

## NOTA TÉCNICA

# PRIMER REPORTE DE LA MANCHA BACTERIANA EN PARCHITA (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) EN VENEZUELA

Yoleidy Escalona<sup>1</sup> y Nancy Contreras<sup>1</sup>

### RESUMEN

El cultivo de la parchita maracuyá es afectado por diversos tipos de enfermedades. La planta, en la localidad de Aroa (estado Yaracuy) ha presentado daños en forma de manchas húmedas en las hojas. Con la finalidad de determinar la identidad del agente causal de esta enfermedad se llevó a cabo el presente trabajo. Hojas sintomáticas fueron llevadas al laboratorio, se desinfectaron con NaOCl al 2% y se obtuvo el aislamiento de una bacteria color amarillo pálido en los medios Agar nutritivo (AN) y extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC), la cual fue inoculada en plantas sanas de parchita. Una vez reproducidos los síntomas 15 días después de la inoculación, se procedió al reaislamiento obteniéndose colonias idénticas a las originales y se realizó la identificación de la bacteria mediante características culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Se encontró una bacteria con forma de bastón, Gram negativa, aeróbica, con reacción positiva a catalasa, hidrólisis del almidón, producción de H<sub>2</sub>S, crecimiento a 35°C, hidrólisis de esculina, licuefacción de gelatina y digestión de proteínas; con reacción negativa al bacteriofenol rojo dextrosa agar, oxidasa, producción de ureasa y reducción de nitratos; produjo ácidos a partir de arabinosa, glucosa, manosa, celobiosa, fructosa, galactosa y trehalosa; creció en los medios SX y Tween. Todas estas características permitieron identificar el agente causal como *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Gonçalves & Rosato, constituyendo este trabajo el primer reporte de la bacteria en el cultivo de la parchita en Venezuela.

**Palabras clave adicionales:** Bacteriosis, etiología, maracuyá, *Xanthomonas*

### ABSTRACT

#### First report of bacterial blight of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) in Venezuela

The cultivated passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) is affected by several kinds of diseases. At the locality of Aroa, Yaracuy State, the plant has shown damages such as leaf spots, and this work was carried out to determine the identity of the causal agent of this disease. Symptomatic leaves were collected and transferred to the laboratory, disinfected with 2 % NaOCl and the isolation of a pale yellow bacteria was obtained on nutrient agar (NA) and yeast extract-dextrose-calcium carbonate (YDC), which was inoculated into healthy plants of passion fruit. Once reproduced the symptoms, 15 days after inoculation, we proceeded to re-isolation obtaining colonies identical to the original ones, and the identification of the bacteria was obtained by its cultural, morphological, physiological, and biochemical characteristics. The isolated bacterium was Gram negative, with a rod shape, aerobic; with positive reaction for catalase, starch hydrolysis, production of H<sub>2</sub>S from cysteine, growth at 35 °C, esculin hydrolysis, gelatin liquefaction and protein digestion; with negative reaction for red phenol dextrose agar, oxidase, urease production, and nitrate reduction. It showed acid production from carbohydrates arabinose, glucose, mannose, cellobiose, fructose, galactose and trehalose. The isolate grew in the cultures Tween and SX. All these characteristics identified the causal agent as *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) Gonçalves & Rosato, being this the first report of this bacterium causing bacterial blight in passion fruit in Venezuela.

**Additional key words:** Bacterial disease, etiology, maracuyá, *Xanthomonas*

### INTRODUCCIÓN

La parchita maracuyá, un frutal perteneciente a la familia Passifloraceae, representa un cultivo típico de países de clima tropical, y dentro de

éstos Venezuela ocupa uno de los primeros lugares como productor a nivel mundial (Pinto et al., 2003).

La planta puede verse afectada por diversos tipos de patógenos, y para el desarrollo de las

---

Recibido: Mayo 13, 2010

Aceptado: Febrero 7, 2011

<sup>1</sup> Posgrado de Fitopatología, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo 400. Barquisimeto, Venezuela. e-mail: yoleidyescalona@ucla.edu.ve; ncontreras@ucla.edu.ve

estrategias de control es necesario realizar estudios en cuanto a la identificación y caracterización del agente causal de la enfermedad en las regiones donde ésta se presente.

