

Tabla 25. Análisis de correlación de Pearson de cada una de las huertas muestreadas.							
1. Linares-EI Refugio				2. Linares-La Amistad			
Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)	Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)
T° mínima	0.99*	—	—	T° mínima	0.79*	—	—
Log. F.N.	0.66*	0.72*	—	Log. F.N.	0.02	-0.02	—
T° de nucl.	-0.68*	-0.70*	-0.63	T° de nucl.	-0.48*	-0.58	-0.57
3. Hualahuis-EI Roble				4. Hualahuis-EI Refugio			
Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)	Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)
T° mínima	0.53	—	—	T° mínima	0.77*	—	—
Log. F.N.	0.02	0.23	—	Log. F.N.	-0.21	-0.38	—
T° de nucl.	-0.48	-0.87*	-0.12	T° de nucl.	0.43	-0.04	0.45
5. General Terán-CEGET				6. General Terán-Soledad de la Mota			
Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)	Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)
T° mínima	0.05	—	—	T° mínima	0.80*	—	—
Log. F.N.	0.12	0.2	—	Log. F.N.	-0.23	-0.19	—
T° de nucl.	-0.28	-0.43*	-0.09	T° de nucl.	-0.6	-0.49	0.34
7. Montamorelos-Ojo de Agua				8. Montamorelos-García Jiménez			
Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)	Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)
T° mínima	0.7	—	—	T° mínima	-0.8	—	—
Log. F.N.	-0.57	-0.54	—	Log. F.N.	0.26	0.52	—
T° de nucl.	-0.62	-0.90*	0.4	T° de nucl.	0.11	0.42	0
9. Allende-Altamira				10. Allende-Diego López			
Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)	Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)
T° mínima	0.41	—	—	T° mínima	0.6	—	—
Log. F.N.	-0.06	0.12	—	Log. F.N.	-0.17	0.08	—
T° de nucl.	-0.82*	-0.39	0.1	T° de nucl.	-0.72*	-0.46	-0.09
11. Cadereyta-EI Castillo				12. Cadereyta-Santa Fé			
Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)	Variable	Log. ufc/g (r)	T° mínima (r)	Log. F.N. (r)
T° mínima	0.58	—	—	T° mínima	0.63	—	—
Log. F.N.	0.54	0.72*	—	Log. F.N.	0.02	0.6	—
T° de nucl.	-0.75*	-0.44	0.57	T° de nucl.	-0.88*	-0.75*	-0.11

Variables: Logaritmo de la población bacteriana (ufc/g de peso fresco), temperatura mínima alcanzada (°C), logaritmo de la frecuencia de nucleación (F.N.), temperatura de nucleación (°C) de cada una de las huertas muestreadas. Simbología: * Diferencia significativa.

Análisis de correlación de Pearson de todas las huertas

Una asociación directa significativa entre el logaritmo del promedio de la población bacteriana con la promedio de la temperatura de nucleación ($r = 0.43$, $p < 0.05$).

Una asociación directa significativa entre el promedio de la temperatura mínima alcanzada con el logaritmo del promedio de la población bacteriana ($r = 0.45$, $p < 0.05$).

Una asociación inversa significativa entre el promedio de la temperatura de nucleación con el promedio de la temperatura mínima alcanzada ($r = -0.48$, $p < 0.05$).

Una asociación directa significativa entre el logaritmo de la frecuencia de nucleación con el promedio de la temperatura mínima alcanzada ($r = 0.24$, $p < 0.05$).

No se encontró diferencia significativa entre el promedio de la temperatura de nucleación y el logaritmo del promedio de la frecuencia de nucleación ($r = -0.13$, $p > 0.05$) y significa que al aumentar la temperatura mínima alcanzada en la huerta, aumentar el logaritmo de la población bacteriana en las hojas y la nucleación se realizó a temperatura mas fría. A mayor temperatura mínima alcanzada, mas población bacteriana I.N.A., mas frecuencia de nucleación (Tabla 26).

Tabla 26. Análisis de correlación de Pearson de todas las huertas muestreadas.			
Variable	Log. ufc/g	T° mínima	Log. F.N.
	(r)	(r)	(r)
T° mínima	0.45 *	—	—
Log. F.N.	0.01	0.24*	—
T° de nucl.	0.43*	-0.48*	-0.13

Variables: Logaritmo del promedio de la población bacteriana (ufc/g de peso fresco), temperatura mínima alcanzada (°C), logaritmo de la frecuencia de nucleación (F.N.), temperatura de nucleación (°C) de todas las huertas muestreadas. Simbología: * diferencia significativa, r = regresión.

Análisis de varianza entre huertas y municipios

Se analizaron las siguientes variables: Logaritmo del promedio de la población bacteriana, promedio de la población bacteriana, promedio de la temperatura media, promedio de la temperatura mínima alcanzada, clima, promedio de la frecuencia de nucleación, logaritmo del promedio de la frecuencia de nucleación, promedio de la temperatura de nucleación, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia herbicola* var. *herbicola*, *Erwinia ananas*, *Erwinia uredovora* y *Erwinia rubrifaciens* para todas las huertas muestreadas y municipios de la zona citrícola del estado de Nuevo León.

