

**INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
ESCUELA DE SANIDAD VEGETAL  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA**

**TRABAJO DE DIPLOMA**

**Calidad fitosanitaria de semilla de repollo (*Brassica oleracea* L.) en tres regiones de Nicaragua y respuesta de la semilla infestada con *Xantomonas campestris* pv. *campestris* a tratamientos térmico y osmotérmico.**

**Autor: Flavia Deyanira Delgado Jirón.  
Asesor: Ing. Marlon Dolmuz V.  
Consultor: Dr. Falguni Guharay.**

**Managua, Abril de 1990.**

INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
ESCUELA DE SANIDAD VEGETAL  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

**TRABAJO DE DIPLOMA**

Calidad fitosanitaria de semilla de repollo (*Brassica oleracea* L.) en tres regiones de Nicaragua y respuesta de la semilla infestada con *Xantomonas campestris* pv. *campestris* a tratamientos térmico y osmotérmico.

Por: Flavia Deyanira Delgado Jirón.

Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador  
como requisito final para optar al grado profesional de  
INGENIERO AGRONOMO.

---

Dirección de Investigación y Postgrado.

Managua, Abril de 1990.

## **DEDICATORIA.**

Este trabajo es dedicado a mi tía Rosa Adilia Jirón quien hizo posible mi formación profesional a través de su esfuerzo y sacrificio.

A mi esposo por todo el apoyo que me brindo en la realización de mi trabajo.

A la Revolución Popular Sandinista y en especial al Pdte. de Nicaragua Cmdte. Daniel Ortega Saavedra, quien ha luchado y lucha por la paz y la democracia en nuestro país.

**Deyanira Delgado**

## **AGRADECIMIENTO.**

Quiero agradecer de manera especial a mi tutor Ing. Marlon Dolmuz V., al Dr. Falguni Guharay y al Dr. Gerardo Bruin por sus constantes y valiosas ayudas brindadas durante la realización de este trabajo.

A la Escuela de Sanidad Vegetal, al Proyecto Holandes (ISCA-LUW) y al Programa Ciencia de las plantas (ISCA-SLU) por su apoyo material en la culminación exitosa de este trabajo y durante mi formación como profesional.

A los productores de repollo de las regiones I, IV y VI y a todas aquellas personas que de una forma u otra ayudaron a la realización de este trabajo.

Deyanira Delgado

## INDICE GENERAL

<u>Contenido:</u>	<u>Página:</u>
I Introducción.....	1
II Objetivos.....	4
III Materiales y Métodos.....	5
IV Resultados y Discusión.....	9
A. Calidad fitosanitaria de la semilla de repollo en la I, IV y VI regiones.....	9
B. Efecto de los tratamientos sobre la desinfección la semilla.....	13
C. Efecto de los tratamientos sobre la germinación.....	20
V Conclusiones.....	23
VI Recomendaciones.....	24
VII Bibliografía.....	25

## INDICE DE CUADROS.

<u>Cuadro No.</u>		<u>Página:</u>
1	Porcentaje de germinación y grado de infestación presente en la semilla de las variedades de la región I.....	10
2	Porcentaje de germinación y grado de infestación presente en la semilla de las variedades de la región IV.....	10
3	Porcentaje de germinación y grado de infestación presente en la semilla de las variedades de la región VI.....	10
4	Porcentaje de germinación y grado de infestación presente en la semilla de las variedades obtenidas en casas comerciales.....	11
5	Efecto de los tratamientos sobre la germinación y saneamiento de la semilla de repollo Variedad Glory of Enkhuizen.....	14
5a	Resultados del análisis de Regresión múltiple para la variedad Glory of Enkhuizen.....	15
5b	Comparación del efecto de los tratamientos sobre el % de germinación mediante Contrastes ortogonales (Variedad Glory of Enkhuizen).....	15
6	Efecto de los tratamientos sobre la germinación y saneamiento de la semilla de repollo Variedad Roundup.....	16
6a	Resultados del análisis de Regresión múltiple para la variedad Roundup.....	16
6b	Comparación del efecto de los tratamientos sobre el % de germinación mediante Contrastes ortogonales (Variedad Roundup)....	17
7	Efecto de los tratamientos sobre la germinación y saneamiento de la semilla de repollo Variedad Superette.....	17
7a	Resultados del análisis de Regresión múltiple para la variedad Superette.....	18
7b	Comparación del efecto de los tratamientos sobre el % de germinación mediante Contrastes ortogonales (Variedad Superette).....	18
8	Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas de las diferentes variedades de repollo.....	19

## RESUMEN.

Con los objetivos de conocer si las semillas de las variedades de repollo sembradas por los productores y las que venden las casas comerciales, son portadoras de la enfermedad "Quema o Chamusca" causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), y para buscar un método de desinfección que permita obtener semillas libres del patógeno, se procedió a la recolección de muestras de semillas de las diferentes variedades que se siembran y se ofertan en las principales regiones repolleras (I, IV y VI) y casas comerciales del país.

A las 24 muestras recolectadas se les realizaron pruebas de germinación y aislamiento del patógeno; luego se procedió a la identificación de las bacterias aisladas realizándoles las pruebas fisiológicas y bioquímicas recomendadas por Lelliot y Stead (1987). Los resultados de este análisis indicaron que de las 24 muestras recolectadas, 18 muestras estaban infectadas con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Determinada la presencia de Xcc, se procedió a la desinfección de las semillas para lo cual se seleccionaron tres variedades infectadas con la bacteria sometiéndolas a tratamientos térmicos con agua caliente a diferentes temperaturas (50, 52 y 55 °C) y tiempos (20, 25 y 30 min.), posteriormente se repitieron los mismos tratamientos pero se le agregó al agua un protector de la germinación conocido como Polyethylenglycol (PEG-6000) a una dosis de 314 gr. de PEG por litro de agua. Posterior a los tratamientos se les realizaron pruebas de germinación y aislamiento a la semilla para ver el efecto de los tratamientos; a los resultados obtenidos se les realizaron análisis de regresión múltiple y contrastes ortogonales.

Los resultados indicaron que la temperatura juega un papel muy importante en la disminución de la cantidad del inóculo presente en la semilla pero esta tuvo un efecto negativo sobre el porcentaje de germinación de las semillas, pero cuando se adicionó PEG-6000 al agua, éste ejerció un efecto protector de la germinación durante el tratamiento térmico.