En la localidad de Aroa (estado Yaracuy) se han presentado daños tales como manchas húmedas en las hojas de este cultivo. Con la finalidad de determinar la identidad del agente causal del daño, se llevó a cabo el presente trabajo mediante la colecta de hojas afectadas y posterior estudio de este material en condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Hojas sintomáticas de parchita con manchas dispersas en toda la hoja fueron colectadas en una finca de Aroa y procesadas en el laboratorio de Bacteriología de los Posgrados de Agronomía de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA) para el diagnóstico e identificación del agente causal. Para el aislamiento del presunto patógeno, las muestras identificadas para el diagnóstico como P-0185 fueron desinfectadas con NaOCl al 2 %, lavadas tres veces en agua destilada estéril (ADE) y transferidas luego al medio agar nutritivo (AN) de composición (3 g extracto de carne, 5 g de peptona y 15 g de agar), por el método de dilución en serie, esparciendo 0, 1 mL de las diluciones  $10^5$  a  $10^6$  con una varilla de vidrio estéril para la obtención de colonias individuales. Las cápsulas se incubaron a temperatura ambiente (aproximadamente 24 a 26 °C) en posición invertida y se esperó hasta la formación de las colonias. Se realizaron pruebas presuntivas, en las cuales se usó KOH al 3 % para determinar si eran Gram (-) ó Gram (+) (Suslow et al., 1982) y la tinción con rojo congo para observar en el microscopio óptico (100X) la forma de la célula bacteriana. Para la obtención del cultivo puro la colonia bacteriana fue repicada en el medio extracto de levadura, dextrosa, carbonato de calcio (YDC) de composición (10 g extracto de levadura, 20 g dextrosa (glucosa), 20 g carbonato de calcio y 15 g de agar) para obtener a las 24 a 48 horas. El cultivo puro se utilizó para la realización de las pruebas de patogenicidad y la identificación del patógeno (French y Hebert, 1980).

La preparación del inóculo fue realizado a partir de cepas bacterianas puras desarrolladas en AN de 24-48 horas de crecimiento. Se prepararon

suspensiones con agua destilada estéril con una concentración de  $10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>, correspondiente al tubo N° 4 según la escala de McFarland (Barret, 1975). Para la inoculación se utilizaron plantas provenientes de semillas de frutos sanos de parchita, las cuales fueron sembradas en bolsas de polietileno de 2 kg de capacidad, conteniendo una mezcla de sustrato preparado con tierra negra y concha de arroz en proporción 2:1, respectivamente, y esterilizado con vapor. Se inocularon plantas de 60 días de edad con la cepa bacteriana. Se utilizaron los métodos de aspersión en las hojas con heridas y sin heridas, el primero consistió en realizar pequeñas heridas a las hojas con la aguja de una jeringa y luego asperjar con la suspensión del inóculo tres hojas por cada planta. Se dejaron tres plantas testigo las cuales fueron inoculadas de la misma manera pero con ADE. Las plantas se mantuvieron en cámara húmeda pre-inoculación por 48 horas y posterior a la inoculación por 72 horas, para lo cual se utilizó una bolsa plástica transparente, con una armadura hecha de alambre y mantenidas en umbráculo a una temperatura de 27 °C y 68 % de HR en promedio. Las plantas se asperjaron con agua dos veces al día y se realizaron observaciones diariamente hasta que se presentaron los síntomas. Posteriormente se aisló la bacteria y se realizaron pruebas para corroborar que se trataba de la misma bacteria que fue inoculada. Kososki et al. (2008) siguieron metodologías y condiciones en las pruebas de patogenicidad similares a las usadas en este experimento.

Para la identificación y caracterización del género y especie de la bacteria se realizaron observaciones morfológicas y fueron estudiadas las características culturales. Igualmente, fueron realizadas pruebas bioquímicas y fisiológicas de acuerdo a metodologías recomendadas (Holt et al., 1994; Schaad et al., 2001).

La evaluación de características culturales se realizó luego de 24 horas, a partir de colonias bacterianas puras en los medios de cultivo AN y YDC. Se observaron características de borde, brillo, elevación, consistencia y color de las cepas individuales (Schaad et al., 2001).