En el caso de las huertas muestreadas, no se encontró diferencia significativa para la mayoría de las variables, solamente en el promedio de la población bacteriana (ufc/g de peso fresco) entre Hualahuises-El Refugio contra General Terán-CEGET y Cadereyta-El Castillo (Tabla 27).

En el caso de los municipios la diferencia significativa se encontró para la misma variable, el promedio de la población bacteriana entre Linares-El Refugio contra Hualahuises-El Roble, Hualahuises-El Refugio, General Terán-CEGET, General Terán-Soledad de la Mota; y entre Linares-La Amistad con Hualahuises-El Refugio y General Terán-Soledad de la Mota (Tabla 27).

Tabla 27. Análisis de varianza de un factor (Oneway) y prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis comparando huertas y municipios.				
Variable	Huertas		Municipios	
	Estadístico	P	Estadístico	P
ufc/g	2.789 a	0.0029*	2.653	0.025*
Log. ufc/g	1.185 a	0.305	0.781	0.565
T° Mínima	1.556 a	0.121	1.285	0.275
Clima	14.629 b	0.102	11.255	0.046*
F.N.	1.697 a	0.062	1.927	0.095
Log. F.N.	1.123 a	0.35	0.616	0.688
T° de Nucl.	0.349 a	0.972	0.453	0.81
P.syringae	9.753 b	0.371	8.931	0.112
P. fluorescens	10.468 b	0.314	6.874	0.23
P. viridiflava	6.754 b	0.663	3.327	0.649
E. herbicola	7.468 b	0.588	6.005	0.306
E. ananas	9.560 b	0.378	4.767	0.445
E. uredovora	9.595 b	0.384	8.508	0.13
E. rubrifaciens	6.477 b	0.691	3.926	0.56

Simbología : a= F del análisis de varianza, b = χ^2 de Kruskal-Wallis, * = diferencia significativa.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos señalaron que el 100% de las muestras de hojas colectadas en las huertas localizadas en los municipios de Linares, Hualahuis, General Terán, Montemorelos, Allende y Cadereyta del estado de Nuevo León, contenían bacterias activadoras de núcleos de hielo (I.N.A). Concordando con lo publicado por Hirano *et al*, (1982) quién señala que las cepas de la mayoría de las bacterias de los árboles frutales son I.N.A.

Las bacterias I.N.A. aisladas en la zona citrícola del estado de Nuevo León fueron *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3, *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia herbicola* var. *herbicola*, *Erwinia ananas*, *Erwinia uredovora*, *Erwinia rubrifaciens*. Predominando *Pseudomonas* con un 64 % y *Erwinia* con un 36%. De acuerdo con Buchanan *et al* (1984) en algunos hábitats *Pseudomonas* puede representar una minoría o puede ser la mayoría de la microflora total.

Maki *et al* (1974), Lindow *et al* (1978), Lindow (1983), Gross *et al* (1984) e Hirano *et al* (1985) han señalado como bacterias I.N.A. comunes a *Pseudomonas syringae* (Van Hall) y *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye. Los resultados de la presente investigación no concuerdan con lo anterior ya que predomina *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3 seguida de *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia herbicola* var. *herbicola* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* además de otras bacterias encontradas en todas las huertas pero en menor proporción, en relación a esto, Buchanan *et al*, (1984) señala que cepas de muchas especies de *Pseudomonas* son obicuas y a menudo los datos de aislamiento hechan abajo los resultados que hay acerca de su ecología. Además esto confirma lo dicho por Lindow, (1983) y Gross *et al*, (1984) que la presencia de las bacterias I.N.A. está influenciada por las condiciones ambientales que prevalecen en el hábitat al que parecen adaptarse específicamente.

Las cepas I.N.A. de *Pseudomonas fluorescens* aisladas en la mayoría de las investigaciones realizadas son biotipo G (Biovariedad 5) y se establece que es residente del suelo y del agua (Maki and Willoughby, 1978) y ocasionalmente son recuperadas de la superficie de las plantas solo como reflejo casual de plantas asociadas con depósitos de partículas del suelo, las cuales son movidas por el viento (Gross *et al*, 1984), en la investigación se encontró a *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3 predominando y distribuida por todas las huertas muestreadas, constante y abundantemente, esto se confirma con lo encontrado por Austin *et al* (1978) quién señala, que *Pseudomonas fluorescens* es un importante componente de la microflora normal del borde de las hojas del zacate (*Lolium perene*), y además Austin y Goodfellow (1979) en Buchanan *et al* (1984), mencionan aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* de hojas de *Phaseolus vulgaris*, *Fagus* y *Pinus* en varios trabajos y consideran estas especies de *Pseudomonas* "autóctonas" de la superficie de las hojas, de acuerdo con ciertas condiciones (pH

cercano a la neutralidad, materia orgánica en solución, temperatura en el rango de los mesófilos, un buen suministro de oxígeno disuelto) y su capacidad de rápido crecimiento en ausencia de complejos factores de crecimiento deciden su predominancia.

