

# RELACIONES SEROLÓGICAS ENTRE AISLAMIENTOS

## BACTERIANOS DE LOS GÉNEROS *Erwinia*, *Pectobacterium* Y *Pantoea*

Yonis Hernández y Gustavo Trujillo

### RESUMEN

Este estudio fue realizado con el propósito de conocer las relaciones serológicas entre aislamientos pertenecientes a diferentes géneros y especies de bacterias. Se utilizaron ocho aislamientos, tres de *Pectobacterium chrysanthemi* obtenidos de maíz (*Zea mays*), papa (*Solanum tuberosum*) y batata (*Ipomoea batatas*); tres de *P. carotovora* subsp. *carotovora*, provenientes uno de cafecito de jardín (*Aglaonema commutatum* 'María') y dos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), con diferencias en el comportamiento fisiológico y patógeno. Los aislamientos restantes, uno fue obtenido de lechosa (*Carica papaya*) y el otro de *Alocasia macrorrhiza*. Los antisueros se obtuvieron inyectando conejos de 2,5 meses de edad en forma intravenosa con células formalizadas. Los antisueros fueron probados con antígenos homólogos y

heterólogos como los utilizados en la presente investigación y con otros de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas* y de contaminantes bacterianos comunes. Los antisueros mostraron buenos títulos y resultaron ser muy específicos. Se establecieron seis serotipos diferentes. El primero (A) conformado por los aislamientos de *P. chrysanthemi* provenientes de papa y batata y el de *P. carotovora* subsp. *carotovora* de cafecito de jardín. El aislamiento de *P. chrysanthemi* proveniente de maíz constituyó un serotipo diferente (B). Los dos aislamientos de *P. carotovora* subsp. *carotovora* provenientes de tomate, así como los de *Erwinia* sp. de lechosa y *P. agglomerans* de *Alocasia macrorrhiza*, fueron colocados en diferentes serotipos que se denominaron C, D, E y F respectivamente.

### Introducción

El género *Erwinia*, dividido ahora en *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea* y *Brenneria*, e inicialmente denominado así en honor de Erwin Smith, fue el primero propuesto para bacterias patógenas de plantas con forma de bastón, móviles por flagelos peritricos y anaeróbicos facultativos (Young *et al.*, 1992).

Noval (1991) señala que mientras algunos miembros del género *Erwinia* se limitan a vivir sobre las superficies vegetales o a ejercer un papel secundario en diversas infecciones, otros, verdaderos patógenos, desencadenan enfermedades de gran interés para la agricultura, como es el caso del tizón del fuego de las rosáceas, cuyo agente productor (*Erwinia amylovora*) merece destacarse por las medidas de lucha adoptadas en su contra, reflejo de

su importancia, y también por la curiosidad histórica de constituir el punto de partida de la bacteriología vegetal. En este género figuran también organismos de menor renombre histórico, pero más devastadores e importantes por el daño que ocasionan a los cultivos y a los productos hortícolas, tales como las erwinias que producen pudriciones blandas, donde se destacan principalmente *E. carotovora* y *E. chrysanthemi* (ahora *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* y *P. chrysanthemi*), cuya importancia se incrementa por el amplio rango de hospedantes y su distribución mundial, así como sus mecanismos de sobrevivencia y dispersión (Perombelon y Kelman, 1980).

En Venezuela (Trujillo, 1996) este género ha venido adquiriendo importancia en los últimos años, sobre todo el grupo causante de pudri-

ciones blandas. Integrantes del género *Erwinia* han sido señalados en cultivos y plantas ornamentales, entre ellos *Dieffenbachia* sp. (Ochoa *et al.*, 1987), tomate (*Lycopersicon esculentum* L. Mill; Custodio *et al.*, 1993), batata (*Ipomoea batatas* L. Lam; Varela *et al.*, 1993), papa (*Solanum tuberosum* L.; Faría *et al.*, 1993), maíz (*Zea mays* L.; Hernández *et al.*, 1994), lechosa (*Carica papaya* L.; Soto, 1994), mango (*Mangifera indica*; Guevara *et al.*, 1980), zanahoria (*Daucus carota*; Rodríguez *et al.*, 2002), patilla (*Citrullus lanatus*; Carvajal y Corrales, 1993), plátano (*Musa AAB*; Ordosgoitti *et al.*, 1974), yuca (*Manihot esculenta* Crantz; Guevara *et al.*, 1992), cafecito de jardín (*Aglaonema commutatum*; Hernández y Trujillo, 1993a).

Como se evidencia en la cantidad de cultivos atacados por integrantes del género

antes denominado como *Erwinia*, cobra importancia establecer en el país nuevos métodos de identificación o diagnóstico, ya que el método convencional que contempla el aislamiento del patógeno, y su caracterización fisiológica y bioquímica, consume mucho tiempo y reactivos, siendo estos últimos cada vez más difícil de conseguir y con costos crecientes en el tiempo.

La serología constituye una herramienta de gran potencial de uso en laboratorios locales, ya que permite una identificación rápida y precisa de cualquier patógeno. No obstante, su aplicación está supeditada al estudio de los antisueros a usar en cada caso, la determinación de su especificidad y el establecimiento de sus relaciones serológicas con otros aislamientos bacterianos, de tal manera que su uso sea lo más acertado po-

### PALABRAS CLAVE / *Erwinia* / *Pantoea* / *Pectobacterium* / Serotipo /

Recibido: 21/01/2004. Modificado: 06/07/2004. Aceptado: 22/07/2004.

Yonis Hernández. Ingeniero Agrónomo y M.Sc. en Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesor, Facultad de

Agronomía, UCV. Dirección: Instituto de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía, UCV. Apartado Postal 4579, Maracay

2101, Edo. Aragua, Venezuela. e-mail: yonisa@cantv.ve  
Gustavo Trujillo. Ingeniero Agrónomo, UCV. Ph.D., Michigan

State University, EEUU. Profesor, Facultad de Agronomía, UCV. e-mail: gus202@cantv.net

## SUMMARY

This study was carried out in order to find the serological relationships between different isolates from different bacterial genera and species. Eight isolates were used, three of them from *Pectobacterium chrysanthemi* obtained from corn (*Zea mays*), potato (*Solanum tuberosum*) and sweet potato (*Ipomoea batatas*); three of *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*, one coming from garden coffee (*Aglaonema commutatum* 'María') and the other two from tomato (*Lycopersicon esculentum*), differing in some physiological tests and pathogenicity. Two other isolates were of *Erwinia* sp. from papaya (*Carica papaya*) and *Pantoea agglomerans* from *Alocasia macrorrhiza*. Antisera were obtained by intravenous injection of formalized cells in rabbits 2.5 months old.