Las características morfológicas fueron determinadas en colonias de 24 a 48 horas de crecimiento. Se procedió a observar en el microscopio óptico (100X) la forma de la célula bacteriana mediante la tinción con rojo congo

(Schaad et al., 2001). Para la determinación de las características fisiológicas y bioquímicas, se utilizaron diferentes pruebas tales como: KOH al 3 %, prueba de Hugh y Leifson (requerimiento de oxígeno), bactotiglicolato, bactofenol rojo dextrosa agar, oxidasa, catalasa, hidrólisis de almidón. Producción de H<sub>2</sub>S, crecimiento a 35 °C, producción de ureasa, digestión de las proteínas, licuefacción de la gelatina, hidrólisis de esculina, producción de ácidos a partir de carbohidratos, reducción de nitratos, tolerancia de la bacteria a NaCl (0-5 %). Se determinó la producción de ácidos a partir de arabinosa, glucosa, manosa, celobiosa, fructosa, galactosa, trehalosa. Finalmente se realizaron pruebas de crecimiento en los medios semiselectivos SX y Tween (Klement et al., 1990; Holt et al., 1994; Schaad et al., 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento del patógeno, pruebas presuntivas y obtención del cultivo puro

El aislamiento puro obtenido a partir de las manchas en hojas de parchita fue un crecimiento bacteriano de color amarillo en el medio YDC y color crema amarillento en AN (Figuras 1A, 1B), el cual al realizarse las pruebas presuntivas resultó Gram negativo (positivo al KOH 3 %) y con células en forma de bastón. Luego, se procedió a la inoculación de la bacteria purificada en plantas de parchita.

### Pruebas de patogenicidad

La bacteria inoculada produjo síntomas de manchas foliares necróticas con un halo amarillo, 15 días después de la inoculación, las manchas se iniciaron en la parte terminal del folíolo y manchas necróticas circulares en toda la superficie del folíolo, éstas se tornaban amarillentas y se desprendían fácilmente de la planta (Figuras 1C, 1D, 1E). Del reaislamiento se obtuvo una colonia bacteriana con las mismas características de la bacteria inoculada cumpliéndose con los postulados de Koch y posteriormente se procedió a la identificación del patógeno.

Los síntomas obtenidos fueron similares a los señalados por otros autores al inocular esta bacteria en plantas de parchita, como manchas pequeñas aceitosas, con halos visibles, que al evolucionar la enfermedad las lesiones se tornaron

castañas y causaban el secamiento de las hojas y defoliación. El comienzo de la mancha en la extremidad de la hoja, también es mencionado por Tassa y Duarte (2002). La mancha foliar necrótica con halo clorótico, en los márgenes de la hoja, también fue obtenida por Pinto et al. (2003), quienes observaron el síntoma en hojas maduras que al coalescer se diseminaba por toda la hoja, secándola y causando posteriormente la muerte y defoliación; además observaron que la bacteria causa daños a los frutos, con manchas verdosas grasientas en la superficie, y cuando penetra produce una fermentación, daño que es de gran importancia debido a que afecta directamente el producto comercial. Por su parte, Liberato y Zerbini (2003) señalan que el patógeno ataca los folíolos de la planta y produce una costra dura en los frutos que impide su comercialización. Los síntomas de mancha necrótica a partir de los márgenes de la hoja, obtenidos en este trabajo, así como clorosis de las hojas han sido similares a los reportados por Miranda (2004). Halfeld-Vieira y Nechet (2006) también obtuvieron los síntomas rápidos de quema foliar al pulverizar las plantas en umbráculo con una suspensión bacteriana ajustada a  $5 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Lopes et al. (2006) utilizaron la misma técnica de inoculación de aspersión por heridas de una suspensión bacteriana de  $10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup> a partir del crecimiento bacteriano en AN en plantas que luego se mantuvieron en umbráculo a una temperatura promedio de 28 °C, similar a los parámetros de este experimento.

