

# Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación

## Phytopathogenic Bacteria in Seeds: Detection and Regulation

**Rosa Navarrete Maya\***, Unidad de Investigación en Granos y Semillas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Dr. Jorge Jiménez Cantú s/n, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, México CP 54740, correspondencia: rosa\_navarrete@hotmail.com; **Sergio Aranda Ocampo**, Postgrado de Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, México CP 56230, correspondencia: saranda@colpos.mx; **María de Lourdes Rodríguez Mejía**, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Edo. de México, México CP 56230, correspondencia: rodrime\_lu@hotmail.com; **Sandra Lourdes Moya Hernández**, Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Km. 37.5, carretera Federal México-Pachuca, Tecámac, Edo. de México, México CP 55740, correspondencia: lourdes\_2111@hotmail.com; y **Mitzi Georgina González Ochoa**, mitzi.georgina12@gmail.com. \*Autor de Correspondencia: rosa\_navarrete@hotmail.com.

Recibido: Diciembre 01, 2014

Aceptado: Enero 27, 2016

Navarrete-Maya R, Aranda-Ocampo S, Rodríguez-Mejía ML, Moya-Hernández SL y Gonzalez-Ochoa MG. Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. 2014. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 75-88.

**Resumen.** En la actualidad, aproximadamente el 90 % de las plantas cultivadas a nivel mundial son propagadas por semillas, las que se consideran la fuente más importante para la perpetuación de las bacterias, debido a su prolongada longevidad. Las bacterias asociadas a las semillas son un problema que impacta económicamente en todo el mundo, debido a que aún cuando los porcentajes de transmisión sean bajos pueden causar pérdidas del 100 %; son responsables de la re-emergencia de enfermedades, del movimiento de patógenos a través de continentes y de la introducción de enfermedades

**Abstract.** Nowadays, about 90 % of cultivated plants are propagated by seeds, which are the main source for bacteria survival due the prolonged longevity of them. Around the world seed-borne bacteria have an economic impact because could produce 100 % losses even if there are a low percentage of transmission of them. Infected seeds can produce re-emerging diseases, movement of pathogens through continents and the disease introduction to new areas. The main focus for develop an integrated management program for bacterial diseases should be the seed health, as well national and international quarantines must be implemented. The knowledge of transmission characteristics of seed-borne bacteria, the bacteria of cereal and horticultural seeds, the seed-borne bacteria detection methods, and the actual regulation for exporting seeds are important.

en nuevas áreas. La sanidad de las semillas debe ser el primer punto de enfoque en el desarrollo de programas de manejo integrado de las enfermedades bacterianas, así como en la implementación de cuarentenas nacionales e internacionales. Es importante conocer las características de la transmisión de bacterias por semillas; a las bacterias asociadas a semillas de cereales y de hortalizas; así como los métodos de detección de bacterias en semillas y la regulación vigente en el movimiento de exportación de semillas.

**Palabras clave:** sanidad de semillas de cereales, semillas de hortalizas, métodos, normas.

En la actualidad, aproximadamente el 90 % de las plantas cultivadas a nivel mundial son propagadas por semillas, es común que éstas no tengan las condiciones óptimas de calidad fitosanitaria para su uso y comercialización, debido a la presencia de patógenos como las bacterias que pueden desarrollarse sobre o dentro de ellas. Las semillas se consideran la fuente más importante para la perpetuación de las bacterias; además, su longevidad es mayor en las semillas que en el suelo o en residuos de cosecha, y su estrecha relación con la semilla favorece las infecciones primarias tempranas.

Como consecuencia de los procesos de globalización y la apertura comercial a nivel mundial, en los últimos años se ha incrementado el volumen y la diversidad de productos intercambiados. Actualmente, hay cada vez mayor demanda en la producción y movimiento de semilla para el desarrollo de cultivos y para la generación de alimentos. Por esta razón, ante los riesgos fitosanitarios que implica el flujo dinámico de semillas, son necesarias las medidas cuarentenarias.

La transmisión de patógenos por semilla, parti-

**Keywords:** seed health, cereals seeds, horticultural seeds, methods, norms.

Approximately 90 % of plants grown nowadays on a global scale are propagated by seeds, which commonly are not in optimum phytosanitary quality conditions for their use and sale, due to the presence of pathogens such as bacteria that can develop on or inside them. Seeds are considered the most important source for the perpetuation of bacteria; also, their longevity is higher in seeds than in the soil or residues, and their broad relation with the seeds favors early primary infection.

As a consequence of the processes of globalization and the commercial opening on a worldwide scale, recent years have seen the increase in the volume and the diversity of products exchanged. Currently, there is an increasing demand for the production and movement of seeds for the production of crops and food. For this reason, in the face of plant health risks implied by the dynamic flow of seeds, quarantine measures are necessary.

The transmission of pathogens through seed, particularly bacteria, constitutes one of the most efficient mechanisms in the introduction and spreading of diseases. The bacteria that are associated to seeds continue to become a worldwide problem with an economic impact, they are responsible for the re-emergence of diseases, the movement of pathogens throughout continents, and the introduction of diseases into new areas.

