Evaluación de medios de cultivo para *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* a partir de semillas de algodón

Andréia Iraci Tumelero[1], Norimar D' Ávila Denardin[1], Diana E. Goméz[2]

1 Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agronomía y Medicina Veterinaria, Universidad de Passo Fundo, Campus I - CP. 611. Passo Fundo, Rio Grande do Sul. Brasil.
2 Laboratorio Regional de Patología Vegetal, EEA INTA Sáenz Peña, Ruta 95 km 1108, Pres. Roque Sáenz Peña, Prov. de Chaco, Argentina.

Recibido:

Recibido en: 22/01/2013

| Aceptado:
Aceptado en: 30/04/2013

Contacto: Andréia Iraci Tumelero - iraciandreia@hotmail.com

Resumen

La semilla es la principal fuente de inóculo de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm), agente causal del tizón bacteriano del algodón. La utilización de variedades resistentes y semillas certificadas son fundamentales para controlar la enfermedad. El análisis sanitario de las semillas es indudablemente una forma de evitar la diseminación de la bacteria a nuevas áreas de cultivo. El objetivo fue evaluar y/o mejorar los medios de cultivo semiselectivos descriptos en la bibliografía para la detección de Xcm observando los criterios de sensibilidad y facilidad operacional. Se utilizó la bacteria IBSBF 1880 para inocular semillas por medio de inmersión, restricción hídrica y por presión de vacío. La detección de la bacteria fue en los medios de cultivo 523, 523 modificado, PSA, NA modificado MSXM y MSSXM. Los resultados obtenidos permitieron definir que los medios de cultivo PSA y 523 modificado fueron similares entre sí en comparación con los medios 523, agar nutriente, MSXM y MSSXM, que no siempre permitieron el crecimiento selectivo de Xcm. El medio semiselectivo 523 modificado tiene las características de sensibilidad y practicidad para la rutina del laboratorio ya que permite un crecimiento rápido y selectivo de las colonias Xcm asociadas a las semillas de algodón.

Palabras clave: detección, sensibilidad, inoculación artificial.

Evaluation of culture media for *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* from cotton seeds

Abstract

The seed is the main source of inoculum of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm), the causal agent of bacterial blight of cotton. The use of resistant varieties and certified seed are essential to control the disease. The sanitary quality of seeds is unquestionably important to prevent the spread of the bacterium to new growing areas. The goal was to evaluate and / or improve the culture media described in the literature for selective detection of Xcm observing the criteria of sensitivity and operational ease. Strain 1880 IBSBF was used to inoculate seeds, by dipping, fluid restriction and vacuum pressure. The detection of the bacteria in the culture media was 523, 523 modified, PSA, NA modified MSXM and MSSXM. The results allow to define the culture media modified and PSA 523 similar to each other compared to the means 523, nutrient agar, MSXM and MSSXM, which is not always allowed for the selective growth of Xcm. The semi-selective modified 523 that has the characteristics of sensitivity and practicality for routine laboratory because it allows rapid and selective growth of Xcm colonies attached to cotton seed.

Key Words: Detection, sensitivity, artificial inoculation

INTRODUCCIÓN

La mancha angular es una enfermedad foliar del algodón provocada por *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) que puede causar daños del 10 al 20%. La intensidad de la enfermedad depende de las condiciones climáticas favorables y varía de acuerdo a la susceptibilidad de los cultivares del algodonero (2). La presencia de las razas virulentas de la bacteria está relacionada con la capacidad de inducir enfermedad en diferentes variedades (15). En el mundo se han identificado más de 20 razas fisiológicas de Xcm (4, 14, 19). Cepas altamente virulentas fueron identificadas en África en la década de 1980, siendo clasificados como las razas 20, 21 y 22. Estudios de variabilidad de los aislamientos encontrados en Brasil indican estrecha variabilidad siendo la raza 18 de mayor predominancia (7, 8, 19, 25).