### Identificación y caracterización de la bacteria. Características culturales

La colonia bacteriana se observó de color amarillo, circular, mucosoide, brillante, de bordes enteros y superficie lisa en el medio YDC, y colonia crema a amarilla claro en AN. Estas colonias crecieron después de las 24 h de su siembra, coincidiendo con lo descrito para esta bacteria por otros autores (Tassa y Duarte, 2002; Halfeld-Vieira y Nechet, 2006).

### Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas

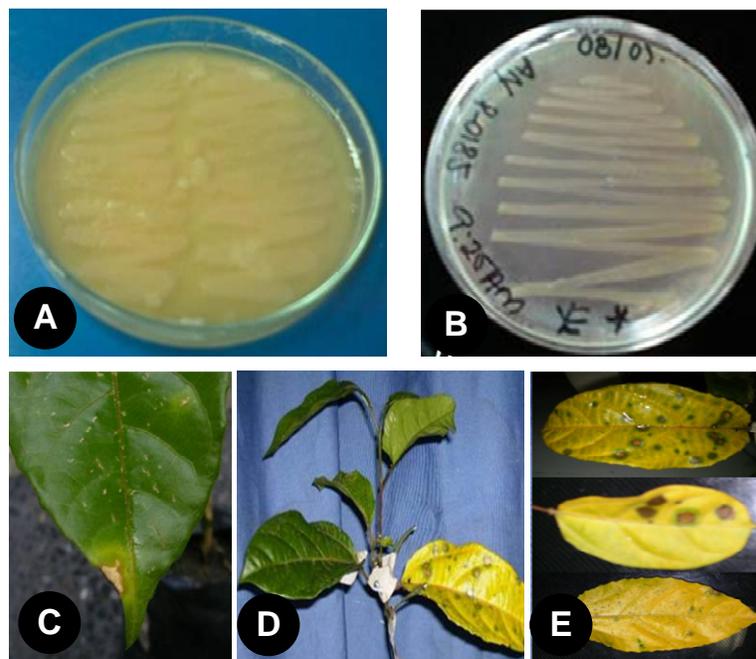
La bacteria presentó forma de bastón en la tinción con rojo congo así como en la tinción de Gram. Resultó positiva en la prueba del KOH al 3 %, bactotiglicolato, hidrólisis de almidón,

producción de H<sub>2</sub>S, licuefacción de la gelatina, prueba de catalasa, y reacción negativa en la prueba de oxidasa, Hugh y Leifson, bactofenol rojo dextrosa agar y reducción de nitratos. Todas las características mencionadas en el Cuadro 1 coinciden con las descritas para el género *Xanthomonas* (Holt et al., 1994; Schaad et al., 2001; Tassa y Duarte, 2002).

El crecimiento de la bacteria a 35 °C fue evidenciada por la turbidez del tubo de YS inoculado, comparado con el testigo. También se observó crecimiento de la colonia en YS agar, la bacteria resultó positiva para digestión de la proteína, hidrólisis de esculina, licuefacción de la gelatina (licuefacción total a los 3 días) y resultó negativa en la producción de la ureasa. En las placas con concentración de NaCl en concentración de 0, 1, 2 y 3 % se observó un desarrollo completo de la bacteria, mientras que a concentraciones de 4 y 5 % se observó poco desarrollo y la bacteria no redujo nitrato. La bacteria fue capaz de formar ácidos después de reducir los carbohidratos arabinosa, glucosa, manosa, fructosa, trehalosa, galactosa y celobiosa, lo cual fue evidenciado por el cambio de color de los tubos inoculados. Estos resultados coinciden con lo señalado por Holt et al. (1994).

Todas las características antes mencionadas (Cuadros 1 y 2) coinciden con las descritas para el género *Xanthomonas* (Holt et al. 1994; Schaad et al., 2001; Vicente et al., 2001). Es una enfermedad de ocurrencia generalizada en Brasil, que ha llegado a limitar la producción en algunas regiones (Kosowski et al., 2008; Nakatani et al., 2009). En otros países de América Latina como Colombia y Ecuador también ha sido señalada (FAO, 1999). Nakatani et al. (2009) mencionan a la mancha bacteriana causada por *Xap* como una de las más importantes de la parchita en la región del Brasil, pudiendo limitar la producción en algunas regiones. El uso de resistencia genética, control químico, conjuntamente con medidas de exclusión, es una de las prácticas de control más recomendadas. Lopes et al. (2006) concluyeron en la importancia del análisis de la diversidad genética entre los aislamientos de *Xap*, ya que está demostrado que hay variabilidad para agresividad o virulencia (Gonçalves y Rosato, 2000).

