

DETECCIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN SEMILLAS

DE MAÍZ (*Zea mays* L.)

Yonis Hernández y Gustavo Trujillo

RESUMEN

Se realizó un estudio con el objeto de conocer la presencia de bacterias fitopatógenas en semillas de maíz. Las muestras de este cereal, que es uno de los más importantes cultivos agrícolas en el ámbito mundial y uno de los primeros en Venezuela, fueron recolectadas en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias y la Universidad Central de Venezuela, y se analizaron usando serología (doble difusión en agar) y medio semiselectivo. De 21 muestras de maíz dentado, todas resultaron contaminadas con al menos una especie de bacteria.

SUMMARY

A study was undertaken in order to explore the presence of plant pathogenic bacteria on corn seed. Samples of corn, a cereal that is one of the most important agricultural crops in the world and the first one in Venezuela, were collected at the Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias and the Universidad Central de Venezuela and analyzed by means of serology (agar-gel double diffusion) and semiselective media. Out of 21 samples of dented corn tested, all were contaminated with at

Pseudomonas andropogonis, *Xanthomonas campestris* pv *holcicola*, *P. syringae* pv *syringae* y *P. avenae* fueron encontradas en 15, 11, 6 y 3 muestras, respectivamente. De las seis muestras de maíz dulce tomadas a diferentes edades después de la floración, todas resultaron contaminadas con al menos una especie de bacteria. *P. andropogonis*, *X. campestris* pv *holcicola* y *P. syringae* pv *syringae* fueron encontradas en 3, 3 y 1 muestras, respectivamente. *Erwinia* sp. no fue detectada.

least one species of bacteria. *Pseudomonas andropogonis*, *Xanthomonas campestris* pv *holcicola*, *P. syringae* pv *syringae* and *P. avenae* were found in 15, 11, 6 and 3 samples, respectively. From the 6 different samples of sweet corn taken at different times after flowering, all resulted contaminated with at least one species of bacteria. *P. andropogonis*, *X. campestris* pv *holcicola* and *P. syringae* pv *syringae* were found on 3, 3 and 1 samples, respectively. *Erwinia* sp. was not found.

Introducción

La ciencia que evalúa la calidad de la semilla ha avanzado vertiginosamente en los últimos años en países de mayor desarrollo, evolucionando el conocimiento relacionado con

aspectos tales como tamaño y toma de muestra, así como la importancia de la realización de pruebas de pureza, germinación, pruebas especiales de calidad de la semilla y calidad patológica (Copeland, 1976; Saettler, *et al.*, 1989). Entre

las pruebas para determinar la calidad patológica de la semilla con relación a bacterias fitopatógenas se encuentran el examen visual, pruebas en medios de agar para la identificación de microorganismos, pruebas de infección de plan-

tas, técnicas con bacteriófagos, pruebas serológicas y medios semiselectivos y selectivos (Goto, 1990; Saettler *et al.*, 1989; Sigee, 1993). Sin embargo en Venezuela este desarrollo ha comenzado muy recientemente y aun se está en

PALABRAS CLAVE / Semillas / Bacterias Fitopatógenas / Maíz / *Zea mays* /

Recibido: 03/01/2001. Aceptado 09/03/2001

Yonis Hernández. Ingeniero Agrónomo, MSc en Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesor Agregado, Encargada del Laboratorio de Bacterias Fitopa-

tógenas, Facultad de Agronomía (UCV), Venezuela. Gustavo Trujillo. Ingeniero Agrónomo, Universidad Central de Venezuela (UCV). MSc, Ph.D. Michigan State University.

Profesor Titular, Coordinador de la Asignaturas Fundamentos de Virología y Fundamentos de Bacterias Fito-patógenas, Postgrado en Agronomía, Facultad de Agronomía (UCV). Direc-

ción: Instituto de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía (UCV), Apartado Postal 4579, Maracay 2101, Estado Aragua, Venezuela. e-mail: gus202@cantv.net

Foi realizado um estudo com o objetivo de conhecer a presença de bactérias fitopatógenas em sementes de milho. As amostras deste cereal, que é um dos mais importantes cultivos agrícolas no âmbito mundial e um dos primeiros na Venezuela, foram recolhidas no Centro Nacional de Investigações Agropecuárias e a Universidade Central de Venezuela, e analisaram-nas usando serologia (dupla difusão em agar) e meio semiseletivo. De 21 amostras de milho dentado, todas resultaram contaminadas com pelo menos uma espécie de bactéria.