In the context of seed-related bacteria, and due to its importance as a source of primary inoculant, it is considered necessary for it to be the first focus point in the development of integrated bacterial disease management programs, as well as a critical point to minimize the introduction and spreading of a disease of this nature.

cularmente de las bacterias, constituye uno de los mecanismos más eficientes en la introducción y la dispersión de enfermedades. Las bacterias que están asociadas a las semillas continúan siendo un problema que impacta económicamente en todo el mundo, son responsables de la re-emergencia de enfermedades, del movimiento de patógenos a través de continentes y de la introducción de enfermedades en nuevas áreas.

En el contexto de las bacterias asociadas a las semillas y debido a su importancia como fuente de inóculo primario, se considera que éste debe ser el primer punto de enfoque en el desarrollo de programas de manejo integrado de las enfermedades bacterianas; así como un punto crítico para minimizar la introducción y dispersión de una enfermedad de esta naturaleza.

### GENERALIDADES DE LA TRANSMISIÓN DE BACTERIAS POR SEMILLAS

Las bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son microorganismos Procariontes, pertenecen al Dominio Bacteria, con dos Reinos, propuestos en base a las secuencias comparativas de ARN16S ó 18S:

- Reino I donde se ubican las bacterias fitopatógenas Gram -: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Erwinia* y *Pantoea*.
- Reino II donde se ubican las bacterias fitopatógenas Gram +: *Curtobacterium* y *Clavibacter*.

Todas las bacterias fitopatógenas son aerobias, y algunas anaerobias facultativas. Se multiplican asexualmente por bipartición. Su crecimiento depende de factores nutritivos, temperatura, humedad y pH. Ocasionan diversas enfermedades en plantas

### GENERAL ASPECTS TRANSMISSION OF BACTERIA BY SEEDS

Bacteria are widely distributed in nature; they are Prokaryotic microorganisms, they belong to the bacteria domain, proposed based on the comparative sequences of RNA16S or 18S:

- Kingdom I, which contains the Gram phytopathogenic bacteria -: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Ralstonia*, *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, and *Pantoea*.
- Kingdom II, which contains the Gram phytopathogenic bacteria +: *Curtobacterium* and *Clavibacter*.

All phytopathogenic bacteria are aerobic, and some are facultative anaerobic. They reproduce asexually by bipartition. Their growth depends on nutrition, temperature, humidity, and pH factors. They cause several diseases in plants, with symptoms such as: wilt, rots, and on different plant organs; likewise, they associate with the plant structures of sexual and asexual reproduction.

Bacteria are considered transmitted by seeds when they are carried on or inside them, they penetrate their tissues and remain resting. When the seed is sown, the infection in the new plant will come from the infected seed. Such is the case of the common bean blight (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) and of the angular leaf spot of cucurbits (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). Other bacteria infect seeds at a superficial level or are mixed with them, such as: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in chilies, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in melons, and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage, without this meaning that the seeds transmit the disease to the next generation

con síntomas como: marchitez, pudriciones suaves, manchas en los distintos órganos vegetales; además, se asocian con las estructuras vegetales de reproducción sexual y asexual.

Se considera que las bacterias son transmitidas por semilla cuando son llevadas sobre o dentro de ésta, penetran en sus tejidos y permanecen en estado de reposo, de modo que al sembrar las semillas, la infección en la nueva planta provendrá de la semilla infectada; es el caso del tizón común del frijol (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) y de la mancha angular de las cucurbitáceas (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*). Otras bacterias infestan a las semillas a nivel superficial ó están mezcladas con ellas, como: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en chile, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* en melón y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en col, sin que esto signifique que las semillas transmitan la enfermedad a la siguiente generación de plantas, aunque puede favorecer su desarrollo en las áreas de siembra.

Las bacterias penetran a las semillas a través de la pared del ovario, del pericarpio y de los tegumentos, es el caso de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en frijol; por medio de la testa como *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* en chícharo; por los haces vasculares como *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en frijol; ó a través del micropilo como *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* en melón. Además, las bacterias pueden localizarse en el embrión como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate; en el endospermo como *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* en melón; en la testa, en el pericarpio o en el rafe como *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* en chícharo.

La infección bacteriana puede ocurrir del nivel intra embrional a la infección sistémica o a las infecciones locales; o bien del nivel extra embrional a las lesiones locales como *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en frijol. En calabaza, *Xanthomo-*

of plants, although it could favor its development in the planting areas.

Bacteria penetrate seeds through the ovary wall, the pericarp, and the teguments, as in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in beans; through the testa, as in *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in peas; through vascular bundles, as in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in beans; or through the micropile as in *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in melons. Bacteria can also be found in the embryo, as in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes; in the endosperm, as in *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in melons; in the testa, in the pericarp or in the raphe, as in *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in peas.

Bacterial infection can take from an intra-embryo level to a systemic or local level. Or it could take place from the extra-embryo level to local lesions such as *Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli* in beans. In squash, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* reaches the seeds via the peduncle, silique and funiculus. In peas, the invasion of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* occurs via sepals and via the peduncle; it migrates to the seed from the pod via the funiculus and to the micropyle in the seed coat. There is a systemic invasion in the tomato or potato seeds by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in chilies, and *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* in cucumber. On the other hand, bacteria cause spots in pea seeds by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*; and alter the viability and vigor of bean seeds by *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*.

