo	(+)	(+)
Producción de ácido sulfhídrico	(-)	(+)
Ureasa	(+)	d
Arginina dihidrolasa	d	d
Motilidad	(+)	(+)
Liquefacción de la gelatina	(-)	(-)
Producción de ácido de la glucosa	(+)	(+)
m-inositol	(-)	(-)
Manitol	(+)	(+)
Sorbitol	(+)	(+)
Glicerol	(+)	(+)
Reducción de nitratos	(+)	(+)
Oxidasa	(-)	(-)
Producción de pigmentos amarillos	(-)	(-)

Simbología: (+) positivo, (-) negativo, d = reacción que algunas cepas la dan positiva y otras negativa.

## Medición de los datos de temperatura

La temperatura mínima alcanzada en cada huerta en los días muestreados, se determinó por los registros meteorológicos proporcionados por el Campo Experimental de General Terán (CEGET) y la Comisión Nacional del Agua (C.N.A.).

## Análisis estadístico

Con el propósito de determinar la comparación de las variables normales entre las huertas, así como entre municipios, se realizó un análisis de varianza de un factor (Oneway); mientras que para las variables no normales se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para la determinación del grado de asociación, se aplicó el análisis de correlación de Pearson. El paquete estadístico usado fue el Statistical Package for the Social Science (S.P.S.S., 1992 ver.2.O.).

## Variables analizadas

1. Promedio de la población bacteriana (ufc/g de peso fresco).
  2. Logaritmo del promedio de la población bacteriana (ufc/g de peso fresco).
  3. Temperatura mínima alcanzada (°C).
  4. Clima.
  5. Frecuencia de nucleación (F.N.) (núcleos/células).
  6. Logaritmo de la frecuencia de nucleación (núcleos/células).
  7. Temperatura de nucleación (°C).
- Frecuencia de aislamientos de:
8. *Pseudomonas syringae* patovariedad *syringae*.
  9. *Pseudomonas fluorescens* Biovariedad 3.
  10. *Pseudomonas viridiflava*.
  11. *Erwinia herbicola* variedad *herbicola*.
  12. *Erwinia ananas*.
  13. *Erwinia uredovora*.
  14. *Erwinia rubrifaciens*.

## RESULTADOS

### Caracterización de bacterias I.N.A. de árboles de naranja dulce variedad Valencia de la zona citrícola del estado de Nuevo León

Las características microscópicas de todos los aislados fueron bacilos cortos rectos, Gram negativos.

Para la reacción de hipersensibilidad en tabaco, la observación de una flacidez, seguida de una condición papelosa necrótica de color café claro en la zona infiltrada se reportó positivo y se consideró la bacteria de naturaleza fitopatogena.

Las colonias blanco grisáceo, blanco lechoso y opacas, que produjeron pigmento verde fluorescente difusible en el medio B de King (observando la fluorescencia con la lámpara de luz UV), se identificaron como *Pseudomonas*. También se obtuvieron colonias translúcidas no fluorescentes y todas se examinaron de acuerdo a los ensayos LOPAT y a las pruebas que se mencionan en la Tabla 1.

Las bacterias que resultaron levana (-), oxidasa (-), dihidrolasa de la arginina (-), pudrición de la papa (-) e hipersensibilidad en tabaco (-) fueron identificadas como *Pseudomonas syringae*.

De acuerdo a los resultados positivos obtenidos en las pruebas fisiológicas-bioquímicas señaladas en la Tabla 1 se identificaron 64 cepas como *Pseudomonas syringae pv. syringae*, 15 cepas no respondieron a las pruebas como antes se mencionó sino que 10 cepas de ellas fueron levana (+), 3 cepas respondieron a la hipersensibilidad en tabaco (+) y 2 cepas a la pudrición de la papa (+) y todas ellas fueron identificadas como *Pseudomonas syringae pv. syringae*.

A las bacterias identificadas como *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3 se les realizaron las pruebas mencionadas en la Tabla 1 obteniéndose 153 cepas, variando en la hipersensibilidad en tabaco 97 cepas fueron (-) y 56 cepas (+) y en la pudrición de la papa 89 cepas fueron (-) y 64 cepas fueron (+).

Las bacterias que produjeron un pigmento insoluble café dorado, algunos pigmentos azul-verde y que respondieron de manera positiva a las pruebas señaladas en la Tabla 1 se les identificó como *Pseudomonas viridiflava*, obteniéndose 119 cepas, variando en la hipersensibilidad en tabaco 60 cepas (+) y 59 cepas (-).

En el medio B de King, NBY y (D<sub>3</sub>) se obtuvieron una gran variedad de colonias, en tamaño y forma, ya que fueron circulares, puntiformes; convexas y aplanadas, con bordes continuos y ondulados; con pigmento intracelular amarillo (pálido y fuerte), naranja, se les realizaron las pruebas para diferenciar e identificar especies y variedades de *Erwinias* (Tabla 2).

Se obtuvieron 76 cepas que se identificaron como *Erwinia herbicola* variedad *herbicola* ya que resultaron positivas en las pruebas fisiológicas-bioquímicas mencionadas en la Tabla 2, variando en la prueba de hipersensibilidad en tabaco obteniéndose 8 cepas (+) y 68 cepas (-), también se efectuó la pudrición de la papa obteniendo 59 cepas (+) y 17 cepas (-).

De acuerdo a las pruebas señaladas en la Tabla 2, se identificaron 44 cepas como *Erwinia ananas*, variando en la prueba de hipersensibilidad en tabaco 35 cepas (-) y 9 cepas (+) y en la pudrición de la papa 31 cepas (+) y 13 cepas (-).

Se obtuvieron 43 cepas que se identificaron como *Erwinia uredovora* mediante las pruebas mencionadas en la Tabla 2, con excepción de 20 cepas que variaron en la prueba de hipersensibilidad en tabaco obteniéndose 12 cepas (+) y 8 cepas (-).

A las colonias crema, amarillo pálido, convexas, lisas brillantes, con bordes enteros, mucoides; que produjeron en el medio YDC, un pigmento rosado, soluble en agua; se les efectuaron las pruebas señaladas en la Tabla 2, identificándose 26 cepas de *Erwinia rubrifaciens*; en la prueba de hipersensibilidad en tabaco se obtuvieron 13 cepas (+) y 13 cepas (-) y en la pudrición de la papa dieron 17 cepas (+) y 9 cepas (-).