Las principales medidas de control son la resistencia genética y el uso de semillas certificadas. Cuando estos atributos se pasan por alto la aparición de la epidemia se torna común. Debido a que la enfermedad no se controla adecuadamente con el uso de productos químicos, el control preventivo por el uso de semillas libres de Xcm es dependiente de los métodos de detección altamente sensibles y específicos.

La semilla es el medio más eficiente de diseminación y supervivencia y representa la principal fuente de inóculo para áreas consideradas libres de ese patógeno. Xcm puede afectar a semillas producidas por plantas con síntomas y/o asintomáticas, estando asociadas a la semilla, tanto interna como externamente y su ubicación depende básicamente de la temperatura y humedad del suelo. En raras ocasiones se puede producir la pudrición de las semillas en el suelo, incluso antes de la germinación, constituyendo una fuente de inóculo para nuevas plantas (5).

El desarrollo de metodologías para pruebas de sanidad de semillas debe considerar las formas de extracción de bacterias, identificación de especies y la determinación de la sensibilidad y niveles de tolerancia. Por lo tanto, para análisis de rutina es esencial que los métodos sean sensibles y reproducibles.

La utilización de medios de cultivo es una de las prácticas más comunes en la microbiología, siendo uno de las formas más accesibles para la detección de bacterias (22). Características como selectividad y eficiencia en la detección de bacterias son los criterios principales en la determinación de un medio de cultivo semiselectivo (9). No es suficiente que el medio sea altamente supresor para microorganismos saprófitos y permita una baja represión para la bacteria fitopatógena en análisis, es necesario practicidad, rapidez en la obtención de resultados, costo y facilidad de aislamiento del microorganismo. Se relatan varios inconvenientes para el uso de medios de cultivo de rutina como preparación laboriosa, demanda de tiempo para el diagnóstico, reactivos importados, riesgo de contaminación, entre otros, aun así el uso todavía es común y rutinario en la mayoría de los laboratorios. A pesar de estos inconvenientes, la detección en medios de cultivo es una herramienta indiscutiblemente necesaria. Incluso para las técnicas moleculares, como por ejemplo, Bio-PCR, hace uso de los medios de cultivo líquidos o agarizados para el previo desarrollo de la bacteria presente en las semillas (20).

En este estudio, se evaluó el rendimiento y perfeccionamiento de los medios de cultivo rmencionados en la bibliografía para la detección y cuantificación de Xcm en semillas, teniendo en cuenta la sensibilidad, la precisión

y la facilidad de operación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Normalización de la concentración de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

La cepa IBSBF 1880 se cultivó en medio líquido 523 (16) a 28 °C durante 24 a 48 h. Posteriormente, la suspensión se sometió a centrifugación a 3684 x g durante 10 min., se descartó el sobrenadante y se prepararon suspensiones en solución fisiológica + 0,01% de Tween 20 (SST), cuyas concentraciones fueron determinadas en espectrofotómetro por absorbancia (DO_{580} = 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0). A partir de cada suspensión se prepararon varias diluciones seriadas para la cuantificación de UFC/ml en medio de cultivo. Los medios usados fueron 523 (16), agar nutriente modificado (1), PSA (17), MSXM (23), 523 modificado (3) y MSSXM (10).

2. Inoculación de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* en las semillas de algodón

Las semillas de algodón libre de Xcm fueron infectadas con la cepa 1880 IBSBF por inmersión, restricción hídrica y presión de vacío, como se describe a continuación.

2.1 Inoculación por inmersión: Seis submuestras de 1000 semillas de algodón fueron previamente desinfectadas e inmersas en seis concentraciones bacterianas (DO_{580} 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0) en la proporción de 1:1 peso/volumen y mantenidas a 4 ºC por 10 h. Luego, se descartó el exceso de la suspensión y las semillas fueron secadas en cámara de flujo laminar durante 16 horas para posteriores pruebas de detección.