Pseudomonas andropogonis, *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola*, *P. syringae* pv. *syringae* e *P. avenae* foram encontradas em 15, 11, 6 e 3 amostras, respectivamente. Das seis amostras de milho doze tomadas a diferentes idades depois da floração, todas resultaram contaminadas com pelo menos uma espécie de bactéria. *P. andropogonis*, *X. campestris* pv. *holcicola* e *P. syringae* pv. *syringae* foram encontradas em 3, 3 e 1 amostra, respectivamente. *Erwinia* sp. não foi detectada.

la etapa de demostrar a la colectividad (organismos o instituciones que deben ocuparse del problema de certificar la semilla) que el problema es real y que debemos adoptar otras medidas que permitan mejorar la calidad de la semilla que se produce e importa. Así se evitaría la propagación de enfermedades y por ende se aumentarían los rendimientos.

Varios ejemplos son ilustrativos de lo anterior. La bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomato, que produce la enfermedad conocida como "peca bacteriana del tomate", la cual desmejora enormemente la calidad del fruto en ese cultivo. En el estado de Florida y Sur de Georgia, en los Estados Unidos, la producción de semilla de tomate es importante, pero también lo es un estricto esquema de certificación para el control de esta enfermedad y así asegurar que la semilla esté libre de la bacteria, ya que aún con bajos porcentajes de infección se producen graves daños en las plantaciones. Debido a que el tomate es un cultivo de trasplante (Sigeo, 1993), la peca bacteriana ya constituye un problema en Venezuela (Hidalgo y Camino, 1984; Custodio *et al.*, 1993; Muñoz, 1996; Hernández *et al.*, 1997). Con seguridad, la bacteria viene en la semilla que se importa. Otro ejemplo lo constituye el arroz (*Oryza sativa*) y la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, causa de la "quemazón bacteriana del arroz", una enfermedad devastadora del cultivo, que se transmite vía semilla; porcentajes mínimos de infección ocasionan grandes pérdidas, debido a que el riego

por inundación crea condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad (Goto, 1990). Esta enfermedad ya está presente en Venezuela (Trujillo *et al.*, 1999), por lo que se impone el uso de semilla certificada. La infección de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) por *Xanthomonas phaseoli* es otro ejemplo que se ha señalado en el país (Albarracín, 1982; Contreras y Trujillo, 1984; Trujillo, 1989).

En el I Encuentro de Investigadores Agrícolas, realizado en Maracay en 1996 (MAC, 1995) se estableció, en virtud de la necesidad de estrictos esquemas de certificación para la agricultura del país, y como primera prioridad en el área, trabajar en mejorar la calidad de la semilla. Esto motivó a que se iniciara, en el Postgrado de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, un curso de Patología de semilla, y que se crearan dos nuevos laboratorios, el de Patología de semillas y el de Micotoxicología (Trujillo, 1997; Trujillo, 1999).

La producción de antisueños a patógenos bacterianos y la aplicación de numerosas técnicas serológicas en Venezuela ha abierto la posibilidad de conocer con rapidez la presencia de bacterias en lotes de semillas y la información al respecto ha aumentado aceleradamente (Contreras y Trujillo, 1984; Trujillo y Hernández, 1995; Muñoz, 1996).

La producción de cereales en Venezuela se encuentra limitada a tres rubros: arroz, maíz y sorgo, y representa el 11,7% del valor total de la producción agropecuaria y el 29% de la producción agrícola

vegetal. Sin embargo, su importancia para las políticas agrícolas y agroindustriales es muy grande. El maíz es el rubro de mayor producción, siendo los estados más productores Portuguesa, Guárico y Barinas (IESA, 2000), cualquier problema concerniente a este rubro, amerita su estudio y solución. Dada la nula o muy poca información existente en el país con relación a bacterias fitopatógenas llevadas en la semilla, se inició este estudio, del cual se presentó ya un adelanto (Trujillo y Hernández 1990).