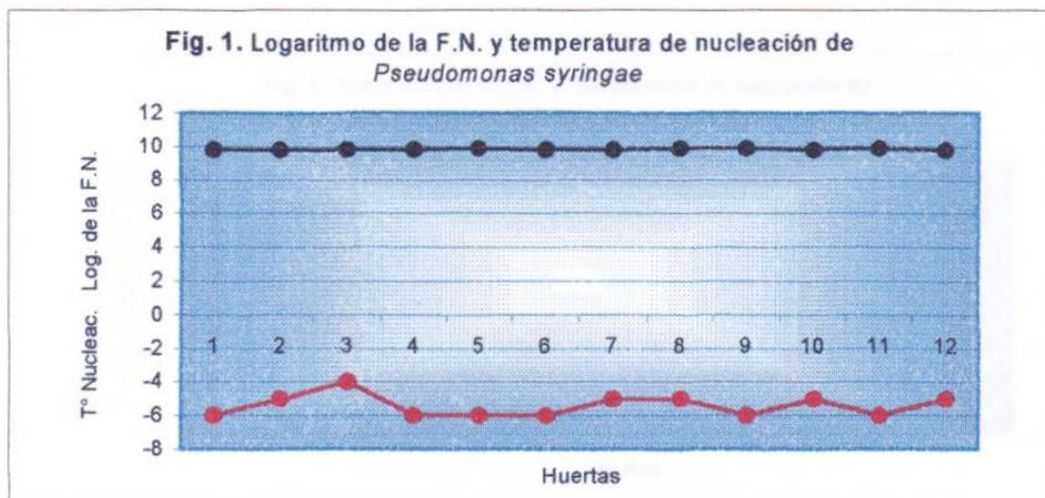
### Distribución de las bacterias I.N.A. en las huertas muestreadas

En los muestreos realizados de octubre de 1997 a febrero de 1998, 64 aislamientos fueron *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Tabla 12) que representan el 12.19% (Fig.8), distribuidos en todas las huertas muestreadas (Tabla 5), obteniéndose los mayores aislamientos en General Terán-CEGET y Allende-Altamira siendo respectivamente de 13 y 10; y la menor cantidad aislamientos se obtuvo en Montemorelos- García Jiménez 2.

**Tabla 5.** Resultados de pruebas realizadas a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Período de muestreo	Huerta	Promedio del log. de la F.N. (núcleos/céls.).	Promedio de la temperatura de nucleación (°C).	Cantidad de aislamientos
Oct. 97 - Feb. 98	L-Re	9.8	-6	7
Oct. 97 - Feb. 98	L-Am	9.8	-5	4
Oct. 97 - Feb. 98	H-Ro	9.8	-4	4
Oct. 97 - Feb. 98	H-Re	9.8	-6	4
Sep. 97- Feb. 98	T-Ce	9.86	-6	13
Oct. 97 - Feb. 98	T-SoM	9.8	-6	7
Oct. 97 - Feb. 98	M-OJA	9.8	-5	3
Oct. 97 - Feb. 98	M-GJ	9.8	-5	2
Oct. 97 - Feb. 98	A-A	9.85	-6	10
Oct. 97 - Feb. 98	A-DL	9.8	-5	3
Oct. 97- Feb. 98	C-C	9.9	-6	3
Oct. 97 - Feb. 98	C-SF	9.8	-5	4

El rango del logaritmo de la frecuencia de nucleación (F.N.) para esta bacteria fue de 9.8-9.9 núcleos/células y el rango de la temperatura de nucleación fue de -4 a -6°C (Fig. 1).

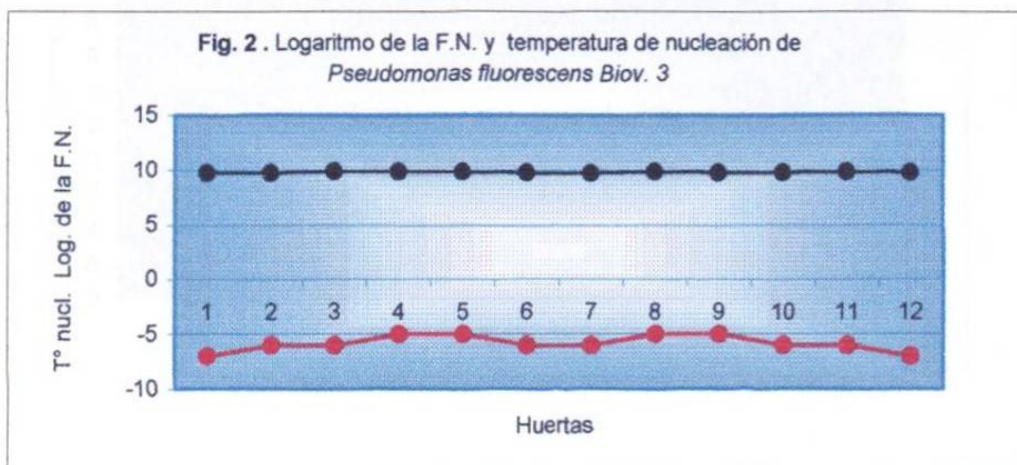


En el caso de la *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3, se realizaron 153 aislamientos, siendo esta la mayor cantidad (Tabla 12) y representa un 29.14% (Fig. 8); encontrándose en todas las huertas. La Tabla 6 ilustra que el mayor aislamiento se obtuvo en General Terán-CEGET siendo 26 y el menor en Hualahuises-El Refugio siendo 7; pero se encontró una distribución constante y abundante de esta bacteria en el resto de las huertas muestreadas.

Tabla 7. Resultados de pruebas realizadas a *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3

Tabla 6. Resultados de pruebas realizadas a <i>Pseudomonas fluorescens</i> Biov. 3				
Período de muestreo	Huerta	Promedio del log. de la F.N. (núcleos/céls.).	Promedio de la temp. de nucleación (°C).	Cantidad de aislamientos
Oct. 97 - Feb. 98	L-Re	9.8	-7	10
Oct. 97 - Feb. 98	L-Am	9.8	-6	10
Oct. 97 - Feb. 98	H-Ro	9.87	-6	13
Oct. 97 - Feb. 98	H-Re	9.85	-5	7
Sep. 97- Feb. 98	T-Ce	9.85	-5	26
Oct. 97 - Feb. 98	T-SoM	9.8	-6	17
Oct. 97 - Feb. 98	M-OJA	9.7	-6	9
Oct. 97 - Feb. 98	M-GJ	9.86	-5	10
Oct. 97 - Feb. 98	A-A	9.8	-5	15
Oct. 97 - Feb. 98	A-DL	9.8	-6	18
Oct. 97 - Feb. 98	C-C	9.87	-6	7
Oct. 97 - Feb. 98	C-SF	9.8	-7	10

El rango de logaritmo de la frecuencia de nucleación (F.N.) para esta bacteria fue de 9.8 a 9.87 núcleos/células y el rango de la temperatura de nucleación fue de -5 a -7°C (Fig. 2).

