

CALIDAD SANITARIA Y SU RELACION CON LA
CALIDAD FISIOLÓGICA EN SEMILLA DE ALGODÓN
(*Gossypium hirsutum*) NACIONAL Y DE
IMPORTACION UTILIZADAS EN LA ZONA
NORTE DEL PAÍS

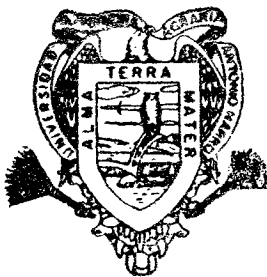
CLAUDIA DEL ROCIO RAMOS VERGARA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA



BIBLIOTECA
EGIDIO G. REBONATO
BANCO DE TESIS
U.A.A.A.N.



Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.

DICIEMBRE DE 1998

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO

CALIDAD SANITARIA Y SU RELACION CON LA CALIDAD FISIOLÓGICA EN
SEMILLA DE ALGODÓN (*Gossypium hirsutum*) NACIONAL Y DE IMPORTACION
UTILIZADAS EN LA ZONA NORTE DEL PAIS.

TESIS

POR

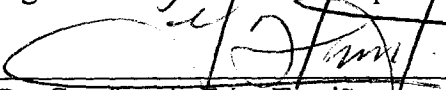
CLAUDIA DEL ROCIO RAMOS VERGARA

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como requisito
parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

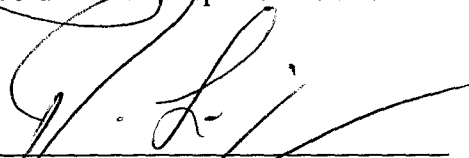
COMITE PARTICULAR

Asesor principal: 
Ing. M.C. Abel Sánchez Arizpe

Asesor: 
Dr. Gustavo A. Frías Treviño

Asesor: 
Ing. M.C. Leticia Bustamante García

Asesor: 
Dr. Jesús Hctor Esparza Martínez


Dr. Ramiro López Trujillo
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Diciembre 1998

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico que me otorgo y con ello lograr mi superación académica.

A mi Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por permitirme recibir parte del conocimiento que ella posee.

A todo el personal del Departamento de Parasitología Agrícola por todo el apoyo brindado durante mi estancia por el mismo.

Especialmente a mis asesores, al M.C. Abiel Sánchez Arizpe por su apoyo como asesor principal; al Dr. Gustavo A. Frías Treviño y M.C. Leticia Bustamante García por su ayuda y asesoramiento en la elaboración y revisión del presente trabajo, y al Dr. Jesús H. Esparza Martínez, por su colaboración técnica y asesoramiento.

Al personal de la Subdirección de Postgrado por la revisión del presente trabajo.

Al personal y maestros del Centro de Tecnología de Semillas por facilitarme el uso de las instalaciones y equipo.

A Cristina y Silvia, por su ayuda que me ofrecieron para la realización de las pruebas de sanidad en el laboratorio de Fitopatología.

A mis compañeros de maestría que directamente o indirectamente intervinieron para la realización de este trabajo, y por su apoyo moral durante mi estancia en el postgrado.

A mis compañeros de trabajo de Sanidad Vegetal y “Especies Forestales”, por darme la oportunidad de transmitir los conocimientos y experiencias adquiridas durante mi formación profesional.

A mi “Alma Terra Mater”

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado muy especialmente para aquellos que me dieron la vida y me enseñaron el camino de la superación, gracias por todo lo bueno que me han dado, sin su ayuda no hubiera logrado salir adelante, a mis padres:

Vicente Ramos Sánchez y Milka Vergara de Ramos

A mis hermanos Oswaldo, Cristina, Vicente, Alejandro y Oliverio.

A mi hijo Adrian Javier, esperando darle el ejemplo de seguir siempre adelante y superarse lo más que se pueda.

A mi esposo Francisco Javier por todo el cariño y apoyo que me ha brindado.

COMPENDIO

La Calidad Sanitaria y su Relación con la Calidad Fisiológica en Semilla de Algodón
(*Gossypium hirsutum*) Nacional y de Importación utilizadas en la Zona Norte de México

POR:

CLAUDIA DEL ROCIO RAMOS VERGARA

MAESTRIA EN

PARASITOLOGIA AGRICOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, DICIEMBRE 1998.

M.C. Abiel Sánchez Arizpe -Asesor-

Palabras clave: Algodón, Semilla, Calidad sanitaria, Calidad fisiológica.

Se realizaron pruebas de vigor, germinación, y sanidad en semilla de algodón, utilizando once variedades nacionales y dos de importación. En la evaluación de vigor y germinación se utilizó el método de siembra en papel húmedo enrollado. La prueba de calidad sanitaria se evaluó mediante el método de cámara húmeda con congelamiento, y siembras en medios de cultivo (PDA, AN). Las variedades de importación presentaron menor porcentaje de incidencia de microorganismos comparados con las variedades

nacionales, no encontrándose una relación directa entre la calidad sanitaria de las semillas y la fisiológica de acuerdo al análisis de componentes principales. Sin embargo, se encontró a la bacteria *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*, en cinco de las variedades nacionales; en las variedades de importación no se encontró esta bacteria.

ABSTRACT

Sanitary and Physiological Quality on Domestic and Foreign Cotton Seed (*Gossypium hirsutum*) used in the North Region of Mexico.

By

CLAUDIA DEL ROCIO RAMOS VERGARA

MASTER DEGREE

AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA SALTILLO, COAHUILA, DECEMBER 1998.

M.C. Abiel Sánchez Arizpe -Advisor-

Key words: Cotton, Seed, Sanitary quality, Physiological quality

The test applied on this investigation were those of vigor, germination and seed sanity using cotton seed. Eleven domestic varieties and two foreign varieties. Were used the evaluation of the vigor and germination were done using moistened blotter . The test of sanitary quality was performed using a freezing moisture chamber, and seedling culture medium i.e. PDA and AN. The foreign varieties presented a low rate incidence of

microorganism, in comparison with the domestic variety. There was not found a direct relation between Sanitary and Physiological quality of seeds from the results of a statistical analysis of the main components.

However *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* was found in the analysis of five of the domestic varieties. The foreign varieties showed the total absence of this pathogen.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	xii
INTRODUCCION	1
Objetivos	5
Hipótesis	5
REVISION DE LITERATURA	6
Generalidades del cultivo	6
Origen	6
Clasificación taxonómica	7
Variedades de algodón	7
Patógenos transmitidos por semilla	8
Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias	14
Atributos de germinación y vigor	16
MATERIALES Y METODOS	
Ubicación del estudio.....	18
Pruebas de sanidad para hongos portados en semilla de algodón	18
Papel secante y congelamiento	19
Placas con Papa Dextrosa Agar	20
Placas con Papa Dextrosa Agar, más congelamiento	20

Pruebas de sanidad para bacterias portadas en semilla de algodón	22
Pruebas en Agar Nutritivo	22
Pruebas en Agar Nutritivo más congelamiento	23
Método Randhawa, en la detección de <i>Xanthomonas</i> spp.	24
Pruebas bioquímicas para la caracterización de bacterias	25
Licuefacción de gelatina	25
Reducción de nitratos	25
Producción de indol	26
Producción de ácidos a partir de carbohidratos	27
Pruebas de patogenicidad con la bacteria caracterizada	28
Pruebas de vigor y germinación	28
Análisis estadístico	29
RESULTADOS	31
Incidencia de hongos	31
Pruebas de patogenicidad para hongos	34
Incidencia de bacterias	34
Pruebas bioquímicas para la caracterización de bacterias	36
Licuefacción de gelatina	36
Reducción de nitratos	36
Producción de indol	37
Producción de ácidos a partir de carbohidratos	37
Pruebas de patogenicidad con la bacteria caracterizada	38
Evaluación de vigor y germinación	38
Análisis estadísticos	40

DISCUSION	42
CONCLUSIONES	43
RESUMEN	44
LITERATURA CITADA	47

INDICE DE CUADROS

CUADRO	Página
4.1 Incidencia de hongos en variedades de algodón nacionales y de importación (desinfectadas con hipoclorito de sodio al por ciento).....	32
4.2 Incidencia de hongos en semillas de algodón nacionales y de importación (sin desinfectar con hipoclorito de sodio, tomada como testigo).....	33
4.3 Incidencia de bacterias gram positiva y presencia de <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>malvacearum</i> en las semillas de algodón nacional y de importación.....	35
4.4 Reacciones obtenidas en la producción de ácidos a partir de carbohidratos.....	37
4.5 Porcentajes de vigor y germinación de las variedades nacionales y de importación.	39
4.6 Resultados de los coeficientes de correlación de las variables evaluadas en las variedades de semilla de algodón.....	41

INTRODUCCION.

En México el algodón se cultiva desde los 14° 30' hasta los 32° 41' de la latitud norte y los 92 y 116° de longitud oeste de Greenwich, presentando un mosaico de ubicación y condiciones ecológicas que van desde la aridez de los desiertos hasta la exuberancia de los trópicos y con altura desde el nivel del mar en las costas, hasta 1200 m de altura en las planicies centro-norte.