Materiales y Métodos

Materiales

Para determinar la presencia de bacterias fitopatógenas en semillas de maíz se contó con material de la Sección de Semillas del Centro Nacional de investigaciones Agropecuarias (CENIAP) y de la Colección de Semillas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Se estudió un total de 75 materiales diferentes, de los cuales 34 fueron de maíz dulce, variedad CENIAP dulce 5-59, cosechado en diferentes etapas después de la floración, y 41 fueron materiales de maíces dentados, dentro de los cuales se incluyeron híbridos, variedades comerciales y experimentales.

Procesamiento de las muestras

Por cada material estudiado se procesaron tres muestras de 20g de semillas (de 59 a 229 granos en maíz dulce y aproximadamente 55 granos

en maíces dentados). Las muestras fueron lavadas dos veces en 200cc de agua destilada estéril, agitando vigorosamente durante 30 minutos. Se descartó el agua y las semillas fueron colocadas en una fiola con medio líquido estéril (5g de levadura en 1l de agua destilada) y ajustado a 50ppm de cicloheximide, para evitar el crecimiento de hongos en el medio (Trujillo, 1979). Las muestras fueron mantenidas en agitación continua por 48 horas, la parte líquida fue centrifugada a 3500g por 15 minutos, el pellet resultante se resuspendió en 2ml de solución salina y luego sometido a baño de María (aproximadamente 100°C) por 30 minutos, siguiendo la metodología de Trujillo y Saettler (1979).

Todas las muestras fueron analizadas por serología con la prueba de doble difusión en agar (Trujillo y Saettler, 1981), utilizando antisueños a *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola*, *Pseudomonas andropogonis*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. avenae* y *Erwinia* sp. Todos los antisueños provenían de la Colección de antisueños del Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

Pruebas de doble difusión en agar

Para realizar las pruebas se preparó un medio con 0,7% de agar purificado, 10ml de solución al 1% (peso/volumen) de orange G, 30ml de solución con 10mg/ml de azida de sodio (NaN₃), com-

pletando hasta 1000ml con buffer fosfato salino. El medio fue esterilizado y vaciado en placas plásticas de 90mm de diámetro, a razón de 20ml por cada una. En cada placa se montaron 4 pruebas serológicas, realizando para ello un orificio o celdilla central de unos 7mm de diámetro y seis celdillas laterales de igual diámetro y separadas a una distancia de 5mm de la celdilla central. El antisuero fue colocado en la celdilla central y las muestras en las celdillas laterales, empleando un volumen de 40µl en cada caso.

Resultados y Discusión

La prueba serológica de doble difusión en agar (Ouchterlony), constituye un método rápido, repetible, fácilmente manejable y confiable para detectar patógenos bacterianos en material vegetal y en semillas. Esta tecnología se ha utilizado con éxito en nuestros laboratorios con cultivos como caraota (Contreras y Trujillo, 1984), sorgo (Hernández, 1989), tomate (Muñoz, 1996) y otros.

El hecho que las semillas fueran lavadas vigorosamente dos veces con agua destilada estéril elimina gran parte de los contaminantes externos, en este caso bacterias. Sin embargo, para tener seguridad de que se ha eliminado la contaminación externa es necesario una desinfección del material con productos apropiados (solución de cloro, azida de sodio, alcohol). En este caso se procedió solamente a una limpieza con agua destilada estéril, para reducir la posibilidad de contaminación externa, mas no eliminarla, pues muchos desinfectantes pueden penetrar rápidamente e, incluso, eliminar parte de la población interna (Trujillo, 1998). Por el hecho de no diferenciar contaminación externa de infección interna, en este trabajo se utilizan los términos genéricos de presencia, detección u otros, que no implican el sitio donde está alojada la bacteria.