There are epidemiological implications of bacteria related to seeds, which can favor the development of diseases when planting infected seeds, due to the following characteristics: a) prolonged transmission, b) protected form of survival and potential primary inoculant, c) long-

*nas campestris* pv. *campestris* llega a la semilla por el pedúnculo, silicua y funículo. En chícharo la invasión por *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* ocurre a través de sépalos y del pedúnculo; migra a la semilla desde la vaina por el funículo y hasta el micropilo en la cubierta de la semilla. Hay invasión sistémica en la semilla de tomate o papa por *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en chile y *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* en pepino. Por otra parte, las bacterias son causantes del manchado de semillas de chícharo por *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*; de la alteración de la viabilidad y del vigor de las semillas de frijol por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*.

Existen implicaciones epidemiológicas de las bacterias asociadas a semillas, las cuales pueden favorecer el desarrollo de enfermedades al sembrar semillas infectadas, por los siguientes atributos: a) transmisión prolongada, b) forma de supervivencia protegida e inóculo primario potencial, c) diseminación a grandes distancias y dispersión al azar, d) selección preferencial a cepas ó razas de patógenos y e) posibilidad de infecciones sinérgicas. En muchas ocasiones las bacterias asociadas a semillas no se pueden detectar a simple vista; por ello cuando se moviliza semilla de una región a otra, sin que se someta el material a cuarentena y sin que se efectúen las pruebas de sanidad correspondientes, se propicia el desarrollo de nuevas enfermedades.

Dichas enfermedades pueden ser explosivas y severas, si los hospedantes son susceptibles y si las condiciones ambientales son favorables. Por ejemplo, en California se ha calculado que con una población de  $1 \times 10^7$  ufc de *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* por g de semilla de zanahoria, es suficiente para iniciar una epifita, cuando prevalecen las condiciones ambientales adecuadas como lluvias y temperaturas de 25 a 30 °C.

Cuando se detecta la presencia de la enferme-

distance dissemination and spreading at random, d) preferential selection to strains or races of pathogens, and e) possibility of synergic infections. Many times, bacteria related to seeds cannot be seen by the naked eye, and therefore, moving seed from a region to another without the material undergoing quarantine and without the adequate sanitary tests promotes the generation of new diseases.

These diseases may be explosive and sever if hosts are susceptible and if environmental conditions are favorable. For example, estimates in California concluded that with a population of  $1 \times 10^7$  ufc of *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* per g of carrot seeds, it is enough to start an epiphyte, when environmental conditions are adequate, such as rainfall and temperatures between 25 and 30 °C. When the presence of a disease is found in a critical time period, adequate control measures must be taken. For the control of bacteria transmitted by seeds, fields must be inspected in order to determine the health of the plots, especially when there are conditions that promote the development of diseases that can drastically affect seed production.

#### BACTERIA ASSOCIATED TO CEREAL SEEDS

Cereals (from Latin *Ceres*, name of the goddess of agriculture), are very important crops for humanity; approximately 75 % of the total of the surface planted in the world is used for their production. Cereal seeds are a direct source of two thirds of the energy and protein required by humans. Its nutritional value is expressed by its high content of carbohydrates, mostly in the form of starch, as well as proteins, lipids, mineral salts and fibers.

Many different species and varieties of cereals are grown throughout Mexico, maize (*Zea mays* L.) being the planted cereal that covers the largest



dad en un período crítico, tendrán que tomarse las medidas de control pertinentes. Para el control de las bacterias transmitidas por semillas se deben efectuar inspecciones de campo para determinar la sanidad de los lotes, especialmente cuando existan condiciones que propicien el desarrollo de enfermedades que puedan afectar drásticamente la producción de semilla.

### **BACTERIAS ASOCIADAS A SEMILLAS DE CEREALES**

Los cereales (del latín *Ceres*, nombre de la diosa de la agricultura), son cultivos muy importantes para el hombre; aproximadamente el 75 % del total de la superficie cultivada del mundo está destinada a la producción de éstos. Las semillas de los cereales constituyen la fuente directa de dos tercios de la energía y proteína requerida por el hombre. Su valor alimenticio se expresa por su alto contenido de hidratos de carbono, principalmente en forma de almidón; además de: proteínas, lípidos, sales minerales y fibras.

En México se cultivan diferentes especies y variedades de cereales a lo largo del territorio nacional, el maíz (*Zea mays* L.) es el cereal cultivado que ocupa la mayor superficie a nivel nacional, seguido por el trigo (*Triticum aestivum* L.), el sorgo (*Sorghum vulgare* L.), la cebada (*Hordeum vulgare* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.) y la avena (*Avena sativa* L.).

Existen diversas enfermedades bacterianas con potencial para su transmisión por semilla, asociadas a cereales de importancia económica en ciertas regiones y latitudes del mundo; las cuales no se encuentran reguladas para evitar su introducción en México o se encuentran en este proceso de regulación. Dentro de este contexto, se han citado infecciones de etiología bacteriana por ejemplo: *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* en ave-

surface in the country, followed by wheat (*Triticum aestivum* L.), sorghum (*Sorghum vulgare* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.), rice (*Oryza sativa* L.), and oat (*Avena sativa* L.).