Los resultados de este estudio mostraron que el mejor tratamiento es el que se efectuó con agua caliente a 50 °C durante 25 minutos mas adición de PEG.

## I. INTRODUCCION.

Este trabajo debe considerarse como un aporte para los pequeños y medianos productores de repollo, quienes en estos momentos enfrentan como principal problema fitosanitario el ataque de bacteriosis (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) y el ataque de *Plutella*, los que han bajado considerablemente los rendimientos de esta hortaliza.

El cultivo del repollo (*Brassica oleracea* L.) es una planta bianual, originaria del mediterraneo (Guenko Guenkoy, 1968). Es una de las hortalizas de mayor comercialización en nuestro país. Actualmente este producto esta destinado al consumo interno, pero presenta grandes perspectivas para exportarlo a otros países (Miranda, 1988).

Para el ciclo 86-87 se proyectó sembrar 851 mz. de este producto destinando a cada región las siguientes áreas en manzanas: Región I, 275 mz. lo que equivale el 31 % de la producción; Región IV, 120 mz. equivalente al 14 %; Región VI, 420 mz. equivalente al 52 %; Región V, 6 mz. lo que corresponde al 0.6 % de la producción nacional (MIDINRA, 1986).

Su oferta durante todo el año no se corresponde con los niveles de demanda, ya que en los meses de Julio- Agosto los mercados se observan llenos de este producto comprándose a un precio bajo, sin embargo en los meses de Noviembre-Mayo esta hortaliza se escasea alcanzando cada cabeza precios altísimos; esto se debe a que la producción está principalmente en manos de pequeños y medianos productores y de cooperativas, sector que no cuenta con los medios adecuados para producir todo el año (Varela, 1988).

Existen también otros factores que vienen a disminuir la producción: falta de



insumos y adaptación de variedades. Debido a las pocas variedades que se ofertan a los productores estos no pueden escoger la que mas se adapte a la zona del cultivo, lo que provoca que se estén sembrando la misma variedades en los mismos lugares. Esta situación, además de un deficiente manejo del cultivo y condiciones favorables del ambiente, permiten una mayor incidencia de plagas y enfermedades. Una de estas enfermedades registrada causando pérdidas es la llamada por los productores "Quema, Chamusca o Podredumbre negra" causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc).

La bacteria Xcc puede llegar al cultivo transportada por la semilla y puede permanecer sobreviviendo por un período de cuatro a cinco años en el suelo de países con clima templado (Messiaen y Lafon, 1967) pero en los países tropicales, la bacteria Xcc sobrevive por períodos menores a un año (Shaad y Thaveechai, 1983).

La podredumbre negra de las crucíferas fue citada por primera vez en Kentucky en 1961 y la bacteria fue descrita por Pammel afectando Nabo amarillo en el estado de Iowa en 1895. Este patógeno fue una de las primeras bacterias en la que se demostró la transmisión por semilla; debido a este tipo de diseminación por semillas del agente patógeno esta enfermedad ha sido citada a menudo como muy destructiva en muchas regiones del mundo (Walker, 1973).

Esta bacteria requiere para su desarrollo una temperatura óptima de 25-28 °C y agua en forma de rocío, siendo la temperatura la más determinante para la enfermedad. Las mejores medidas de lucha contra la enfermedad son: rotación de cultivos y desinfección de semillas en agua caliente, también se recomienda usar semilla certificada reproducidas en regiones donde el organismo patógeno no incide por razones de baja humedad (Mayea, 1985).

La infección se inicia en los márgenes de las hojas, y la penetración de la

bacteria se realiza a través de los poros acuíferos o hidátodos donde se produce una clorosis que progresa hacia la nervadura central formándose la característica mancha en forma de V, en ataques intensos puede haber deformación de las hojas además de defoliación (Vigliola y Calot, 1982).

La bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, organismo causal de la podredumbre negra de las crucíferas, sobrevive primeramente como patógeno de la semilla y un bajo nivel de semilla infestada (3 semillas en 10,000) puede provocar una alta incidencia de la enfermedad en el campo (Randhawa y Schaad, 1984),

La infección en la semilla podría ser detectada culturalmente o por germinación de la semilla sobre papel absorbente húmedo a 22 °C (Hayward y Waterston, 1965).

Debido a que Xcc es transportada en la semilla muchos esfuerzos para controlar la enfermedad han sido encaminados a la erradicación del patógeno, tratamientos con agua caliente han sido recomendados por muchos años sin embargo éstos no han sido aceptados por la industria ya que reducen la viabilidad de la semilla y no erradican el patógeno completamente (Schaad y Dianese, 1981).

Ante esta problemática los productores demandan nuevas variedades que muestren tolerancia a la enfermedad, pero no es posible obtener un producto de calidad si las condiciones en que se produce son viables para producir la enfermedad (por ejemplo en suelo infectado), lo que hace necesario una rotación de cultivos, no sembrar en terrenos donde recientemente hubo presencia del patógeno, además asegurarse que la semilla este libre del patógeno (Guharay, 1988).

## II. OBJETIVOS.

1. Conocer si las variedades sembradas por los productores son portadoras de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causante de la enfermedad "Quema o Chamusca".
2. Conocer el grado de infestación que presenta cada una de estas variedades.
3. Buscar un método de desinfección de la semilla que permita obtener semilla sana para el cultivo.

### III. MATERIALES Y METODOS.

El presente trabajo en su fase experimental fue llevado a cabo en los laboratorios e invernadero de la Escuela de Sanidad Vegetal del Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias (ISCA), el cual esta ubicado en el Km. 12 1/2 Carretera Norte, Managua.

Este trabajo se desarrolló en tres etapas, las que a continuación se describen:

Primera etapa: Se procedió a la recolección de datos sobre las diferentes variedades de semilla de repollo utilizadas por los productores, seleccionando para este fin tres principales regiones productoras (I, IV y VI) en cada una de las cuales se recolectarán 5, 5 y 9 muestras respectivamente (2gr./muestra) y se obtuvo una información completa sobre el historial de campo, variedad, procedencia de la semilla y manejo del cultivo a través de un formato de encuesta.