La importancia del cultivo del algodón en México radica en la superficie dedicada a su explotación, en la gran cantidad de mano de obra que directa o indirectamente genera y en las divisas que se obtienen por la explotación de su fibra y derivados. Actualmente en los estados del Norte para el ciclo primavera-verano 1995 se sembraron aproximadamente 227,000 ha, el hectareaje sembrado de algodón ha aumentado en México por tercera temporada consecutiva, y esto ha hecho que las compañías estadounidenses inviertan cada vez más en el desarrollo de semillas para México. Debido a que muchas variedades de semilla cultivadas en Estados Unidos pueden adaptarse fácilmente a las diversas condiciones del cultivo, las variedades más utilizadas de importación son Deltapine, Stoneville y Terra, provenientes de Mississippi y Arizona, el costo de la semilla para la siembra es de 40 a 45 dólares por 25 kilos.

En el ciclo primavera- verano 1995 tan solo en la región de Durango se realizaron inversiones superiores a los 41 millones de pesos, generándose 662 mil 478 jornales con el cultivo del algodón en 5 mil 386 hectáreas y con beneficio directo para 3 mil 840 productores, con una producción media de 4 toneladas por hectárea, que representa al final del despepite una producción aproximada a las 35 mil 500 pacas de fibra.

La producción media anual en 1995 fue de 1,543,000 pacas con un valor superior a los 84 millones de pesos. Se producen, además 570,000 toneladas de semilla cuyo valor supera los 10,000 millones de nuevos pesos. Como subproductos muy importantes se extraen de la semilla 100,000 toneladas de aceite comestible y 267,000 toneladas de pasta de semilla rubros en los cuales se ve superado por la soya y el cártamo. A lo anterior hay que sumar la gran cantidad de productos industriales elaborados a partir de los derivados de esta planta. La cual en los últimos años se disminuyó hasta en un 75 por ciento la producción debido a los problemas político socio- económico por los que ha pasado la producción del algodón.

Específicamente los altos costos de producción se originan fundamentalmente por el combate químico de plagas y enfermedades y la cosecha manual, lo cual representa alrededor del 60 por ciento de los costos totales del cultivo.

Se estima que en el país el cultivo del algodón beneficia directamente a 4 millones de personas incluyendo sus familiares, genera mano de obra aproximada a los

30 millones de jornales con una derrama de más de 10 millones de nuevos pesos anuales. Además por diferentes aspectos industriales, genera más de medio millón de empleos con su consecuente importancia económica y social.

El algodón es uno de los principales productos de exportación; siendo superado únicamente por el café. De la producción total se exporta el 50 por ciento a diferentes países de Europa, Asia y del Continente Americano, lo cual implica entrada de divisas superiores a los 250 millones de dólares anuales.

Durante el desarrollo de la semilla, ésta puede ser invadida o contaminada por diversos patógenos, y en muchas ocasiones pasar por alto la condición sanitaria de los lotes de semilla, principalmente durante sus etapas iniciales. Así también las semillas infectadas por hongos pueden verse afectadas en su germinación y vigor, suministrando además inoculo para la futura dispersión de enfermedades y causar una reducción en la cosecha en ambos casos, producción y calidad de la semilla.

Dentro de los diversos factores que afectan el vigor y la geminación de la semilla, se incluye la actividad de hongos y bacterias, cuyo efecto puede presentarse causando problemas de emergencia y reducción de rendimiento.

Las enfermedades más comunes que atacan al cultivo de algodón en México son la secadera temprana (Damping off), secadera tardía (*Verticillium*), pudrición texana, viruela y pudrición de la bellota. Asimismo la marchitez causada por *Fusarium* siendo

uno de los principales problemas fitopatológicos en las diversas zonas aldoneras del país. Además la mancha angular por *Xanthomonas campestris* pv *malvaceraum*, es una enfermedad importante en el cultivo de algodón que se transmite por semilla. Estas enfermedades en los lugares en que se presentan reducen rendimientos, elevan los costos de producción y afectan la calidad de la fibra.

No obstante la importancia de estas enfermedades por los efectos que pueden causar en la reducción de producción del cultivo y siendo las semillas una fuente importante en la diseminación de enfermedades, a la fecha ha sido mínima la atención que se ha dado a evaluar con precisión la condición sanitaria de lotes de semilla en el comercio tanto de producción nacional, como de importación: Este ensayo de la calidad sanitaria es algo que queda reducido a buscar la causa de problemas fitosanitarios presentes en el cultivo, pero hasta que el problema ya está presente. No realizándose exámenes de rutina para el factor sanitario de la semilla de comercio.

Dada la importancia de valorar la presencia de microorganismos patógenos en la semilla utilizada en las siembras del Norte de México, y con especial énfasis en patógenos transmitidos por la misma y de importancia económica, así como el conocer el estado de la semilla que se importa, también con relación a estos patógenos, se plantea el presente estudio con los objetivos siguientes:

Objetivos:

- A. Determinar la incidencia de hongos y bacterias en lotes de semilla de algodón nacional y de importación utilizadas en la zona Norte de México.

- B. Detectar los fitopatógenos de mayor importancia económica asociados a los lotes de semilla evaluados.

- C. Determinar el efecto de la condición sanitaria sobre la calidad fisiológica de los lotes de semilla nacionales y de importación.

Hipótesis:

- La semilla de los lotes comerciales de algodón presentara diferentes niveles de incidencia de hongos y bacterias, existiendo diferencias entre la semilla nacional e importación.

- Los lotes de semilla estudiadas presentaran patógenos de importancia económica tales como:
 - Fusarium oxysporum f. sp vasinfectum*
 - Macrophomina phaseolina*
 - Rhizoctonia solani*
 - Verticillium alboatrum*
 - Xanthomonas campestris pv malvacearum*

- La calidad sanitaria estará directamente relacionada con la calidad fisiológica.

REVISION DE LITERATURA

Generalidades del cultivo.

Origen.

Palomo (1996) menciona que a la fecha, se han identificado alrededor de 50 especies del género *Gossypium* las que se localizan en cuatro continentes: Asia, Africa, Austria y América. Seis especies son alotetraploides ($2n=4x=52$) y las restantes son diploides ($2n=2x=26$). Sólo se cultivan cuatro especies, dos diploides (*G. arboreum* y *G. herbaceum*) y dos alotetraploides (*G. hirsutum* y *G. barbadense*). La especie cultivada más importante es *G. hirsutum*, originaria de México. En México y Australia se localizan 29 de las especies conocidas, 13 son de México. Estas se encuentran distribuidas en toda la zona costera del Océano Pacífico y en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Tabasco y Veracruz.

Mohan (1983) menciona que el algodón se empezó a cultivar en países tropicales de ambos hemisferios. Es un cultivo importante en muchas partes del mundo incluyendo los trópicos de Africa, Australia, China, Egipto, India, Pakistán, el Sudan, Estados Unidos de América y regiones cálidas de América Central y Sur.

Clasificación taxonómica

(Robles, 1982).

Reino	Vegetal
División	Tracheophita
Subdivisión	Pteropsida
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Tribu	Hibisceae
Genero	<i>Gossypium</i>
Especie	<i>hirsutum</i> (cultivado)
Especie	<i>barbadense</i> (cultivado)

Nombre científico: *Gossypium hirsutum*

Nombre común: Algodón

Variedades de algodón.

Las variedades de importación que se cultivan en la zona norte del país son:

(SNICS, 1995).

DELTAPINE 20

DELTAPINE 50

DELTAPINE 80

DELTAPINE 5415

STONEVILLE

TERRA

Las variedades nacionales cultivadas en la zona norte del país:

(INIFAP, 1995).

NAZAS-89

LAGUNA-89

YAQUIMI

CUBACHI

CIAN PRECOZ

CIAN-95

JUAREZ 91

Patógenos transmitidos por semilla.

La asociación de patógenos de plantas transmitidos por semilla fue conocida después de que Bessey realizó en 1886 un análisis microbiológico de semillas y publicó una lista de hongos detectados en semillas.

Las pruebas de semillas realizadas para la detección de patógenos es uno de los parámetros usados para determinar la calidad de la semilla. Muchos países actualmente

llevan a cabo pruebas de rutina de sanidad de la semilla para la certificación Internacional fitosanitaria.

Agarwal y Sinclair (1987) mencionan que más de un método puede estar disponible para la detección de un patógeno de semillas en particular, la selección del método depende del propósito de las pruebas como puede ser la certificación de semillas, tratamiento químico de los lotes, cuarentena, etc. En general, el método debe ser simple, rápido y los resultados deben ser reproducibles. En suma los resultados deben ser confiables con respecto a la función en campo. Las características de infección de un patógeno deben ser reconocidas con facilidad y certeza.

Hunter (1977), señala que muchas clases de semillas hospedan grandes variedades de microflora, principalmente los hongos, los cuales forman el mayor grupo de patógenos que son transmitidos por semillas.