Se encontró a *Pseudomonas viridiflava* como bacteria activadora de núcleos de hielo (I.N.A.) y este resultado coincidió con lo reportado por (Paulin *et al*, 1978) en (Olive *et al*, 1988). Goto en (1992) señaló a *Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas fluorescens* causantes de la pudrición bacterial, al final del otoño y principios de primavera, particularmente en el período cuando las plantas sufren daño por heladas.

Caruso and Catara (1996), informan de un nuevo reporte de *Pseudomonas viridiflava* causando manchas en hojas de Chicory.

Se aislaron cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y de *Erwinia herbicola* var. *herbicola* en las muestras de hojas de naranja dulce analizadas en la presente investigación, coincidiendo con lo reportado por Lindow *et al* (1982) y Lindow (1983) quién señala que cepas de *Pseudomonas syringae* y *Erwinia herbicola* se han encontrado como epífitas en una diversidad de especies de plantas de áreas muy separadas de Estados Unidos y en otras partes del mundo (Paulin, 1978) en (Olive *et al*, 1988).

Se ha establecido que continuas asociaciones con hospederos vivos es importante para la supervivencia de miembros del grupo de *Pseudomonas syringae* (Schroth *et al*, 1881) y la asociación no necesariamente tiene que envolver lesiones, se encuentra únicamente como epífita en huéspedes y no huéspedes (Ercolani *et al*, 1974) (Leben, 1974).

Aunque también se ha reportado a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* como una bacteria fitopatógena con un alto rango de hospederos incluyendo importantes especies de plantas agronómicas (Synden *et al*, 1971) (Grossand De Vay, 1977) en (Buchanan, 1984). En el mango produce necrosis bacterial apical (Cazorla *et al*, 1998) ha producido graves epidemias en cítricos (Goto, 1992) (López., 1989), se ha correlacionado el cáncer bacteriano en perales(Weaver *et al*, 1978) (Montesinos and Vilardell, 1991) en duraznos (Endert and Ritchie, 1984) almendra (Lindow and Connell, 1984) melocotón y albaricoque (Goto, 1992). Putnam *et al*, en (1998), estableció un nuevo reporte de *Pseudomonas syringae* causando daño en las hojas de *Kalmia latifolia*

Concordando con lo anteriormente señalado, Buchannan *et al*, en (1984) estableció que la bacteria I.N.A. *Erwinia herbicola* var. *herbicola* es la microflora epífita de las plantas, Gibbins en (1978) reportó que esta produce síntomas en plantas y a veces es posible una asociación con otras bacterias fitopatógenas.

Erwinia herbicola es una bacteria activadora de núcleos de hielo, cuyas suspensiones incrementan el daño por heladas en el maíz a -2.3°C (Lindow *et al*, 1978), se encuentra frecuentemente en perales y manzanos (Billing, 1963) (Riggle, 1972) (Schaad, 1988).

En relación al comportamiento de las bacterias I.N.A. como epífitas o fitopatógenas, Vidaver y Bucker (1978) en Gross *et al* (1984) señalan que la expresión de la enfermedad puede depender de la apropiada combinación huésped-patógeno, de las condiciones ambientales críticas y del estrés de los árboles

Ross and Hattingh (1987), en (Olive *et al*, 1988) afirman que cada una de las variedades de las frutas soportan poblaciones heterogéneas de *Pseudomonas syringae pv. syringae* algunas de las cepas pueden ser mas virulentas en otros hospederos esto confirma nuestros resultados en los cuales encontramos bacterias heterogéneas, de *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3, *Pseudomonas syringae pv. syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia herbicola var. herbicola*, *Erwinia ananas*, *Erwinia uredovora* y *Erwinia rubrifaciens*, dando algunas positivo la reacción de hipersensibilidad en tabaco y pudrición de la papa; y otras no lo hacen, lo que indica que se trata de diferentes cepas.

Si hay una relación entre la reacción de hipersensibilidad en tabaco y la patogenicidad, como generalmente se asume (Olive *et al*, 1988) esencialmente todas las cepas I.N.A. que dieron la reacción positiva y que fueron aisladas de árboles de naranja dulce tienen un potencial de patogenicidad.

Los árboles frutales son perenes y, consecuentemente la asociación de *Pseudomonas syringae* I.N.A. puede ser una adaptación específica que le da estabilidad dentro de su hábitat. El factor de que las cepas de *Pseudomonas syringae pv. syringae* de los árboles frutales no son patogénicas en el maíz y es de suponer tampoco en otras plantas, apoya esta hipótesis (Gross *et al*, 1984).

Erwinia ananas, *Erwinia uredovora* han sido reportadas como activadoras de núcleos de hielo (I.N.A.) en (Goto, 1992), pero en cítricos no se han reportado por lo que estos resultados son el primer reporte.