TABLA I
PRESENCIA DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MUESTRAS DE MAÍZ DULCE, COSECHADAS A DIFERENTES DÍAS DESPUÉS DE LA FLORACIÓN

Días desde floración	<i>P. avenae</i>	<i>P. androp.</i>	<i>P. s. pv. s</i>	<i>Erwinia sp.</i>	<i>X. c. pv. h</i>
15	-	-	+	-	+
30	-	+	-	-	+
40	-	+	-	-	-
50	-	+	-	-	-
60	-	+	-	-	+
65	-	-	-	-	+
Totales	0/6	4/6	1/6	0/6	4/6

P. avenae = *Pseudomonas avenae*.

P. androp. = *Pseudomonas andropogonis*

P. s. pv. s = *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

X.c.pv.h = *Xanthomonas campestris* pv. *holcicola*

Por cada material analizado, se tomaron dos muestras de 20g de semilla.

Se consideró (+) cuando al menos una muestra resultó, serológicamente, infectada con la bacteria.

TABLA II
BACTERIAS FITOPATÓGENAS DETECTADAS EN MUESTRAS DE MAÍZ DULCE (*Zea mays* L.)

Muestra*	<i>P. avenae</i>	<i>P. androp.</i>	<i>P. s. pv. s</i>	<i>Erwinia sp.</i>	<i>X. c. pv. h</i>
1	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	+	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	-	+	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	+	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	+	-	-	-
18	-	+	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	+	-	-	-
22	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-
26	-	-	+	-	-
27	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-
Totales	0	6	2	0	1

*Muestras de maíz dulce (Dulce 5-59) provenientes de diferentes ensayos.

Ver Tabla I.

Maíz dulce

Se detectó bacterias en todas las muestras de maíz dulce cosechado 15 a 65 días después de la floración. Las muestras provenían de los

campos de CENIAP (Maracay), bien atendidos y supervisados. En el 50% de las muestras se detectó la combinación de dos bacterias, donde las mas frecuentemente encontradas fueron *P. andropo-*

gonis y *X. campestris* pv. *holcicola*. (Tabla I).

Como se explica en Materiales y Métodos, por obtenerse poca cantidad de semilla por material analizado, sólo se estudió una muestra de

20g por cada material y se realizaron dos repeticiones. Sin embargo el número de granos de maíz para las muestras tomadas 15 días después de la floración (aproximadamente 229 semillas) fue casi cinco veces el número de granos para los estudiados 65 días después de la floración (aproximadamente 59 granos). De las 34 muestras del material maíz dulce Ceniap 5-59 analizadas, 28 de ellas provenían de ensayos diferentes y no se conocía a cuantos días después de la floración fueron cosechados. De esas 28 muestras de maíz dulce, tan sólo nueve mostraron la presencia de bacterias, lo que constituye el 34,6% de las muestras estudiadas (Tabla II). Si se toma en consideración las 34 muestras de maíz dulce, el número de muestras con bacterias aumenta a 15, lo que representa un 44,11% de semillas de maíz con al menos una bacteria. Sólo se encontraron tres muestras con infección doble (con dos bacterias diferentes). En orden de importancia fue detectada *P. andropogonis* en 10 muestras de 34 (29,41%), *X. campestris* pv. holcicola en 5 (14,75%) y *P. syringae* pv. syringae en una muestra (2,94%). No se detectó *P. avenae* ni *Erwinia* sp., aunque es conocido que todas estas bacterias son llevadas en la semilla (Hernández, 1989; Trujillo y Hernández, 1995).

Maíz dentado

En el caso del maíz dentado, el 100% de las muestras estudiadas estaban afectadas (Tabla III). Nueve de las muestras presentaron más de una bacteria, coincidiendo los resultados con los obtenidos para el maíz dulce. La bacteria *P. andropogonis* fue la más frecuentemente encontrada (Tabla IV), detectándose en 15 de las 21 muestras estudiadas (71,42%). Se encontró *X. campestris* pv. holcicola en 11 muestras (52,38%), *P. syringae* pv. syringae en 6 muestras (28,57%), *P. avenae* en 3 muestras (14,28%) y no se de-

TABLA III
DETECCIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN SEMILLAS DE MAÍZ (*Zea mays.*) DENTADO