2.2 Inoculación por restricción hídrica: La bacteria IBSBF 1880 se cultivó durante 24 h en medio 523 con potencial osmótico de -1,0 MPa (3, 24). Las semillas de algodón, previamente desinfectadas, se distribuyeron en número de 50 por caja de Petri y permanecieron durante 24 horas a una temperatura de 28 º C. Después de este período, las semillas fueron retiradas de las cajas y secadas en cámara de flujo laminar. Para simular las muestras con diferentes niveles de contaminación, las semillas previamente inoculadas fueron mezcladas con semillas libres de Xcm, componiendo niveles de muestras con 50, 25, 10 y 5% de semillas inoculadas correspondiendo a las muestras 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

2.3 Inoculación por presión de vacío: Las muestras de 1000 semillas se sumergieron en suspensiones de la cepa IBSBF 1880 (DO580 1,0). Estas semillas se sometieron a tres pulsos de vacio por durante 5 min a una presión de 680 mm Hg. Se prepararon muestras conteniendo 1000 semillas con 100, 50, 25, 5 y 0% de incidencia referidas como muestra 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

3. Detección de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* en las semillas inoculadas artificialmente

Para la detección de Xcm en semillas se utilizaron medios de cultivo para la determinación de la concentración de las suspensiones puras de la bacteria patrón (sección 1). A metodología para pruebas é segundo (18). Las submuestras consistieron de 100 semillas colocadas en remojo en 50 ml de solución salina + Tween 20 y sometidas a agitación de 140 rpm a 4 °C durante 4 horas. A continuación, la suspensión fue centrifugada durante 20 minutos a 3684 xg. El sobrenadante fue descartado y los sedimentos fueron sometidos a diluciones en serie y 300 ml de cada dilución fueron distribuidos en tres cajas de petri (100/caja) para cada medio de cultivo en estudio.

El número de UFC/ml de Xcm obtenido de semillas inoculadas artificialmente fueron transformadas en logaritmo en base 10 y las medias fueron sometidas a análisis de la varianza y comparación de medias por el test de Tukey al 0,05% de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Normalización de la concentración y detección de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* en semillas de algodón inoculadas artificialmente por inmersión.

En la Tabla 1 están presentados los logaritmos de UFC/ml de cada lectura de absorbancia de las suspensiones puras de Xcm, como así también, la detección a partir de semillas previamente inoculadas con las seis concentraciones bacterianas. De acuerdo a los resultados, los mayores números de UFC/ml fueron obtenidos en los medios 523 modificado, medio PSA, 523, NA modificado MSXM y MSSXM. Se observó una correlación significativa entre el número de UFC/ml a partir de suspensiones puras y extraidas de las semillas para cada medio de cultivo. El comportamiento de los medios de cultivo fue semejante entre sí, de manera que la concentración bacteriana aumentó a medida que las semillas fueron sumergidas en suspensiones más concentradas excepto para la absorbancia 0,6 cuya concentración inicial fue de aproximadamente logaritmo 10,9 UFC/ml, siendo la detección en las semillas de 5,5 UFC/ml. El medio de cultivo MSSXM mostró una mayor variación para el desarrollo de Xcm partir de cultivos puros, ya que el crecimiento fue menor que en los demás, principalmente a partir de las lecturas de absorbancia de 0,1 y 0,2, que fue de 5,58 y 6,34 (3,8 x 10^5 y 2,19 x10^6) log de UFC/ml, respectivamente (Tabla 1). Los demás medios utilizados fueron semejantes entre sí en las diferentes concentraciones de inóculo, tanto para la cuantificación a partir de suspensiones puras, como a partir de la extracción de la bacteria de las semillas. En el medio de MSSXM se produce lipólisis de Tween 80, lo que facilita la identificación del género *Xanthomonas*, ya que alrededor de las colonias aparecen halos blanquecinos característica del género. Sin embargo, comparado a los demás medios de hubo menor desarrollo.

Tabla 1. Detección de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Xcm) en semillas inoculadas artificialmente por inmersión en diferentes medios de cultivo.