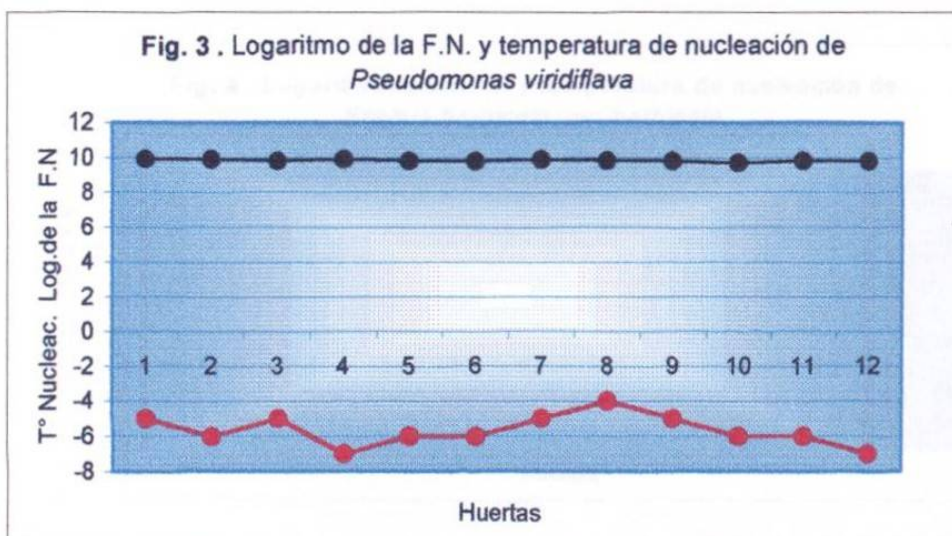


Se obtuvieron 119 aislamientos de *Pseudomonas viridiflava* (Tabla 12) que representan el 22.67% (Fig.8), se encuentra presente en todas las huertas muestreadas, obteniéndose la mayor cantidad de aislamientos de General Terán-CEGET siendo 20 y la menor cantidad en General Terán-Soledad de la Mota siendo 6 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Resultados de pruebas realizadas a *Pseudomonas viridiflava*

Periodo de muestreo	Huerta	Promedio del log. de la F.N. (núcleos/céls.).	Promedio de la temp. de nucleación (°C).	Cantidad de aislamientos
Oct. 97 - Feb. 98	L-Re	9.9	-5	10
Oct. 97 - Feb. 98	L-Am	9.9	-6	8
Oct. 97 - Feb. 98	H-Ro	9.8	-5	7
Oct. 97 - Feb. 98	H-Re	9.87	-7	9
Sep. 97- Feb. 98	T-Ce	9.8	-6	20
Oct. 97 - Feb. 98	T-SoM	9.8	-6	6
Oct. 97 - Feb. 98	M-OJA	9.87	-5	7
Oct. 97 - Feb. 98	M-GJ	9.8	-4	8
Oct. 97 - Feb. 98	A-A	9.8	-5	8
Oct. 97 - Feb. 98	A-DL	9.7	-6	17
Oct. 97- Feb. 98	C-C	9.8	-6	9
Oct. 97 - Feb. 98	C-SF	9.8	-7	10

El rango del logaritmo de la frecuencia de nucleación (F.N.) fue de 9.7 a 9.9 núcleos/células y el rango de la temperatura de nucleación fue de -4 a -7°C (Fig. 3).

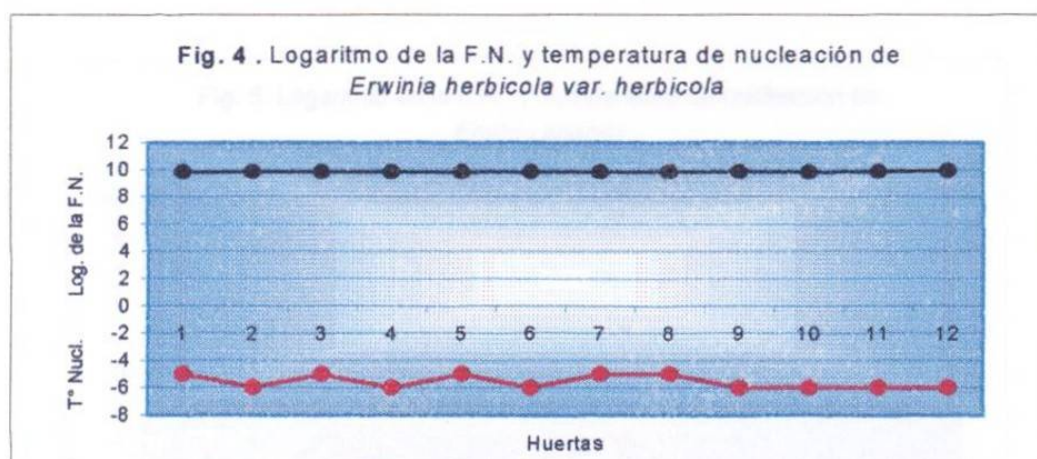


De *Erwinia herbicola* variedad *herbicola* se obtuvieron 76 aislamientos (Tabla 12) que representa un 14.48% (Fig.8), la cual se encontró presente en todas las huertas muestradas, se obtuvo la mayor cantidad de aislamientos en General Terán-CEGET siendo 12 y la menor cantidad de aislamientos fue 3 y se obtuvo en Montemorelos-García Jiménez (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultados de pruebas realizadas a *Erwinia herbicola* var. *herbicola*

Período de muestreo	Huerta	Promedio del log. de la F.N. (núcleos/céls.).	Promedio de la temp. de nucleación (°C).	Cantidad de aislamientos
Oct. 97 - Feb. 98	L-Re	9.8	-5	8
Oct. 97 - Feb. 98	L-Am	9.8	-6	4
Oct. 97 - Feb. 98	H-Ro	9.8	-6	4
Oct. 97 - Feb. 98	H-Re	9.8	-6	9
Sep. 97 - Feb. 98	T-Ce	9.8	-6	12
Oct. 97 - Feb. 98	T-SoM	9.8	-6	8
Oct. 97 - Feb. 98	M-OJA	9.8	-5	6
Oct. 97 - Feb. 98	M-GJ	9.8	-5	3
Oct. 97 - Feb. 98	A-A	9.8	-6	9
Oct. 97 - Feb. 98	A-DL	9.8	-6	4
Oct. 97 - Feb. 98	C-C	9.8	-7	4
Oct. 97 - Feb. 98	C-SF	9.87	-6	6

El promedio del logaritmo de la frecuencia de nucleación (F.N.) fue de 9.8 núcleos/células y el rango de la temperatura de nucleación fue de -5 a -7° C (Fig. 4).



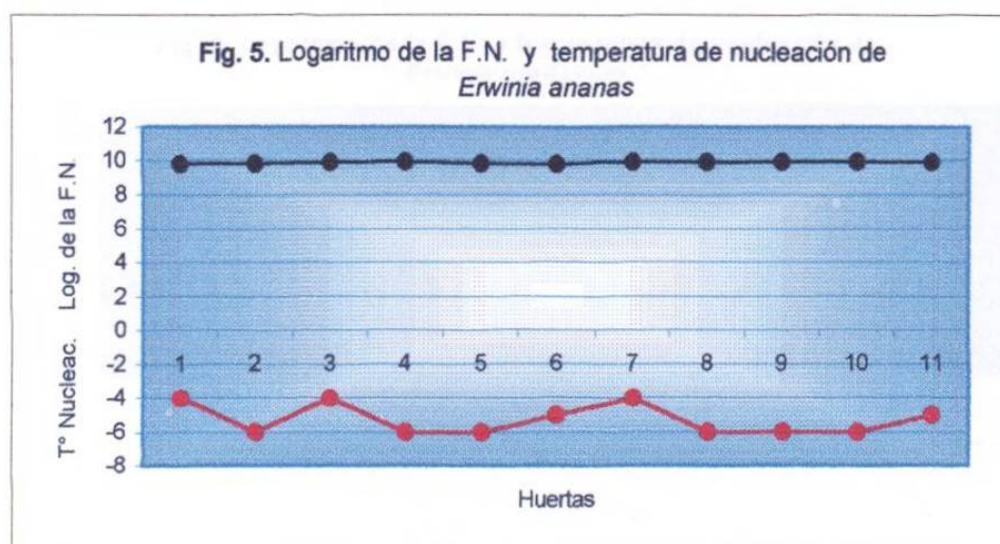


En el caso de *Erwinia ananas* se obtuvieron 44 aislamientos (Tabla 12) que representan un 8.38% (Fig.8), se encontró distribuida en poca proporción y de la siguiente manera, en Linares-La Amistad fueron 8 aislamientos (mayor cantidad) y en Montemorelos-García Jiménez no se obtuvo ninguno (Tabla 9).