## RESUMO

Este estudio foi realizado com o propósito de conhecer as relações serológicas entre isolamentos pertencentes a diferentes gêneros e espécies de bactérias. Utilizaram-se oito isolamentos, três de *Pectobacterium chrysanthemi* obtidos de milho (*Zea mays*), batata (*Solanum tuberosum*) e batata doce (*Ipomoea batatas*); três de *P. carotovora* subsp. *carotovora*, provenientes de "Cafecito de Jardim" (*Aglaonema commutatum* 'María') e dois de tomate (*Lycopersicon esculentum*), com diferenças no comportamento fisiológico e patógeno. Os isolamentos restantes, um foi obtido de mamão (*Carica papaya*) e o outro de *Alocasia macrorrhiza*. Os anti-soros se obtiveram injetando coelhos de 2,5 meses de idade em forma intravenosa com células formalizadas. Os anti-soros foram provados com antígenos homólogos e

The antisera produced were tested with the homologous and heterologous antigens used in this research, others from the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas*, and isolates of common contaminating bacteria. The antisera showed good titer and were quite specific. Six serological serotypes were clearly separated. The first one (A) for two isolates of *P. chrysanthemi*, coming from potato and sweet potato and the *P. carotovora* subsp. *carotovora* of garden coffee. The isolate from corn also *P. chrysanthemi* formed a different serotype (B). The other isolates, two of *P. carotovora* subsp. *carotovora* from tomato, *Erwinia* sp. from papaya and *P. agglomerans* from *Alocasia macrorrhiza* were placed each one in a different serotype: C, D, E and F respectively.

heterólogos como os utilizados na presente investigação e com outros dos gêneros *Pseudomonas* e *Xanthomonas* e de contaminantes bacterianos comuns. Os anti-soros mostraram bons títulos e resultaram ser muito específicos. Se estabeleceram seis serotipos diferentes. O primeiro (A) conformado pelos isolamentos de *P. chrysanthemi* provenientes de batata e batata doce e o de *P. carotovora* subsp. *carotovora* de "cafecito de jardim". O isolamento de *P. chrysanthemi* proveniente de milho constituiu um serotipo diferente (B). Os dois isolamentos de *P. carotovora* subsp. *carotovora* provenientes de tomate, assim como os de *Erwinia* sp. de mamão e *P. agglomerans* de *Alocasia macrorrhiza*, foram colocados em diferentes serotipos que se denominaram C, D, E y F respectivamente.

sible (Schaad, 1979; Rodríguez, 1989).

Se han preparado antígenos del género *Erwinia* contra células vivas y células muertas con calor, inmunógenos purificados y no purificados, los cuales han sido usados para la diferenciación o identificación de todas las especies del género excepto para *E. ananas*, *E. cripipedii*, *E. mallotivora*, *E. rhapsodici* y *E. Uredovora*, y se han determinado serogrupos para *E. carotovora* (De Boer et al., 1979) y *E. chrysanthemi* (Samson y Nassan-Agha, 1978; Yakrus y Schaad, 1979).

En esta investigación se planteó como objetivo el establecer las relaciones serológicas entre ocho aislamientos de los géneros *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Pantoea* de tal manera que se puedan utilizar los antiseros para diagnóstico y otros estudios epidemiológicos. Información preliminar de esta investigación ha sido presentada (Hernández y Trujillo, 1997).

## Materiales y Métodos

### Aislamientos utilizados

Se utilizaron ocho aislamientos bacterianos pertenecientes a los géneros *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Pantoea*: tres aislamientos de *P. carotovora* subsp. *carotovora*, dos de los cuales fueron obtenidos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y que se diferenciaban (Pcca y Pccf, respectivamente) en algunas características fisiológicas y de patogenicidad (Custodio et al., 1993) y otro (Pccc) proveniente de cafecito de jardín (*Aglaonema commutatum* 'María'; Hernández y Trujillo, 1993a); tres aislamientos de *E. chrysanthemi* obtenidos uno (Pcb) de batata (*Ipomoea batatas* L. (Lam)), otro (Pcp) de papa (*Solanum tuberosum*; Faría et al., 1993) y otro (Pcm) de maíz (*Zea mays*; Hernández et al., 1994); un aislamiento de *Pantoea agglomerans* (P.a.) proveniente de ocumo bravo (*Alocasia*

*macrorrhiza* cv. Variegata; Garrido et al., 1993) y un aislamiento de *Erwinia* sp. (E.1.) obtenido de lechosa (*Carica papaya*; Soto et al., 1993).

### Obtención de antiseros

Para tal fin, se utilizaron conejas de 2,5 meses de edad, las cuales fueron inyectadas con células bacterianas formalizadas de los aislamientos señalados anteriormente según metodología de Trujillo y Saettler (1981).

### Formalización de células bacterianas

Las bacterias señaladas fueron sembradas en placas que contenían medio agar nutritivo (AN). Se sembraron 6 placas por aislamiento bacteriano. Los cultivos sembrados se incubaron en condiciones de laboratorio (temperatura promedio 24°C) por 48h y posteriormente fueron removidas del medio con formol salino, dejando la sus-

pensión en condiciones de laboratorio por 48h, de tal manera que las células murieran pero se mantuviese intacto el flagelo.

Seguidamente las células fueron centrifugadas dos veces a 3500rpm por 15min en una centrífuga CRU-500 y resuspendidas en solución salina. Se verificó la esterilidad de la solución sembrando una ansada de la misma en placas con agar nutritivo. Se ajustó la concentración de las suspensiones bacterianas a una lectura de absorbancia de 0,224 a  $\lambda=490\text{nm}$ , medida en un espectrofotómetro Spectronic 21. Las suspensiones (3ml) fueron conservadas a 0°C en botellas serológicas hasta su utilización.

### Inmunización de las conejas

Antes del proceso de inmunización se obtuvo suero normal sangrando los conejos en la vena marginal de la oreja izquierda, para determinar por pruebas de

aglutinación en tubos si los conejos que se iban a inmunizar poseían anticuerpos para los antígenos a utilizar. Una vez determinado lo anterior, se procedió a la inmunización de los conejos, aplicando inyecciones intravenosas a intervalos de tres días y en dosis crecientes de 0,1ml el primer día; 0,3ml a los 3 días; 0,5ml a los 6 días; 1,0ml a los 9 días hasta 2,0ml a los 12 días. Las inyecciones fueron en la vena marginal de la oreja derecha (Trujillo y Saettler, 1981). A los 8 días después de la última inyección, se realizó el sangrado para la obtención del antisuero.

Los antisueros fueron sometidos a varias pruebas, entre ellas: títulos por aglutinación en tubos y por doble difusión en agar, confrontación de los antisueros con antígenos heterólogos en pruebas de aglutinación en tubos y por doble difusión en agar.

#### Pruebas en aglutinación en tubos

Se determinaron títulos de los antisueros con sus antígenos homólogos y heterólogos (correspondientes a las bacterias usadas en el estudio) con células vivas (antígenos totales) y células sometidas a calor húmedo por 30 min a 100°C (antígenos termoestables) para los diferentes antígenos.