Medios de cultivo	La media de log de UFC/ml suspensiones puras/medias de UFC/ml extraídas de semillas de algodón						Correlación de Pearson
	Densidad óptica en 580 nm						
	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	
523	7,3 4,9	7,1 4,5	8,2 5,1	10,4 5,2	10,1 7,0	13,2 8,2	0,88***
523 modificado	7,0 5,0	7,1 4,1	8,3 5,2	10,9 5,5	10,8 7,1	13,2 8,8	0,90***
PSA	7,6 5,0	7,1 4,1	8,6 5,2	10,8 4,9	10,3 7,7	13,2 8,8	0,80***

MSXM	7,1 4,0	7,5 4,0	8,4 5,1	10,5 5,0	10,4 7,0	13,1 8,1	0,90***
NA modificado	7,6 4,9	7,3 4,5	8,2 5,0	10,7 5,2	10,7 6,5	12,9 8,1	0,90***
MSSXM	5,5 4,4	6,3 3,7	8,4 5,2	10,3 4,7	10,3 6,4	13,0 7,3	0,85***

Medias de logaritmo de las UFC de suspensión pura de Xcm (IBSBF 1880) y extraidas de las semillas inoculadas por inmersión.

Detección de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* en las semillas de algodón, inoculadas artificialmente, por restricción hídrica

En la evaluación de las muestras constituidas por diferentes incidencias de semillas contaminadas con Xcm por restricción hídrica (3, 24) se verificó la mayor detección del mayor número de UFC en los medios de cultivo 523, 523 modificado, PSA y NA modificado, según se observa en la Tabla 2. Sin embargo, en los medios de cultivo MSSXM y MSXM hubo un menor desarrollo de Xcm, probablemente debido a la composición de los medios de cultivo son ricos en almidón, que propician el mejor crecimiento de *Xanthomonas* spp.

Un factor importante en la detección es el proceso de extracción de las bacterias de las semillas que pueden influir en la eficiencia de selectividad del medio de cultivo. Fuentes de carbono, de nitrógeno, presencia y concentración de antibióticos, condiciones osmóticas altas dadas por la concentración de azúcares, niveles de pH y temperatura de incubación permiten el desarrollo de los microorganismos en estudio, inhibiendo a los demás. En algunos casos el nitrógeno puede ser utilizado como fuente de carbono y esto puede afectar negativamente a la selectividad del medio de cultivo (6, 12).

Diferentes períodos y temperaturas para las cuales las semillas son sumergidas en diferentes soluciones de extracción pueden interferir en la recuperación o extracción de las bacterias de las semillas. Otros procesos como la trituración de las semillas, filtrado de la solución de extracción y etapas de centrifugación con el fin de concentrar las células de las bacterias patógenas, buscan la eficiencia del método de cultivo en medio semiselectivo (11, 21). El periodo de inmersión de las semillas utilizadas en el presente trabajo, en adición al proceso de centrifugación, favoreció la extracción de las bacterias inoculadas artificialmente en las semillas de algodón. Ese resultado concuerda con un estudio en semillas de tomate (13) en el que se comprobó que el proceso de centrifugación aumentó cerca de 10 veces el límite de detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a partir de una única semilla contaminada en una muestra conteniendo 5000 semillas.

Tabla 2. Detección de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* en semillas inoculadas artificialmente por restricción hídrica.

Medios de cultivo	Semillas de algodón			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4

523	4,40 a	4,36 a	4,47 a	4,30 a
523 modificado	4,16 a	3,88 a	4,10 a	3,97 a
PSA	4,38 a	4,19 a	4,05 a	4,16 a
NA modificado	4,16 a	4,07 a	3,99 a	3,81 a
MSXM	2,75 b	2,33 b	2,08 b	0,82 c
MSSXM	2,16 b	1,87 b	1,32 b	1,64 b
Coeficiente de variación (%)	23,33	29,88	28,40	30,00

Medias seguidas de la misma letra en la columna no difieren significativamente entre sí por el test de Tukey a un nivel de significación de 0,05%.