**Tabla 9.** Resultados de pruebas realizadas a *Erwinia ananas*

Período de muestreo	Huerta	Promedio del log. de la F.N. (núcleos/céls.).	Promedio de la temp. de nucleación (°C).	Cantidad de aislamientos
Oct. 97 - Feb. 98	L-Re	9.8	-4	5
Oct. 97 - Feb. 98	L-Am	9.8	-6	8
Oct. 97 - Feb. 98	H-Ro	9.86	-4	3
Oct. 97 - Feb. 98	H-Re	9.88	-6	3
Sep. 97 - Feb. 98	T-Ce	9.8	-6	5
Oct. 97 - Feb. 98	T-SoM	9.8	-6	4
Oct. 97 - Feb. 98	M-OJA	9.9	-4	1
Oct. 97 - Feb. 98	M-GJ	No	No	No
Oct. 97 - Feb. 98	A-A	9.9	-6	6
Oct. 97 - Feb. 98	A-DL	9.9	-6	3
Oct. 97 - Feb. 98	C-C	9.88	-6	3
Oct. 97 - Feb. 98	C-SF	9.87	-5	3

El rango de logaritmo de la frecuencia de nucleación (F.N.) fue de 9.8 a 9.9 núcleos/células y el rango de la temperatura de nucleación fue de -4 a -6°C (Fig. 5).

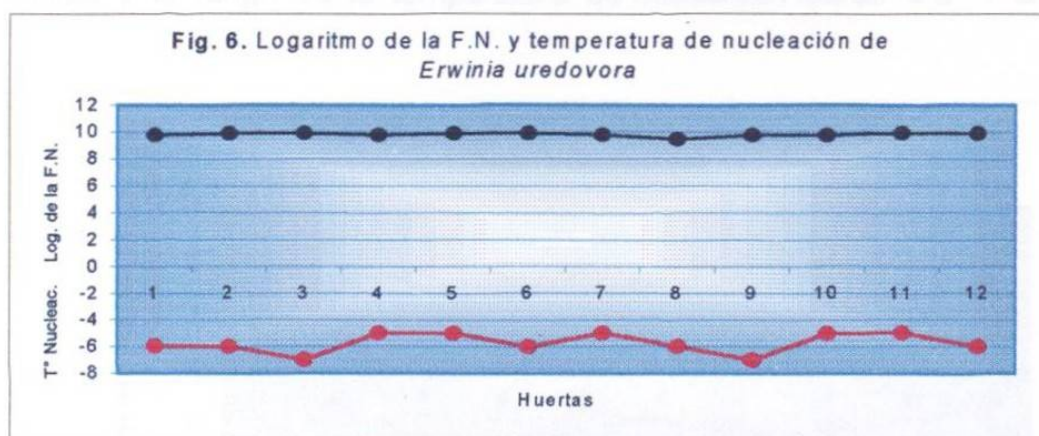


En el caso de *Erwinia uredovora* se obtuvieron 43 aislamientos (Tabla 12) que representan el 8.19% (Fig.8), cuya distribución en todas las huertas muestreadas fue de la siguiente manera, la mayor cantidad de aislamientos que fue 9 se obtuvo en Hualahuises–El Refugio y la menor cantidad que fue 1 aislamiento en cada huerta se obtuvo en Cadereyta–El Castillo y Cadereyta–Santa Fé (Tabla 10).

**Tabla 10.** Resultados de pruebas realizadas a *Erwinia uredovora*

Período de muestreo	Huerta	Promedio del log. de la F.N. (núcleos/céls.).	Promedio de la temp. de nucleación (°C).	Cantidad de aislamientos
Oct. 97 - Feb. 98	L-Re	9.75	-6	2
Oct. 97 - Feb. 98	L-Am	9.9	-6	5
Oct. 97 - Feb. 98	H-Ro	9.87	-7	5
Oct. 97 - Feb. 98	H-Re	9.8	-5	9
Sep. 97- Feb. 98	T-Ce	9.85	-5	4
Oct. 97 - Feb. 98	T-SoM	9.9	-6	5
Oct. 97 - Feb. 98	M-OJA	9.8	-5	2
Oct. 97 - Feb. 98	M-GJ	9.5	-6	4
Oct. 97 - Feb. 98	A-A	9.8	-7	3
Oct. 97 - Feb. 98	A-DL	9.8	-5	2
Oct. 97- Feb. 98	C-C	9.9	-5	1
Oct. 97 - Feb. 98	C-SF	9.87	-6	1

El rango de logaritmo de la frecuencia de nucleación (F.N.) fue de 9.75 a 9.9 núcleos/células y el rango de la temperatura de nucleación fue de -5 a -7°C (Fig. 6).



Se obtuvieron 26 aislamientos de *Erwinia rubrifaciens* (Tabla 12) que representan el 4.95%, el menor porcentaje (Fig.8). Esta bacteria se encontró en poca proporción, distribuída de la siguiente manera, la mayor cantidad de aislamientos que fue 6 se obtuvo en Allende-Altamira y en Allende-Diego López respectivamente y en la huerta de Hualahuises-El Roble no se obtuvo ningún aislamiento, el resto de los aislamientos fue de 3 en Cadereyta-El Castillo; 2 en Linares-El Refugio y Cadereyta-Santa Fé y 1 en Linares-La Amistad, General Terán-CEGET, General Terán Soledad la Mota, Montemorelos-Ojo de Agua y Montemorelos-García Jiménez, respectivamente (Tabla 11).

**Tabla 11.** Resultados de pruebas realizadas a *Erwinia rubrifaciens*

Período de muestreo	Huerta	Promedio del log. de la F.N. (núcleos/céls.).	Promedio de la temp. de nucleación (°C).	Cantidad de aislamientos
Oct. 97 - Feb. 98	L-Re	9.8	-5	2
Oct. 97 - Feb. 98	L-Am	9.87	-5	1
Oct. 97 - Feb. 98	H-Ro	No	No	No
Oct. 97 - Feb. 98	H-Re	9.9	-3	2
Sep. 97- Feb. 98	T-Ce	9.7	-7	1
Oct. 97 - Feb. 98	T-SoM	9.78	-7	1
Oct. 97 - Feb. 98	M-OJA	9.7	-4	1
Oct. 97 - Feb. 98	M-GJ	9.7	-5	1
Oct. 97 - Feb. 98	A-A	9.8	-6	6
Oct. 97 - Feb. 98	A-DL	9.8	-6	6
Oct. 97- Feb. 98	C-C	9.87	-5	3
Oct. 97 - Feb. 98	C-SF	9.9	-4	2

El rango del logaritmo de la frecuencia de nucleación (F.N.) fue de 9.7 a 9.9 núcleos/células y el rango de la temperatura de nucleación fue de -3 a -7°C (Fig. 7).