Several bacterial diseases have the potential of being transmitted through seeds, related to cereals of economic importance in certain regions and latitudes of the world, which are not regulated to avoid their introduction into Mexico, or are in this regulation process. Within this context, infections of bacterial etiology have been cited, such as *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* in oat and sorghum; *Xanthomonas translucens* pv. *undolosa* in wheat and barley; *Xanthomonas translucens* pv. *hordei* in barley; *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Dickeya zae* in maize; *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in oat, maize, barley, sorghum, wheat, and rice; *Erwinia rhapontici* in wheat; *Burkholderia andropogonis* and *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* in sorghum, maize, and others.

In Mexico, in a recent study found that *Burkholderia gladioli*, *Pantoea ananatis*, and *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causes foliar spots in a maize cultivar in the state of Veracruz. However, the potential for transmission by seeds of these bacteria was not established, although there was information on the sporadic appearance of these symptoms in different growing cycles. It is known that *Burkholderia gladioli* is related to rice and oat seeds, that *Pantoea ananatis* is related to onion seeds, and *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* is to maize seeds.

The economic importance of these diseases varies between regions, countries, and continents. The transmission and spreading of bacteria via seeds, and the high risk it represents in the re-emergence of bacterial seeds or in their introduction to new crop-producing areas, highlights the importance of having faster and more efficient

na y sorgo; *Xanthomonas translucens* pv. *undolosa* en trigo y cebada; *Xanthomonas translucens* pv. *hordei* en cebada; *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Dickeya zeae* en maíz; *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* en avena, maíz, cebada, sorgo, trigo y arroz; *Erwinia rhapsodica* en trigo; *Burkholderia andropogonis* y *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola* en sorgo y maíz, entre otras.

En México, en un estudio reciente, se detectaron *Burkholderia gladioli*, *Pantoea ananatis* y *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causando manchas foliares en un cultivar de maíz en el estado de Veracruz. Sin embargo, no se determinó el potencial de transmisión por semilla de estas bacterias, pero se informó de la aparición esporádica de estos síntomas en diferentes ciclos de cultivo. Se conoce que *Burkholderia gladioli* se asocia a semillas de arroz y avena, *Pantoea ananatis* a semillas de cebolla y *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* a semillas de maíz.

La importancia económica de estas enfermedades varía entre región, país y continente. La transmisión y dispersión de bacterias por medio de la semilla, el alto riesgo que representa en la re-emergencia de enfermedades bacterianas o en la introducción de éstas a nuevas áreas de cultivo, resalta la importancia de contar con esquemas y protocolos de detección más rápidos y eficientes. Se considera que es muy difícil y poco probable determinar si un lote de semilla está completamente libre de bacterias que las infesten o las infecten. Sin embargo, si es posible certificar que un lote de semillas contiene un umbral por debajo de un nivel específico de infección, mediante el análisis de semillas y la inspección en el campo donde se producen. Lo anterior ha originado que en los últimos años se enfatice en el desarrollo de nuevos protocolos de detección con el objetivo de incrementar la sensibilidad y selectividad de diferentes técnicas, tanto

detección schemes and protocols. Determining whether a seed lot is completely free of bacteria that infest or infect them is considered very difficult and improbable. However, it is possible to certify that a seed lot contains a threshold below a specific level of infection by means of seed analysis and the inspection of fields in which they are produced. This has led, in recent years, to emphasizing the development of new detection methods with the aim of increasing the sensitivity and selectivity of different dependant and independent planting techniques, to determine the safety of seeds.

It is considered necessary that in the future the knowledge of the seed-bacteria interaction must be deepen and increased, mainly in the biology of seed infections by bacteria, in the process of colonization, and its epidemiology, as well as in the development of new tests in seed, combining different technologies, understanding the infection thresholds in relation to the sample size and the efficiency of these plant health tests.

## BACTERIA RELATED TO VEGETABLE SEEDS

In recent years, vegetable cultivation has become considerably important worldwide. During the period from 2000 to 2006, the Mexican countryside produced an average of 9.33 million tons; from 2006 to 2010, the volume grew 8.6%, which contemplates the intensive use of inputs, particularly for the production of seeds.

Mexico's privileged geographic position gives the country a diversity of climates and ecosystems that not only favor it for the production of vegetables all year long, but also to produce approximately 70 varieties. The different vegetables produced in Mexico are classified into 7 groups, some of the most important of which are: seeds-grains (peas and green beans), fruits (tomatoes,

de cultivo dependiente como independiente, para determinar la sanidad de semillas.

En el futuro, se considera necesario profundizar e incrementar el conocimiento de la interacción semilla-bacteria, principalmente en la biología de la infección de semilla por bacterias, en el proceso de colonización y su epidemiología. Así como en el desarrollo de nuevas pruebas en semillas combinando diferentes tecnologías, entender los umbrales de infección en relación al tamaño de muestra y la eficiencia de estas pruebas fitosanitarias.

### **BACTERIAS ASOCIADAS A SEMILLAS DE HORTALIZAS**

En los últimos años, el cultivo de las hortalizas ha cobrado considerable importancia a nivel mundial. Durante el periodo 2000-2006, el campo mexicano produjo en promedio 9.33 millones de toneladas; entre el 2006 y 2010 el volumen creció 8.6 por ciento, lo que contempla el uso intensivo de insumos, en particular para la producción de semillas.