Para la identificación de la especie (*campestris*) se observó el crecimiento en Sx y Tween; en ambos medios de cultivo la prueba resultó positiva, evidenciado por el crecimiento de la bacteria, con la formación de un aclaramiento alrededor del estriado.



**Figura 1.** Crecimiento bacteriano en los medios YDC (A) y AN (B). Prueba de patogenicidad mostrando manchas iniciales (C y D), y posterior amarillamiento y desprendimiento de la planta (E)

**Cuadro 1.** Características culturales, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la bacteria aislada

Prueba	Reacción	Prueba	Reacción
Forma de la célula bacteriana	Bastón	Producción ureasa	-
KOH al 3 %	+	Crecimiento a 35 °C	+
Bactiotiglicolato	+	Tolerancia al NaCl:	
Hugh y Leifson	-	0-3 % (buen crecimiento)	+
Bactofenol rojo dextrosa agar	-	4-5 % (poco crecimiento)	+/-
Oxidasa	-	Producción de ácidos a partir de:	
Catalasa	+	Arabinosa	+
Hidrólisis del almidón	+	Glucosa	+
Producción de H <sub>2</sub> S	+	Manosa	+
Digestión de proteínas	+	Celobiosa	+
Hidrólisis esculina	+	Fructosa	+
Licuefacción gelatina (total a 3 días)	+	Trehalosa	+
Reducción de nitrato	-	Galactosa	+

**Cuadro 2.** Crecimiento de la bacteria en diferentes medios de cultivos diferenciales y convencionales

Medio	<i>X. campestris</i>	Crecimiento colonia
SX	+	+
Tween	+	+
AN	Amarillo	Crema amarillento
YDC	Amarillo	Amarillo claro
YS	+	+

Para la determinación del patovar, la bacteria presentó patogenicidad al ser inoculada en parchita, mostrando la mancha bacteriana ya mencionada y confirmando el pv. *passiflorae*. Liberato y Zerbini (2003) señalaron a *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira) como bacteria patógena que causa manchas foliares en parchita, la cual es también nombrada bajo la sinonimia de *X. campestris* pv. *passiflorae* (Pereira) Dye. La mancha bacteriana fue descrita por primera vez por Pereira (1969), en Sao Paulo, Brasil, quien la clasificó como una nueva especie: *Xanthomonas passiflora*, aunque más tarde, Dye et al. (1980) la reclasificaron como *X. campestris* pv. *passiflorae*. Finalmente, Gonçalves y Rosato (2000), por medio de técnicas de hibridación ADN-ADN, propusieron su reclasificación como *X. axonopodis* pv. *passiflorae*.

Como se mencionó anteriormente, la especie *Xanthomonas campestris* incluye los patovares designados según la patogenicidad en sus hospedantes. *X. campestris* pv. *passiflorae* es una bacteria patógena en parchita, y raramente es un patovar incluido en los estudios taxonómicos generales, quizás porque la planta hospedante es

cultivada en las regiones tropicales y subtropicales (Gonçalves y Rosato, 2000). La reclasificación del género *Xanthomonas* fue propuesta por Vauterin et al. (1995) basados principalmente en el análisis de hibridación DNA-DNA. *X. campestris* fue dividido en 16 nuevas especies y el Comité de Taxonomía de bacterias patógenas en plantas validó la propuesta. Sin embargo, la *Xanthomonas* patógena en parchita no había sido analizada y la designación anterior de *X. campestris* pv. *passiflorae* se había mantenido (Gonçalves y Rosato, 2000). La bacteria también fue estudiada por Tassa y Duarte (2002) en parchita y la identificaron como *X. axonopodis* pv. *passiflorae* por presentar reacción (-) a la oxidasa y uso de glucosa, manosa, galactosa, trealosa y celobiosa, lo cual, coincide con los resultados que se presentan en el Cuadro 1. Ya caracterizada e identificada la bacteria como *X. axonopodis* pv. *passiflorae*, es mantenida en glicerol 15 % a -20 °C, en el Cepario de Bacterias Fitopatogénicas del Posgrado de Agronomía de la UCLA.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con la sintomatología observada en cuanto a los resultados positivos de las pruebas de patogenicidad, a las características morfológicas, culturales, fisiológicas y bioquímicas, y al crecimiento de la bacteria en los medios semiselectivos Sx y Tween, se identificó el agente causal como *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Pereira, 1969) Gonçalves & Rosato (2000) y se comprobó que los síntomas observados son causados por esta bacteria. Representa el