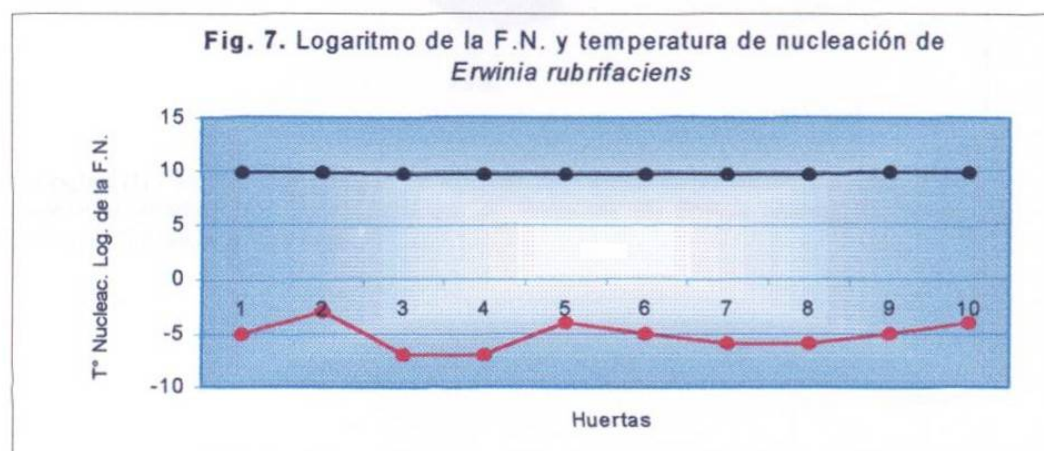
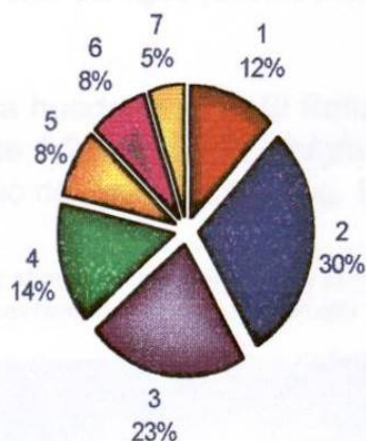


Tabla 12. Total de bacterias I.N.A. aisladas en la zona citrícola del estado de Nuevo León de septiembre de 1997 a febrero de 1998.

Microorganismos	Cantidad de aislamientos	% de aislamientos
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	64	12.19
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biov. 3	153	29.14
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	119	22.67
<i>Erwinia herbicola</i> var. <i>herbicola</i>	76	14.48
<i>Erwinia ananas</i>	44	8.38
<i>Erwinia uredovora</i>	43	8.19
<i>Erwinia rubrifaciens</i>	26	4.95
	Total: 525	

Fig. 8. Porcentaje total de bacterias I.N.A. aisladas en la zona citrícola del estado de Nuevo León de septiembre de 1997 a octubre de 1998.



**Simbología :** (1) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, (2) *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3, (3) *Pseudomonas viridiflava*, (4) *Erwinia herbicola* var. *herbicola*, (5) *Erwinia ananas*, (6) *Erwinia uredovora* y (7) *Erwinia rubrifaciens*.

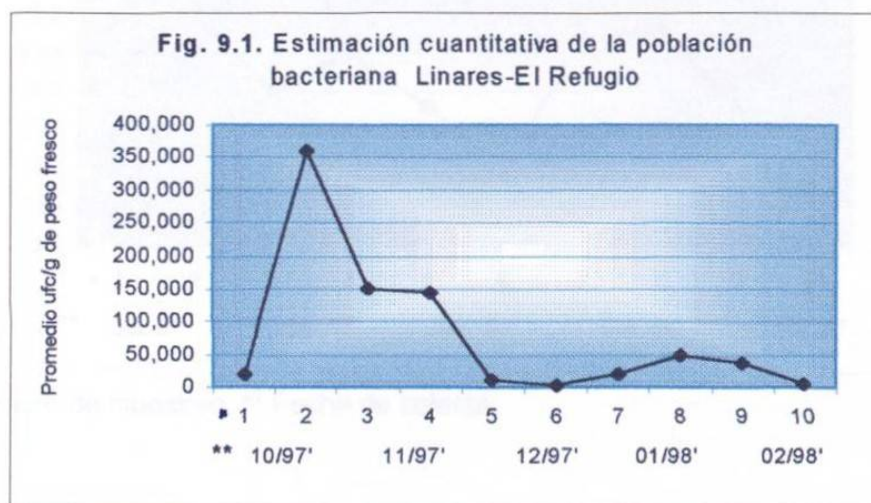
## Fluctuaciones estacionales de las poblaciones de bacterias I.N.A. en las huertas muestreadas y su relación con otros factores

**Tabla 13.** Resultados de las pruebas realizadas a las muestras de Linares-El Refugio.

Fecha de muestreo	Prom. de la pob. bacteriana (ufc/gramo de peso fresco).	Log. del prom. de la pob. bact. (ufc/gramo de peso fresco)	Temperatura mínima alcanzada (° C)	Clima	Promedio de la frecuencia de nucleación (núcleos/céls.)	Log. del prom. de la frec. de nucleación	Prom de la temp. de nucleación (°C)
20/10/97	20,000	4.301	14	Fresco	$8 \times 10^9$	9.9	-7
06/11/97	360,000	5.55	23	Templado	$8 \times 10^9$	9.9	-6
14/11/97	150,000	5.176	19	Templado	$6.02 \times 10^9$	9.8	-7
27/11/97	145,000	5.161	17	Fresco	$7 \times 10^9$	9.85	-7
05/12/97	12,000	4.079	13	Fresco	$6 \times 10^9$	9.78	-4
15/12/97	2,200	3.34	-2	Frío	$5 \times 10^9$	9.7	-4
07/01/98	20,000	4.3	8.5	Frío	$7.5 \times 10^9$	9.87	-5
15/01/98	48,000	4.68	14	Fresco	$7.7 \times 10^9$	9.88	-5
02/02/98	38,000	4.58	9.5	Frío	$6.1 \times 10^9$	9.78	-4
20/02/98	5,000	3.7	5.5	Frío	$5.8 \times 10^9$	9.76	-4