#### Pruebas de doble difusión en agar

Se establecieron títulos de los antisueros con sus respectivos homólogos y antígenos heterólogos utilizando antígenos totales y antígenos termoestables. Se usó agar purificado al 0,7%, 10ml de solución 1% (peso/volumen) de Orange G, 30ml de solución de 10mg/ml de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>) y buffer salino hasta 1000ml. El medio fue esterilizado y vaciado a razón de 20ml por placa desechable de 90mm diam. En cada pla-

TABLA I  
TÍTULOS OBTENIDOS AL CONFRONTAR ANTISUEROS A BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *Erwinia*, *Pectobacterium* Y *Pantoea* CON CÉLULAS DE SUS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS SOMETIDAS A CALOR EN PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN EN TUBOS

Bacteria	Antisuero Contra							
	Pccc	Pcb	Pcp	Pcm	Pcca	Pccf	E.I.	P.a.
Pccc	1:131072	1:32768	1:8192	1:16	1:4	1:16	1:8	-
Pcb	1:131072	1:32768	1:8192	1:16	1:8	1:4	1:256	-
Pcp	1:2048	1:3192	1:8192	1:8	1:16	N.R.	1:8	1:4
Pcm	1:16	1:2	1:1024	1:8192	1:8	1:16	1:32	-
Pcca	-	1:8	1:16	1:8192	1:16384	1:4	1:32	1:4
Pccf	1:4	1:4	1:128	1:32	1:128	1:16384	1:16	-
E.I.	1:4	1:32	1:128	1:128	1:256	1:128	1:4096	1:8
P.a.	-	1:32	1:16	-	1:32	1:32	-	1:262144

Pccc: *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* de *Aglaonema commutatum*; Pcb: *P. chrysanthemi* de *Ipomoea batatas*; Pcp: *P. chrysanthemi* de *Solanum tuberosum*; Pcm: *P. chrysanthemi* de *Zea mays*; Pcca: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; Pccf: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; E.I.: *Erwinia* sp. de *Carica papaya*; P.a.: *Pantoea agglomerans* de *Alocasia macrorrhiza*. -: No se observó reacción de aglutinación.

ca se montaron 4 pruebas serológicas, realizando para ello un orificio o celdilla central de aproximadamente 7mm diam. y seis celdillas laterales de igual diámetro y separadas a una distancia de 5mm de la celdilla central. En la celdilla central se colocó el antígeno y en las laterales las diluciones del antisuero.

Se realizaron pruebas de especificidad de los antisueros, confrontándolos con bacterias pertenecientes a los géneros *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, y con contaminantes bacterianos comunes en el laboratorio; en este caso se usaron antígenos totales y termoestables.

Cada prueba serológica en doble difusión en agar fue realizada por duplicado e incubada en condiciones de laboratorio (temperatura promedio 24°C). Las observaciones fueron tomadas diariamente hasta una semana después de iniciada la prueba. Se observó la formación o no de bandas y el número y tipo de bandas formadas en el agar.

#### Resultados y Discusión

##### Pruebas de aglutinación en tubos

En las Tablas I y II aparecen los títulos obtenidos en las pruebas de aglutinación en tubos de las bacterias en

estudio, al ser confrontadas con células vivas y tratadas con calor de sus antígenos homólogos y heterólogos. Se observa que los antisueros obtenidos poseen títulos altos con sus antígenos homólogos, lo que evidencia que los aislamientos bacterianos utilizados para inmunizar a los conejos tenían una alta capacidad inmunogénica. Asimismo, los títulos fueron mayores con células vivas de sus antígenos homólogos que con células sometidas a calor. No obstante, el antisuero obtenido para *P. agglomerans* presentó títulos más altos con células tratadas con calor.

En la Tabla II se presentan los resultados de la con-

TABLA II  
TÍTULOS OBTENIDOS AL CONFRONTAR ANTISUEROS A BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *Erwinia*, *Pectobacterium* Y *Pantoea* CON CÉLULAS VIVAS DE SUS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS EN PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN EN TUBOS

Bacteria	Antisuero Contra							
	Pccc	Pcb	Pcp	Pcm	Pcca	Pccf	E.I.	P.a.
Pccc	1:262144	1:262144	1:16384	1:4	1:4	1:32	1:16	1:8
Pcb	1:262144	1:262144	1:32768	1:4	-	1:4	1:1024	1:64
Pcp	1:4096	1:2048	1:32768	1:16	1:4	1:4	1:32	1:8
Pcm	1:128	1:512	1:256	1:262144	1:256	1:512	1:64	1:512
Pcca	1:4	1:2	1:4096	1:4	1:16384	-	1:1024	1:4
Pccf	-	1:8	1:4096	1:4	1:1024	1:65536	1:256	1:8
E.I.	1:8	1:16	1:512	1:2048	1:1024	-	1:262144	1:64
P.a.	1:2	1:2048	1:32	1:8	1:16	1:32	-	1:8192

Pccc: *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* de *Aglaonema commutatum*; Pcb: *P. chrysanthemi* de *Ipomoea batatas*; Pcp: *P. chrysanthemi* de *Solanum tuberosum*; Pcm: *P. chrysanthemi* de *Zea mays*; Pcca: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; Pccf: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; E.I.: *Erwinia* sp. de *Carica papaya*; P.a.: *Pantoea agglomerans* de *Alocasia macrorrhiza*. -: No se observó reacción de aglutinación.

TABLA III  
TÍTULOS EN PRUEBAS DE DOBLE DIFUSIÓN EN AGAR DE LOS ANTISUEROS OBTENIDOS A BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *Erwinia*, *Pectobacterium* Y *Pantoea* AL SER CONFRONTADOS CON CÉLULAS DE SUS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS SOMETIDAS A CALOR

Bacteria	Antisuero Contra							
	Pccc	Pcb	Pcp	Pcm	Pcca	Pccf	E.l.	P.a.
Pccc	1:16	1:16	1:32	-	-	Puro*	-	-
Pcb	1:16	1:16	1:32	-	Puro*	-	-	-
Pcp	1:16	1:16	1:32	-	-	-	-	-
Pcm	-	-	-	1:32	Puro*	-	-	-
Pcca	-	-	Puro*	1:32	-	-	-	-
Pccf	-	-	-	-	-	1:32	-	-
E.l.	-	-	-	-	-	-	1:512	-
P.a.	-	-	-	-	-	-	-	1:64

\* Sólo se observó reacción con el antisuero puro (sin diluir).

Pccc: *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* de *Aglaonema commutatum*; Pcb: *P. chrysanthemi* de *Ipomoea batatas*; Pcp: *P. chrysanthemi* de *Solanum tuberosum*; Pcm: *P. chrysanthemi* de *Zea mays*; Pcca: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; Pccf: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; E.l.: *Erwinia* sp. de *Carica papaya*; P.a.: *Pantoea agglomerans* de *Alocasia macrorrhiza*. -: No se observó reacción de aglutinación.

frontación de los antisueros con células tratadas con calor (también llamados antígenos termoestables o antígenos "O") de antígenos homólogos y heterólogos. Se observa que los antisueros contra Pccc y Pcb tienen un comportamiento similar, ya que los títulos obtenidos con sus respectivos homólogos y heterólogos (reacciones cruzadas) son iguales al ser utilizados indistintamente entre ellos. También se comportaron en forma similar con la bacteria Pcp. Estos resultados evidencian un comportamiento parecido entre las tres bacterias (Pccc, Pcb y Pcp).