Erwinia ananas en la presente investigación se encontró distribuida en poca proporción en todas las huertas muestreadas y en Montemorelos-García Jiménez no se aisló.

Goto en (1992), reportó a *Erwinia uredovora* como una bacteria activadora de núcleos de hielo (I.N.A.), ésta es un parásito de un hongo herrumbroso y se multiplica en los tejidos de las plantas infectadas por los organismos herrumbrosos. El ingreso del patógeno generalmente ocurre por aberturas naturales y heridas

(Buchanan *et al*, 1984) por otro lado, en estudios realizados con el microscopio electrónico de barrido se ha establecido que *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* L195 entra a las hojas a través de los estomas y se multiplica en la cámara subestomacal (Luciene *et al*, 1989).

A *Erwinia uredovora* se le asocia con la mancha angular de la hoja del pepino y con el cáncer bacteriano del Kiwi (Goto, 1992) y se encontró distribuida en todas las huertas muestreadas.

Erwinia rubrifaciens fue identificada y caracterizada apropiadamente en base a las pruebas fisiológicas-bioquímicas (Tabla 2) en el medio YDC, por el pigmento rosado, soluble en agua alrededor de la colonia, reportándose por primera vez como una bacteria activadora de núcleos de hielo (I.N.A.) en cítricos. Se encontró en baja proporción en todas las huertas, obteniendo la mayor cantidad en Allende-Altamira y Allende-Diego López y en Hualahuises-El Roble no se obtuvo ningún aislamiento (Tabla 10).

Al no haber diferencia significativa entre los géneros de bacterias I.N.A. aisladas, se comprobó que éstas están distribuidas de manera muy semejante por todas las huertas y municipios muestreados.

Las bacterias I.N.A. son la mayor fuente biogénica de núcleos de hielo en la superficie de la mayoría de las especies de plantas en temperaturas relativamente heladas, ellas son por lo tanto importantes limitantes en el efecto dañino de las heladas en los tejidos de las plantas entre -2 a -5°C (Lindow *et al*, 1978) (Lindow *et al*, 1983 a) (Gross *et al*, 1984).

De los resultados obtenidos en la presente investigación se estableció que las bacterias I.N.A. colonizan abundantemente la superficie de las hojas de los árboles de naranja dulce (*Citrus sinensis*) var. Valencia y representan un peligro potencial, ya que el tamaño de las poblaciones de bacterias I.N.A., en plantas sensibles a las heladas fueron correlacionadas con la incidencia del daño por heladas en plantas enfriadas entre -2 y 5°C en estudios de laboratorio (Amy *et al*, 1976) (Lindow *et al*, 1982) (Lindow *et al*, 1983 a) (Paulin, 1978) en (Olive *et al*, 1988) y en el campo (Lindow, 1978) (Lindow *et al*, 1982) (Lindow, 1983 a) (Lindow *et al*, 1983 c).

La colonización vegetativa de la superficie de los árboles frutales por bacterias I.N.A. parece seguir un patrón cíclico compuesto de una rápida colonización durante la maduración de las flores en una primavera húmeda y fresca; un declive en las poblaciones hasta bajar a niveles no detectables durante un verano seco y caliente; y un gradual incremento en el número durante el otoño antes de que caigan las hojas, las bacterias I.N.A. pueden persistir en las yemas durante la inactividad de los árboles frutales (Gross *et al*, 1983).

La presente investigación se inició al final del verano de 1997 que en general fue caluroso y templado obteniendo las temperaturas mas elevadas y el logaritmo del promedio de la población bacteriana I.N.A. mas alto, las cuáles descendieron y ascendieron según bajó o subió la temperatura mínima alcanzada en cada huerta en otoño, en general el clima fue templado, fresco, frío aunque no necesariamente en ese orden, en invierno se obtuvo la población bacteriana I.N.A. mas baja y la temperatura mínima alcanzada, mas baja, estableciéndose una asociación directa significativa entre la población bacteriana I.N.A. y la temperatura mínima alcanzada. Estos resultados concuerdan con lo señalado por Olive *et al*, en (1988), de que las poblaciones pueden variar mucho dependiendo del tiempo de muestreo y de la localidad.

Las poblaciones bacterianas I.N.A. durante los muestreos realizados fluctuaron en un rango de 450-360,000 ufc/g de peso fresco.

Lindow *et al* (1982), demostró que la extensión en que las plantas sensibles son dañadas por la helada a determinada temperatura, no es función únicamente del tamaño de la población de bacterias I.N.A., sino también de la frecuencia de nucleación y en algunas de las huertas muestreadas, se encontró una asociación directa entre el logaritmo de la población bacteriana y el logaritmo del promedio de la frecuencia de nucleación, significando que al tener una población bacteriana I.N.A. grande se obtendrá mayor nucleación y viceversa.