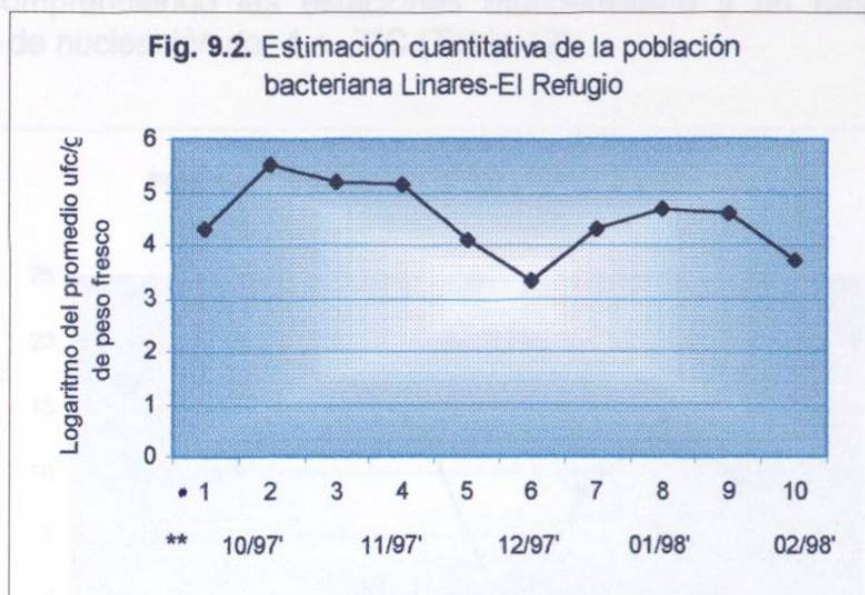
**Clima:** Helada (0.0°C), Frío (0.5-10.0°C), Fresco (10.5-18.0°C), Templado (18.5-26°C), Caluroso (26.5°C en adelante). Comisión Nacional del Agua (C.N.A.) y Campo Experimental de General Terán (CEGET).

Durante los muestreos en la huerta Linares-El Refugio las poblaciones bacterianas I.N.A. fluctuaron en un rango de 2,200-360,000 ufc/gramo de peso fresco (equivalente en  $\log_{10}$  3.3-5.5 ufc/gramo de peso fresco) (Fig. 9.1 y 9.2).



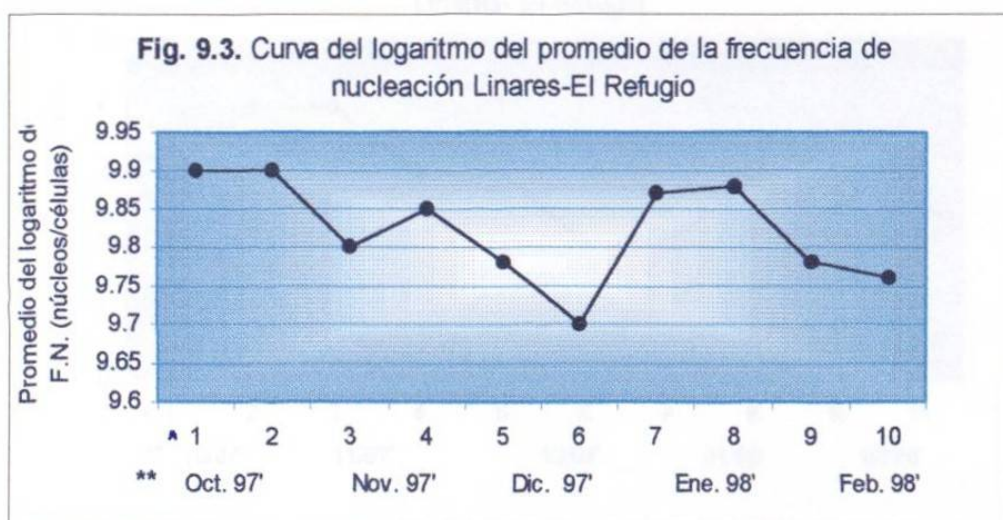
\* Número de muestreo, \*\* Fechas de colecta.

Y un rango de temperatura mínima alcanzada de 2 a 23°C (Fig. 9.4) siendo el clima imperante durante los meses de muestreo en esta fuente templado-fresco-frío (Fig. 9.5) comprendiendo las estaciones de primavera y un rango promedio de temperatura de nucleación



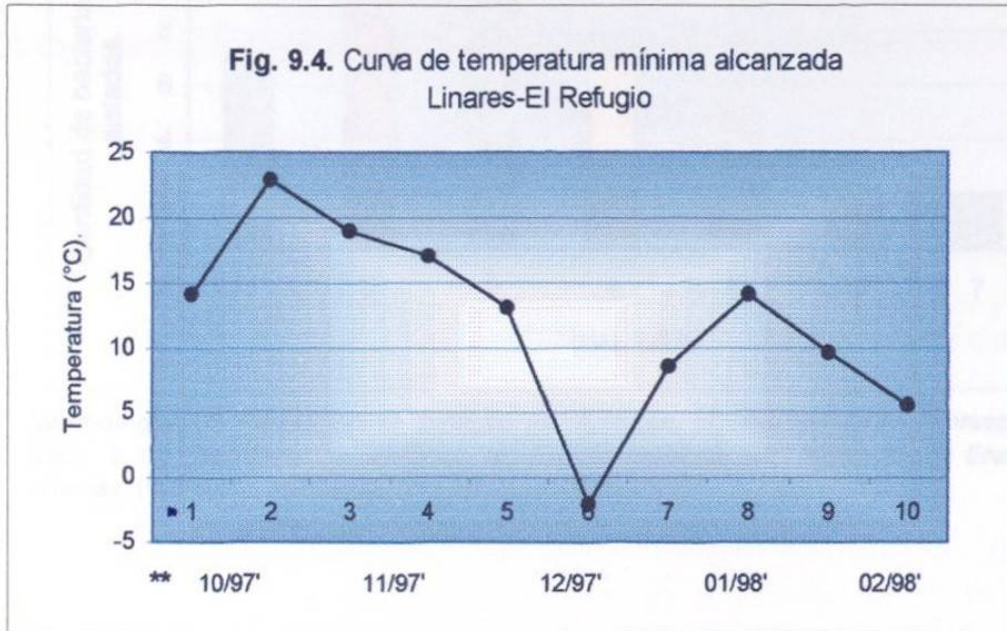
\* Número de muestreo, \*\* Fechas de colecta.