Los medios de cultivo 523, 523 modificado, PSA y NA modificado permitieron un desempeño semejante para la detección de Xcm. Es de destacar que en los medios 523 modificado y PSA, las colonias fueron menores facilitando el recuento, además de una mayor inhibición de la presencia de microorganismos contaminantes. Fue observado por los autores un bajo nivel de contaminación con hongos con las modificaciones de los referidos medios de cultivo. Tales características se deben a la presencia de diferentes fuentes de carbono, de antibióticos y de fungicidas en los respectivos medios, que tienen la función principal de reducir los contaminantes y/o estimular al desarrollo de la bacteria en estudio.

Algunos autores encontraron crecimientos más rápido de colonias de Xcm con la satisfactoria inhibición de microorganismos contaminantes presentes en las semillas de algodón, con la utilización del medio PSA comparado al medio de nutriente agar. Con este medio semiselectivo se determinó que la bacteria puede sobrevivir infectando las semillas durante al menos 28 meses en condiciones de temperatura de 5 °C. Sin embargo, en las condiciones ambientales de alrededor de 24°C no se ha informado del tiempo de sobrevivencia de Xcm (17). En el presente trabajo, las semillas inoculadas por inmersión, fueron almacenadas a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C) durante tres meses, observando que al final del período hubo ausencia de células viables. Este hecho se debe, probablemente, al proceso de inoculación, ya que las células bacterianas quedan en la superficie de las semillas, estando más expuestas y sujetas a las agresiones del ambiente de almacenamiento.

La detección de Xcm fue verificada en el medio MSSXM en muestras de semillas que contienen 0,1% de infección. Los resultados sensibles detectaron la bacteria en muestras conteniendo 0,05% de infección usando el medio semiselectivo PSA. Sin embargo, los autores informan que no fue posible correlacionar los niveles de infección de las semillas con los niveles de severidad en el campo (10)

Cuantificación de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* las semillas inoculadas con presión de vacío

Los medios utilizados para la detección de Xcm fueron 523, 523 modificado, PSA y MSXM modificado (sin adición de ampicilina y con la sustitución de dextrosa por sacarosa). En la Tabla 3 se observa que la mayor concentración bacteriana fue detectada en la muestra, la cual tenía el 100% de las semillas inoculadas con Xcm. En las muestras 2, 3 y 4 los menores números de UFC se deben al nivel de contaminación de 50%, 25% y 5% de las semillas. La recuperación de Xcm fue similar en los medios 523, 523 modificado y PSA para todas las muestras cuya mayor concentración bacteriana fue 5,72 x 10^7 UFC/mL (log de 7,72) en el medio PSA, comparada con la menor concentración obtenida en el medio MSXM que fue 8,13 x 10^5 UFC/mL (log de 5,91) para la muestra 1 y la misma tendencia se observó entre las otras muestras. Se destaca que en los medios 523 modificado y en PSA las colonias se

desarrollaron entre 3 a 6 días después de la incubación y se caracterizaron por ser de color amarillo, con aspecto brillante y mucoide, pero sin exceso de polisacáridos, lo cual facilitó el recuento de las colonias, principalmente cuando el nivel de contaminación es alto. Es primordial en un medio de cultivo de uso en la rutina, la practicidad de preparación, los costos de los reactivos, la sensibilidad y rapidez del crecimiento de la bacteria.

La inclusión de fuentes de carbono específicas, de antibióticos, colorantes, u otros compuestos inhibidores en un medio de cultivo semiselectivo favorece la distinción entre las bacterias patógenas de las no patógenas.