Muestra	<i>P. avenae</i>	<i>P. androp.</i>	<i>P.s.pv.s</i>	<i>Erwinia</i> sp.	<i>X.c.pv.h</i>
CENIAP-69	-	+	+	-	+
CENIAP-1006	+	+	-	-	+
CENIAP-1016	-	+	-	-	+
FUNIP-1	+	+	-	-	-
Sefloarca-02	+	+	+	-	+
Sefloarca-88	-	+	+	-	+
PB-8	-	+	+	-	-
PB-8(A)	-	+	-	-	+
Amarillo	-	+	-	-	+
Obregón	-	-	-	-	+
Cotufa	-	-	-	-	+
Blanco-1	-	-	-	-	+
Blanco-2	-	-	-	-	+
M-8	-	-	+	-	-
M-9	-	+	-	-	-
M-11	-	+	-	-	-
M-14	-	+	-	-	-
M-15	-	+	-	-	-
M-18	-	+	-	-	-
M-21	-	+	-	-	-
M-26	-	-	+	-	-
Totales	3	15	6	0	11
%	14,28	71,42	28,57	0	52,38

Ver Tabla I

tectó *Erwinia* sp. Aunque para cada material sólo se tomó una alícuota de 20g (con dos repeticiones), la presencia de bacterias en el 100% de estos materiales y el hallazgo de semillas que albergaban más de un patógeno, llegando a presentar hasta cuatro patógenos bacterianos, implica un problema real para el cultivo.

P. avenae fue detectada en los materiales de maíz dentado CENIAP 1006, FUNIP-1 y Sefloarca 02, señalados como susceptibles a esa bacteria (Hernández y Trujillo, 1995). *Erwinia* sp. no fue encontrada en las muestras estudiadas y los mismos autores (Hernández y Trujillo, 1995) señalan a CENIAP PB-8, CENIAP 69, CENIAP 1016, Sefloarca 02, Sefloarca 88 y FUNIP-1 como resistentes a la bacteria. También reportan otros materiales susceptibles a *Erwinia* sp., como CENIAP PB-8 y Obregón. Las condiciones requeridas por las bacterias del género *Erwinia* para la infección de plantas son diferentes

TABLA IV
PRESENCIA DE BACTERIAS EN SEMILLAS DE MAÍZ DENTADO

Infectados	Total muestras infectadas	% muestras infectadas
Al menos con 1 bacteria	21/21	100
Con 2 bacterias diferentes	5/21	23,8
Con 3 bacterias diferentes	3/21	14,28
Con 4 bacterias diferentes	1/21	4,76
Con <i>P. andropogonis</i>	15/21	71,42
Con <i>X. c. pv. holcicola</i>	11/21	52,38
Con <i>P. s. pv. syringae</i>	6/21	28,57
Con <i>P. avenae</i>	3/21	14,28
Con <i>Erwinia</i> sp.	0/21	0

Ver Tabla I

a las requeridas por las de los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, comenzando por la necesidad de heridas para la penetración del patógeno (Noval, 1991; Fahy y Persley, 1983; Sigeo, 1993).

Para alcanzar una mejor comprensión de la realidad serían necesarios datos como zona de procedencia de la muestra, a fin de conocer las

condiciones climáticas que tanto inciden en la propagación de bacterias, tipo de riego, densidad de siembra, etc. (Goto, 1990; Sigeo, 1993). Sin embargo, es claro que se está frente a un problema, pues al presentarse condiciones favorables, cualquiera de las bacterias detectadas pueden producir enfermedades graves en las plantaciones.

Conclusiones y Recomendaciones

En el presente trabajo se demuestra que las semillas de maíz son afectadas y pueden llevar con ellas una serie de patógenos bacterianos, que en condiciones apropiadas pueden causar problemas al cultivo. Se detectó la presencia de las bacterias *X. campestris* pv. holcicola, *P. andropogonis*, *P. syringae* pv. *syringae* y *P. avenae* en la mayoría de las muestras analizadas, y no se detectó a *Erwinia* sp. De haberse estudiado un número mayor de muestras por cada material, los resultados serían de mayor contundencia, por lo que se recomienda continuar con estos estudios.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del Centro Nacional de Semilla del CENIAP, por su ayuda en la obtención de diferentes muestras de maíz, y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, por el financiamiento parcial de esta investigación (Proyecto N° 01-31-4008-97).