El rango de la frecuencia de nucleación (F.N.) fue  $5 \times 10^9$  a  $8 \times 10^9$  núcleos/células (equivalente en  $\log_{10}$  9.7-9.9 núcleos/células) (Fig. 9.3)

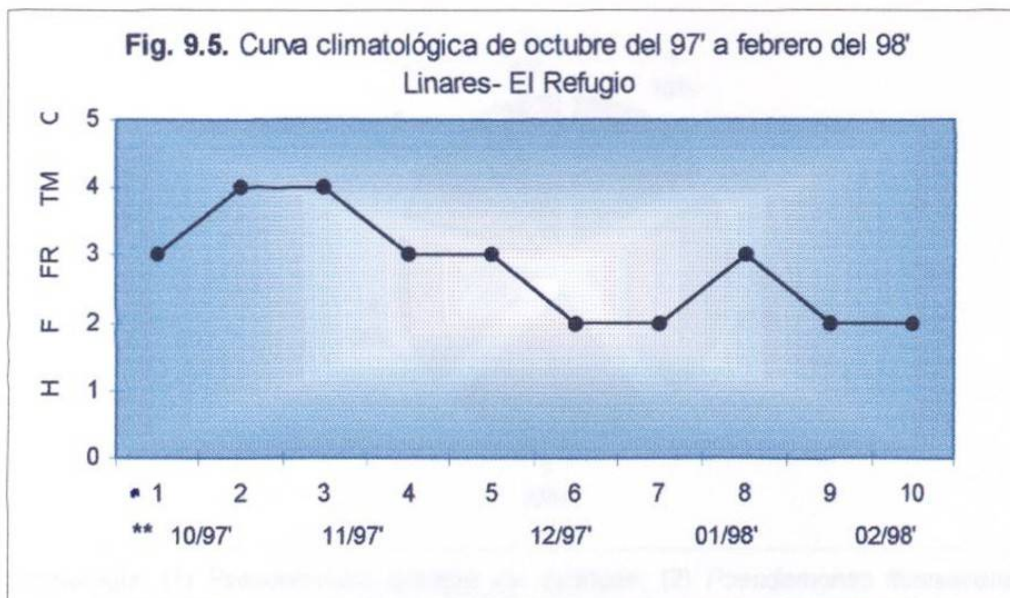


\* Número de muestreo, \*\* Fecha de colecta.

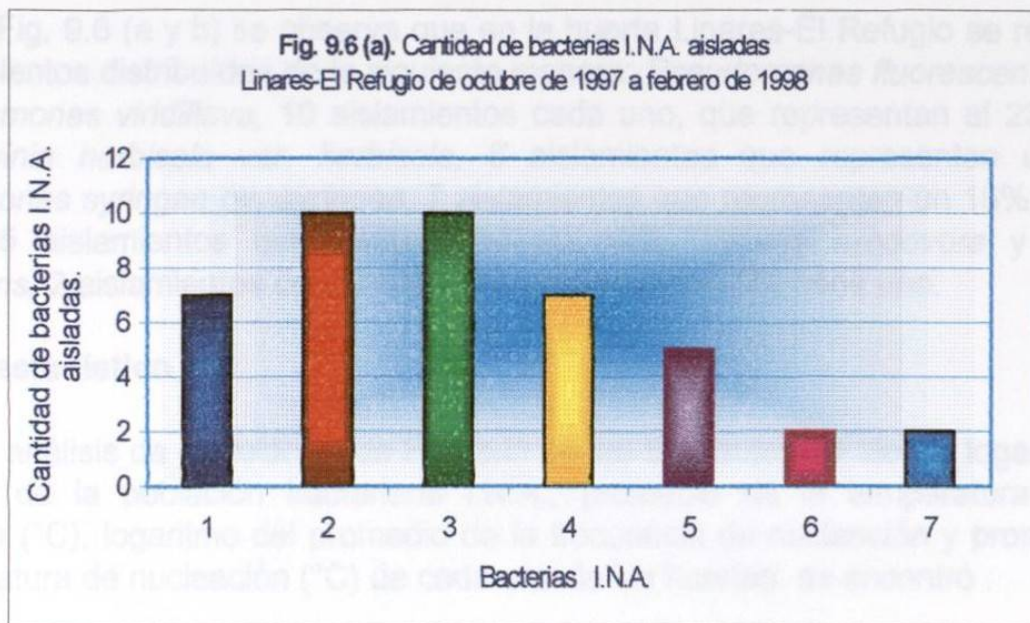
Y un rango de temperatura mínima alcanzada de 2 a 23°C (Fig. 9.4) siendo el clima imperante durante los meses de muestreo en esta huerta templado-fresco-frío (Fig. 9.5) comprendiendo las estaciones otoño-invierno y un rango promedio de temperatura de nucleación de -4 a -7°C (Tabla 12).



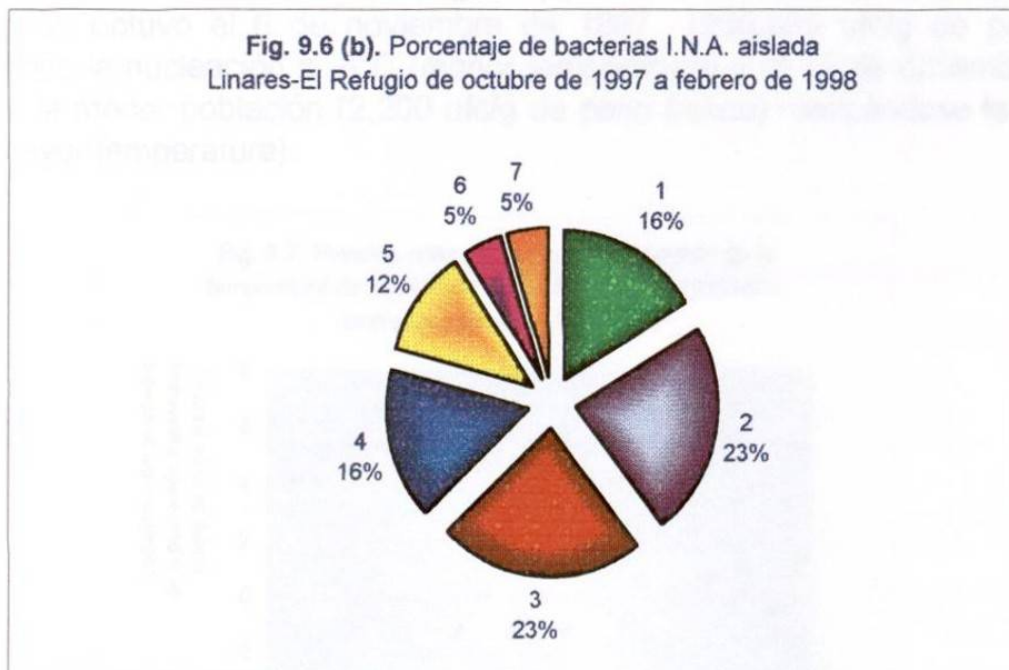
\* Número de muestreo, \*\* Fecha de colecta.



**Clima:** 1H: Helada (0.0°C), 2F: Frío (0.5-10.0°C), 3FR: Fresco (10.5-18.0°C), 4TM: Templado (18.5-26.0°C), 5C: Caluroso (26.5°C en adelante); \* Número de muestreo, \*\* Fechas de colecta.



**Simbología:** (1) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, (2) *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3, (3) *Pseudomonas viridiflava*, (4) *Erwinia herbicola* var. *herbicola*, (5) *Erwinia ananas*, (6) *Erwinia uredovora*, (7) *Erwinia rubrifaciens*.



**Simbología:** (1) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, (2) *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3, (3) *Pseudomonas viridiflava*, (4) *Erwinia herbicola* var. *herbicola*, (5) *Erwinia ananas*, (6) *Erwinia uredovora*, (7) *Erwinia rubrifaciens*.