Richardson (1979), menciona las enfermedades de mayor importancia económica transmitidas por semilla de algodón:

Fusarium oxysporum f. sp. *vasinfectum*

Colletotrichum gossypii

Rhizoctonia solani

Macrophomina phaseolina

Verticillium albo-atrum

Xanthomonas campestris pv. *malvacearum*

Rudolph y Harrison (1945) señalan que pocos hongos infectan sistemáticamente la semilla dañando la planta madre, tal es el caso de *Fusarium oxysporum* en algodón. El cuál penetra a través de la pared del ovario y cubierta de la semilla.

Este hongo presenta micelio septado, microconidios pequeños y elípticos, macroconidios finos, alargados, puntiagudos con pared delgada, midiendo 27 a 60 x 3 a 5 micras. Las clamidosporas son globosas, individuales o en pares, intercalares o en una pequeña ramificación lateral. La masa de esporas da una coloración rosa, ocre rosa, púrpura o violeta, *F. oxysporum* f sp. *vasinfectum* (Atk.) S. y H., presenta cuatro razas. La raza I es virulenta en *Gossypium hirsutum*; la raza II es virulenta sobre *Gossypium hirsutum* y tabaco; la raza III es virulenta en *Gossypium barbadense* y la raza IV es virulenta en *Gossypium indicum*. Ciertos autores señalan que algunos aislamientos de las razas I y II pueden ser virulentas en leguminosas (*Glycine max* y *Cassia tora*).

Para la determinación de especies de *Fusarium* se recomiendan las claves de Snyder y Hansen. Para categorías inferiores a la especie, estos mismos autores sugieren la denominación de formas especiales y razas, según se trate de subgrupos semejantes morfológicamente pero con diferente patogenicidad hacia determinados hospedantes, o variedades en el mismo hospedante.

Meiri y Volcani (1977) señalan que el hongo *Colletotrichum gossypii*, puede transmitirse por semilla, esta cuando es infectada se producen los conidios, que son diseminados por el aire y van a infectar tejido sano. El inoculo primario se considera que

son los peritecios que se encuentran en residuos de cosecha, produciendo ascosporas que mediante el aire van infectar a las plantas. Adicionalmente el acervulo y micelio sobre residuos de cosecha forman conidios que infectan al cultivo de algodón ya sea por salpicaduras o por el aire.

Papavizas (1977) menciona que *Macrophomina phaseolina*, tiene un gran rango de hospederos y distribución geográfica. Reichert y Young (1949), recopilaron índices de literatura donde listan especies hospederas de plantas cultivadas, en la cual incluyen al algodón (*Gossypium* spp.)

Sackston (1983) menciona que el marchitamiento del algodón causado por *Verticillium albo-atrum*, fue observado primeramente en plantas de invernadero en los E.U.A. en 1918, y en campo en 1928. En el año 1950 fue reconocida como una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo. El aislamiento del patógeno en la semilla de algodón lo realizó Taubenhau, sembrando la semilla en suelo estéril, en 1936 y 1937.

Allen (1953) en estudios realizados con *Verticillium* en algodón señala que los hongos inoculados en una superficie estéril de restos de semillas viables, pueden germinar cinco meses más tarde.

Evans et al (1966) y Karaca et al (1973) mencionan que se han encontrado arriba de 10 microesclerosios viables de *Verticillium dahliae* presentes en semilla de algodón

comercial sembrados en el Valle de San Joaquín en California en 1965. En aislamientos realizados se encontraron en Turquía esclerosios alrededor de 1 por ciento en la cubierta de la semilla y 2 por ciento en los hipocotilos de semillas.

Presley (1950) sembró miles de semillas colectadas de plantas marchitas en Arizona utilizando suelo estéril en invernadero, de las cuales ninguna de las plantulas resultó con síntomas de marchitez. No se encontró evidencia externa o interna por *Verticillium dahliae*, en más de 9,000 semillas examinadas en Irán (Djavadi, 1969). El hongo se presentó muy raramente en la cubierta de la semilla y no penetrando el embrión de la semilla de plantas infectadas.

En reportes realizados por INIFAP (1995) señalan que la marchitez por *Verticillium*, llamada también “encueradera”, ataca al algodón en cualquier etapa de su desarrollo. En el Valle del Yaqui se presenta esta enfermedad todos los años, principalmente en los meses de junio; julio y agosto; sin embargo, su distribución no es homogénea. Así mismo, se le encuentra en Delicias Chihuahua y en la Comarca Lagunera.

En relación a otros patógenos como bacterias, Walker (1969) menciona que un gran número de éstas se localiza en los tejidos de la cubierta de la semilla y puede resultar una infección sistémica del hospedero, tal es el caso de *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* (Smith) Oye; en semillas de algodón esta bacteria sobrevive en la base y extremo de la calaza como un contaminante de la superficie de la semilla o en la

hilaza. En la germinación, se adhiere a los cotiledones la cual es transportada por el suelo donde la infección puede realizarse a través de los estomas o heridas y los síntomas se desarrollan en los cotiledones. La bacteria puede diseminarse a través de la irrigación y salpicaduras por la lluvia.

Xanthomonas campestris pv *malvacearum* (Smith) Oye, es detectada a los 21 días después de sembradas las semillas de algodón presentando lesiones en los cotiledones en forma de tizón. La infección por *X. campestris* pv *malvacearum* también puede ser detectada a los 14 días en plántulas de algodón bajo condiciones de 85-90 por ciento de humedad relativa y temperaturas de 25 a 28°C.

Según Agrios (1985) la bacteria *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* puede invernar en las semillas, sobre la borra y sobre restos de plantas aún no descompuestas. En los tallos jóvenes, las lesiones se alargan y ennegrecen. En cápsulas jóvenes de algodón aparecen también manchas negras de forma angular e irregular, haciendo que se pudran y lo cual produce que se desprendan de la planta.

Shaad (1988) y Krieg y Holt (1984), mencionan las características de *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*, la cual presenta un crecimiento mucoso en medio YDC, coloración amarilla; las células miden 0.3-0.6 x 1.3-2.7 micras, no forma esporas, móvil por un flagelo polar, Gram negativo, aeróbica, licúa gelatina, no reduce nitratos, produce sulfuro de hidrógeno, no indol, produce ácido pero no gas de dextrosa, sucrosa, maltosa, lactosa, levulosa, galactosa, xylosa, rafinosa, glicerol; no produce

arabinosa, ramnosa, dulcitol, manitol; hidroliza almidón, hidrólisis de asculina positiva, digestión de proteínas positiva, el medio selectivo para su aislamiento es XCS. Las temperaturas óptimas de crecimiento son de 25-30°C, máxima 36-38°C, y mínima cerca de 10°C.

Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias.

Da Silva (1982) señala que cuando se trata de la identificación de bacterias, las pruebas bioquímicas constituyen un criterio importante y casi exclusivo para la identificación. Sin embargo, en el caso de las bacterias fitopatógenas, aunque la patogenicidad sea uno de los principales criterios, muchos otros son importantes y deben considerarse como es la morfología celular, dimensiones de la célula, aspecto de las colonias en determinados medios de cultivo, relación con el oxígeno libre, medios selectivos, métodos de coloración, etc., ninguno de estos criterios tiene valor real si se emplean aisladamente y deben ser considerados en conjunto si se pretende tener la seguridad en la identificación.

Rodríguez (1994) menciona que la licuefacción de gelatina es una prueba bioquímica donde, la gelatina que es una proteína simple, obtenida de la hidrólisis del colágeno, la cual puede ser dipolimerizada por todas aquellas bacterias que sintetizan, la enzima gelatinasa, sin embargo es importante señalar que el medio donde se va a probar la acción de dicha enzima debe estar exenta de carbohidratos, ya que al ser fermentados inhiben las síntesis de gelatinasa.

Kiraly et al (1970) menciona que ciertas especies de bacterias utilizan los nitratos como aceptores de hidrogeno y lo reducen a nitritos, nitrógeno libre o amoniaco, dependiendo esto su sistema enzimático; por lo que suele hacerse en un medio liquido que contenga peptona y nitrato de sodio o potasio. El nitrito se valora al añadir ácido sulfanilico y naftilamina, el resultado positivo es indicado por el desarrollo de una coloración roja. La enzima nitrato reductasa ocasiona la reducción de nitratos a nitritos. Si la prueba fuera negativa para nitrito, o el nitrato no fue reducido o la reducción fue más allá del nitrito con producción de amonio o de nitrógeno libre, al adicionarse zinc en polvo al tubo con el cultivo, el nitrato es reducido para nitrito y la prueba sería positivo.

Rodríguez (1994) señala que la producción de ácidos a partir de carbohidratos esta entre los caracteres más comúnmente empleados en la identificación de bacterias, figuran las fuentes de carbono donde se toma en cuenta el cambio de pH que provoca en el medio en el cual se desarrollan las bacterias, así como la producción de gas a partir de los carbohidratos. Las fuentes de carbono, son requeridas para la obtención de energía proveniente de las reacciones de oxido-reducción, involucradas en la degradación de estos productos. Existen diferentes medios de cultivo con los cuales se puede determinar la capacidad de la bacteria para utilizar una fuente de carbono determinada las más utilizadas son: los monosacáridos como glucosa y manosa; disacáridos como sacarosa, maltosa y lactosa; polisacáridos, almidón; Alcoholes, glicerol, manitol, sorbitol, eritrol, y dulcitol; glúcidos tales como salicina, esculina, metilglucocido; lípidos como aceite de algodón, aceite de ricino, yema de huevo, y tween 20 u 80.