El rango del logaritmo de la frecuencia de nucleación fue de 5×10^9 a 8×10^9 núcleos/células y representa una frecuencia de nucleación alta, estas frecuencias de nucleación de hielo parecen estar distribuidas normalmente por todas las huertas que fueron muestreadas en la zona de estudio, ya que no hubo diferencia significativa, pero obtener diferentes frecuencias de nucleación en una misma huerta significa que existen diferentes géneros y cepas de bacterias I.N.A. Esto concuerda con lo señalado por Lindow *et al* (1982), la frecuencia de nucleación de *Pseudomonas syringae* varía con las cepas y con las condiciones de crecimiento para determinadas cepas.

La frecuencia de nucleación parece también afectada por la temperatura del ambiente antes del muestreo (Lindow *et al*, 1982). Un similar fenómeno ha sido reportado por Anderson *et al* en (1982) y por Hirano *et al* (1989). Encontrándose una asociación directa significativa entre el logaritmo del promedio de la frecuencia de nucleación con el promedio de la temperatura mínima alcanzada. Entonces, la frecuencia de nucleación de la bacteria I.N.A. no es una característica invariable, intrínseca de la célula, es una propiedad que varía con determinados factores del cultivo y de la planta (Lindow *et al*, 1982) (Douglas *et al*, 1988) es muy importante en la determinación del riesgo de heladas en las plantas (Lindow *et al*, 1983 a).

Se encontró en el análisis de correlación en las huertas, una asociación inversa significativa entre el logaritmo del promedio de la población bacteriana I.N.A. con el promedio de la temperatura de nucleación, así como entre la temperatura mínima alcanzada con el promedio de la temperatura de nucleación. El rango de la temperatura de nucleación fue de -3 a -7°C correspondiéndole un rango de temperatura mínima alcanzada de -2 a 23°C.

En el análisis de varianza entre huertas, solamente entre Hualahuises-El Refugio contra General Terán-CEGET y Cadereyta-El Castillo se encontró una diferencia significativa en el logaritmo del promedio de la población bacteriana I.N.A. (Tabla 26), que probablemente se debió a cambios climáticos locales, ya que González *et al* en 1983 señala que la región citrícola del estado de Nuevo León se caracteriza por un clima subtropical donde la temperatura es el factor climático mas importante que regula el crecimiento de los árboles además Olive *et al* en (1988), establece que la humedad y la temperatura son factores importantes que influyen en las poblaciones de bacterias I.N.A.

En el análisis de varianza entre municipios, hubo diferencias significativas en el logaritmo del promedio de la población bacteriana I.N.A., presentándose la diferencia entre Linares-El Refugio contra Hualahuises-El Roble, Hualahuises-El Refugio, General Terán-CEGET y General Terán-Soledad de la Mota, y entre la Linares-Amistad contra Hualahuises-El Refugio y General Terán-Soledad de la Mota, que probablemente se debió a diferencias climáticas ya que en esta región los inviernos variables son frecuentes (González *et al*, 1983).

Las poblaciones pueden variar mucho dependiendo del tiempo de muestreo y de la localidad (Olive *et al*, 1988).

González *et al*, en (1983), señala que existen dos aspectos muy importantes a considerar durante una helada que son: la temperatura mínima alcanzada y su duración, ya que éstas determinarán el grado de daño al árbol y al fruto.

El haber encontrado géneros, especies, variedades y patovariedades bacterianas I.N.A. que coinciden con los reportados internacionalmente (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia herbicola* var. *herbicola*), pero no en la misma proporción; encontrar otra variedad diferente del género y la especie (*Pseudomonas fluorescens* Biov. 3) reportada en los artículos internacionales en gran cantidad; aislar otras especies bacterianas no reportados en cítricos (*Erwinia ananas* y *Erwinia uredovora*) y un género y especie bacteriana que se reporta por primera vez como bacteria I.N.A. (*Erwinia rubrifaciens*); refuerza nuestra hipótesis de trabajo; pero si además, no se encontraron los géneros bacterianos con capacidad I.N.A. *Citrobacter* sp., *Alcaligenes* sp. y *Xanthomonas* sp. reportados por (Banda, 1992) probablemente porque este trabajo se realizó en cuatro localidades

geográficas diferentes (Monterrey, Santiago, El Cercado y General Terán) a las nuestras, con condiciones ambientales específicas, en una estación del año (marzo, abril, mayo), diferente y con diferentes variedades de cítricos, refuerza aún más nuestra hipótesis de la especificidad de las bacterias I.N.A. al hospedero y que las poblaciones fluctúan en base al clima imperante y las patovariedades son específicas de los árboles frutales con los que se asocian.

Por lo anterior, se considera que la presente investigación logró cumplir con los objetivos planteados. Estableciendo las bases para continuar con trabajos que sean de utilidad en el control integral de las heladas.