Segunda etapa: Una vez recolectadas las muestras de campo se procedió a la fase de laboratorio, en donde se les realizó pruebas de germinación y aislamiento del patógeno a cada una de las muestras. En la prueba de germinación se tomaron 100 semillas de cada muestra y se colocaron en cámara húmeda, para conocer el porcentaje de germinación de cada muestra. Para el aislamiento del patógeno se tomaron 1 gr. de semilla por muestra (aproximadamente 125 semillas) vertiéndolas en 10 ml. de agua destilada esteril, para obtener una suspensión microbiana, la cual se dejo en reposo por 24 horas para permitir que la bacteria se difundiera en el agua (Saettler, Schaad y Roth, 1989 (modificado de acuerdo a las condiciones de nuestro

experimento con respecto a la cantidad de semillas por muestra cedidas por los productores para su análisis)). Posterior a las 24 horas, de la suspensión microbiana ( $10^{-1}$ ) se hicieron diluciones en serie hasta alcanzar una dilución de  $10^{-5}$ , con el objetivo de obtener una dilución menos concentrada que facilite el crecimiento de colonias mas aisladas y cuantificación de las mismas.

De la dilución obtenida se hicieron tres repeticiones, tomando 0.2 ml. de suspensión la que se esparció en placas petri con medio LPGA específico para Xcc. 48 horas despues de la siembra se realizó el conteo sobre el número y tipo de colonias presentes en cada plato Petri.

Los diferentes tipos de bacterias se aislaron en platos petri con medio nutritivo para obtener cultivos puros y proceder a la preservación de cada cepa bacteriana.

Debido a que la cantidad de semilla colectada en las regiones productoras escogidas fue poca, se utilizarón otras cinco variedades diferentes las que fuerón adquiridas en casas comerciales del país, realizándoles las mismas pruebas antes mencionadas y siguiendo la misma metodología.

Una vez realizado el aislamiento de las bacterias presentes en la semilla, se procedio a la identificación de éstas, tomando para esto cultivos juvenes (24 horas) y observándose bajo el microscopio la forma, color y tamaño de las colonias realizándoles luego una serie de pruebas bioquímicas según Lelliott y Stead, 1987:

- Tincion de Gram.
- Calentamiento de spora.
- Producción de oxidasa.
- Producción de catalasa.
- Pudrición blanda en disco de tubérculos de papa.

- Licuefacción de la gelatina.
- Prueba de agar nutritivo con 0.1 y 0.2 % de Triphenyltetrazoliumchloride.
- Prueba de oxidación-fermentación (O/F).

Después de haber realizado las pruebas en el laboratorio se procedió a la inoculación de las cepas bacterianas en plantas de tomate y repollo para realizar las pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad respectivamente. Luego se tomaron muestras de hojas enfermas y se les efectuaron aislamiento en el laboratorio.

Tercera etapa: Una vez realizadas las pruebas bioquímicas que nos identificaron a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, se procedió a la desinfección de tres de las 18 muestras de semillas infestadas sometiéndolas a diferentes tratamientos térmicos y osmotérmicos:

-Un tratamiento termico con agua caliente a diferentes temperaturas (50, 52 y 55 °C), y cada temperatura a tres tiempos diferentes (20, 25 y 30 minutos), realizando un total de 9 tratamientos mas un testigo..

-Posterior a esto, se repitieron los mismos tratamientos térmicos, pero se le agregó al agua un protector de germinación de la semilla conocido como Polyethylenglycol (PEG-6000) a una dosis de 314 gr. por litro de agua (Dr. Gerardo Bruin, Comunicación personal). Para cada tratamiento se utilizaron 4 grs. de semilla (aproximadamente 500 semillas).

Después de finalizados los tratamientos, se procedió a realizarles pruebas de germinación y aislamiento de patógenos para cada una de las muestras tratadas siguiendo la misma metodología antes descritas.

A los datos obtenidos se les hizo un analisis de regresion multiple y

contrastes ortogonales para probar el efecto de los tratamientos con o sin PEG sobre el % de germinación y desinfección de semilla.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

##### A. Calidad fitosanitaria de la semilla de repollo en la I, IV y VI regiones.

Los resultados correspondientes a los análisis realizados en el laboratorio y la intensidad del ataque de la enfermedad reportado por los productores nos muestra lo siguiente:

La variedad Superette es la más utilizada en las 3 regiones examinadas (Cuadros 1, 2 y 3); como podemos notar, las muestras de las variedades analizadas en el laboratorio presentan un alto porcentaje de germinación, sin embargo hay un alto índice de infestación lo que coincide en un 72.6 % con los datos levantados en las encuestas a los productores.

Otras variedades como la King Cole, Copenhagen y Golden Acre presentan un buen porcentaje de germinación y cero infestación en las muestras procedentes de las regiones IV y VI, pero no se usan a gran escala, esto se puede deber a dos cosas: la desconfianza que tienen los productores de sembrar otras variedades que no sea la que tradicionalmente han venido sembrando en cada ciclo, y la falta de una política de convencimiento por parte de los técnicos para que los productores esten sembrando nuevas variedades que les asegure semillas con buena germinación y libre del patógeno. En los casos en que el análisis bacteriológico mostró cero número de colonias (Cuadros 2 y 3) pero los productores reportaron ataques de baja y media intensidad, podría indicarnos que la fuente de inóculo de la enfermedad es otra (el suelo por ejemplo (Messiaen y Lafon, 1967; Shaad Y Thaveechai, 1983)).



**Cuadro 1.** Porcentaje de germinación y grado de infestación por Xantomonas campestris pv. campestris presente en las semillas de las variedades de la Región I.

Variación	Procedencia	% de germinación	No. de colonias/gr semilla+	IDASE*
Roundup	California, USA.	98	16,667	Medio
Roundup	California, USA.	95	16,667	Nulo
Superette	California, USA.	99	83,333	Medio
Superette	California, USA.	97	0	Nulo
Golden Acre	California, USA.	95	50,000	Bajo

+ Análisis de laboratorio.

\* Índice de ataque de la enfermedad según las encuestas a los productores.

**Cuadro 2.** Porcentaje de germinación y grado de infestación por Xantomonas campestris pv. campestris presente en las semillas de las variedades de la Región IV.

Variación	Procedencia	% de germinación	No. de colonias/gr semilla+	IDASE*
Superette	California, USA.	100	33,333	Bajo
Superette	California, USA.	94	183,333	Medio
Superette	California, USA.	97	100,000	Alto
King cole	California, USA.	91	0	Medio
Copenhagen	Holanda	95	0	Bajo

+ Análisis de laboratorio.

\* Índice de ataque de la enfermedad según las encuestas a los productores.

**Cuadro 3.** Porcentaje de germinación y grado de infestación por Xantomonas campestris pv. campestris presente en las semillas de las variedades de la Región VI.