Atributos de germinación y vigor.

Esparza (1996) menciona que la germinación puede definirse como la serie secuenciada de eventos morfogénicos que resultan en la transformación de un embrión en una plántula. Dicho proceso involucra la división y expansión celular y la formación de órganos de la planta como tallos, hojas y raíces. El proceso de germinación puede subdividirse en la siguiente serie de eventos: imbibición de agua, activación enzimática, iniciación del crecimiento del embrión, ruptura del crecimiento de la semilla, emergencia, y establecimiento de la plántula. Dicho proceso se ve grandemente influenciado por los factores, especie, variedad, madurez de la semilla y composición ambiental.

Las causas principales de bajo vigor son: genéticos, ciertos cultivares son más susceptibles que otros a condiciones adversas de medio ambiente; fisiológicos, semillas inmaduras y deterioro en campo y almacén; morfológicos, semillas pequeñas, son menos vigorosas (usualmente); mecánicos, quebraduras y producción de necrosis, lo cual produce daños microbianos, invasión de hongos y bacterias.

Las pruebas de germinación y pureza de las semillas se han usado para determinar la calidad de la semilla por más de un siglo. En 1869 en Saxony (U.K), los primeros trabajos de pruebas de semilla se realizaron con germinación y pureza. Por consiguiente dichas pruebas fueron estandarizadas por la Asociación de Análisis Oficial

de Semilla (AOSA 1983) en los E.U., y la Asociación Internacional de Pruebas de Semilla (ISTA, 1985).

Pullman *et al* (1981) mencionan que los hongos que infectan las plántulas de algodón pueden producir una serie de síntomas entre los que se incluyen la pudrición de la semilla, lesión o decoloración del hipocotilo y destrucción de las raíces. La secadera de plántulas se lleva a cabo por acción directa y enzimática. La penetración en la semilla es directa a través de la testa humedecida o hinchada o de las cuarteaduras que se hacen a causa del resecamiento; posteriormente el hongo llega al embrión o tejido de la plántula por presión mecánica y acción enzimática.

Moreno (1984) señala que las semillas que son capaces de extender la raíz durante la germinación, pueden no tener vigor para establecer una planta en condiciones de campo. El vigor es por lo tanto un indicador de la calidad de la semilla, es un concepto nuevo comparado con el de germinación, y surgió de la observación de diferencias en el establecimiento de plántulas entre lotes de semillas. Considerando la prueba de germinación insuficiente para predecir la emergencia y detectar diferencias de calidad entre lotes.

MATERIALES Y METODOS.

Ubicación del estudio.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología de la U.A.A.N., así como en el invernadero de la misma Universidad.

Se utilizaron muestras de semilla de algodón remanentes de lotes comerciales para el ciclo primavera-verano 1995; las variedades utilizadas fueron dos variedades sin borra de importación como Deltapine , y Stoneville, y las variedades nacionales con borra fueron Laguna-89, CIAN-95, CIAN-precoz, Deltapine- 50, Cubachi, Yaquimi, las variedades nacionales sin borra fueron Laguna-89, CIAN-95, CIAN Precoz, Deltapine-50, Juarez- 91, y Nazas-89.

Pruebas de sanidad para hongos portados en semillas de algodón.

Para determinar la incidencia de hongos en semillas de algodón nacionales y de importación, se realizaron las siguientes pruebas de sanidad:

Papel secante y congelamiento (Neergaard, 1977).

Para determinar la micoflora presente se usó el método de cámara húmeda con congelamiento, para ello se utilizaron 200 semillas de cada una de las variedades, las que se prepararon mediante un lavado con hipoclorito de sodio al 6 por ciento por dos minutos, y se enjuagaron con agua destilada estéril, dejando una repetición sin realizar el lavado, que se tomó como testigo. Las semillas se distribuyeron con la ayuda de unas pinzas, de modo equidistante sobre cuatro capas de papel secante húmedo y estéril, en cajas de plástico de 22x24x10 cm las cuales se incubaron a 20°C por 24 horas para inducir germinación, y posteriormente se transfirieron a -20°C en un congelador durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se colocaron a 20°C durante 11 días, la duración total de la prueba es de 14 días.

A la evaluación se examinaron los hongos desarrollados sobre las semillas bajo microscopio de disección y de luz compuesta, cuantificando la presencia de las diferentes especies de hongos encontrados. Estos se aislaron en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), y se purificó cada uno mediante cultivos monosporicos, realizando diluciones de las esporas en medio agar-agua, una vez que germinaron las esporas se aislaron individualmente en medio PDA; para su identificación se utilizaron las claves para hongos deuteromicetes de Barnett y Hunter 1987, y las claves de Nelson y Tousson 1983, para la identificación de las especies de *Fusarium*.

Placas con Papa Dextrosa Agar (PDA), Neergaard (1977).

Para esta prueba se utilizaron 50 semillas de cada una de las variedades, éstas se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 6 por ciento, durante dos minutos, y agua destilada por tres veces.

Las semillas se colocaron en placas de PDA (10 semillas/placa) y se incubaron a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un período de cinco a ocho días. Para la evaluación se examinaron las colonias fúngicas con un microscopio de disección y otro de luz compuesta.

Placas con Papa Dextrosa Agar (PDA), más congelamiento.

Para este ensayo se utilizaron también 50 semillas de cada una de las variedades, lavándose por 2 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 6 por ciento, y agua destilada por tres veces.

Las semillas se colocaron sobre cuatro hojas de papel secante húmedo en cajas de plástico 22x24x10 cm, y se incuban a 20°C por 24 horas, posteriormente se transfirieron a un congelador con temperatura de -20°C por 24 horas. Enseguida, se colocaron 10 semillas a las placas con medio PDA colocándose a 20°C durante 5-8 días. Para la evaluación se cuantificó el número de semillas infectadas por hongos, aislados e identificándose de la misma forma que en los casos anteriores.

Una vez registrados los hongos presentes en las semillas se realizaron pruebas de patogenicidad mediante tres métodos, una vez teniendo el registro de los hongos presentes en la semilla de las diferentes variedades se utilizó al género *Fusarium*, ya que es uno de los hongos reportados en la literatura como transmitido por semilla y el que estuvo presente en la mayoría de estas. Para el primer método, se tomaron 4 semillas de seis variedades, tres con borra y tres sin borra (Laguna-89, CIAN-precoz, Deltapine 50), se sumergieron en una suspensión de 2×10^5 esporas/ml, durante tres horas, para después sembrarse en macetas con tierra estéril. Se colocaron las macetas en cámaras bioclimáticas, a 25°C., para su evaluación se realizaron observaciones diarias durante 20 días, para la detección de síntomas presentes.

El segundo método, se realizó sembrando semillas de seis variedades, tres con borra y tres sin borra (Laguna-89, CIAN-precoz, Deltapine 50) en macetas con tierra estéril; y puestas en invernadero a 25°C. Una vez desarrolladas las plántulas a 15 cm de altura, se sacaron de las macetas, para desinfectar las raíces con hipoclorito de sodio al 6 por ciento, y enjuagar con agua destilada estéril, posteriormente, se les cortaron las puntas de las raíces, sumergiéndolas en una suspensión de 2×10^5 esporas/ml durante tres horas, para posteriormente transplantarlas en macetas con tierra estéril; para su evaluación se realizaron observaciones diarias durante 20 días, para la detección de síntomas presentes.

El tercer método, consistió en sembrar semillas de seis variedades, tres con borra y tres sin borra (Laguna-89, CIAN-precoz, Deltapine 50) en macetas con tierra estéril

una vez desarrolladas las plántulas, se utilizó una espátula sumergiéndola en la tierra, esto con el fin de causar heridas a las raíces y propiciar la penetración del hongo, se adicionó una suspensión concentrada de esporas de *Fusarium* en las macetas; todas las macetas se colocaron bajo condiciones de invernadero, a temperaturas de 25°C., para su evaluación se realizaron observaciones diarias durante 20 días, para la detección de síntomas presentes.

Pruebas de sanidad para bacterias portadas en semilla de algodón.

Para determinar la incidencia de bacterias en las semillas de las variedades nacionales y de importación se realizaron las siguientes pruebas de sanidad:

Pruebas en Agar Nutritivo.

Se lavaron 50 semillas de cada una de las variedades, en una solución de hipoclorito de sodio al 6 por ciento y agua destilada por tres veces, colocándose en cajas petri con medio agar nutritivo y se incubaron a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ por un período de cinco a ocho días.

Para la evaluación se examinaron las colonias bacterianas con un microscopio de disección y compuesto, se aislaron las colonias en medio Agar Nutritivo; Enseguida se

realizó la tinción de Gram y se procedió a su identificación, sembrándose las colonias bacterianas en medios diferenciales de la serie Shaad (1988) y Kado y Heskett (1970).