Pccc y Pcb tienen la misma carga antigénica (sometida a calor) la cual posee antígenos comunes con Pcp. De igual manera todos los antígenos sometidos a calor de Pcp están presentes en Pccc y Pcb, constituyendo por lo tanto Pccc, Pcb y Pcp un serotipo aparte y bastante diferenciado del resto que se denominará serotipo A.

Los integrantes del serotipo A, respecto a sus antígenos sometidos a calor, no guardan ninguna relación con las bacterias Pcm, Pcca, Pccf, E.l. y P.a., lo que se evidencia en los títulos tan bajos obtenidos, o en ausencia de reacción al confrontar

los antisueros de Pccc, Pcb y Pcp con las bacterias mencionadas.

En la Tabla II también se aprecia que los antisueros a Pccf, E.l. y P.a., al reaccionar con sus respectivos homólogos y heterólogos, presentan títulos muy bajos con estos últimos, y en algunos casos no se observa reacción. Esto denota su especificidad y aplicabilidad en labores de diagnóstico y en estudios epidemiológicos; Pccf, E.l. y P.a. constituyen cada una, en relación a sus antígenos termoestables, un serotipo diferente que se denominarán D, E y F, respectivamente.

Por otra parte, los antígenos termoestables de la bacteria Pcm son compartidos por Pcca, ya que el antisuero para la primera bacteria presenta un título similar con su homólogo y con Pcca. Sin embargo, lo mismo no ocurre con el antisuero de Pcca en relación a los antígenos termoestables de Ecm. En virtud de que estos resultados son contradictorios, es recomendable repetir los experimentos para confirmar su autenticidad.

Cuando se confrontan los antisueros obtenidos con células vivas (no tratadas) con los antígenos homólogos y heterólogos (Tabla II), se confirman los resultados ya mencionados con antígenos tratados (sometidos a calor húmedo) y en este caso se tiene una visión más general, teniendo en consideración el hecho de que en las células vivas están presentes todos los antígenos de los aislamientos bacterianos estudiados (los antígenos O, resistentes al calor y también llamados antígenos somáticos; los antígenos H o flagelares o; los provenientes de las regiones externas; los susceptibles al calor húmedo; etc.).

La primera consideración sobre los resultados de la Tabla II es la confirmación de la existencia del denominado serotipo A en relación a los antígenos O resistentes al calor, el cual se mantiene en la misma forma, constituido por Pccc, Pcb y Pcp, formando un serotipo bastante compacto. Con relación a los antígenos no resistentes al calor, se observa que Pcp tiene antígenos comunes con Pcca y Pccf y también con Pcm y E.l., pero en una proporción mucho menor. No obstante, estos últimos resultados no son equiparables con las estrechas relaciones existentes entre Pccc, Pcb y Pcp y sus antígenos termoestables.

Resulta curioso el comportamiento del antisuero a Pcb, el cual posee un título de 1:8192 con células de

TABLA IV  
TÍTULOS EN PRUEBAS DE DOBLE DIFUSIÓN EN AGAR DE LOS ANTISUEROS OBTENIDOS A BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *Erwinia*, *Pectobacterium* Y *Pantoea* AL SER CONFRONTADOS CON CÉLULAS VIVAS DE SUS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS

Bacteria	Antisuero Contra							
	Pccc	Pcb	Pcp	Pcm	Pcca	Pccf	E.l.	P.a.
Pccc	1:2048	1:2048	1:2048	Puro*	1:4	-	Puro*	Puro*
Pcb	1:2048	1:2048	1:2048	Puro*	Puro*	-	Puro*	Puro*
Pcp	1:128	1:1024	1:2048	Puro*	Puro*	-	Puro*	Puro*
Pcm	1:2	1:2	Puro*	1:32	Puro*	-	-	-
Pcca	-	-	-	-	1:32	-	-	-
Pccf	-	-	-	-	-	Puro*	-	-
P.l.	-	-	-	-	-	-	1:256	-
P.a.	-	-	-	-	-	-	-	1:2048

\*Sólo se observó reacción (bandas de precipitación) con el antisuero sin diluir (puro).

Pccc: *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* de *Aglaonema commutatum*; Pcb: *P. chrysanthemi* de *Ipomoea batatas*; Pcp: *P. chrysanthemi* de *Solanum tuberosum*; Pcm: *P. chrysanthemi* de *Zea mays*; Pcca: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; Pccf: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; E.l.: *Erwinia* sp. de *Carica papaya*; P.a.: *Pantoea agglomerans* de *Alocasia macrorrhiza*. -: No se observó reacción de aglutinación.

Pcp sometidas a calor y de tan solo 1:2048 con antígenos totales. Esto posiblemente se deba a la presencia de antígenos de superficie presentes en células vivas del género *Erwinia* (Mushin *et al.*, 1959) los cuales actúan como blanqueadores de la unión antígeno-anticuerpo.

Pccc mantiene prácticamente el mismo comportamiento con antígenos termoestables y antígenos totales en todos los aislamientos estudiados, y Pcb muestra antígenos no termoestables comunes con Pcm y E.l. Por otra parte, Pcm, Pccc, Pccf y P.a. no muestran reacción de sus antisueros

con los antígenos totales del serotipo A, pero si muestran entre ellos algunos antígenos comunes que, de acuerdo a los títulos obtenidos, parecen tener poca importancia y son fácilmente visualizados si siempre se utiliza como control el homólogo respectivo, sobre todo si se van a emplear en diagnóstico o en evaluaciones epidemiológicas.

Lo señalado corresponde a todos los grupos de bacterias, los cuales poseen antígenos comunes debido a su composición química, pero también existen antígenos específicos para cada uno de los aislamientos. Tunstall y Gowland (1975), detectaron en el género *Pseudomonas*, tres antígenos diferentes asociados con la pared celular. Uno de ellos, no resistente al calor, era común a todas las *Pseudomonas* y que consistía del mucopéptido de la pared celular, formado por carbohidratos y polipéptidos; otro antígeno también común a las *Pseudomonas*, compuesto de polisacáridos y lipopolisacáridos, situado