Variación	Procedencia	% de germinación	No. de colonias/gr semilla+	IDASE*
Superette	California, USA.	94	200,000	Alto
Superette	California, USA.	91	250,000	Nulo
Superette	California, USA.	96	16,666	Bajo
Superette	California, USA.	88	50,000	Bajo
Copenhagen	Holanda	92	66,666	Bajo
Copenhagen	Holanda	94	0	Bajo
Golden Acre	California, USA.	82	0	Nulo
	*	0	166,666	Alto
	**	0	366,666	Alto

+ Análisis de laboratorio.

\* Índice de ataque de la enfermedad según las encuestas a los productores.

\* y \*\* Productores no sabían el nombre de la variedad.

**Cuadro 4.** Porcentaje de germinación y grado de infestación por Xantomonas campestris pv. campestris presente en las semillas de las variedades obtenidas en las casas comerciales.

Variedad	Procedencia	% de germinación	No. de colonias/gr semilla+
Glory of Enkhuizen	Holanda	91	131,250
Roundup	California, USA.	98	68,750
Superette	California, USA.	100	100,000
Red Cabbage	EE.UU	33	75,000
King Cole	Holanda	93	0

+ Análisis de laboratorio.

En el cuadro 8, se observan los resultados de las pruebas bioquímicas que se les efectuaron a las bacterias aisladas de las variedades en el análisis de laboratorio.

Con la prueba de tinción de Gram (Fucikovski, 1976 citado por Salgado, 1977), se obtuvo la diferenciación de bacterias  $G^+$  y  $G^-$  siendo de nuestro interés todas aquellas bacterias  $G^-$ , observándoseles además la forma y el tamaño de las colonias.

Al realizar la prueba de calentamiento de esporas y siembra, gran cantidad de bacterias aisladas de las semillas fueron eliminados por presentar esporas, debido a que Xcc no produce esporas como forma de sobrevivencia.

Las colonias de bacterias en la cual la prueba de oxidasa nos resultó negativa, se iban seleccionando ya que estas corresponden a los resultados detallados por Lelliot y Stead (1987).

La prueba de catalasa (Digat, 1971), la podemos considerar positiva debido a la efervescencia causada por la liberación del oxígeno libre en forma de gas por las colonias bacterianas, lo que indica la presencia de catalasa en nuestras colonias en estudio.

La prueba de pudrición de papa resultó negativa, ya que cuando las bacterias fueron inoculadas en tubérculos de papa no hubo ninguna pudrición, lo que concuerda con Salgado (1977).

La prueba de gelatina fué positiva en nuestro caso ya que las bacterias ocasionaron la licuefacción de la gelatina en el tiempo establecido (Anónimo, 1953). Esto también es reportado así por Lelliot y Stead (1987).

La prueba de oxidación/fermentación (O/F) (Hugh y Leifson, 1953 citado por Salgado, 1977), nos dió resultados positivos en los tubos sometidos a condiciones aeróbicas, observándose un cambio de color azul verde a amarillo.

En cuanto a las inoculaciones en medio de Agar Nutritivo (AN) con Triphenyltetrazoliumchloride (TTZC) al 0.1 % y 0.02 %, se observó que el crecimiento bacterial fue inhibido en agar nutritivo con TTZC al 0.1 % y hubo un crecimiento leve en 0.02 % comparado con el AN que no llevaba TTZC.

Todos los resultados de nuestras pruebas bioquímicas que coinciden con los obtenidos por Lelliot y Stead (1987), indican que del total de tipos de bacterias aisladas de las semillas, 18 cepas corresponden al grupo de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causante de la pudrición negra o Chamusca en el repollo (cuadros 1, 2, 3, 4 y 8).

Además, las pruebas de patogenicidad en plantas inoculadas, nos dieron después de cinco días síntomas similares a los causados por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* tanto en las plantas de tomate como en las de repollo, mostrándonos áreas necróticas especialmente en el sitio en donde se efectuó la inoculación. Estos mismos síntomas han sido reportados para esta bacteria (Forkas y Lourekovich, 1964 citados por Salgado, 1977).

## **B. Efecto de los tratamientos aplicados a tres variedades obtenidas en las casas comerciales .**

La efectividad de los tratamientos térmicos a diferentes temperaturas y tiempos y con o sin Polyethylenglycol (PEG-6000) sobre el porcentaje de infección y germinación son presentados en los cuadros 5, 6 y 7 y anexos 1, 2 y 3.

Para la variedad Glory of Enkhuizen, el análisis de regresión múltiple mostró un efecto significativo entre las diferentes temperaturas y tiempos empleados para la desinfección de semilla; al hacer una comparación entre la temperatura y el tiempo observamos que la temperatura ejerce un mayor efecto en la disminución de la cantidad de inóculo presente en las semillas que el tiempo de desinfección, no existiendo así un efecto significativo cuando se emplea PEG lo cual significa que no existe ninguna relación entre la desinfección de la semilla y el uso de PEG (cuadro 5a).

El análisis de regresión para la variedad Roundup muestra que existe un efecto significativo entre las diferentes temperaturas y los diferentes tiempos, existiendo un mayor efecto de la temperatura en la disminución de la cantidad de inóculo que el tiempo, no hubo efecto significativo cuando se emplea PEG en los diferentes tratamientos (cuadro 6a).

Para la variedad Superette, el análisis muestra claramente que hubo efecto significativo entre las diferentes temperaturas y tiempos y que por cada grado de temperatura empleado se disminuye grandemente la cantidad de inóculo en la semilla; el uso de PEG no tiene ningún efecto en la desinfección de semilla (cuadro 7a).

Al comparar las tres variedades se observa claramente que el lote de la

variedad Superette muestra mayor tolerancia a los tratamientos osmotérmicos con respecto a su respuesta para el porcentaje de germinación que las otras dos variedades (cuadros 5, 6 y 7 y anexos 1, 2 y 3).

**Cuadro 5.** Efecto de los tratamientos sobre la germinación y saneamiento de semilla de repollo Variedad Glory of Enkhuisen.