Pruebas en Agar Nutrivo más congelamiento.

Igualmente se utilizaron 50 semillas de cada una de las variedades, las cuales fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 6 por ciento y se enjuagaron por tres veces en agua destilada estéril, colocándose la semilla posteriormente en cajas petri con papel húmedo previamente esterilizado. Las semillas se incubaron a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para inducir germinación, y posteriormente se colocaron en un congelador a una temperatura de -20°C por 24 horas. Después de este tiempo, se pasó la semilla a placas con agar nutritivo, incubándose a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un período de cinco a ocho días.

Una vez desarrolladas las colonias bacterianas, se realizó el aislamiento, y purificación de las colonias en medio agar nutritivo para su caracterización, se hizo la tinción de gram, registrándose también el número de semillas que presentaron crecimiento de colonias bacterianas.

Método Randhawa (1995), en la detección de *Xanthomonas* spp.

Una muestra de 1000 semillas de cada una de las variedades nacionales y de importación, se lavó por 30 minutos con agua destilada. Enseguida las semillas se remojaron toda la noche en 100 ml de fosfato buffer 0.05 M, compuesto por (7.0 gr de K_2HPO_4 , 1.3 gr de KH_2PO_4 , 0.1 ml de tween 20, en 1000 ml de agua destilada) a 4°C. De esta suspensión se realizaron diluciones de 1:0, 1:10, 1:100, tomando 0.1 ml de cada dilución y colocándose en medio Agar Nutritivo, e incubándose a 25°C durante siete días. Transcurrido este tiempo se observaron las colonias presentes en el medio, y se aislaron las colonias sospechosas en medio agar nutritivo, se realizó la tinción de gram y las pruebas bioquímicas para su caracterización, tales como: licuefacción de gelatina, hidrólisis de asculina, digestión de proteínas, producción de indol, reducción de nitratos, producción de ácidos a partir de carbohidratos.

Asimismo se tomó una muestra de 1000 semillas de cada una de las variedades, lavándose por 30 minutos con agua destilada, y se colocaron en papel para secarlas, una vez seca se maceró cada una de las muestras agregando una suspensión de 100 ml de 0.05 M fosfato buffer compuesta por (7.0 gr de K_2HPO_4 , 1.3 gr de KH_2PO_4 , 0.1 ml de tween 20, en 1000 ml de agua destilada). En un matraz de erlenmeyer donde se remojaron las semillas por tres horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizaron diluciones de las suspensiones a concentraciones de 1:0, 1:10, 1:100, tomando 0.1 ml de cada dilución y dispersándose con una varilla de vidrio en el medio Agar Nutritivo. Las siembras se incubaron a 25°C por siete días y enseguida se

observaron las colonias presentes en el medio, realizándose el aislamiento de las colonias que presentaron morfología colonial y coloración amarilla en el medio agar nutritivo, así como en medio YDC. Así mismo se sembraron en medios diferenciales de la serie Shaad (1998) y Kado y Heskett (1970), realizándose la tinción de gram, y se elaboraron las pruebas bioquímicas para su caracterización.

Pruebas bioquímicas para la caracterización de bacterias.

Licuefacción de gelatina.

Se utilizó gelatina nutritiva disolviéndose 128 gr en un litro de agua destilada, y se vació en tubos de ensayo, tapándose perfectamente, y se esterilizó en la autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos. Posteriormente, se inoculó la bacteria con el asa de platino, tomando una porción de la colonia, previamente crecida por 48 horas; se dejó en incubación por 72 horas a 28°C.

Reducción de Nitratos.

Para esta prueba se utilizó, 10 gr. de Peptona, 1.0 gr de KNO_3 , 1000 ml de agua destilada, 0.8 ml de ácido sulfanílico, 93 por ciento ácido acético, 0.5 por ciento de Naftalamina.

Se prepararon dos tipos de soluciones que fueron usadas como indicadores de nitrógeno en el medio.

Solución A.

Se disolvió con ligero calentamiento 0.8 por ciento de ácido sulfanílico en ácido acético 5N.

Solución B.

0.5 por ciento de ácido naftalamina se disolvió en 95 por ciento de ácido acético 5N.

Se preparó el medio con peptona y KNO_3 , vaciándose en tres tubos de ensayo, una vez preparado el medio, se le adicionó la cepa bacteriana, en todos los tubos asignados, se pusieron en incubación, por cinco días a 28°C . Pasado este período, se le adicionó a cada tubo 0.5 ml de la solución A y B. Para la evaluación si el medio nutritivo no cambió su coloración se le agregó 1 gr de zinc y se mantuvo en reposo. Un cambio de color a los 5 minutos indica la presencia de nitritos, así como que el nitrato ha sido reducido.

Producción de indol.

Se preparó el medio para indol, tomando 10 gr de bactotripton, 1.0 gr de L-triptofano, y se disolvieron en 1000 ml de agua destilada, este medio se vació en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave a 121°C , por 15 minutos, posteriormente se tomó un tubo como testigo y otro tubo inoculando con la colonia bacteriana, se incubó a 28°C durante 72 horas. Transcurrida la incubación, se preparó el reactivo de Kovac (20 ml):

disolviendo lentamente el P-Dimetil amino benzoaldehído (0.5 gr) en el butil alcohol 7.5 por ciento a 50-55°C y posteriormente enfriarlo. Una vez frío se le adicionó el ácido clorhídrico (2.5 ml) lentamente. Teniendo preparado el reactivo Kovac se le adicionó 0.5 ml de este al tubo inoculado, se realizaron observaciones un minuto después para observar la formación del anillo rojo en la parte superior del tubo.

Producción de ácidos a partir de carbohidratos.

Se preparó un medio de cultivo, adicionando 0.003 gr de bromotimol azul y un gramo de poliptetona a 90 ml de agua destilada, se disolvió perfectamente y se introdujo en la autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión. Una vez frío se le adicionó el disacarido a evaluar (lactosa, dextrosa, sucrosa, maltosa, levulosa, galactosa, xylosa, rafinosa) en una concentración de 1 por ciento. Se tomó 10 ml de agua destilada y se disolvió el disacarido, para después filtrarlo.

Teniendo preparado el medio indicador se procedió a inocular con la bacteria, empleando una asa de platino previamente esterilizada, se tomó una porción del crecimiento bacteriano y se colocó a un tubo con medio, cerrándose perfectamente, y se tomó un tubo más, como testigo sin inocular llevándose a una incubadora por 14-18 horas a 28°C.

Pasado el período de incubación se observó, si se dio una variación de color del azul-verde a amarillo, se tomó como positivo, cuando hay una variación en color y se tomó como negativo cuando no hay cambio de color.

Pruebas de patogenicidad con la bacteria caracterizada.

Una vez aislada y purificada la bacteria, se realizaron las pruebas de patogenicidad mediante inoculaciones en tres formas. En una suspensión de $1-5 \times 10^5$ células/ml se sumergieron cuatro semillas de seis variedades (Laguna-89, CIAN Precoz, y Deltapine-50), con sus tres repeticiones de cada una, más el testigo, durante tres horas, para después sembrarlas en macetas con tierra estéril. Además se inocularon plántulas de 20 cm, mediante dos formas, una por aspersión de la suspensión bacteriana y por inyección; en plantas de igual tamaño, todas se colocaron en cámaras bioclimáticas a una temperatura de 25°C, y para su evaluación se realizaron observaciones diarias durante 20 días, para detectar la presencia de síntomas causadas por la bacteria.

Pruebas de vigor y germinación.

Se tomaron 200 semillas de cada variedad, y se colocaron entre cuatro hojas de papel secante (23x30 cm) húmedo, especial para pruebas de germinación. Se distribuyeron equidistantemente en el papel; y después de cubrirse se enrolló para

25°C, durante doce días. A los cuatro días se realizó un primer conteo de plántula anotándose las plántulas normales (fuertes) y tomándose como un dato de vigo indicándose la velocidad de germinación. Al segundo conteo que se realizó siete días después se anotaron las plántulas normales restantes, plántulas anormales que presentaron pequeñas alteraciones en su desarrollo, y las semillas sin germinar. La capacidad de germinación correspondió a la suma de plántulas normales de ambos conteos y el vigor (velocidad) correspondió al número de plántulas normales al primer conteo.

Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron mediante análisis de componentes principales utilizando principalmente los coeficientes de correlación, donde tenemos un conjunto de variables y el objetivo es determinar funciones lineales de ellas de manera que explique la mayor variabilidad posible. La medida de correlación lineal comúnmente usada en la estadística es el llamado coeficiente de correlación de Pearson entre y y x . Esta cantidad denotada por el símbolo r , se calcula como se indica en la siguiente ecuación:

$$r_{xy} = \frac{Cov(X,Y)}{\sigma_x \sigma_y}$$

donde:

$$-1 \leq r_{xy} \leq 1$$

y:

$$\text{Cov}(x,y) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - \mu_x)(Y_i - \mu_y)$$

Donde se midieron las siguientes variables de cada variedad de semilla de algodón:

- A. Semilla con borra y sin borra.
- B. Origen de la semilla (nacional e internacional).
- C. Incidencia de hongos en semillas lavadas con hipoclorito de sodio al 6 por ciento.
- D. Incidencia de hongos en semillas sin lavar con hipoclorito de sodio (testigo).
- E. Incidencia de bacterias en semillas lavadas con hipoclorito de sodio.
- F. Incidencia de bacterias en semillas sin lavar con hipoclorito de sodio (testigo).
- G. Porcentaje de vigor.
- H. Porcentaje de germinación.

RESULTADOS

Incidencia de hongos.

Para detectar la incidencia de las diferentes clases de hongos presentes en la semillas, las pruebas de siembra directa de semilla lavada con hipoclorito de sodio y sin lavar en PDA, así como siembra de semilla sometida a congelamiento antes de colocarla en placas con medio PDA, mostraron nula efectividad al favorecer ampliamente solo el desarrollo de *Rhizopus spp.*, al final del período de incubación y para todos los casos. La invasión completa del medio dificultó determinar la incidencia de los hongos presentes. No obstante, el desarrollo de este patógeno en estas pruebas, correspondió a la alta presencia del mismo en la semilla con borra. Observándose en todos los casos, que ni el tratamiento con hipoclorito, ni el congelamiento de la semilla inhibieron el desarrollo de los hongos, presentes en las semillas en una alta proporción.

Dados los resultados en estas pruebas, la incidencia de hongos fue determinada adecuadamente en el método de cámara húmeda con congelamiento. El Cuadro 4.1 muestra la incidencia de hongos presentes en cada una de las variedades nacionales y de importación (con borra y sin borra) lavadas con hipoclorito de sodio las variedades con

mayor incidencia fueron las siguientes: Deltapine-50 (borra) con 60 por ciento, CIAN-precoz (borra) con 42.7 por ciento; Laguna-89 (borra) con 36.7 por ciento; CIAN-95(borra), Nasas-89 (sin borra) y CIAN-precoz (sin borra) alrededor de 20 por ciento, el resto de las variedades presentaron incidencias menores al 10 por ciento, los hongos que más predominaron fueron los siguientes en diferentes proporciones: *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.*, *Fusarium oxysporum*, y *Aspergillus flavus*.

Cuadro 4.1. Incidencia de hongos en variedades de algodón nacionales y de importación (desinfectadas con hipoclorito de sodio al 6 por ciento)

Variedad	Origen	Incidencia de hongos				% total de Incidencia
		<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>	
Laguna-89(borra)	Nacional	26.7	2.7	0.0	7.3	36.7
CIAN-95 (borra)	Nacional	13.3	0.0	2.0	4.7	20.0
CIAN-precoz (borra)	Nacional	13.3	0.0	6.7	22.7	42.7
Deltapine 50 (borra)	Nacional	16.7	0.0	0.0	43.3	60.0
Cubachi (borra)	Nacional	1.3	0.0	0.0	0.0	1.3
Yaquimi (borra)	Nacional	0.6	3.3	0.0	0.0	3.9
Laguna-89 (sin borra)	Nacional	4.0	0.0	0.0	0.0	4.0
CIAN-95 (sin borra)	Nacional	8.7	0.0	0.6	0.0	9.3
CIAN precoz (sin borra)	Nacional	15.3	0.0	4.7	0.0	20.0
Deltapine 50 (sin borra)	Importación	2.7	0.0	0.6	0.0	3.3
Juarez-91 (sin borra)	Nacional	6.0	0.0	2.6	0.0	8.6
Nazas-89 (sin borra)	Nacional	18.0	0.0	4.0	0.0	22.0
Stonville (sin borra)	Importación	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

El Cuadro 4.2, muestra la incidencia de hongos en las semillas sin lavar con hipoclorito de sodio al 6 por ciento, al igual que el cuadro anterior las variedades con más incidencia fueron las siguientes: Deltapine-50 (borra) con 92 por ciento, CIAN-95 (borra) con 72 por ciento; CIAN-precoz con 70 por ciento; Laguna-89 con 42 por ciento; CIAN-precoz (sin borra) con 36 por ciento; Nazas-89 (sin borra) con 34 por ciento; el resto de las variedades presentaron porcentajes menores al 20 por ciento, los hongos que más predominaron fueron: *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp.*, *Fusarium oxysporum*, y *Aspergillus flavus*. En ambos cuadros se observa que existe mayor incidencia de hongos en las primeras cuatro variedades.

Cuadro 4.2. Incidencia de hongos en semillas de algodón nacionales y de importación (sin desinfectar con hipoclorito de sodio, tomada como testigo)

Variedad	Origen	Incidencia de hongos				% total de incidencia
		<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i>	
Laguna-89(borra)	Nacional	30.0	0.0	3.0	9.0	42
CIAN-95 (borra)	Nacional	60.0	0.0	12.0	0.0	72
CIAN-precoz (borra)	Nacional	16.0	0.0	4.0	50.0	70
Deltapine 50 (borra)	Nacional	20.0	0.0	10.0	62.0	92
Cubachi (borra)	Nacional	15.0	0.0	0.0	5.0	20
Yaquimi (borra)	Nacional	6.0	0.0	0.0	6.0	12
Laguna-89 (sin borra)	Nacional	14.0	0.6	0.0	0.0	14
CIAN-95 (sin borra)	Nacional	10.0	0.0	6.0	0.0	16
CIAN precoz (sin borra)	Nacional	20.0	0.0	16.0	0.0	36
Deltapine 50 (sin borra)	Importación	4.0	0.0	2.0	0.0	6
Juarez-91 (sin borra)	Nacional	15.0	0.0	5.0	0.0	20
Nazas-89 (sin borra)	Nacional	24.0	0.0	10.0	0.0	34
Stonville (sin borra)	Importación	2.0	0.0	0.0	0.0	2

Pruebas de patogenicidad para hongos.

Las pruebas de patogenicidad solo se realizaron con el hongo del género *Fusarium*, ya que esta reportado como hongo de importancia económica en la literatura, la especie se identificó de acuerdo a las claves de Nelson et al (1983), como *Fusarium oxysporum*. En las pruebas realizadas, ninguno de los tres métodos por los que se inocularon semillas y plántulas, presentaron síntomas que pudiera causar este hongo a los 20 días, no obstante que se dejó más tiempo, pero no hubo síntomas.

Incidencia de bacterias.

Las siembras directas en el medio agar nutritivo, con variedades nacionales y de importación, presentaron solo bacterias de gram positiva, en forma de cocos, no encontrándose ninguna con características fitopatógenas, así también cuando la semilla se sometió a congelamiento y se sembró en medio agar nutritivo, solo se presentaron bacterias de la familia Actinomicetaceae en las variedades nacionales. No encontrándose bacterias con características fitopatógenas. En el Cuadro 4.3, obsérvese que la mayor incidencia de bacterias de gram positiva en semillas lavadas con hipoclorito se encuentra en aquellas variedades sin borra, desde un 90 por ciento hasta 15 por ciento, a excepción de la variedad Laguna-89 con borra que también presentó incidencia de bacterias. En comparación con el testigo las mismas variedades presentaron incidencia de bacterias gram positiva.

Así también en el método propuesto por Randhawa (1995), donde se detectó la bacteria del género *Xanthomonas*, presente solo en cinco variedades que fueron: Laguna-89(borra), CIAN-precoz (borra), Laguna-89(sin borra) CIAN-precoz (sin borra), y Nazas-89 (sin borra), todas de procedencia nacional las cuales se muestran también en el Cuadro 4.3.

Cuadro 4.3. Incidencia de bacterias gram positiva y presencia de *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* en la semilla de algodón nacional y de importación.

Variedad	Origen	Incidencia de		
		Bacterias Gram positivo	Gram positivo testigo	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>malvacearum</i>
Laguna-89(borra)	Nacional	10.0	13.3	Presente
CIAN-95 (borra)	Nacional	0.0	0.0	Ausente
CIAN-precoz (borra)	Nacional	0.0	0.0	Presente
Deltapine 50 (borra)	Nacional	0.0	0.0	Ausente
Cubachi (borra)	Nacional	0.0	0.0	Ausente
Yaquimi (borra)	Nacional	0.0	0.0	Ausente
Laguna-89(sin borra)	Nacional	80.0	92.7	Presente
CIAN-95 (sin borra)	Nacional	84.0	90.7	Ausente
CIAN precoz(sin borra)	Nacional	64.0	84.7	Presente
Deltapine 50 (sin borra)	Importación	94.0	96.7	Ausente
Juarez-91 (sin borra)	Nacional	80.0	91.4	Ausente
Nazas-89 (sin borra)	Nacional	15.3	40.0	Presente
Stonville (sin borra)	Importación	0.0	90.0	Ausente

Pruebas bioquímicas para la caracterización de bacterias.