Tabla 3. Detección y cuantificación de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* en semillas de algodón inoculado por presión de vacío

Medio de cultivo	Muestras de semillas/incidencia de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*			
	100	50	25	5
523	A 7,72 a	B 3,62 b	C 2,93 ab	C 2.96 ab
523 modificado	A 7,68 a	B 4,71 a	CD 2,60 b	C 2,95 ab
PSA	A 7,75 a	B 3,87 b	CD 2,71 ab	C 3,12 a
MSXM	A 5,91 b	B 3,10 c	D 2,26 c	C 2.56 c

Logaritmo del UFC/ml de Xcm en medio de cultivo. Medias mayúsculas y minúsculas seguidas de la misma letra en la fila y la columna, respectivamente, no difieren entre sí por el test de Tukey (0,05%).

El medio de cultivo MSSXM es un medio semiselectivo indicado para la rutina de detección de Xcm en semillas de algodón, como forma para prevenir epidemias de mancha angular ya que se pudo detectar bajos niveles de Xcm en muestras conteniendo 0,1% de incidencia. En este estudio, la detección de Xcm en este medio no fue semejante a los resultados encontrados por los autores, aunque los mismos hayan sido obtenidos a partir de semillas contaminadas naturalmente. El hecho del bajo desarrollo de Xcm en el medio MSSXM indica una baja detección de células viables, tal vez debido a que esta bacteria tiene una amplia variación en la sensibilidad a los fungicidas y/o antibióticos (10).

Independientemente de las formas de inoculación de las semillas, el desarrollo de Xcm en los medios de cultivo fue observado luego de 2 a 6 días después de la incubación, siendo el crecimiento más rápido en los medios 523, 523 modificado, NA modificado y MSXM. El crecimiento más lento fue en los medios PSA y MSSXM, demorando alrededor de 4 a 5 días para el desarrollo de las colonias. Este periodo no es deseable para las rutinas de laboratorio, ya que, además del crecimiento de las bacterias en medio de cultivo, es necesario identificar y/o determinar la patogenicidad, procesos que requieren tiempo.

CONCLUSIONES

Los medios de cultivo semiselectivos 523 y PSA modificado demostraron ser eficaces para la detección de *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* asociada a la semilla de algodón. Aunque este último demanda mayor tiempo de incubación, las características culturales del género y la baja contaminación los favorecen comparados con los medios NA modificado MSSXM y MSXM. Por otro lado, el medio 523 modificado se destaca en relación a la practicidad de preparación, tiempo de desarrollo de las colonias, características culturales y baja contaminación, siendo indicado como el más práctico para el proceso de Xcm a partir de semillas de algodón inoculadas artificialmente.

REFERENCIAS

1. Almeida, I. M. G.; Berian, L. O. S. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* em sementes de algodoeiro. Iv Congresso Brasileiro de Algodão. (2003).

2. Almeida, R. P. de; Silva, C. A. D. Da; Ramalho, F. De S. (2008). Manejo integrado de pragas do algodão. In: Beltrão, N. E. de M.; Azevedo, D. M. P. de (Org.). O Agronegócio do Algodão no Brasil. 2. ed. Brasília: *Embrapa Informação tecnológica* 2: 1034-1098.

3. Barbosa, J. F. Inoculação e detecção de Xanthomonas citri subsp. malvacearum em sementes de algodão (*Gossipium hirsutum* L.) (2007). Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2007, 135 p.

4. Bird, L.S.; Brinkerhoff, L.A.; Davis, R.G. (1981). Bacterial blight. In: Watkins, G. M. (ed.). Compendium of cotton disease. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN. p. 25-28.

5. Brinkerhoff, L. A. & Hunter, R. E. (1963). Internally infected seed as a source of inoculums for the primary cycle of bacterial blight of cotton. *Phytopathology*. 53:1397-1401.

6. Chang, C.J.; Donaldson, R.; Crowley, M. & Pinnow, D. (1991). A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from crucifer seeds. *Phytopathology*.81:449-453. http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1991Articles/Phyto81n04_449.pdf

7. Cia, E.; Salgado, C.L. (2005). Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A.(Ed.) Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2:42-52.