Tratamiento	Temperatura °C	Tiempo minutos	PEG	Germinación %	No. de colonias por gr de semilla
1	50	20	no	29.75	15,000
2	50	25	no	35.00	0
3	50	30	no	29.00	0
4	52	20	no	15.75	0
5	52	25	no	15.00	0
6	52	30	no	7.25	0
7	55	20	no	5.00	0
8	55	25	no	4.75	0
9	55	30	no	2.25	0
10+	0	0	no	86.50	120,000
11	50	20	si	76.50	15,000
12	50	25	si	71.00	0
13	50	30	si	66.50	0
14	52	20	si	56.50	0
15	52	25	si	46.50	0
16	52	30	si	41.00	0
17	55	20	si	37.00	0
18	55	25	si	25.00	0
19	55	30	si	19.00	0
20+	0	0	no	88.00	120,000

+ Testigos sin aplicación de temperaturas y tiempos y sin PEG.

**Cuadro 5a.** Resultados de análisis de regresión múltiple para la variedad Glory of Enkhuizen.

Efecto sobre No. de colonia/g de semilla				Efecto sobre % germinación			
Variable	Coefficiente	T	P (2 Tail)	Variable	Coefficiente	T	P (2 Tail)
Constante	56298.2	3.5	.001	Constante	404.8	13.2	.000
Temp	-828.9	-2.7	.009*	Temp	-6.9	-12.2	.000**
Tiempo	-450.0	-3.0	.005*	Tiempo	-0.9	-3.3	.002*
PEG	-333.3	0.78	.787 ns	PEG	32.6	13.9	.000**
F = 5.629    p = 0.003				F = 119.0    p = 0.000			

\* Significativo al 0.5 %. \*\* Altamente significativo al 0.1 %. ns=no significativo.

**Cuadro 5b.** Comparación del efecto de los tratamientos sobre el % de germinación mediante contrastes ortogonales (Variedad Glory of Enkhuizen).

Tratamientos comparados	F calculado	F tabulado
1 a 9 contra 11 a 19	143.91*	4.38
1, 2 y 3 contra 11, 12 y 13	32.76*	4.38
11, 12 y 13 contra 20	2.19 ns	4.38
12 contra 13	0.22 ns	4.38

\* Significativo al 0.5 %. ns=no significativo.

**Cuadro 6.** Efecto de los tratamientos sobre la germinación y saneamiento de semilla de repollo Variedad Roundup.

Tratamiento	Temperatura °C	Tiempo minutos	PEG	Germinación %	No. de colonias por gr de semilla
1	50	20	no	32.25	14,000
2	50	25	no	29.5	0
3	50	30	no	20.25	0
4	52	20	no	17.75	0
5	52	25	no	15.50	0
6	52	30	no	9.25	0
7	55	20	no	6.75	0
8	55	25	no	3.5	0
9	55	30	no	3	0
10+	0	0	no	88	63,000
11	50	20	si	78.5	14,000
12	50	25	si	73.5	0
13	50	30	si	72	0
14	52	20	si	59.5	0
15	52	25	si	44.5	0
16	52	30	si	37.5	0
17	55	20	si	34	0
18	55	25	si	31	0
19	55	30	si	23.5	0
20+	0	0	si	97.5	63,000

+ Testigos sin aplicación de temperaturas y tiempos y sin PEG.

**Cuadro 6a.** Resultados de análisis de regresión múltiple para la variedad Roundup.

Efecto sobre No. de colonia/g de semilla				Efecto sobre % germinación			
Variable	Coefficiente	T	P (2 Tail)	Variable	Coefficiente	T	P (2 Tail)
Constante	58210.5	3.5	.001	Constante	358.96	9.074	.000
Temp	-859.6	-2.8	.008*	Temp	-5.86	-7.99	.000**
Tiempo	-466.6	-3.0	.005*	Tiempo	-1.47	-3.9	.000**
PEG	-0.000	0.00	1.00 ns	PEG	32.36	10.7	.000**
F = 5.710    p = 0.003				F = 64.94    p = 0.000			

\* Significativo al 0.5 %. \*\* Altamente significativo al 0.1 %. ns=no significativo.

**Cuadro 6b.** Comparación del efecto de los tratamientos sobre el % de germinación mediante los contrastes ortogonales (Variedad: Roundup).

Tratamientos comparados	F calculado	F tabulado
1 a 9 contra 11 a 19	444.59*	4.38
1, 2 y 3 contra 11, 12 y 13	156.57*	4.38
11, 12 y 13 contra 20	10.05*	4.38
12 contra 13	0.035 ns	4.38

\* Significativo al 0.5 %. ns=no significativo.

**Cuadro 7.** Efecto de los tratamientos térmicos sobre la germinación y saneamiento de semilla de repollo Variedad Superette.

Tratamiento	Temperatura °C	Tiempo minutos	PEG	Germinación %	No. de colonias por gr de semilla
1	50	20	no	53.5	13,000
2	50	25	no	49.0	0
3	50	30	no	47.5	0
4	52	20	no	40.0	0
5	52	25	no	31.5	0
6	52	30	no	21.7	0
7	55	20	no	16.0	0
8	55	25	no	13.5	0
9	55	30	no	11.7	0
10	0	0	no	98.0	97,000
11	50	20	si	86.0	13,000
12	50	25	si	84.0	0
13	50	30	si	80.0	0
14	52	20	si	77.0	0
15	52	25	si	67.0	0
16	52	30	si	63.0	0
17	55	20	si	52.0	0
18	55	25	si	54.0	0
19	55	30	si	47.0	0
20	0	0	si	97.5	97,000

+ Testigos sin aplicación de temperaturas y tiempos y sin PEG.



**Cuadro 7a.** Resultados de análisis de regresión múltiple para la variedad Superette.

Efecto sobre No. de colonia/g de semilla				Efecto sobre % germinación			
Variable	Coefficiente	T	P (2 Tail)	Variable	Coefficiente	T	P (2 Tail)
Constante	51017.5	3.5	0.001	Constante	407.8	21.7	.000
Temp	-752.1	-2.8	0.008*	Temp	-6.7	-19.4	.000**
Tiempo	-408.3	-3.0	0.005*	Tiempo	-0.8	-5.08	.000**
PEG	-166.6	-6.1	0.881 ns	PEG	36.3	25.3	.000**
F = 5.685    p = 0.003				F = 384.9    p = 0.000			

\* Significativo al 0.5 %. \*\* Altamente significativo al 0.1 %. ns=no significativo.

**Cuadro 7b.** Comparación del efecto de los tratamientos sobre el % de germinación mediante los contrastes ortogonales (Variedad Superette).