Para la correcta identificación se realizaron pruebas bioquímicas y características morfológicas de las colonias bacterianas, las cuales presentaron los siguientes resultados: En la tinción de gram, una vez que se obtuvo la preparación, se observaron células teñidas de color rojo, pudiéndose apreciar también que las células bacterianas poseen forma de barras. Estas adquirieron una coloración donde se puede afirmar que estas pertenecen al grupo de las gram negativa.

Licuefacción de gelatina.

En la prueba de licuefacción de gelatina, se observó una degradación del medio de gelatina, mostrándose acuoso el medio, comparándose con el tubo testigo que se encontraba en estado sólido. Por lo que se afirma que la bacteria tiene la capacidad de producir la enzima gelatinasa capaz de licuar la gelatina.

Reducción de nitratos.

En la evaluación de reducción de nitratos, al adicionar los reactivos A y B al tubo con el medio de nitratos, no se observó un cambio en la coloración de amarillo a rojo. Al dar esta reacción nos indica que es negativa a esta prueba, indicando que la bacteria inoculada no es capaz de producir la enzima nitrato reductasa, y por lo tanto no tiene la capacidad de degradar el nitrato a nitrito.

Producción de indol.

Para la evaluación de la prueba de producción de indol, no se observó ningún cambio de coloración, en el medio de triptofano al adicionar el reactivo de Kovac, por lo que se considera negativo.

Producción ácidos a partir de carbohidratos.

Obsérvese el Cuadro 4.4, las reacciones que se obtuvieron en la preparación de los medios para producción de ácidos.

Cuadro 4.4 Reacciones obtenidas en la producción de ácidos a partir de carbohidratos.

Medio	Reacción
Dextrosa	+
Sucrosa	+
Maltosa	+
Lactosa	+
Galactosa	+
Levulosa	+
Xylosa	+
Rafinosa	+

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, se identificó a la bacteria como *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*.

Pruebas de patogenicidad con la bacteria caracterizada.

En las pruebas de patogenicidad que se realizaron para *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*, se presentaron síntomas de tizón en las plántulas a los 15 días de inoculada por inyección y por aspersión. Se aisló y purificó la bacteria del el tejido infectado, en medio AN, y se corroboró la presencia de esta, mediante características morfológicas y pruebas bioquímicas.

Evaluación de vigor y germinación.

Los resultados obtenidos de las pruebas de vigor y germinación, en cada una de las variedades se muestran en el Cuadro 4.5, en donde se observa que la calidad fisiológica de las variedades tanto nacional como de importación es aceptable para capacidad de germinación, exceptuando la variedad Yaquimi (borra) que presentó muy baja germinación (58 porciento). Los porcentajes estuvieron de 84 por ciento en la variedad Deltapine-50 (borra) y arriba de 90 por ciento hasta 100 por ciento para el resto de las variedades. Estos porcentajes son aceptables considerando que se trato con semilla remanente. Los resultados de vigor parecen aceptables solo en los casos de porcentajes arriba de 60 por ciento, lo cual corresponde a las variedades de más lata capacidad de germinación. Observándose que para el caso de otras variedades que mostraron alta capacidad de germinación, el vigor medido por el primer conteo de plántulas normales a la primera evaluación es de bajo a medio. Estas diferencias nos indican que no siempre los lotes con una alta germinación presentan alto vigor medido por cualquier parámetro

indicador del mismo, siendo este el caso, ya que la mayoría de las variedades presentó germinación arriba del 90 por ciento, sin embargo, el vigor estuvo en el rango de 10 por ciento a 83 por ciento medido por las plantas normales al primer conteo (velocidad) de germinación, parámetro que ha sido utilizado como uno de los indicadores más antiguos del vigor de semillas dentro de un lote (AOSA, 1983).

Cuadro 4.5. Porcentajes de vigor y germinación de las variedades nacionales y de importación.

Variedades	Origen	% Vigor	% Germinación
Laguna-89(borra)	Nacional	41.0	100.0
CIAN-95 (borra)	Nacional	24.0	94.0
CIAN-precoz (borra)	Nacional	28.0	93.0
Deltapine 50 (borra)	Nacional	36.0	84.0
Cubachi (borra)	Nacional	30.0	91.0
Yaquimi (borra)	Nacional	10.0	58.0
Laguna-89(sin borra)	Nacional	83.0	100.0
CIAN-95 (sin borra)	Nacional	38.0	94.0
CIAN precoz(sin borra)	Nacional	64.0	100.0
Deltapine 50 (sin borra)	Importación	46.0	100.0
Juarez-91 (sin borra)	Nacional	18.0	96.0
Nazas-89 (sin borra)	Nacional	69.0	96.0
Stonville (sin borra)	Importación	37.0	90.0

Análisis estadístico.

En el Cuadro 4.6, se observa los resultados que se obtuvieron de los coeficientes de correlación que se realizaron para las ocho variables donde se evaluó la incidencia de hongos, bacterias con su previo testigo, así como porcentaje de vigor y de germinación, se hace evidente el alto grado de intercorrelación entre las variables medidas, los asteriscos denotan la significancia al 5 por ciento. Así tenemos que la variable A (semilla con borra y sin borra) tiene una correlación negativa (-0.606*) con la variable D (Incidencia de hongos testigo), lo que significa que las semillas con borra tienen alta incidencia de hongos; también la variable A es altamente significativa con las variables E y F (0.754** y 0.947**), esto se puede observar en el cuadro 4.3, donde las variedades sin borra son las que tienen mayor porcentaje de bacterias gram positiva tanto en las semillas lavadas como el testigo. La variable G presentó una correlación significativa con la A (0.561*) que significa que la semilla sin borra tiende a presentar mayor vigor que la semilla con borra. La variable C es altamente significativa (0.899**) con la variable D lo que significa que hay una relación con la incidencia de hongos en semilla lavada y el testigo. Así también hay una correlación negativa entre la variable D y F (-0.646*) esto significa que hay mayor incidencia de hongos y bacterias en los testigos; existe también una correlación altamente significativa entre las variables E y F (0.837**) que significa que hay mayor incidencia de bacterias en el testigo que en la semilla lavada; y la variable G presentó una correlación significativa (0.582*) con la variable H esto quiere decir que los porcentajes de vigor y de germinación, tienen una relación directa entre ellos. Como se puede observar no hay una relación directa entre la calidad fisiológica (germinación y

vigor) con la calidad sanitaria (incidencia de hongos y bacterias), que fue uno de los objetivos a evaluar.

Cuadro 4.6. Resultados de los coeficientes de correlación de las variables evaluadas en las variedades de semilla de algodón.

	A	B	C	D	E	F	G	H
A		0,39477	-0,4990	-0,6061*	0,7541**	0,9472**	0,5612*	0,4563
B			-0,3873	-0,4653	0,1573	0,4694	0,0254	0,1182
C				0,8992**	-0,3986	-0,5342	-0,0291	0,0486
D					-0,4763	-0,6464*	-0,1383	0,0217
E						0,8376**	0,3944	0,4701
F							0,4589	0,4683
G								0,5821*
H								1,0000

Las variables evaluadas de cada variedad de semilla de algodón fueron las siguientes:

- A. Semilla con borra y sin borra.
- B. Origen de la semilla (nacional e internacional).
- C. Incidencia de hongos en semillas lavadas con hipoclorito de sodio al 6 por ciento.
- D. Incidencia de hongos en semillas sin lavar con hipoclorito de sodio (testigo).
- E. Incidencia de bacterias en semillas lavadas con hipoclorito de sodio.
- F. Incidencia de bacterias en semillas sin lavar con hipoclorito de sodio (testigo).
- G. Porcentaje de vigor.
- H. Porcentaje de germinación.

CONCLUSIONES

La incidencia de hongos fue menor en las variedades de importación con respecto a las variedades nacionales, no encontrándose hongos fitopatógenos de importancia económica portados en la semilla en ambos casos.

No obstante en cinco de las variedades nacionales se detectó a la bacteria *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*, no presente en el resto de las variedades nacionales y de importación, pero si presentando una gran incidencia de bacterias gram positivas en su mayoría de la familia actinomicetae en aquellas variedades con sin borra a excepto de la variedad Laguna-89 (con borra) con una incidencia por debajo del 15 por ciento.

La calidad fisiológica fue aceptable con los datos que se obtuvieron para la capacidad de germinación a excepto de una variedad. Así mismo el resultado de los datos de vigor fueron buenos en aquellas variedades con porcentajes arriba del 60 por ciento, la cual corresponde a las variedades de la más alta capacidad de germinación. Sin embargo, con los datos obtenidos de la incidencia de microorganismos y correlacionados con los datos de la calidad fisiológica, se concluyó que la calidad fisiológica no tiene ninguna relación directa con la calidad sanitaria.

DISCUSION

Para la detección de las diferentes clases de hongos presentes en la semilla, las siembras directas en medio PDA con semilla lavada con hipoclorito de sodio y sin lavar, así como aquella que se sometió a congelamiento antes de sembrarse en medio PDA, mostraron nula efectividad, ya que favorecieron el desarrollo de hongos que en su mayoría se consideran como saprofitos, al final del periodo de incubación en la mayoría de las variedades, invadiendo completamente el medio y dificultando así determinar la incidencia de otros microorganismos. Por esta razón la incidencia se evaluó con aquellos hongos presentes en la cámara húmeda más congelamiento. Sin embargo, en los casos de semilla sin desborrar ni el tratamiento con hipoclorito, ni el congelamiento inhibieron el desarrollo de hongos presentes en la semilla en una alta proporción.

