

---

**PROTOSCOLOS PARA LA AISLACIÓN DE *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* DESDE SEMILLA DE COLIFLOR (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), IDENTIFICACIÓN E INOCULACIÓN EN CAMPO.**

**JAIME ESTEBAN VERGARA LÓPEZ  
INGENIERO AGRÓNOMO**

El objetivo general de este ensayo consistió en la validación de dos protocolos para la extracción y aislamiento de la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, su identificación y posterior inoculación en campo. La bacteria fue obtenida a partir de semillas de coliflor, variedad Vigo, en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad de Talca. Una vez aislada e identificada la bacteria, se procedió a inocularla en un campo experimental de repollos ubicado en la localidad de Colorado en la comuna de San Clemente.

El primer protocolo de aislamiento, consistió en la maceración directa de la semilla, para así extraer microorganismos tanto del exterior como del interior. A pesar de que la variedad de semilla que se utilizó se considera susceptible a la bacteria, no se pudieron encontrar colonias características que provocan la patología de mancha angular en ninguna de las placas sembradas. Al no funcionar la primera maceración, se procedió a realizarla nuevamente con una previa inmersión de las semillas en alcohol al 50% por 3 minutos con el fin de eliminar microorganismos que se encontraban al exterior de las semillas, favoreciendo así el aislamiento de microorganismos internos, obteniéndose nuevamente resultados negativos.

El segundo protocolo consistió en la inmersión de las semillas, las que fueron suspendidas bajo una solución de Tampón salino más Tween 20 y agitadas durante 2,5 horas a 100 rpm. Terminado el tiempo de agitación, se realizaron 2 disoluciones (101 y 102) de las cuales se prepararon placas por cada una, obteniéndose colonias pertenecientes a la bacteria en estudio.

Para el protocolo de inoculación en campo se preparó una solución con caldo nutritivo, dejándolo por 24 horas para permitir la reproducción de la bacteria. Posteriormente, se realizó la inoculación en plantas de repollo mediante aspersión con una bomba manual de espalda, obteniendo resultados positivos, mostrándose síntomas característicos de la bacteria a los 14 días después de la inoculación. Luego se realizaron las evaluaciones de patogenicidad tomando hojas de las plantas que muestran síntomas de la bacteria, las cuales se trasladaron al

---

laboratorio para realizar el macerado de estas con el fin de realizar la validación del protocolo.

## ABSTRACT

Two protocols for the isolation from cauliflower seeds of the pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, identification and inoculation in the field were evaluated. The bacterium was obtained from cauliflower seeds, cv. Vigo variety, and the experimental process took place at the Plant Pathology laboratory, Universidad de Talca. Once the bacterium was isolated and identified, it was inoculated in an experimental cabbage field located in Colorado, San Clemente.

The first isolation protocol consisted in the seed maceration in order to extract microorganisms from both the inside and the surface of the seed. Although the cultivar used it is considered susceptible to the bacterium, it was not possible to find typical colonies in culture media of the pathogen which cause black vein. The procedure was repeated, immersing the seeds in alcohol (50%) for 3 minutes to eliminate the external microorganisms of the seeds. This, to facilitate the isolation of the internal microorganism. However, negative results were obtained again.

In the second protocol, seeds were suspended in saline buffer and Tween 20, shaking the suspension for 2.5 hours at 100 rpm. After finishing this process, two dilutions (10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>) were prepared, sowing them in separate Petri dishes containing differential culture media. As a result, colonies of the bacteria were obtained.

For the field inoculation, a nutrient broth solution was prepared and left at room temperature for 24 hours to allow the reproduction of the bacteria. After that, cabbage plants were inoculated using a manual sprinkler irrigator. Positive results were obtained showing the inoculated plants typical symptoms of the disease 14 days after the inoculation. Then, pathogenicity evaluations were made.