Tratamientos comparados	F calculado	F tabulado
1 a 9 contra 11 a 19	581.72*	4.38
1,2 y 3 contra 11,12 y 13	104.91*	4.38
11,12 y 13 contra 20	29.83*	4.38
12 contra 13	0.461 ns	4.38

\* Significativo al 0.5 %. ns=no significativo.

**Cuadro B.** Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas de diferentes variedades de repollo.

Variedades	Región	Gram	Espora	Oxidasa	Catalasa	Papa	Gelatina	O/F Test(1)		AN / TTZC(2)		Patog. Test+	Hiper Test++	Xcc* si*
								O	F	0.1%	0.02%			
Xcc *		-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si*
Roundup	I	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Roundup	I	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Superette	I	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	no
Superette	I	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Golden Acre	I	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Superette	IV	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Superette	IV	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Superette	IV	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
King Cole	IV	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
King Cole	IV	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	no
Copenhagen	IV	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	no
Superette	VI	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Superette	VI	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Superette	VI	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Superette	VI	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
☐ Copenhagen	VI	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
⊖ Copenhagen	VI	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	no
Golden Acre	VI	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	no
**	VI	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
***	VI	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Glory (3)CC		-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Glory	CC	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	no
Roundup	CC	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Superette	CC	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
Red cabbage	CC	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	si
King Cole	CC	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	no

\* *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* según Lelliott y Stead (1987) y Hayward and Waterston (1965).

\*\* y \*\*\* Variedades no identificadas.

1 Prueba de oxidación/fermentación.

2 Prueba de tolerancia a Triphenyltetrazoliumchloride al 0.1 y 0.02% en Agar Nutritivo.

3 Variedades obtenidas en las casas comerciales.

+ Prueba de patogenicidad en repollo. ++ Prueba de hipersensitividad en tomate.

### C. Efecto de los tratamientos sobre la germinación.

Para la variedad Glory of Enkhuizen, hubo un efecto altamente significativo entre las diferentes temperaturas y PEG, y un efecto significativo para los diferentes tiempos empleados en los tratamientos (cuadro 5a). La temperatura ejerce un efecto negativo en la germinación de la semilla, pero la germinación es afectada en menor grado cuando se usan temperaturas de 50 °C y se adiciona PEG al agua (cuadro 5 y anexo 1).

Para la variedad Roundup, hubo un efecto altamente significativo tanto para las diferentes temperaturas, tiempos y uso de PEG (cuadro 6a) dando el mismo efecto negativo en la temperatura cuando no se usa PEG (cuadro 6 y anexo 2).

Para la variedad Superette, hubo un efecto altamente significativo en las diferentes temperaturas, tiempos y PEG (cuadro 7a), observándose que el uso de PEG ejerce un efecto positivo en la protección de la germinación (cuadro 7 y anexo 3). El PEG mezclado con aguas es utilizado para la pre-germinación de semillas (Muhyaddin y Wiebe, 1989; Huang y Zou, 1989) pero aprovechando esta condición osmótica de pre-germinación, algunos fungicidas o antibióticos pueden ser mezclados junto al PEG y al agua para reducir la colonización o infección de algunos patógenos transportados en o dentro de la semilla (Osburn y Schroth, 1988). Nosotros en nuestro estudio, utilizamos esa condición osmótica de pre-germinación con el uso del PEG para aplicar diferentes temperaturas y tiempos a las semillas de repollo infectadas con *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y ver su efecto sobre la desinfección tal y como se observa en los cuadros 5, 6 y 7 y anexos 1, 2 y 3. El uso de PEG es indispensable cuando se realiza tratamiento térmico para la desinfección de la semilla, ya que este ejerce un efecto positivo en la protección de la

germinación de la semilla tratada con agua caliente.

Como resultado del análisis de contrastes ortogonales para la variedad Glory of Enkhuizen, encontramos que hubo efecto significativo entre los tratamientos osmotérmicos (con PEG) y los tratamientos térmicos (sin PEG). Se observa claramente que el uso de PEG en los tratamientos ejerce un efecto positivo en la protección de la germinación. Al compararse los tratamientos 11, 12 y 13 con respecto al testigo, se observa que no hubo diferencias significativas en la disminución del porcentaje de germinación cuando se utiliza PEG, sin embargo encontramos diferencias significativas cuando comparamos los tres primeros tratamientos con PEG y sin PEG; no hubo diferencias significativas entre los tratamientos 12 y 13 cuando se utiliza PEG (Cuadro 5b).

Para la variedad Roundup, encontramos que hubo diferencias significativas al comparar los tratamientos térmicos con PEG y sin PEG, también hubo diferencias significativas cuando comparamos los tratamientos 11, 12 y 13 con PEG y el testigo, pero el efecto sobre el porcentaje de germinación es mínimo por lo que se pueden considerar tratamientos efectivos; no hubo diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 3 (cuadro 6b).

La variedad Superette muestra los mismos efectos de significancia en los contrastes ortogonales que la variedad Roundup (cuadro 7b).

Según estos datos analizados, tanto en la regresión múltiple como en los contrastes ortogonales se determina que el mejor tratamiento con agua caliente es el de 50 °C durante 25 minutos mas PEG, el cual no afecta grandemente la germinación y su efecto sobre la eliminación de la infección se logró a partir de este punto, lo cual coincide con Hayward y Waterstoon (1965), quienes recomiendan el mismo tratamiento térmico sin PEG, pero no coinciden

con Messiaen y Lafon (1967), y con Mayea (1985), quienes recomiendan sumergir la semilla en agua caliente a 50 °C durante 30 minutos, pero estos investigadores no hicieron uso de PEG como protectivo de germinación.

## V CONCLUSIONES.

1- En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que de las 24 muestras de las variedades recolectadas en las tres principales regiones productoras de repollo y casas comerciales, 18 muestras estaban infectadas con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

2- Según las encuestas y los análisis realizados, la variedad Superette es la mas afectada y la mas utilizada por los productores.

3- Al realizarse los tratamientos térmicos, estos dieron un efecto positivo en la eliminación del patógeno en las semillas, pero disminuyeron el porcentaje de germinación; se puede agregar un protector de germinación de las semillas (PEG-6000) a los tratamientos térmicos para garantizar semillas libres del patógeno con buen porcentaje de germinación.

4- La efectividad de los tratamientos térmicos se logro a partir del tratamiento con agua a 50 °C durante 25 minutos; se determinó que este tratamiento es mejor cuando le añadimos PEG, ya que se logra cero infestación y la germinación no se afecta grandemente con respecto al testigo.