8. Delannoy, E.; Lyon, B.R.; Marmey, A.; Jalloul, J.F. Daniel, Montillet, J.L.; Essenberg, M.; & Nicole, M. (2005). Resistance of cotton towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annual Review Phytopathology.* 43:63–82.

9. Denardin, N. D. et al. (2004). *Detecção e identificação de bactérias em sementes. In: Simpósio Brasileiro de Patologia De Sementes.* João Pessoa, In: Anais. SNA, p.62-67.

10. Dezordi, C.; Maringoni, A. C.; Menten, J.O.M. & Camara, R.C. (2010). Semi-seletive culture medium for *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* detection in cotton seeds (*Gossypium hisurtum* L.). *Asian Journal of Plant Pathology*.4(2):128-138. http://scialert.net/qredirect.php?doi=ajppaj.2010.128.138&linkid=pdf

11. Fatmi, M. & Schaad N.W. (1988). Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology* 78: 121-126. http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1988Articles/Phyto78n01_121.pdf

12. Gitaitis, R. & Walcott, R. (2007). The Epidemiology and Management of Seedborne Bacterial Diseases. *Annual Review Phytopathology*. 45:371-397.

13. Hadas R, Kritzman G, Klietman F, Gefen T, Manulis. (2005). Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology* 54:643-649. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2005.01230.x/pdf

14. Huang, X.; Zhai, J.; Luo, Y. & Rudolph, K. (2008). Identification of a highly virulent strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *European Journal Plant Pathology*, 122:461–469.

15. Hunter R.E., Brinkerhoff L.A., Bird L.S. (1968). Development of a set of Upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. *Phytopathology* 58:30–32

16. Kado, C.I. & M.G. Heskett. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-975. http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Articles/Phyto60n06_969.pdf

17. Mehta, Y. R.; Bomfeti, C. & Bolognini, V. A (2005). Semi-Selective Agar Medium to Detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. m*alvacearum* in naturally infected cotton seed. *Fitopatologia brasileira* 30:489-496. http://www.scielo.br/pdf/fb/v30n5/26145.pdf

18. Miles A. A. & Misra, S.S. (1938).The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene* 38:732-749

19. Nunes, M.P.; Bolognini, V.; Mehta, Y.R.; Mehta, A.; Rosato, Y; Aguiar, P.H.; Pizzinato, M.A.; Chiavegatto, E.J. (2003). Variabilidade genética entre isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* do algodoeiro. Iv Congresso Brasileiro de Algodão, Goiânia. *Anais***.** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA.

20. Randhawa, P.S.; Pannu, S.S. & Schaad, N.W. (2001). Improved bio-PCR test for detection of *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* in watermelon and cantaloupe seeds. Salt Lake City, Joint Meeting. p.25-29.

21. Rane, K.K. & Latin, R. X. (1992). Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed. *Plant Disease.* 76:509-512. http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1992Articles/PlantDisease76n05_509.pdf

22. Schaad, N. W.; Stall, R. E. (1988) *Xanthomonas*: In: Schaad, N. W., ed. Laboratory guide for identification of plant pathogens bacteria. St. Paul, APS Press. 2: 81-94.

23. Soares, J. (2006). *Desenvolvimento de meio semi-seletivo para a detecção de Xanthomonas axonopodis pv. malvacearum em sementes de algodoeiro*. 57p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

24. Teixeira, H., Machado J.C., Oride, D., Alves, M.C. & Noda (2005). Técnica de restrição hídrica: efeito sobre *Acremonium strictum*, protrusão de sementes e obtenção de sementes de milho infetadas. *Fitopatologia Brasileira.* 30:109-114

25. Zhai, J.; Luo, Y.; Zhen, D.; Huang, X. (2010). Evaluation of Genetic Diversity of Highly Virulent Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* by rep-PCR Fingerprinting. *Jornal of Phytopathology*. 158(11-12):764-768.

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Volumen 12, Número 2, Agosto de 2013

ID artículo:F0171

Versión online