primer reporte en Venezuela de este patógeno en el hospedante *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*.

### LITERATURA CITADA

1. Barret, T. 1975. Preparation of bacterial vaccine. *In*: Proceedings of the First Workshop of Phytobacteriology. R.N. Goodman (ed.). Columbia. University of Missouri. pp. 1-6.
2. Dye, D., J. Bradbury, M. Goto, A. Hayward, R., Llelliot y M. Sohro. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype stains. *Review of Plant pathology* 59: 153-168.
3. F.A.O. 1999. Impactos actuales y potenciales de las enfermedades de los cultivos perennes de la Amazonia y posibilidades de control para el desarrollo sostenible de la región. *Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaria pro tempore*. Caracas, Venezuela. 178 p.
4. French, E. y T. Hebert. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Editorial IICA. San José, Costa Rica. 289 p.
5. Gonçalves, E. y Y. Rosato. 2000. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evolu. Microbiol.* 50: 811-821.
6. Halfeld-Vieira, B. y K. Nechet. 2006. Ocorrência da mancha bacteriana do maracujazeiro em Roraima. *Fitopatol. Bras.* 31(2): 5513 (Abstract).
7. Holt, J., N. Krieg, P. Sereath, J. Staley y S. Williams (eds.). 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William & Wilkins. Baltimore.
8. Klement, Z., K. Rudolph y D. Sands. 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiadó, Budapest. 568 p.
9. Kososki, R.M., J.R. Peixoto, N.T. Junqueira, C.H. Uesugi y B. de Melo. 2008. Reação de génotipos de maracujazeiro-azedo a *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, em casa de vegetação. Passionfruit genotypes reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, under greenhouse conditions. *Bioscience Journal* 24(1): 60-66.
10. Liberato, J. y F. Zerbini. 2003. Proposed list of common names of diseases of passionfruit (*Passiflora* spp.). *Phytopathology News* 37 (8): 117.
11. Lopes, R., M.T. Gomes Lopes, M. Sampaio Carneiro, F. de Pina Matta, L.E. Aranha Camargo y M.L. Carneiro Vieira. 2006. Linkage and mapping of resistance genes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in yellow passion fruit. *Genome* 49: 17-29.
12. Miranda, J. 2004. Reação de variedades de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) a bacteriose causada por *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*. Trabalho de Grado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Sao Paulo-Brasil. 99 p.
13. Nakatani, A.K, R. Lopes y L.E. Camargo. 2009. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. *Summa phytopathol.* 35( 2): 116-120.
14. Pereira, A.L.G. 1969. Uma nova doença bacteriana do maracujá (*Passiflora edulis*, Sims) causada por *Xanthomonas passiflorae* n.sp. *Arq. Inst. Biol.* 36: 163-174.
15. Pinto, F., F. Oliveira, J. Cardoso y J. Vidal. 2003. Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle. *Comunicado Técnico* 86: 1-12.
16. Schaad, N.W., J.B. Jones y W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press. Minnessota. 373 p.
17. Suslow, T., M. Schroth y M. Isaka. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and

- saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72: 917-918.
18. Tassa S. y V. Duarte. 2002. Ocorrência de mancha bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, em maracujazeiro no estado de mato grosso. *Fitopatología Brasileira* 27(6): 647.
19. Vauterin, L., B. Hoste, K. Kesters y J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
20. Vicente, J., J. Conway, S. Roberts y J. Taylor. 2001. Identification and origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races and related pathovars. *Phytopathology* 91(5): 492-499.