## VI RECOMENDACIONES.

1- Siendo la variedad Superette la mas infectada con el patógeno Xcc, se recomienda realizarle un análisis bacteriológico a las semillas antes de usarse, para asegurarse que estas no sean portadoras del inóculo lo que nos evitaría llevar la enfermedad al campo y por consiguiente pérdidas futuras.

2- Todas aquellas semillas portadoras de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* deben ser tratadas osmotérmicamente con agua caliente a 50 °C durante 25 min. agregandole PEG-6000 para proteger su germinación.

3- Se recomienda no realizar la siembra en lugares con suelos contaminados con *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, vigilar continuamente los semilleros y realizar rotación de cultivos.

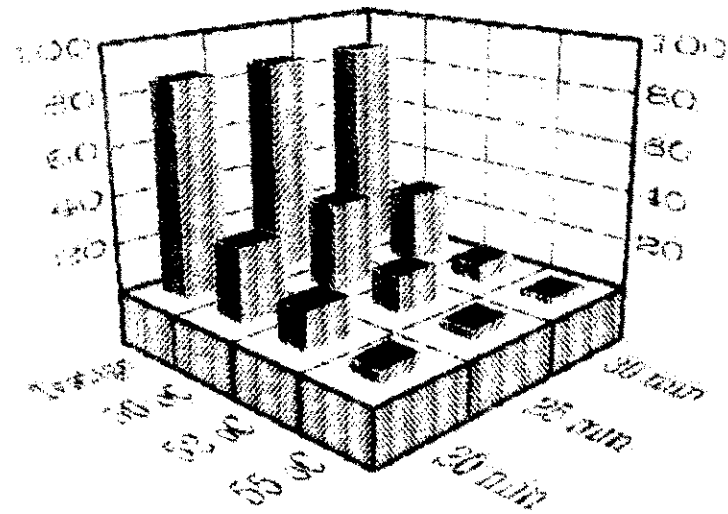
4- Repetir este experimento haciendo uso de temperaturas menores pero con períodos de tiempo mas largos, usando PEG-6000 a diferentes dosis y otros materiales "osmocondicionantes" de las semillas.

## VII. BIBLIOGRAFIA.

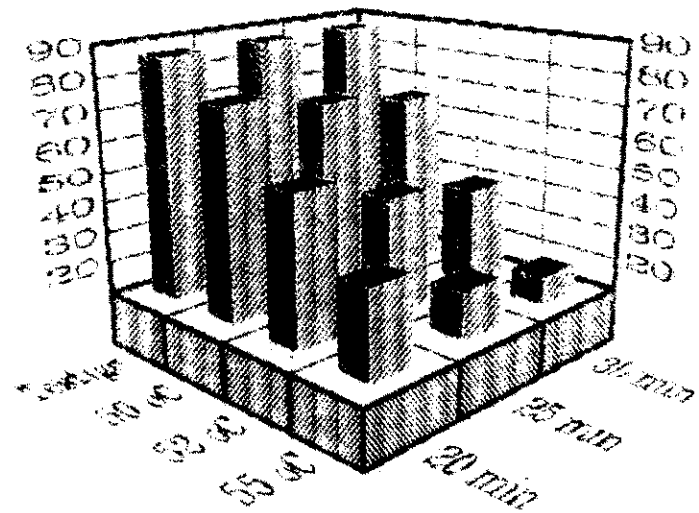
- ANONIMO. 1953. Difco Manual dehydrates culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. 9th. Ed. Difco, laboratories inc. Detroit, Michigan, USA. pag.350.
- DIGAT, B. 1971. The Significance of Catalasic Activity in *Pseudomonas solanacearum*. In: Third International Conference on Plant Pathogenic bacteria. Wageningen. pp. 71.
- FARKAS, Z. G. L. and L. LOYREKOVICH. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the Tobacco leaf. *Phytopatology* 54: 474-477.
- FUCIKOVSKI, Z. L. 1976. Curso de bacterias fitopatógenas. C. P., E.N.A., Chapingo, México.
- GUENKO GUENKOV. 1968. Fundamentos de la horticultura cubana. Editorial Pueblo y Educación. Habana, Cuba. pp. 215.
- GUHARAY, F. 1988. Taller Sobre Manejo del Cultivo de Repollo con Enfasis en MIP-Repollo. Escuela de Sanidad Vegetal. Proyecto MIP-REPOLLO-SAYE. Managua, Diciembre 1988.
- HAYWARD, A.C. and J.M. WATERSTOON. 1965. *Xanthomonas campestris*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No 47.
- HUANG, Y. G. and Q. ZOU. 1989. Effects of osmoconditining and draying on germination of *Pinus sylvestris* var. *Mongolica* and *Larix gmelinii* seeds. *Seed Science and Technology* 17: 235-242.
- HUGH, R. and E. LEIFSON. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 66, 24-6
- KLEMENT, Z.; FARKAS, G. L. and L. LOUREKOVICH. 1964. Hypersensitive reaction induced by Phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopatology*. pp. 474-477.
- LELLIOTT R.A. and D.E. STEAD. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Published on behalf of the British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publications. pp. 69-72.
- MAYEA, S.; L. HERRERA y C.M. ANDREU. 1985. Enfermedades de las plantas cultivada en Cuba. Editorial Pueblo y Educación. Habana, Cuba. pp. 307.
- MESSIAEN, C.M. y R. LAFON. 1967. Enfermedades de las Hortalizas. Ediciones Yilassar de Mar. Barcelona, España. pp. 245.
- MIDINRA, Dirección de Horticultura. 1986. Diagnóstico de producción de hortalizas. pp. 2.
- MIRANDA, F. 1988. I Taller Sobre Manejo del Cultivo de Repollo con Enfasis en MIP-REPOLLO. Escuela de Sanidad Vegetal. Proyecto MIP-REPOLLO-SAYE. Managua, Diciembre 1988.