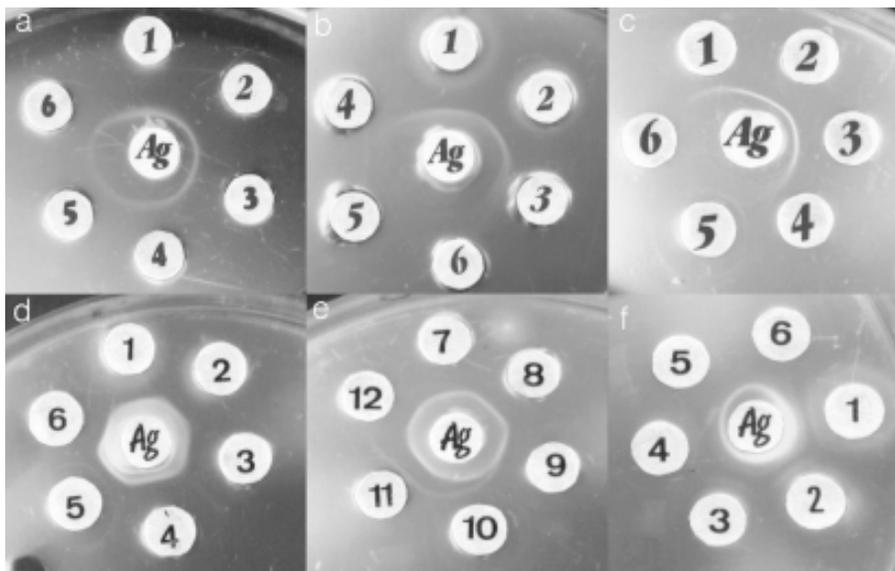


Figura 1. Título en pruebas de doble difusión en agar del antisuero a *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* aislada de cafecito de jardín (*Aglaonema commutatum* 'María') con células vivas (A) y células sometidas a calor (B). Título del antisuero a *Pectobacterium chrysanthemi* aislada de papa (*Solanum tuberosum*) con células sometidas a calor (C). Título para antisuero a *Pantoea herbicola* aislada de ocumo bravo (*Alocasia macrorrhiza*) con células vivas (D y E) y sometidas a calor (F). Ag: antígeno homólogo. 1: antisuero puro. Los números 2,3,4,5,6, 7,8,9,10,11 y 12, corresponden a las diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 y 1:2048 del antisuero.

después del primero; y un antígeno altamente específico con un alto peso molecular, que formaba una especie de envoltura alrededor de la célula, compuesto de proteína o lipoproteína.

En el género *Xanthomonas*, Elrod y Braun (1947) señalan la existencia de un mucopolisacárido responsable de reacciones cruzadas entre aislamientos de ese género, pero cuando ese material es eliminado, las reacciones se hacen más específicas.

Con respecto al género *Erwinia*, Elrod (1941) señala la incapacidad para diferenciar entre aislamientos de *E. carotovora*, *E. atroseptica* y *E. aroidea* (ahora *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* y *P. carotovora* subsp. *atroseptica*) con antisueros a células vivas e igual tipo de antígeno, y sugiere que las reacciones cruzadas pueden ser el resultado de antígenos flagelares comunes presentes en la preparación de células completas utilizadas para la inmunización. Resultados similares fueron reportados por Lazar

títulos obtenidos en pruebas de doble difusión en agar para los antisueros bajo estudio, usando como antígenos células sometidas a calor y células vivas, respectivamente. En este caso, los títulos de los antisueros bajaron considerablemente con respecto a los obtenidos en pruebas de aglutinación en tubos. Estos resultados son comúnmente encontrados en este tipo de prueba y han sido señalados por varios investigadores (Trujillo y Saettler, 1981; Hernández y Trujillo, 1993b; Muñoz, 1996).

Los resultados obtenidos en esta prueba corroboran con mayor fuerza los obtenidos en

(1972) en igual tipo de pruebas y antígenos totales, señalando que los organismos incluídos para ese momento en el género *Erwinia* parecían formar un grupo estrechamente relacionado serológicamente. Aunque el autor no lo menciona, esto se debe a la presencia de antígenos comunes entre esas bacterias. En contraste, Samson (1973), al usar antígenos somáticos (más específicos) y antisueros contra este tipo de antígeno, señala que *E. carotovora* var. *chrysanthemi* (ahora *P. chrysanthemi*) es serológicamente distinta de *E. carotovora* subsp. *carotovora* y *E. carotovora* subsp. *atroseptica*.

En el presente estudio, a través de pruebas de aglutinación en tubos, fue imposible diferenciar con antígenos termoestables o con antígenos totales a las bacterias Pccc y Pcb.

#### Pruebas de doble difusión en agar

En las Tablas III y IV se indican los resultados de los

pruebas de aglutinación en tubos con antígenos termoestables y antígenos totales, donde queda el serotipo A conformado por Pccc, Pcb y Pcp, así como los serotipos B, C, D, E y F, conformados por Pcm., Pcca, Pccf, E.l. y P.a., respectivamente. También queda evidenciado que aunque Pcb y Pcp poseen antígenos comunes a otros aislamientos, éstos no están en suficiente cantidad como para obtener una reacción visible en pruebas de doble difusión en agar. Este mismo razonamiento es válido para Pcm, Pcca, Pccf, E.l. y P.a. Igualmente se confirma que la reacción de los antígenos termoestables de Pcca con el antisuero a Pcm en pruebas de aglutinación en tubos, es dudosa y deberá ratificarse ya que no se observa reacción en doble difusión en agar con diluciones del antisuero, y sólo se observa reacción cuando se utiliza el antisuero sin diluir, siendo la reacción diferente a la del homólogo.

Por otra parte, el aislamiento Pcp presentó como

título con los antisueros a Pccc y Pcb en pruebas de aglutinación en tubos de 1:4096 y 1:2048, respectivamente, con antígenos totales; sin embargo, en pruebas de doble difusión en agar no se observó reacción. Esto se puede explicar porque los antígenos que difunden con mayor facilidad en el agar son antígenos solubles que en su mayoría resultan de la ruptura celular al someter a las bacterias al calor. En este caso el agar funciona retrayendo el movimiento de los elementos particulados de mayor tamaño (Shepard, 1972).

Resalta también el comportamiento del antisuero obtenido a E.I., que en pruebas de aglutinación en tubos presentó títulos más altos con antígenos totales que con antígenos sometidos a calor, mientras que en pruebas de doble difusión en agar sucedió lo contrario, es decir, los títulos fueron mayores con antígenos termoestables que con antígenos totales. Este hecho es curioso y en la literatura no se encontró explicación al respecto. Sin embargo, sería conveniente tratar previamente los antígenos totales con sodio dodecil sulfato o vaciar las placas con algún agente disociante para determinar si este hecho se debe a poca difusión en el agar por parte de los agentes reaccionantes.

En general, en los serotipos A y F se cumplió que el título en doble difusión en agar, con antígenos totales, fue mayor que con antígenos termoestables (Figuras 1a-f). Esto es lo que normalmente se ha señalado con antisueros obtenidos con bacterias del género *Xanthomonas* (Trujillo y Saettler, 1981; Hernández y Trujillo, 1993b), *Pseudomonas* (Hernández, 1989; Muñoz, 1996) y *Erwinia* (Soto, 1994; Muñoz, 1996).