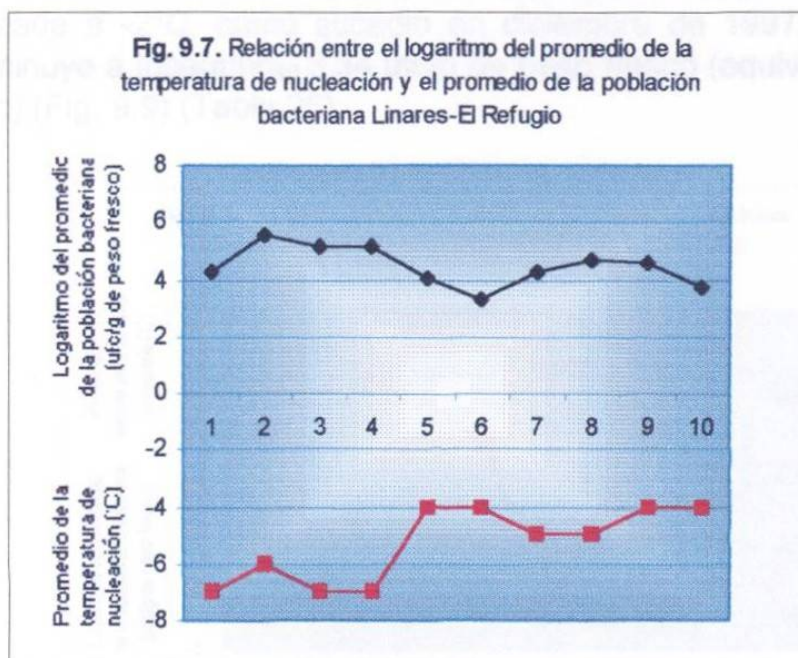
En la Fig. 9.6 (a y b) se observa que en la huerta Linares-El Refugio se realizaron 44 aislamientos distribuidos de la siguiente manera: *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3 y *Pseudomonas viridiflava*, 10 aislamientos cada uno, que representan el 23% cada uno; *Erwinia herbicola* var. *herbicola*, 8 aislamientos que representan un 16%, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, 7 aislamientos que representan un 16%; *Erwinia ananas*, 5 aislamientos que representan un 12%, *Erwinia uredovora* y *Erwinia rubrifaciens*, 2 aislamientos cada uno, que representan un 5% cada uno.

## Análisis estadístico

En el análisis de correlación de Pearson de las siguientes variables: logaritmo del promedio de la población bacteriana I.N.A., promedio de la temperatura mínima alcanzada (°C), logaritmo del promedio de la frecuencia de nucleación y promedio de la temperatura de nucleación (°C) de cada una de las huertas, se encontró :

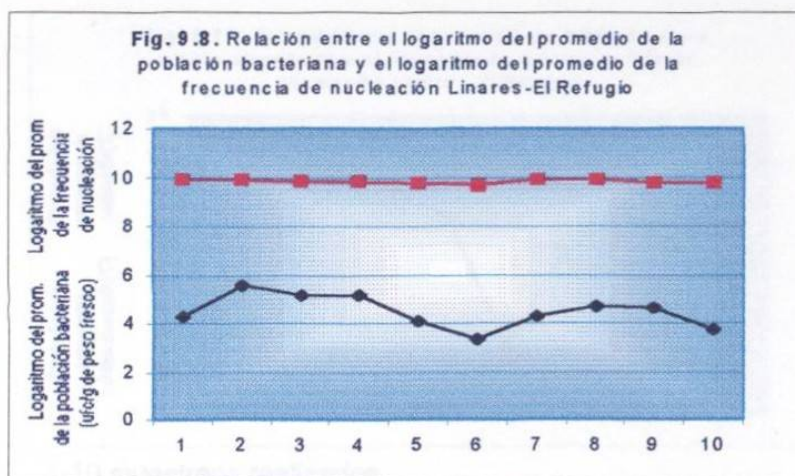
### 1. Huerta Linares-El Refugio

Una asociación inversa significativa entre el logaritmo del promedio de la población bacteriana I.N.A. (ufc/g de peso fresco) con el promedio de la temperatura de nucleación (°C), ( $r = -0.68$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 9.7) (Tabla 25). Encontrándose que la mayor población se obtuvo el 6 de noviembre de 1997 (360,000 ufc/g de peso fresco) verificándose la nucleación a  $-6^{\circ}\text{C}$  (menor temperatura) y el 12 de diciembre de 1997 se obtuvo la menor población (2,200 ufc/g de peso fresco) realizándose la nucleación a  $-4^{\circ}\text{C}$  (mayor temperatura).



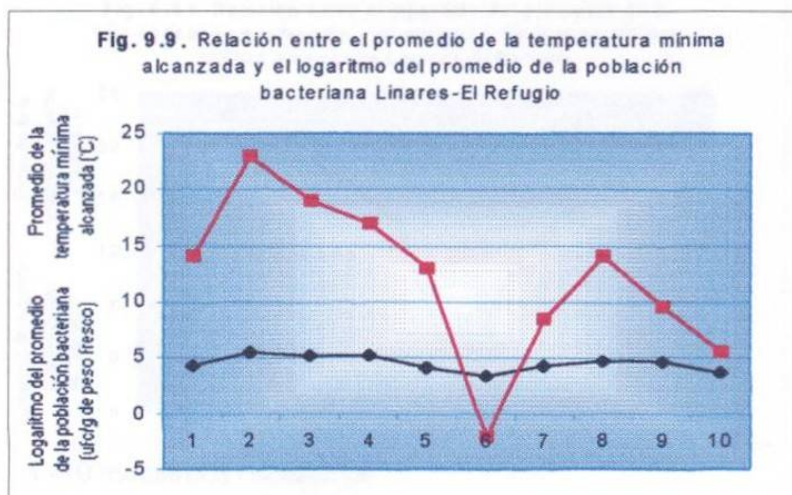
1-10 muestreos realizados.

Existe una asociación directa significativa entre el logaritmo promedio de la población bacteriana I.N.A. (ufc/g de peso fresco) con el logaritmo del promedio de la frecuencia de nucleación (núcleos/células) ( $r= 0.66$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 9.8) (Tabla 25) lo que significa que al aumentar la población bacteriana I.N.A. aumenta la frecuencia de nucleación; disminuye la población bacteriana I.N.A. y disminuye la frecuencia de nucleación.



1-10 muestreos realizados.

La mayor población bacteriana I.N.A. se obtuvo en los muestreos de noviembre de 1997, logaritmo<sub>10</sub> 5.55 ufc/g de peso fresco, (equivalente a 360,000 ufc/g de peso fresco) se correlaciona ( $r= 0.99$ ,  $p<0.05$ ) con el promedio de la temperatura mínima alcanzada más alta, 23°C. Así mismo, se nota que al descender la temperatura mínima alcanzada a -2°C, como sucedió en diciembre de 1997, el logaritmo de la población disminuye a logaritmo<sub>10</sub> 3.34 ufc/g de peso fresco (equivalente a 2,200 ufc/g de peso fresco) (Fig. 9.9) (Tabla 25).



1-10 muestreos realizados.