La privilegiada posición geográfica que tiene México, le permite contar con una riqueza de climas y ecosistemas que no solo le favorecen para producir hortalizas durante todo el año, sino también para cultivar alrededor de 70 variedades. Las diferentes hortalizas que se cultivan en México se clasifican en 7 grupos, entre las que destacan: semillas-granos (chicharo y ejote), frutos (tomates, chiles berenjena, sandía, melón y chayote), bulbos (ajo, cebolla, puerro y poro), hojas (col de bruselas, brócoli, espinaca, acelga y lechuga), tallos tiernos (achicora, endibias, escarola, apio y espárrago), pepónidas (calabacín, calabaza, pepino y chilacayote), raíces (zanahoria, rábano, remolacha de mesa, betabel, papas y papanabo) y flores comestibles (alcachofa, flor de calabaza, brócoli y coliflor).

Una de las características que tienen en común

chilies, eggplants, watermelon, melons, and y chayote), bulbs (garlic, onions, and leeks), leaves (Brussels sprouts, broccoli, spinach, chard, and lettuce), tender stems (chicory, endives, celery, and asparagus), pepos (zucchini, pumpkin, cucumber, and black-seed squash), roots (carrots, radishes, beets, beetroot, potatoes, and turnips), and edible flowers (artichokes, pumpkin flower, broccoli, and cauliflower).

One of the characteristics this group of vegetables has in common is that they propagate by botanical seeds, which play a relevant part in the health of the crops. The main form of spreading and survival of most bacteria that affect vegetables is via the seeds, therefore, before its purchase and establishment, one must be sure that it has undergone the highest sanitary controls.

When environmental conditions are not favorable for the growth and reproduction of bacteria, not only does the seed provide protection, but also helps break barriers, both natural and legal, and reach places very far from their place of origin.

It is important to point out that the percentage of transmission by seeds is low, generally fluctuating between 0.1 and 5 %. However, when environmental conditions are adequate for the bacteria, one infected seed in a lot of 10,000 is enough to cause losses of 100 % if the adequate sanitary measures are not taken. In crops in which there is transplantations and require agricultural practices such as defoliated, removing suckers, trimming, and others, the spreading of pathogens will be favored if a control is not carried out. When infected seeds are established, damages can occur in plantlets or in adult plants, and can manifest themselves as rotting, leaf spots, cankers, scabs, wilting, and overgrowth.

Bacteria that affect vegetables belong to the genera *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Acidovorax*,



este grupo de hortalizas es que se propagan por semilla botánica, la cual tiene un papel relevante en la sanidad de los cultivos. La principal vía de diseminación y sobrevivencia de la mayoría de las bacterias que afectan a las hortalizas es por medio de la semilla; por consiguiente, antes de su compra y establecimiento, se debe tener la certeza de que han pasado por los mayores controles de sanidad.

Cuando las condiciones ambientales no son favorables para el crecimiento y la reproducción de las bacterias, la semilla no solo le brinda protección, sino también les ayuda a romper barreras, tanto naturales como legales, y llegar a lugares muy distantes de su punto de origen.

Es importante señalar que el porcentaje de transmisión de bacterias por semilla es bajo, generalmente oscila entre el 0.1 al 5 %; sin embargo, cuando las condiciones ambientales son propicias para la bacteria, basta una semilla infectada en un lote de 10,000 para causar pérdidas del 100 %, si no se toman las medidas sanitarias adecuadas. En aquellos cultivos donde se hace trasplante y se requieren prácticas agrícolas como: deshojado, deschuponado, podas, entre otras; se favorecerá la diseminación de patógenos si no se efectúa el control. Cuando se establecen semillas infectadas, los daños pueden presentarse desde la plántula hasta la planta adulta y se pueden manifestar como: pudriciones, manchas foliares, tizones, canchales, roñas, marchitamientos y sobrecrecimientos.

Las bacterias que afectan a las hortalizas pertenecen a los géneros: *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Curtobacterium* y *Ralstonia*. Entre las cuales podemos citar:

Semillas-granos (*Pseudomonas syringae* pv. *lisi* y *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*).

Frutos (*Xanthomonas gardneri*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* y *Ralstonia solanacearum*).

*Curtobacterium*, and *Ralstonia*. Among these, we can mention:

Seeds-grains (*Pseudomonas syringae* pv. *lisi* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*).

Fruits (*Xanthomonas gardneri*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Ralstonia solanacearum*).

Bulbs (*Pectobacterium carotovorum*, *Burkholderia cepacia* and *Pantoea ananatis*).

Leaves (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pseudomonas cichorii*).

Tender stems (*Pseudomonas syringae* pv. *apii*).

Pepos (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* and *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*).

Roots (*Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*, *Pectobacterium carotovorum*, and *Xanthomonas beticola*).

Edible flowers (*Dickeya chrysanthemi*).

#### METHODS FOR FINDING BACTERIA IN SEEDS

Due to the international economic importance of the activity of producing seeds, the bacterial diagnose has enormous relevance for the timely production of different species in favorable economic conditions. The analysis of seeds helps to detect adequately the bacteria related to them; treatments help protect them from these pathogens and, in some cases, to eradicate them.