De Boer *et al.* (1979) encontraron con *E. carotovora* (ahora *P. carotovora*) que el tratamiento con calor para desnaturalizar antígenos de superficie se tradujo en título

TABLA V  
CONFRONTACIÓN EN PRUEBAS DE DOBLE DIFUSIÓN EN AGAR, DE ANTISUEROS OBTENIDOS A BACTERIAS DE LOS GÉNEROS *Erwinia*, *Pectobacterium* Y *Pantoea* CON CÉLULAS DE SUS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS Y HETERÓLOGOS SOMETIDAS A CALOR / CÉLULAS VIVAS

Bacteria	Antisuero Contra							
	Pccc	Pcb	Pcp	Pcm	Pcca	Pccf	E.I.	P.a.
Pccc	++/++	++*/++*	++*/++*	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+
Pcb	++*/++*	++/++	++*/++*	-/+	+/+	-/-	-/+	-/+
Pcp	++*/++*	++*/++*	++/++	-/+	-/+	-/-	-/+	-/+
Pcm	-/+	-/+	-/+	++/++	+/+	-/-	-/-	-/-
Pcca	-/-	-/-	-/-	+/+	++/++	-/-	-/-	-/-
Pccf	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	++/++	-/-	-/-
E.I.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	++/++	-/-
P.a.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	++/++
P.sp. sorgo	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
P.sp. ajo	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/-
X.c.pv.v.	-/-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
X.c.cebolla	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
P.st.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
X.a.pv.ph.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

\*: Reacción de identidad total; +: Reacción débil generalmente 1 ó 2 bandas; ++: Reacción bien definida de una o varias bandas; -: No se observó reacción.

Pccc: *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* de *Aglaonema commutatum*; Pcb: *P. chrysanthemi* de *Ipomoea batatas*; Pcp: *P. chrysanthemi* de *Solanum tuberosum*; Pcm: *P. chrysanthemi* de *Zea mays*; Pcca: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; Pccf: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; E.I.: *Erwinia* sp. de *Carica papaya*; P.a.: *Pantoea agglomerans* de *Alocasia macrorrhiza*; -: No se observó reacción de aglutinación;

P.sp. sorgo: *Pseudomonas* sp. de *Sorghum bicolor*; P.sp. ajo: *Pseudomonas* sp. de *Allium sativum*; P.st.: *P. syringae* pv. *tomato* de *Lycopersicon esculentum*; X.c.pv.v.: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; X.c. cebolla: *X. campestris* de *Allium cepa*; X.c.pv.ph.: *X. axonopodis* pv. *Phaseoli*.

los bajos de los antisueros. Iguales resultados fueron obtenidos con células de *Proteus ruttgeri* tratadas con calor (Penner *et al.*, 1974). De Boer *et al.* (1979) señalan que aunque el tratamiento con calor no parece destruir los antígenos O, puede causar disociación en subunidades no antigénicas. Esto no se cumplió para los serotipos B (a Pcm), C (a Pcca), D (Pccf) y E (E.I.). En estos grupos, B y C presentaron el mismo título tanto con antígenos termoestables como con antígenos totales, mientras que E dio mayor título con antígenos termoestables y D sólo reaccionó con sus antígenos totales cuando se utilizó el antisuero puro sin diluir.

Al analizar las pruebas de especifici-

dad para los antisueros obtenidos (Tabla V) se aprecia que los antisueros a Pccc, Pcb, Pcp y Pcm resultan

más específicos al ser confrontados con antígenos sometidos a calor, y que Pccf, E.I. y P.a son altamente específicos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lucas y Grogan (1969), quienes reportaron que cuando los antígenos de *Pseudomonas lachrymans* fueron calentados por una hora a 100°C la mayoría de los antígenos termoestables comunes desaparecieron, facilitando la observación de las líneas de precipitación producidas por antígenos específicos termoestables. Guillorit y Samson (1993) señalaron igualmente que las reacciones cruzadas que ocurren con células bacterianas completas desaparecen cuando se emplean preparaciones de lipopolisacáridos

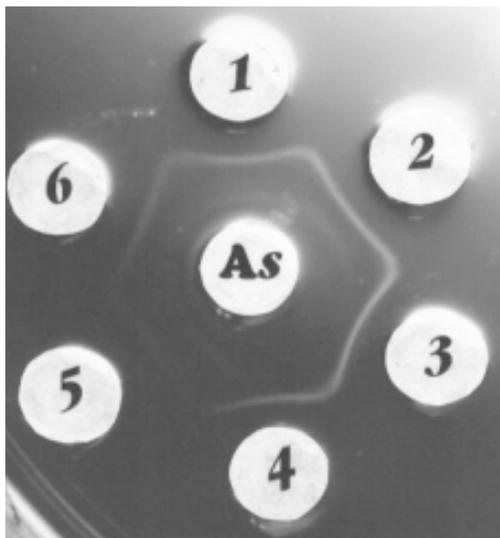


Figura 2. Reacción en pruebas de doble difusión en agar del antisuero (AS) a *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* de café de jardín (*Aglaonema commutatum* 'María'); Pccc) al ser confrontado con células sometidas a calor de 1: Pccc, 2: *P. chrysanthemi* de batata, 3: *P. chrysanthemi* de papa (Pcp), 4: Pccc, 5: Pcm, 6: Pcp. Observe la reacción de identidad entre los aislamientos.

TABLA VI  
NÚMERO DE BANDAS DE PRECIPITACIÓN VISIBLES EN PRUEBAS DE DOBLE  
DIFUSIÓN EN AGAR OBTENIDAS AL CONFRONTAR ANTISUEROS CONTRA  
AISLAMIENTOS DE LOS GÉNEROS *Erwinia*, *Pectobacterium* Y *Pantoea* CON CÉLULAS  
DE SUS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS Y ALGUNOS ANTÍGENOS HETERÓLOGOS  
SOMETIDAS A CALOR / CÉLULAS VIVAS

Bacteria	Antisuero Contra							
	Pccc	Pcb	Pcp	Pcm	Pcca	Pccf	E.l.	P.a.
Pccc	2/2	1/2	2/1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Pcb	2/2	1/2	1/2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Pcp	3/1	1/1	1/1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Pcm	-/-	-/-	-/-	2/1	-/-	-/-	-/-	-/-
Pcca	-/-	-/-	-/-	-/-	1/2	-/-	-/-	-/-
Pccf	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	3/2	-/-	-/-
E.l.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	3/1	-/-
P.a.	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	3/1

\* Sólo se da el número de bandas formadas para antígenos homólogos o para antígenos heterólogos donde se observó reacción de identidad total con los antisueños probados.

Pccc: *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* de *Aglaonema commutatum*; Pcb: *P. chrysanthemi* de *Ipomoea batatas*; Pcp: *P. chrysanthemi* de *Solanum tuberosum*; Pcm: *P. chrysanthemi* de *Zea mays*; Pcca: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; Pccf: *P. carotovora* subsp. *carotovora* de *Lycopersicon esculentum*; E.l.: *Erwinia* sp. de *Carica papaya*; P.a.: *Pantoea agglomerans* de *Alocasia macrorrhiza*;

dos (LPS) o antígenos O (bacterias sometidas a calor).