CONCLUSIONES

1. Las bacterias I.N.A. se encuentran abundantemente en el follaje de los árboles de naranja dulce (*Citrus sinenses*) variedad Valencia como epífita.
2. Están distribuidas con abundancia variable por todas las huertas y municipios muestreados de la zona citrícola del estado de Nuevo León.
3. Las poblaciones bacterianas I.N.A. fluctuaron en correlación directa a la temperatura mínima alcanzada y a las estaciones del año.
4. Las bacterias I.N.A. aisladas fueron: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas fluorescens* Biov. 3, *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia herbicola* var. *herbicola*, *Erwinia ananas*, *Erwinia uredovora*, *Erwinia rubrifaciens*. Predominando en el número de aislamientos *Pseudomonas* sobre *Erwinia*.
5. Las bacterias I.N.A. aisladas están específicamente adaptadas a su hábitat en la huerta, y representan un peligro potencial por la sensibilización de los cítricos a las heladas.

LITERATURA CITADA

- Anderson, G.L., O. Menkissoglou, and S.E. Lindow. 1991. Occurrence and Properties of Copper-Tolerant Strains of *Pseudomonas syringae*. Isolated from fruit trees in California. *Phytopathology* 81: 648-656.
- Anderson, J.A., and E.N. Ashworth. 1985. Ice Nucleation in tomato Plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 291-296.
- Andrews, P.K., E.L. Proebsting, Jr., and D.C. Gross. 1986. Ice Nucleation and Supercooling in Freeze-sensitive Peach and Sweet Cherry Tissues. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111: 232-236.
- Banda, A.M. 1992. Detección y Distribución de la Población Activadora de Núcleos de Hielo en Cítricos del Estado de Nuevo León. Tesis sin publicar. Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. p35.
- Bauer, M.L. 1987. *Fitopatología*. Limusa, México. pp. 149-151.
- Bentley, E.M., and E.I. Zehr. 1984. Role of Ice-Nucleating (INA) Bacteria in frost injury of Peach Flowers in South Carolina. *Phytopathology* 74: 625-626.
- Billing, E., and L.A. Backer. 1963. Characteristic of *Erwinia* Like Organisms Found in Plant Material. *J. Appl. Bacteriology* 26: 58-65.
- Buchanan, E.R., and N.E. Gibbons. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1:9th ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A.
- Caruso, P., and V. Catara. 1996. First Report of *Pseudomonas viridiflava* Leaf Spot of Red-leaved Chicory. *Plant Dis.* 80: 710.
- Cazorla, F.M., J.A. Torés, L. Olalla, A. Pérez-García, J.M. Farré, and de A. Vicente. 1998. Bacterial apical necrosis of mango in southern Spain: A disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology* 88: 614-620.
- Cody, Y.S., D.C. Gross., E.L. Proebsting, Jr., and R.A. Spotts. 1987. Approaches to biological Control of Ice Nucleation-Active Bacteria on Desiduous Fruit Trees. *Phytopathology* 73: 807.

- Cody, Y.S., D.C. Gross, E.L. Proebsting, Jr., and R.A. Spotts. 1987. Suppression of Ice Nucleation-Active Bacteria on Deciduous Fruit Trees. *Phytopathology* 73:807 (Abstr.)
- Cody, Y.S., D.C. Gross, E.L. Proebsting, Jr., and R.A. Spotts. 1987. Suppression of Ice Nucleation-Active *Pseudomonas syringae* by Antagonistic Bacteria in Fruit Trees Orchards and Evaluations of Frost Control. *Phytopathology* 77: 1036-1044.
- De la Garza González, J.L. 1996. Fitopatología General U.A.N.L. Facultad de Agronomía. Marín, N.L. México. pp. 145-148.
- Deininger, C.A., G.M. Mueller, and P.K. Wolber. 1988. Immunological Characterization of Ice Nucleation Proteins from *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens* and *Erwinia herbicola*. *Journal of Bacteriology* 170: 669-675.
- Douglas O'Brien R., and S.E. Lindow. 1988. Effect of Plant Species and Environmental Conditions on Ice Nucleation Activity of *Pseudomonas syringae* on Leaves. *Appl. and Environ. Microbiol.* 54: 2281-2286.
- Dowler W.M., and D.J. Weaver. 1978. Isolation y Characterization of fluorescent *Pseudomonads* from Apparently Healthy Peach trees. *Phytopathology* 65:223-236.
- Dye, D.W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. III the "*herbicola*" group. N°2 *J.Sci.* 12: 223-236.
- González, G.R., J.E. Padron, J.M. Ramírez, J.A. Sánchez, L. Vasquez, y H. Villarreal. 1983. Guía para el cultivo de los Cítricos en Nuevo León, S.A.R.H.-I.N.I.F.A.P. Campo Experimental General Terán, N.L. Folleto Técnico No. 1 México.
- Goto, M. 1992. Fundamentals of Bacterials Plant Pathology Academic Press. San Diego, Cal. pp. 239-241.
- Gross, D.C., Y.S. Cody, E.L. Proebsting, Jr., G.K. Rademaker, and R.A. Spotts, 1984. Ecotypes an Pathogenicity of Ice-Nucleation-Active *Pseudomonas syringae* Isolated from Deciduous Fruit Tree Orchards. *Phytopathology* 74: 241-248.
- Gross, D.C., Y.S. Cody, E.L. Proebsting, Jr., G.K. Rademaker, and R.A. Spotts, 1983. Distribution, Population Dynamics, and Characteristics of Ice Nucleation-Active Bacteria in Deciduous fruit tree Orchards. *Appl. and Environ. Microbiol.* Dec. pp. 1370-1379.