Potentially seeds can transmit any bacterial disease; they generally infest the surface of seeds, yet those that cause vascular or systemic infections frequently infect the covers or internal tissues of the seed. The bacteria that infest seeds can remain alive for a limited amount of time, whereas bacteria present inside seeds are extremely long-lived.

Detecting bacteria is a very important filter, which makes it necessary for the diagnose to include several detection methods with sensitivity and efficiency to determine the presence or absence

Bulbos (*Pectobacterium carotovorum*, *Burkholderia cepacia* y *Pantoea ananatis*).

Hojas (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *Pseudomonas cichorii*).

Tallos tiernos (*Pseudomonas syringae* pv. *apii*).

Pepónidas (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* y *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*).

Raíces (*Xanthomonas hortorum* pv. *carotae*, *Pectobacterium carotovorum* y *Xanthomonas beticola*).

Flores comestibles (*Dickeya chrysanthemi*).

### MÉTODOS DE DETECCIÓN DE BACTERIAS EN SEMILLAS

Debido a la importancia económica internacional del rubro de producción de semillas; el diagnóstico de bacterias tiene gran trascendencia para que la producción de las diferentes especies llegue a buen término y en condiciones económicas favorables. El análisis de las semillas permite la detección oportuna de las bacterias asociadas a ellas; los tratamientos permiten protegerlas de dichos patógenos y, en algunos casos, erradicarlos.

Potencialmente, cualquier enfermedad bacteriana puede ser transmitida por semilla; generalmente las bacterias se encuentran infestando la superficie de las semillas, pero las que causan infecciones vasculares o sistémicas frecuentemente infectan las cubiertas o los tejidos internos de la semilla. Las bacterias que infestan semillas pueden mantenerse vivas durante un periodo de tiempo limitado, mientras que las bacterias presentes en el interior de las semillas son extraordinariamente longevas.

La detección de bacterias representa un filtro muy importante, por ello es necesario que el diagnóstico incluya varios métodos de detección con la sensibilidad y la eficiencia para determinar la presencia o ausencia de bacterias. La detección y diagnóstico de bacterias en semillas es un proceso difícil, ya que en muchas ocasiones se dispone de poca cantidad de semilla para analizar; además, el

de bacteria. The detection and diagnose of bacteria in seeds is a difficult process, since there is often small amounts of seed for analysis. Also, the inoculant is found infesting or infecting the seeds in low amounts; percentages of contaminated seeds are generally 0.1 % or less. Unfortunately, data for many bacteria on the natural inoculant densities in seeds and the numbers of infected seeds necessary for the development of the disease in the field, are not available.

Some of the methods used include traditional techniques such as the isolation of bacteria in *in vitro* cultures, and their physiological and biochemical characterization. Obtaining bacteria from seeds depends on their percentage of recovery, their release, and on the reduction to a minimum of saprophytic organisms. The isolation methods must focus on achieving the growth of the bacteria, even with a reduced number of bacterial cells. To obtain them, different techniques are used, including sterile distilled water, salt solutions at different concentrations, buffer solutions enriched with culture medium and detergents. Once the strains are isolated, the physiological and biochemical characterizations can be carried out.

Very sensitive methods have currently been carried out that greatly help detect bacteria, even under low concentrations, such as serological methods, particularly ELISA and molecular techniques such as PCR, with the sequencing of the resulting product.

The ELISA (or Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) technique, is based on the direct or indirect detection of an antigen on a solid phase, using proteins known as antibodies, which, in the presence of a specific substrate, produce a colored reaction, which can be measured using a spectrophotometer.

This technique is reliable and quick in detecting bacteria, due to its high degree of sensitivity, since its detection limit is 10 bacteria for every 10 g of sample. However, the technique must be carried

inóculo se encuentra en bajas cantidades infestando o infectando la semilla, generalmente los porcentajes de semilla contaminada son de 0.1 % o menos. Desafortunadamente, para muchas bacterias, los datos sobre las densidades de inóculo natural en las semillas y el número de semillas infectadas necesario para el desarrollo de la enfermedad en campo no están disponibles.

Dentro de los métodos utilizados se encuentran las técnicas tradicionales como son el aislamiento de las bacterias en cultivo *in vitro* y su caracterización fisiológica y bioquímica. La obtención de las bacterias a partir de semillas depende del porcentaje de recuperación de las mismas, de su liberación y de la reducción al mínimo de organismos saprófitos. Los métodos de aislamiento se deben enfocar en lograr el crecimiento de la bacteria aun teniendo un reducido número de células bacterianas. Para la obtención de las células bacterianas se utilizan diferentes técnicas como: agua destilada estéril, soluciones salinas a diferentes concentraciones, soluciones amortiguadoras enriquecidas con medio de cultivo y detergentes. Una vez aisladas las cepas bacterianas se realiza la caracterización del perfil fisiológico y bioquímico.

Actualmente se han desarrollado métodos muy sensibles, que ayudan en gran medida a la detección de bacterias aunque estas se encuentren en bajas concentraciones, como los métodos serológicos, particularmente ELISA y las técnicas moleculares como la PCR, con la secuenciación del producto resultante.