En la Figura 2 se evidencia nuevamente el serotipo A, en este caso ratificado por las reacciones de identidad total, que se forma entre Pccc, Pcb y Pcp con cualquiera de los tres antisueños. Aunque Pcca reacciona con antígenos termoestables de Pccc, Pcb y Pcm, las líneas de precipitación formadas son fácilmente diferenciables a las del antígeno homólogo. Igual sucede con los antisueños de Pcm que reacciona con Pcca y la *Pseudomonas* sp. aislada de sorgo y Pccf que también reacciona con esta última bacteria.

Con antígenos totales (Tabla V), la reacción fue la esperada para el serotipo A, donde todos reaccionaron entre sí (con reacción de identidad total) y con Pcm, pero en este caso la reacción fue fácilmente diferenciable a la del homólogo. Iguales resultados ocurrieron con los antisueños a Pcca, E.l. y P.a., que reaccionan con Pccc, Pcb y Pcp, pero en forma diferencial a la reacción con sus respectivos homólogos. El antisuero a Pccf solamente reacciona con su homólogo, lo que denota alta especificidad de sus antígenos totales y el hecho que cons-

tituye un serotipo aparte, completamente diferente del resto.

También se observó relación serológica con otros géneros de bacterias como es el caso de Pcb que reaccionó con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (ahora *X. vesicatoria*) y E.l. con la *Pseudomonas* sp. de sorgo. Sin embargo, estas reacciones fueron muy débiles y fácilmente diferenciables de las de sus respectivos homólogos. En la literatura se señala la existencia de antígenos comunes entre géneros de bacterias, sobre todo cuando se utilizan células completas como antígenos (Trujillo y Saettler, 1981; Hernández y Trujillo, 1993b).

En la Tabla VI se muestra el número de bandas que se forman al confrontar los antisueños obtenidos con células sometidas a calor y células vivas de sus antígenos homólogos y heterólogos. Se observa heterogeneidad en las reacciones. Para los antisueños a Pcp y Pcca se cumplió que el número de bandas formadas fue mayor con células vivas (antígenos totales) que son células sometidas a calor (antígenos termoestables), lo que concuerda con lo observado por

otros (Trujillo y Saettler, 1981; Hernández y Trujillo, 1993b; Soto, 1994). La explicación de este comportamiento puede estar en el hecho ya mencionado, de que con células vivas el número de antígenos involucrados en la reacción es mayor, lo que se traduce en la formación de un número mayor de bandas. Sin embargo, esto no se cumplió para los antisueños a Pccc, Pcm, Pccf, E.l. y P.a., donde el número de bandas formadas con su homólogo fue mayor con antígenos termoestables que con antígenos totales. En este caso pudiese estar sucediendo que el calor permite una mejor disociación de algunos antígenos los cuales, dependiendo de su tamaño, tienen una difusión diferencial en el agar, lo que podría traer como consecuencia la formación de varias bandas de precipitación. De Boer *et al.* (1987) no encontraron en *P. chrysanthemi* diferencias en el número de bandas cuando utilizaron suspensiones tratadas y no tratadas con calor, las que produjeron bandas de precipitación similares.

Entre los integrantes del serotipo A (Pccc, Pcb y Pcp) el antisuero a Pccc, al reaccionar con antígenos someti-

dos a calor de la bacteria Pcp, forma un número mayor de bandas que con su homólogo e igual sucede con la reacción cruzada (antisuero a Pcp con la bacteria Pccc). Lazar (1972) encontró que algunos aislamientos de *Erwinia*, particularmente entre pectobacterias (*P. carotovora*), reaccionaron más fuertemente con antisueños de aislamientos de otras especies que con la bacteria homóloga, resultados que son análogos a los obtenidos en este trabajo.

En forma general, es posible señalar que las relaciones serológicas más estrechas, tanto en pruebas de aglutinación en tubos como en pruebas de doble difusión en agar, se presentaron en lo que se denominó serotipo A, conformado por una *P. carotovora* subsp. *carotovora* (Pccc) y dos aislamientos de *P. chrysanthemi* obtenidos de dos hospedantes diferentes (Pcb y Pcp). Lazar (1972) encontró bandas de precipitación comunes entre aislamientos de *P. chrysanthemi*, *P. carotovora* y *P. carotovora* subsp. *atroseptica*, usando como antígenos extractos bacteriales de origen desconocido. Igualmente, Yakus y Schaad (1979) reportaron que un aislamiento denominado A.7 de *P. carotovora*, presentó antígenos de bandas débiles de precipitación al usar antisueños obtenidos de complejos de proteínas de membrana de varios aislamientos de *P. chrysanthemi*.

Con relación a *P. chrysanthemi*, diferentes autores plantean que en esta especie existen varios subgrupos serológicos. Yakus y Schaad (1979) agruparon 27 aislamientos de *P. chrysanthemi* en 4 serovares diferentes, y Dickey *et al.* (1984) ubicaron en 4 serovares a 315 aislamientos de esa especie y de diferentes hospedantes.

En la presente investigación se determinó que, de los tres aislamientos de *P. chrysanthemi* utilizados (Pcb, Pcp y Pcm), Pcb y

Pcp están estrechamente relacionados, mientras que Pcm constituye claramente un serotipo diferente. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Albornoz y Rivera (1980) y Dickey *et al.* (1987), quienes no encontraron relación serológica entre aislamientos provenientes de maíz y los obtenidos de otros hospedantes, considerando a los de maíz como un serotipo diferente.

En lo que respecta a *P. carotovora* subsp. *carotovora*, ya se discutió la estrecha relación serológica del Pccc con aislamientos de *P. chrysanthemi* (serotipo A), mientras que Pcca y Pccf claramente conforman serotipos diferentes entre sí. Schaad (1974) señaló la carencia de relaciones serológicas entre seis aislamientos de *P. carotovora*, y De Boer *et al.* (1979) establecieron 18 serogrupos para esta especie. En este estudio sólo se incluyeron 3 aislamientos, donde Pcca y Pccf provienen de un mismo hospedante (frutos de tomate) cultivado en sitios distintos. En estudios previos se determinó que estos dos últimos aislamientos diferían en patogenicidad y en algunas pruebas fisiológicas (Custodio *et al.*, 1993), corroborando estos resultados la variabilidad serológica de la especie.

Existe una clara diferenciación serológica entre los aislamientos de E.I. y P.a., y entre los aislamientos de *P. carotovora* y *P. chrysanthemi* particularmente cuando se utilizan antígenos termoestables.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo parcialmente financiado por FONACIT, proyectos S1-2001000998 y S1-2001001009.