- Gross, D.C., and J.E. De Vay. 1977. Population dynamics and pathogenesis of *Pseudomonas syringae* in maize and cowpea in relation to the in vitro production of syringomycin. *Phytopathology* **67**: 475-483.
- García, G. "Zona Citrícola de Nuevo León sufre desplome económico". *El Norte*, 10 de Febrero de 1992. Sección Local, p. 1B.
- Hirano, S.S., E.V. Nordheim, D.C. Army, and C.D. Upper. 1982. Log. normal distribution of epiphytic bacterial populations on leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 695-700.
- Hirano, S.S., L.S. Baker, and C.D. Baker. 1985. Ice Nucleation Temperature of Individual Leaves in Relation to Population Size of Ice Nucleation Activity Bacteria and Frost Injury. *Plant Physiol.* **77**: 259-265.
- Hirano, S.S., and C.D. Upper. 1983. Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **21**: 243-269.
- Hirano, S.S., and C.D. Upper. 1989. Diel Variation in Population Size and Ice Nucleation Activity of *Pseudomonas syringae* on Snap Bean Leaflets. *Appl. and Environ. Microbiol.* **55**: 623-630.
- Holt G.J., N.R. Krieg, H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams and Wilkins Co. Baltimore, U.S.A.
- Ishimaru, C.A., E.J. Klos, and R.R. Brubaker. 1988. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology.* **78**: 746-750.
- Kief, T.L. 1988. Ice Nucleation Activity in Lichens. *Appl. and Environ. Microbiol.* **54**: 1678-1681.
- Kim, H.K., C. Orser, S.E. Lindow, and D.C. Sands. 1987. *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* Strains Active in Ice Nucleation. *Plant Disease* **71**: 994-997.
- Klement, Z. 1963. Rapid Detection of Pathogenicity of Phytopathogenic *Pseudomonadans*. *Nature* **199**: 299-300.
- Kozloff, L.M., M. Lute, and D. Westway. 1984. Phosphatidylinositol as a Component of the Ice Nucleating Site of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. *Science* **226**: 843-846.

- Kozloff, L.M., M.A. Turner, F. Arellano, and M. Lute. 1991. Phosphatidylinositol a Phospholipid of Ice-Nucleating Bacteria. *J. Bacteriology*. **173**: 2053-2060.
- Leben, C. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **3**: 209-230.
- Lindemann, J., and T.V. Suslow. 1987. Competition Between Ice Nucleation Active Wild Type and Ice Nucleation-Deficient Deletion Mutant Strains of *Pseudomonas syringae* and *P. fluorescens* Biov. I and Biological Control of Frost Injury on Strawberry Blossoms. *Phytopathology* **77**: 882-886.
- Lindow, S.E. 1982. Role of Antibiosis in Antagonism Against Ice Nucleation Active Bacteria by Epiphytic Bacteria. *Phytopathology* **72**: 986. (Abstr.)
- Lindow, S.E. 1983.(a) The Role of bacterial Ice Nucleation in Frost Injury to Plants. *Ann. Rev. Phytopathology* **21**: 363-384.
- Lindow, S.E. 1983.(b) Methods of Preventing Frost Injury Caused by Epiphytic Ice-Nucleation-Active Bacteria. *Plant Disease* **67**: 327-333.
- Lindow, S.E. 1983.(c) Kinetics of Changes in Ice Nucleation Activity of *Pseudomonas syringae* Following Temperature Shifts. *Phytopathology* **73**: 809 (Abstr.)
- Lindow, S.E., D.C. Amy, S.E. Lindow, and C.D. Upper. 1976. Frost sensitivity of Zea mays increased by la aplicación de *Pseudomonas syringae*. *Nature* **262**: 282-284.
- Lindow, S.E., D.C. Amy, and C.D. Upper. 1978. *Erwinia herbicola*: A Bacterial Ice Nucleus Active in Increasing Frost Injury to Corn. *Phytopathology* **68**: 523-527.
- Lindow, S.E., D.C. Arney, and C.D. Upper. 1978. Distribution of Nucleation Active bacteria on Plants in Nature. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 831-838.
- Lindow, S.E., D.C. Amy, and C.D. Upper.(a) 1982. Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost Injury to Plants. *Plant Physiol.* **70**: 1084-1089.
- Lindow, S.E., S.S. Hirano, W.R. Barchet, D.C. Amy, and C.D. Upper. 1982.(b) Relation Between Ice Nucleation Frequency of Bacteria and Frost Injury. *Plant Physiol.* **70**: 1090-1093.
- Lindow, S.E., D.C. Amy, and C.D. Upper. 1983(a). Biological Control of Frost Injury: Establishment and effects of an Isolate of *Erwinia herbicola* Antagonist to Ice Nucleation Active Bacteria on Corn in the Field. *Phytopathology* **73**: 1102-1106.