La técnica de ELISA (Ensayo de inmunoadsorción con enzimas conjugadas), se basa en la detección directa o indirecta de un antígeno sobre una fase sólida, mediante proteínas conocidas como anticuerpos, que en presencia de determinado sustrato producen una reacción de color, que puede ser medida con un espectrofotómetro. Esta técnica es confiable y rápida para la detección de bacterias debido al alto grado de sensibilidad que posee, pues

out carefully, since reactions may take place with plant residues, saprophytic bacteria, and residues of agrochemicals for treating seeds, which could give false positive results.

PCR (Polymerase Chain Reaction) is one of the most widely used techniques nowadays, with an analysis from a DNA sample, which contains the sequence to be amplified. The amount of DNA needed to carry out this amplification is very small, hence its main advantage. In the detection of bacterial PCR in seeds, the DNA sample must be purified or the DNA extraction must be carried out from the seed sprout or the isolated bacteria in a pure culture. This is in order to avoid that the reaction can be inhibited by compounds such as starch from the seed.

#### REGULATION IN THE MOVEMENT OF SEED EXPORTS

The applicable plant health legislation is especially transcendent in the normative food and agriculture framework, and it becomes a basic condition for the commercialization of Mexican agricultural products. The measures to protect plant health include applying the plant health measures of Laws, Regulations, Prescriptions, and Procedures established by a particular country to protect the lives of people, animals, and plants from any pollutant or pathogenic organism.

The International Plant Protection Convention (IPPC) is an international plant health agreement with 173 member countries to date, the goal of which is to protect planted and wild plants, preventing the introduction and spreading of pests. The work program of the IPPC Secretariat focuses on the creation of International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM), the exchange of official information, and the creation of capability and technical assistance. These ISPM are created as part of a worldwide policy and technical assistance

su límite detección es de 10 bacterias por gramo de muestra. Sin embargo, durante la realización de la técnica se deben tener precauciones, ya que pueden presentarse reacciones con bacterias saprófitas y residuos vegetales y de los agroquímicos con los que vienen tratadas las semillas, lo que puede dar resultados falsos positivos.

La PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) es una de las técnicas más empleadas en la actualidad, con análisis a partir de una muestra de ADN, que contiene la secuencia que se desea amplificar. La cantidad de ADN necesaria para realizar tal amplificación es muy pequeña, de allí su principal ventaja. En la detección por PCR de bacterias en semilla, la muestra de ADN debe ser purificada o bien, realizar la extracción de ADN a partir del germinado de la semilla o de la bacteria aislada y en cultivo puro. Lo anterior para evitar que la reacción pueda ser inhibida por compuestos como el almidón procedente de la semilla.

### **REGULACIÓN EN EL MOVIMIENTO DE EXPORTACIÓN DE SEMILLAS**

La legislación aplicable en materia fitosanitaria tiene especial transcendencia en el marco normativo agroalimentario y se convierte en un condicionante básico para la comercialización de los productos agrícolas mexicanos. Las medidas para proteger la sanidad de los vegetales, incluyen aplicar las medidas fitosanitarias de Leyes, Reglamentos, Prescripciones y Procedimientos establecidos por un determinado país para proteger la vida de las personas, animales y plantas, ante cualquier contaminante u organismo patógeno.

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es un acuerdo internacional de sanidad de las plantas, que cuenta a la fecha con 173 países miembros cuya finalidad es proteger las plantas cultivadas y las silvestres, previniendo la in-

program in matters of quarantine carried out by the FAO. All IPPC signing countries are obliged to have a national phytosanitary certification system, according to indications specified in the Text of the Convention and in the ISPM No. 7 “System of Phytosanitary Certification.” ISPM No. 12 “Phytosanitary Certificate” was also created, which mentions that the purpose of the *Phytosanitary Certificate (PC)* is to indicate that the shipments comply with the phytosanitary requirements established by importing countries, and must be issued to this end.

The PC is an official document issued by SAGARPA, which confirms the compliance of the legal orders in matters of Plant Health, which the exports of plants, their products and subproducts adhere to when being a possible phytosanitary risk for the importing country. This PC is issued after verifying the place of origin of the product. Official staff or a Verification Unit can carry this out. The verification consists in confirming that the shipment complies with the phytosanitary requirements established by the importing country, which could include the revision of documents, sampling, and lab diagnosis, the results of which must be grounded in a verification verdict, which, along with the corresponding payment of rights, are the basis for the issuance of the PC.

To know the phytosanitary requirements to be complied in order to ship plant materials, their products and subproducts, the legislation of the importing country must be consulted, and verify that it is established in an Work Plan or Agreement, Addendum, Import Manuals or in import permits. In Mexico, bacterial pathogens are regulated to prevent their introduction to the country by Mexican Official Regulations, such as NOM-013-FITO-1995 in rice for pathogens *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*, NOM-017-FITO-1995 in wheat for

roducción y la propagación de plagas. El programa de trabajo de la Secretaría de la CIPF se concentra en la elaboración de Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF), intercambio de información oficial, creación de capacidad y asistencia técnica. Estas NIMF son elaboradas como parte de un programa mundial de políticas y asistencia técnica en materia de cuarentena que lleva a cabo la FAO. Todos los países signatarios de la CIPF tienen la obligación de contar con un sistema nacional de certificación fitosanitaria de acuerdo con lo indicado en el Texto de la Convención y la NIMF No. 7 “Sistema de Certificación Fitosanitaria”. También se elaboró la NIMF No. 12 “Certificados fitosanitarios”, la cual menciona que la finalidad del *Certificado Fitosanitario (CF)* es indicar que los envíos cumplan con los requisitos fitosanitarios establecidos por los países importadores y deberán expedirse exclusivamente con este fin.