Asimismo, en las pruebas para la detección de bacterias, el método que mejor se adaptó para esta evaluación fue el propuesto por Randhawa (1995), y confirmando su presencia con las pruebas bioquímicas y morfológicas, así como las pruebas de patogenicidad.

El nivel de incidencia de microorganismos fitopatógenos no tuvo un efecto directo con la calidad fisiológica de la semilla, pero si se obtuvieron datos donde se da la diferencia que hay entre una alta germinación que no siempre va a presentar un

RESUMEN

Se evaluaron 13 variedades de semillas de algodón nacional y de importación, remanente del ciclo primavera-verano 1995, con la finalidad de determinar su calidad sanitaria y fisiológica. Para la evaluación de la calidad sanitaria se realizaron pruebas para determinar la incidencia de hongos mediante los métodos de papel secante con congelamiento, y siembras en placas con Papa Dextrosa Agar (PDA), y PDA más congelamiento, lavándose previamente con hipoclorito de sodio al seis por ciento, y el testigo sin lavado; De los métodos mencionados el que mejor resultados presento fue el de la siembra en papel secante con congelamiento. Los hongos de mayor incidencia e identificados tanto en la semilla lavada y el testigo fueron: *Aspergillus niger*, *Rhizopus* spp., *Fusarium oxysporum*, y *Aspergillus flavus*.

Las pruebas de patogenicidad en hongos solo se realizó con el de género *Fusarium*, reportado en la literatura como de importancia económica, sin embargo no se presentaron síntomas que pudiera causar este hongo.

Se realizaron pruebas para determinar la incidencia de bacterias portadas en semilla de algodón, mediante siembras directas en medio Agar Nutritivo (AN), siembras en AN con congelamiento con un previo lavado con hipoclorito de sodio al seis por ciento en ambos casos; los resultados que se obtuvieron en estos métodos fue la presencia de bacterias de gram positiva, y de la familia actinomicetaceae, tanto en las variedades de nacionales como las de importación. No obstante, por el método propuesto por Randawa (1995), donde se sembraron diluciones en AN de semilla previamente

remojada toda la noche en 100 ml de fosfato buffer 0.05M, a 4°C, y semillas maceradas en 100 ml de fosfato buffer 0.05M, e incubándose ambos a 25°C por siete días. Las colonias desarrolladas en el medio, se aislaron aquellas que presentaban morfología colonial y coloración amarilla, y se elaboraron las pruebas bioquímicas para su caracterización, de la cual se identificó a la bacteria *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*, en cinco variedades de procedencia nacional.

Las pruebas de patogenicidad con la bacteria caracterizada, se realizaron mediante inoculaciones en tres formas, la primera sumergiendo semillas de seis variedades con cuatro repeticiones de cada una, durante tres horas en una suspensión de $1-5 \times 10^5$ células/ml, sembrándose después en macetas con tierra estéril. La segunda se inoculó plantas de algodón de 20 cm de altura, mediante aspersion de la suspensión bacteriana igual que la antes mencionada, y tercera por inyección en plantas de igual tamaño, colocándose ambas en cámaras bioclimáticas a una temperatura de 25°C, los primeros síntomas se observaron a los 15 días en las plantas inoculadas por los dos últimos métodos.

Las pruebas de vigor y germinación, se realizaron con semillas de cada una de las variedades, sembrándose en papel secante húmedo, especial para realizar ensayos de germinación, se colocaron en bolsas de polietileno, incubándose en posición vertical a una temperatura de 25°C. El primer conteo se realizó a los cuatro días anotándose las plántulas normales (fuertes), indicador de la velocidad de germinación y que se toma como dato de vigor. El segundo conteo se realizó a los siete días después, anotándose las plántulas normales restantes. La capacidad de germinación correspondió a la suma de

plántulas normales en ambos conteos. La mayoría de las variedades mostraron germinaciones arriba del 90 por ciento, sin embargo el vigor estuvo en el rango de 10 a 83 por ciento.

Se realizaron análisis de los dos parámetros de calidad sanitaria con la calidad fisiológica de la semilla, y se concluyó que no existe una relación directa entre ambas.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, V.K. and J.B. Sinclair, 1987. Principles of seed pathology. Vol. (II) C.R.C. U.S.A. p. 18-38.
- Agrios, G.N. 1985. Fitopatología. Ed. Limusa. México, D.F. p. 470-500.
- Allen, R.M., 1953. Verticillium wilt of cotton: Studies of possible Seed Transmission Dissertation Abstracts, 13:463.
- Association of Official Seed Analysts (AOSA), 1983. Seed Vigor Testing Handbook Contribution No. 32 to the Handbook of Seed Testing, USA. p. 88.
- Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. McMillan Publishing Company, U.S.A.
- Da Silva, R.R. 1982. Identificación de Bacterias Fitopatógenas. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo. p. 109.
- Esparza, M.J.H. 1996. Origen y Desarrollo de la Semilla en las semillas en México INIFAP-SAGAR.
- Evans G., Wilhelm, S. and Snyder, W.C. 1966. Dissemination of the *Verticillium* wilt fungus with Cotton Seed, Phytopathology. 56:460-461.
- Hunter, A.C. 1977. Pathological aspects of seed quality in: Proceedings short course for seedmen. Seed Tech. Laboratory. Mississippi State. University. U.S.A 6:105-111.

- International Seed Testing Association (ISTA). 1985. International the Rules for Seed Testing, Seed Sc. and Tech. 13(2). The Netherlands.
- Kado, C.I. and M.G. Heskett. 1970. Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*. *Phytopatolog* Vol. 60:968-976.
- Karaca, I., Ceylan, S. and Karciloglu, A. 1973. The importance of cotton Seed in the dissemination of *Verticillium* wilt; *Review of Plant Pathology*. 52:3333.
- Kiraly, Z.Z., Klement, F. Solymosy and J. Voros. 1970. *Methods in Plant Pathology* Akademia Kiadó. Budapest. p. 509
- Krieg, R. Noel, John G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. Ed. Board. Williams & Wilkins. p.199-209.
- Meiri-Halfon, A. and Volcani, Z. (1977). A combined method for detecting *Colletotrichum gossypii* and *Xanthomonas malvacearum* in cotton seed. *Seed Sci. & Technol.* 5, 129-139.
- Mohan, S.K. 1983. Seed transmission and Epidemiology of *Xanthomonas campestris p malavacearum*. *Seed Sci. & Technol.* The Netherlands. 11:859-865.
- Moreno, M.E. 1884. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 380.
- Nelson, Paul.E., T.A. Toussoun, and W.F.O. Marassas. 1983. *Fusarium Species A Illustrated Manual for identification*. The Pennsylvania State University Press University Park and London.
- Neergaard, P. 1977. *Seed Pathology*. Vol. 1 and 2. Macmillan Press, Ltd. London. p. 1187.
- Palomo G.A. 1996. Distribución, Colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. *Rev. CIENCIA*. Vol.47. No. 4. p.359-369.

- Papavizas, G.C. 1977 Survival of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* and *Sclerotium cepivorum* after drying and wetting treatments. *Soil Biol. Biochem.* 9:343-348.
- Presley, J.T., 1950. Verticillium wilt of cotton with particular emphasis on variation of the causal organism. *Phytopathology*, 40:497-511.
- Pullman, G.S., De Vay, J.E., Garber, R.H., and Weinhold. A.R. 1981. Soil solarization: Effects on Verticillium wilt of cotton and soilborne populations of *Verticillium dahliae*, *Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, and *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology*, 71:954-959.
- Randhawa, P. 1995. Theory and principals seedborne bacteria and their detection. I Curso Taller Internacional sobre métodos para la detección de patógenos en semillas. Memorias. Buenavista, Saltillo, Coah. México.
- Richardson M.J. 1979. An Annotated List of Seedborne Diseases, 3rd ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. p. 320
- Robles, Sánchez R. 1982. Producción de Oleaginosas y Textiles. Ed. Limusa. México. p.675.
- Rodríguez M.M.L. 1994. Manual de Identificación de bacterias fitopatógenas. Depto. de Parasitología Agrícola de la UACH. p.90
- Rosas, R.M. 1991. The effect of seedborne fungi on seed vigor in cereales. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 9:31-37.
- Rudolph, B.A. and Harrison G.J., 1945. The invasion of the Internal Structure of Cotton Seed by certain, *Fusarium*. *Phytopathology.* 35:542.
- Sackston, W.E. 1983. *Seed Sci & Tecchnol.*, 11, 731-747.
- Shaad, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS. PRESS. St. Paul, Minnesota.
- Walker. J.C., 1969. *Plant Pathology*, 3rd. ed. Mc Graw-Hill, New York, p.819.