- MUHYADDIN, T. and H. J. WIEBE. 1989. Effects of seed treatments with Polyethylenglycol (PEG) on emergence of vegetable crops. *Seed Science and Technology* 17:49-56.
- OSBURN, R. M. and M. N. SCHROTH. 1988. Effect of osmopriming Sugar Beet Seed on exudation and subsequent Damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 78:1246-1250
- RANDHAWA, P. S. y N. W. SHAAD. 1984. Selective Isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Black Rot of Crucifers. *Phytopathology* 71(11):1215-1220.
- SALGADO, F.G. 1977. Manual de prácticas de Bacterias Fitopatogenas. Departamento de Parasitología Agrícola. Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México 1977.
- SAETTLER, A. W.; SHAAD, N. W and D. A. ROTH. 1989. Detection of bacteria in seed and other planting materials. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. pp. 68
- SHAAD, N. W. and J. C. DIANESE. 1981. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology* 71: 1215-1220.
- SHAAD, N. W. and N. THAYEECHAI. 1983. Black rot of crucifers in Thailand. *Plant Diseases* 63(11):1231-1234.
- YARELA, G. 1988. I Taller Sobre Manejo del Cultivo de Repollo con Énfasis en MIP-REPOLLO-SAYE. Managua, Diciembre 1988.
- VIGLIOLA, M.I. y L.I. CALOT. 1982. Enfermedades en Poscosecha. Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. pp. 9.
- WALKER, J. CH. 1973. Patología Vegetal. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. Segunda Edición. pp. 150.

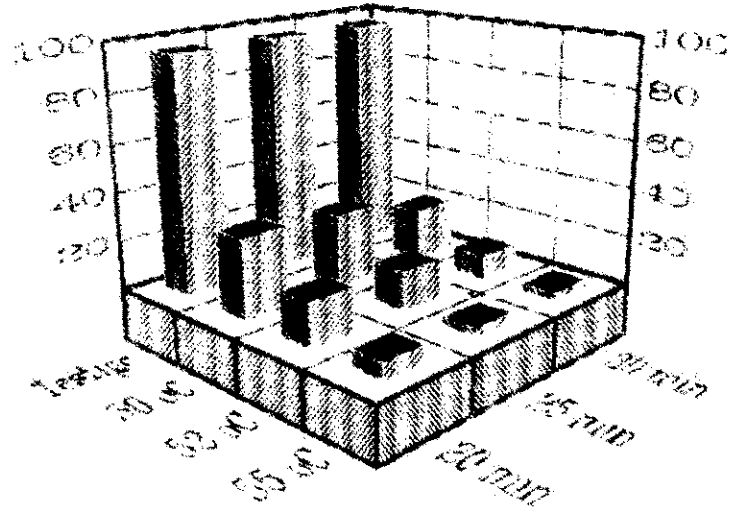


% de germinacion sin PEG Var. Glory.

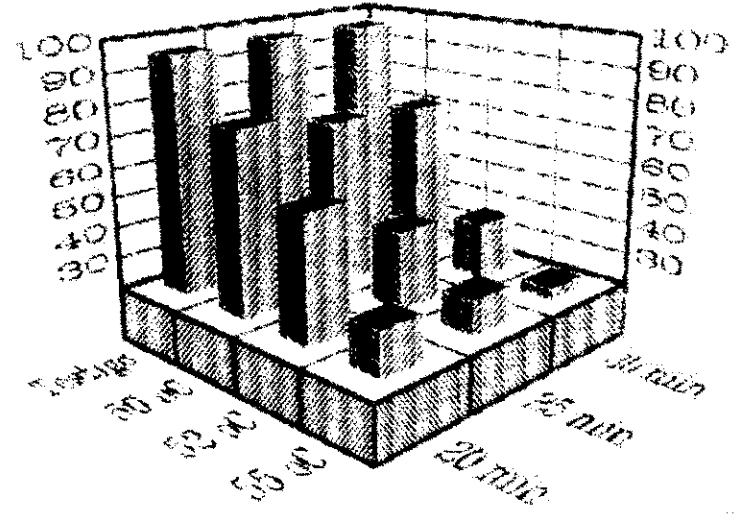


% de germinacion con PEG Var. Glory.

ANEXO II.

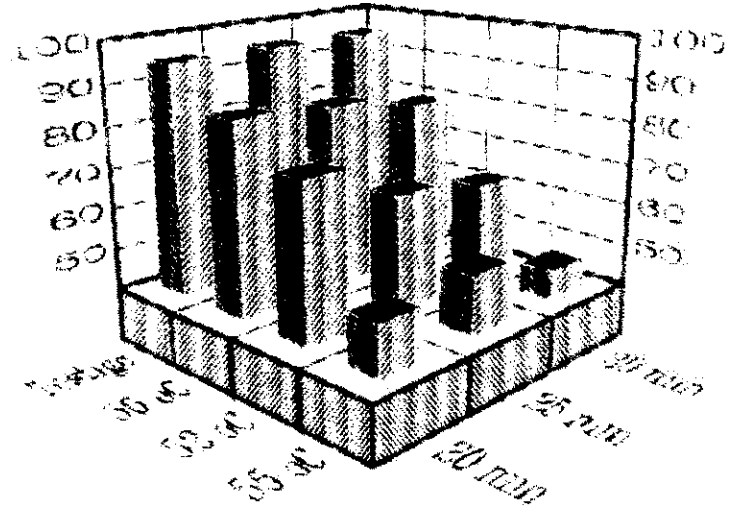
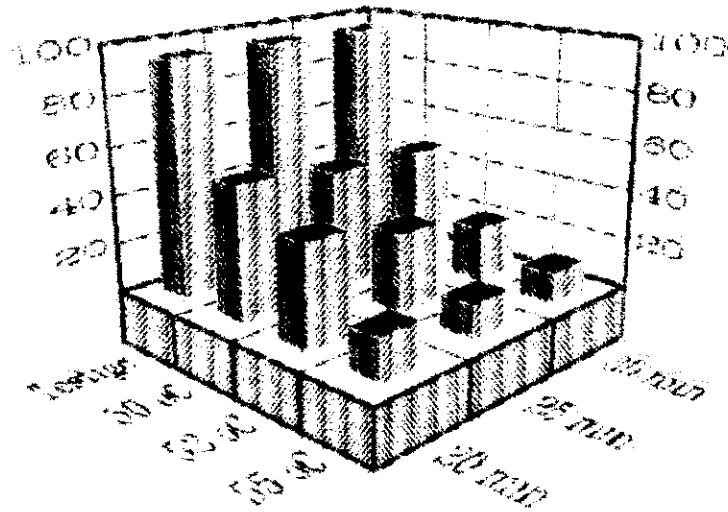


% de germinacion sin PEG Var. Roundup.



% de germinacion con PEG Var. Roundup.

ANEXO III.



% de germinacion sin PEG Var. Superette. % de germinacion con PEG Var. Superette.