El CF es un documento oficial expedido por la SAGARPA, que constata el cumplimiento de las disposiciones legales aplicables en materia de Sanidad Vegetal a que se sujeta la exportación de vegetales, sus productos y subproductos, que representen un riesgo fitosanitario para el país importador. Este CF se expide previa verificación en el lugar de origen del producto, la cual se puede realizar por el personal oficial o por una Unidad de Verificación. La verificación consiste en constatar que el embarque cumple con los requisitos fitosanitarios establecidos por el país importador que puede incluir la revisión documental, muestreo y diagnóstico de laboratorio, cuyos resultados deben quedar asentados en un dictamen de verificación; que en conjunto con el pago de derechos correspondiente, son la base para la emisión del CF.

Para conocer los requisitos fitosanitarios que deben de cumplir los envíos de productos vegetales, sus productos y subproductos, se debe consultar la legislación del país importador y revisar si estos están establecidos en un Acuerdo o Plan de

pathogens *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, and NOM-018-FITO-1995 in maize for *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Pantoea stewartii*, and *Pseudomonas andropogonis*.

~~~~~End of the English version~~~~~

Trabajo, Addendum, Manuales de importación o en los permisos de importación.

En México, los patógenos bacterianos se encuentran regulados para prevenir su introducción al país a través de Normas Oficiales Mexicanas, por ejemplo la NOM-013-FITO-1995 en arroz para los patógenos *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. La NOM-017-FITO-1995 en trigo para los patógenos *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* y la NOM-018-FITO-1995 en maíz para *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Pantoea stewartii* y *Pseudomonas andropogonis*.

## LITERATURA CITADA

- DOF. 2011. Ley Federal de Sanidad Vegetal (última reforma). Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. México. <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/117.pdf> (consulta 29 de mayo, 2013).
- FAO. 2012. Nuevo Texto Revisado de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (1997). Roma. IPPC. 2011. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) 7 Phytosanitary Certification System (1997). International Plant Protection Convention (IPPC). <http://www.ippc.int/index.php?id=13399&L=1> (consulta 29 de mayo, 2013).
- Gijón-Hernandez A, Téliz-Ortíz D, Mejía-Sánchez D, De la Torre-Almaraz R, Cardenas-Soriano E, De León C, and Mora-Aguilera A. 2011. Leaf stripe and stem rot caused by *Burkholderia gladioli*, a new maize disease in Mexico. *Journal of Phytopathology* 159 (5):377-381
- Gitaitis R, and Walcott R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 45: 371-397.
- Hsieh TF, Huang HC, and Erickson RS. 2006. Bacterial wilt of common bean: effect of seedborne inoculum on disease



- incidence and seedling vigour. *Seed Science and Technology* 34: 57-67.  
<http://repiica.iica.int/docs/bv/agrin/b/f03/XL2000600205.pdf>.
- IPPC. 2011. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) 7 Guidelines for Phytosanitary Certificate (2001). International Plant Protection Convention (IPPC). <http://www.ippc.int/index.php?id=13399&L=1> (consulta 29 de mayo, 2013).
- IPPC. 2011. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) 12 Guidelines for Phytosanitary Certificate (2001). International Plant Protection Convention (IPPC). <http://www.ippc.int/index.php?id=13399&L=1> (consulta 29 de mayo, 2013).
- Janse JD. 2005. *Phytobacteriology: principles and practice*. CABI. Oxfordshire, UK. 360 p.
- Koike ST, Gladders P, and Paulus AD. 2007. *Diseases of vegetable crops. A color handbook*. Academic Press. San Diego, CA, USA. 400 p.
- Mbega ER, Wulff EG, Mabagala RB, Adriko J, Lund OS, and Mortensen, CN. 2012. Xanthomonads and other yellow-pigmented Xanthomonas-like bacteria associated with tomato seeds in Tanzania. *African Journal of Biotechnology* 11: 14303-14312.
- Mezzalama M. 2010. *Sanidad de Semilla: Reglas y Normas Para el Desplazamiento Seguro de Germoplasma*. CIMMYT. Segunda Ed. México, D. F. México. 20 p.
- Munkvold, G.P. 2009. Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology* 47: 285-311.
- Navarrete M R. 2000. Patología de semillas. In: Fuentes, DG. y Castillo PG. (eds.). *Fitosanidad de cultivos tropicales*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. pp.155- 161.
- Rodríguez M ML. 2006 *Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas*. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 146 p.
- Saettler AW, Schaad NW, and Roth DA. 1989. *Detection of Bacteria in Seed and other Planting Material*. APS Press. St. Paul, MN, USA. 122 p.
- Schaad N, Jones J, and Chun J. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third ed. APS Press, St. Paul, MN, USA. 373 p.
- Schaad NW. 1982. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. *Plant Disease* 66: 885-890.
- Zillinsky F. 1984. *Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño*. CIMMYT. El Batán, México. 141 pp.