REFERENCIAS

Albarracín M, Trujillo G, Borges O (1982) La quemazón bacteriana de la caraota (*Phaseolus*

vulgaris L.) en Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 12: 213-221.

Copeland LO (1976) *Principles of Seed Science and Technology*. Burgess Publishing Company. Minnesota. 369 pp.

Contreras de Velasquez N, Trujillo G (1984) Evaluación de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* en lotes de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) mediante la técnica combinada del medio semiselectivo e inmuno difusión en agar. *Agronomía Trop.* 34: 59-68.

Custodio F, Hernández Y, Trujillo G, Albarracín M (1993) Bacteriosis en plantaciones de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) del estado Aragua. *Fitopatol. Venez.* 6: 44 (Resumen).

Goto M (1990) *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*. Academic Press. California. 373 pp.

Fahy PC, Persley GJ (1983) *Plant Bacterial Diseases. A Diagnostic Guide*. Academic Press. Sydney. 379 pp.

Hernández Y, Trujillo G (1995) Reacción de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) a tres enfermedades bacterianas. *Rev. Fac. Agron.* 21: 27-36.

Hernández Y, Trujillo G, Muñoz C (1997) Diagnóstico de bacterias que afectan al tomate en algunas zonas de producción en Venezuela. *Memorias XV Congreso Venezolano de Fitopatología*. Maracaibo, Venezuela. p. 9.

Hernández J (1989) *Bacteriosis en el cultivo del sorgo (Sorghum bicolor* L. Moench). *Algunos aspectos epidemiológicos*. Tesis Mg. Sc. Facultad de Agro-

nomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 210 pp.

Hidalgo W, Camino J M (1989) Identificación del agente causal de la peca bacterial del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 2: 30-32.

IESA (2000) El Negocio Agro-alimentario. Seminario. Caracas, febrero 24-25.

Ministerio de Agricultura y Cría. (1995). *Las Jornadas de Reflexión y Diagnóstico de la Investigación Agrícola en Venezuela*. Talleres Gráficos FONAIAP. Maracay. 114 pp.

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 de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. 81 pp.

Noval AC (1991) Genero *Erwinia*. En: Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Madrid. P 203-239.

Saettler AW, Schaad NW, Roth DA (1989) *Detection of bacteria in seed*. A.P.S. Press, Minnesota. 122 pp.

Sigeo DC (1993) *Bacterial Plant Pathology: Cell and Molecular Aspects*. University Press. Cambridge. 325 pp.

Trujillo G (1979) *The use of serology and semiselective media in the detection of Xanthomonas bean blight bacteria*. Ph. D. Thesis. Michigan State University. East Lansing. Michigan. 133 pp.

Trujillo G (1989) La problemática

de las semillas de leguminosas comestibles en relación a los patógenos de plantas, caso: Venezuela. *Agronomía al Día* 2: 30-32.

Trujillo G (1997) *Investigaciones sobre enfermedades de plantas 1995-1997*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. N° 9. 47 pp.

Trujillo G (1998) *Fundamentos de bacterias fitopatógenas*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Alcance N° 56. 210 pp.

Trujillo G (1999) *Investigaciones sobre enfermedades de plantas 1997-1999*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. N° 10. 69 pp.

Trujillo GE, Saettler AW (1979) A combined semiselective medium and serology test for the detection of *Xanthomonas* blight in bean seed. *Journal of Seed Technology* 4: 35-41.

Trujillo GE, Saettler AW (1981) Production and characterization of antisera to *Xanthomonas phaseoli* var *fuscans* and *Xanthomonas phaseoli*. *Research Report*. 27: 232. Michigan State. Agricultural Experiment Station. East Lansing. 8 pp.

Trujillo G, Hernández Y (1990) Detección de bacterias en semillas de maíz (*Zea mays* L.) *Jornadas Técnicas del Instituto de Botánica Agrícola*. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. pp. 23-25.

Trujillo G, Hernández Y, Subero L, Garrido MJ, Muñoz C (1999) La quemazón bacteriana del arroz causada por *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* en Calabozo estado Guárico, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 12: 2-5.

*El mundo está lleno de buenas máximas,
sólo falta aplicarlas*

Blaise Pascal