#### REFERENCIAS

- Albornoz A, Rivera N (1980) Relación serológica entre cepas de *Erwinia chrysanthemi* aislada de diversos hospederos. *Cienc. Tec. Agric.* 3: 111-127.
- Carvajal R, Corrales S (1993) Detección de bacterias en semillas de patilla (*Citrullus canatus*) y su relación con la pudrición de los frutos. *Fitopatol. Venez.* 6: 43-44.
- Custodio F, Hernández Y, Trujillo G (1993) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* en frutos de tomate. *Fitopatol. Venez.* 6: 43-44.
- De Boer SH, Verdonck L, Vrugink H, Harju P, Bang HO, De Ley J (1987) Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains. *J. Appl. Bact.* 63: 487-495.
- De Boer SH, Copeman RJ, Vrugink H (1979) Serogroups of *Erwinia carotovora* potato strains determined with diffusible somatic antigens. *Phytopathol.* 69: 316-319.
- Dickey RS, Zumoff CH, Uyemoto JK (1984) *Erwinia chrysanthemi*: Serological relationships among strains from several hosts. *Phytopathol.* 74: 1388-1394.
- Dickey RS, Claflin LE, Zumoff CH (1987) *Erwinia chrysanthemi*: Serological comparisons of strains from *Zea mays* and other hosts. *Phytopathol.* 77: 426-430.
- Elrod RP (1941) Serological studies of the Erwiniae. I. *Erwinia amylovora*. *Bot. Gaz.* 103: 123-131.
- Elrod RP, Braun AC (1947) Serological studies of the genus *Xanthomonas*. I. Cross agglutination relationships. *J. Bacteriol.* 53: 509-518.
- Faría A, Hernández Y, Barreto T, Trujillo G (1993) *Erwinia chrysanthemi* afectando papa. *Fitopatol. Venez.* 6: 43.
- Garrido M, Hernández Y, Trujillo G (1993) Identificación de *Erwinia herbicola* infectando ocumo bravo. *Fitopatol. Venez.* 6: 43.
- Guevara Y, Rondón A, Solórzano R (1980) Bacteriosis del mango (*Mangifera indica* L.) en Venezuela. I. Sintomatología e identificación. *Agron. Trop.* 30: 65-76.
- Guevara Y, Rondón A, Arnal E, Suárez Z, Solórzano R, Navas R (1992) La pudrición bacteriana del tallo de la yuca en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 5: 33-36.
- Guillorit C, Samson R (1993) Serological specificity of the lipopolysaccharides the mayor antigens of *Pseudomonas syringae*. *J. Phytopathol.* 137: 157-171.
- Hernández Y, Trujillo G (1993a) Manchas foliares acuosas en cafecito de jardín (*Aglaonema commutatum*) 'María'. *Fitopatol. Venez.* 6: 42.
- Hernández Y, Trujillo G (1993b) Obtención y aplicación de antisueros a dos patovares de *Xanthomonas campestris*. *Rev. Fac. Agronomía (Maracay)* 19: 37-50.
- Hernández Y, Trujillo G (1997) Relaciones serológicas y electroforéticas entre ocho aislamientos del género *Erwinia*. *Fitopatol. Venez.* 10: 25-26.
- Hernández Y, Pino I, Trujillo G (1994) Pudrición en tallos de maíz (*Zea mays* L.). *Memorias 2ª Jornada Científica Nacional del Maíz*. pp. 59-60.
- Lazar I (1972) Serological relationship between the "Amylovora", "Carotovora" and "Herbicola" groups of the genus *Erwinia*. *Proc. 3rd Int. Conf. Plant. Path. Bact.* Wageningen, Holanda. pp. 131-141.
- Lucas LT, Grogan RG (1969) Some properties of specific antigens of *Pseudomonas lachrymans* and other *Pseudomonas* nomenclatures. *Phytopathol.* 59: 1913-1917.
- Muñoz C (1996) Detección de bacterias fitopatógenas en muestras de plantas provenientes de campo y en semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) usando la técnica serológica de doble difusión en agar. Tesis. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 71 pp.
- Mushin R, Naylor J, Lahovary N (1959) Studies on plant pathogenic bacteria. II Serology. *Aust. J. Biol. Sci.* 12: 233-246.
- Noval C (1991) Género *Erwinia*. En *Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. pp. 203-239.
- Ochoa F, Trujillo G, Sanabria de Albarracín N, Fernández J (1987) Enfermedad bacteriana en *Dieffenbachia* sp. *Fitopatol. Venez.* 1: 23-24.
- Ordosgoitti A, Santos R, Haddad O (1974) La pudrición acuosa del tallo del plátano. *Agron. Trop.* 24: 350-354.
- Penner, JL, Hinton NA, Hennessy J (1974) Serotyping of *Proteus rettgeri* on the basis of O antigens. *Can. J. Microbiol.* 20: 777-789.
- Perombelon MC, Kelman A (1980) Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 361-387.
- Rodríguez I (1989) *La serología en el diagnóstico y estudio de bacteriosis en plantas*. Boletín de Reseñas N°30. La Habana, Cuba. 35 pp.
- Rodríguez S, Sanabria de Albarracín N, Arjona A, Albarracín M, Hernández Y (2002) Diagnóstico postcosecha de enfermedades bacterianas zanahoria. *Fitopatol. Venez.* 15: 17-20.
- Samson R (1973) Les *Erwinia* pectinolytiques. II Recherches sur les antigens somatiques d'*Erwinia carotovora* var. *chrysanthemi*. *Ann. Phytopathol.* 5: 377-388.
- Samson R, Nassan-Agha N (1978) Biovars and serovars among 129 strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Proc. 4th. Int. Conf. Plant Path. Bact.* Angers, Algeria. pp. 547-543.
- Shepard JF (1972) *Gel diffusion methods for the serological detection of potato viruses X, S and M*. Bulletin N°662. Montana State University. Bozeman, MO, EEUU. 72 pp.
- Schaad NW (1974) Comparative immunology of ribosomes and disc gel electrophoresis of ribosomal proteins from erwiniae, pectobacteria and other members of the family Enterobacteriaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 42-53.
- Schaad NW (1979) Serological identification of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17: 123-147.
- Soto M (1994) Identificación y estudio de algunos aspectos epidemiológicos de las bacterias que afectan al lechoso (*Carica papaya*). Tesis. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 247 pp.
- Soto M, Trujillo G, Subero L (1993) Nueva enfermedad bacteriana afectando el cultivo del lechoso (*Carica papaya* L.). *Fitopatol. Venez.* 6: 43.
- Tunstall AM, Gowland G (1975) The antigens associated with the cell walls of members of the genus *Pseudomonas*. *J. Appl. Bact.* 38: 159-168.
- Trujillo GE (1996) Fundamentos de bacterias fitopatógenas. Trabajo de Ascenso. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 449 pp.
- Trujillo GE, Saettler AW (1981) Production and characterization of antisera to *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*. Research Report N°414. Agricultural Experiment Station. Michigan State University. East Lansing, MI, EEUU. 7 pp.
- Varela G, Hernández Y, Trujillo G (1993) Pudrición del tallo de la batata por *Erwinia chrysanthemi*. *Fitopatol. Venez.* 6: 42.
- Yakrus M, Schaad NW (1979) Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathol.* 69: 517-522.
- Young JM, Takikawa Y, Gordon L, Stead DE (1992) Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 67-105.