- Lindow, S.E., D.C. Army, and C.D. Upper. 1983(b). Biological Control of Frost Injury: Isolate of *Erwinia herbicola* Antagonistic to Ice Nucleation Active Bacteria. *Phytopathology*: 1097-1102.
- Lindow, S.E., and J.H. Conell 1984. Reduction of Frost Injury to Almond by Control of Ice Nucleation Active Bacteria. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **109** (1); 48-53.
- Little, R.C. 1989. Statistical analysis of experiments with repeated measures. *Hort Science* **24**: 37-40.
- López, G.G. 1992. Aislamiento de Microorganismos Antagonistas Contra Bacterias Activadoras de Nucleos de Hielo (INA), *Erwinia herbicola* y *Pseudomonas syringae* a partir de Cítricos. Tesis sin publicar. Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. pp.44
- Lucciene, M.E., and M.J. Hattingn. 1989. Scanning Electron Microscopy of Invasion of Apple Leaves and Blossoms by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **55**: 533-538.
- Maki, L.R., E.L. Gaytan, and Chang-Chieng. 1974. Ice Nucleation Induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol.* **28**: 456-459.
- Maki, L.R., and K.J. Willoughby. 1978. Bacteria of biogenic sources of freezing nuclei. *J. Appl. Meteorol.* **17**: 1049-1053.
- Makino, T. 1983. Ice nucleation activity of bacteria isolated from gemmisphere of tea trees. *Ann. Phytopath. Soc. Jnp.* **49**: 32-37.
- Mercier, J., and S.E. Lindow. 1996. A method involving ice nucleation for the identification of microorganisms antagonistic to *Erwinia amylovora* on pear flowers. *Phytopathology* **86**: 940-945.
- Modlibowska, I. 1962. Some Factors Affecting Supercooling of Fruit Blossoms. *J. Hort. Sci.* **37**: 2449-261.
- Montesinos, E. and P. Vilardell. 1991. Relation ships Among Population Leavel of *Pseudomonas syringiens*. Amount of Ice Nuclei, and Incidence of Blast of Dormant Flower Buds in Commercial Pear Orchards in Catalunya, Spain. *Phytopathology* **81**: 113-119.
- Olive, J.W. and S.M. Mc Carter. 1988. Ocurrence and nature of ice nucleation-active strains de *Pseudomonas syringae* on apple y peach trees in Georgia. *Plant Disease* **72**: 837-843.

- Padrón Chávez, J.E., y G. Treviño de la Cruz. 1990. Manejo de Huertas de Cítricos Dañados por Heladas. S.A.R.H.-I.N.I.F.A.P. Campo Experimental Gral. Terán, N.L. Publicación Especial No. 1
- Phelps, P., T.H. Gildings, M. Prochoda, and R. Fall. 1986. Release of Cell-Free Ice Nuclei by *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.* **167**: 496-500.
- Pierce, L., and A.H. Mc Cain. 1992. Selective medium for isolation of pectolytic *Erwinia sp.* *Plant Dis.* **76**: 382-384.
- Putham, M.L. 1988. *Pseudomonas syringae* Leaf Blight, a New Disease of *Kalmia latifolia*. *Plant. Dis.* **82**: 1171.
- Schaad, N.W. (Ed). 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2da. edition. APS.Press. St. Paul Minnesota. pp.33-93.
- Sijam K., C.J. Chang, and R.D. Gitaitis. 1991. An Agar Medium for the isolation and identification of *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* from seed. Vol. 81 N° 8, 1991. *Phytopathology* **81**: 831-834.
- Stainer, R.Y., N.J. Palleroni, and M. Doudoroff. 1966. The aerobic *pseudomonads*: A taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**: 159-271.
- Sule, S., and E. Seemuller. 1987. The role of ice formation in the infection of sour cherry leaves by *Pseudomonas syringae pv. syringae*. *Phytopathology* **77**: 173-177.
- Yankofsky, S.A., Z. Levin, and A. Moshe. 1981. Association with citrus of ice nucleating bacteria and their possible role as causative agents of frost damage. *Current Microbiol.* **5**: 213-217.
- Yelenosky, G. 1983. Ice nucleation active (INA) agents in freezing of young citrus trees. *J. Amer. Soc. Hort. Soc.* **108(6)** 1030-1034.
- Weaver, D.J. 1978. Interactions of *Pseudomonas syringae* and freezing in bacterial canker on excised peach twigs. *Phytopathology.* **68**: 1460-1463.
- Zagory, D., S.E. Lindow, and J.R. Parmeter. 1983. Toxicity of smoke to Epiphytic Ice Nucleation-Active Bacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* **46**: 114-119.



