

# Detección de *Xanthomonas cucurbitae* (Bryan) Vauterin *et al.* afectando frutos de zapallo coreano en Mendoza y San Juan, Argentina

## Detection of *Xanthomonas cucurbitae* (Bryan) Vauterin *et al.* affecting fruits of winter squash in Mendoza and San Juan, Argentina

Jorge G. Lafi<sup>1,2</sup>  
Clara E. Linardelli<sup>1</sup>

Originales: Recepción: 02/03/2010 - Aceptación: 06/10/2011

Nota científica

### RESUMEN

Durante las campañas 2007/08 y 2008/09, en explotaciones comerciales de zapallo coreano (*Cucurbita moschata* Duch) de las zonas hortícolas de Mendoza y San Juan, se observaron sobre los frutos numerosas lesiones circulares, de 3 a 6 mm de diámetro, de aspecto húmedo, algo deprimidas hacia el centro, con un exudado gomoso color ámbar. Cuando las lesiones superficiales se unían, se desarrollaba una podredumbre gelatinosa hacia el interior de los tejidos, que podía profundizar hasta la cavidad seminal. El resultado final de la afección era una podredumbre seca y costrosa, que abarcaba gran parte del fruto, inutilizándolo para ser comercializado. En follaje también se observaron síntomas de la enfermedad, como manchas cloróticas angulares de 2 a 3 mm de lado, que en ocasiones se fusionaban. El objetivo del presente trabajo fue determinar la etiología de la enfermedad. Para ello, se tomaron y analizaron muestras de frutos y hojas afectadas, durante ambas temporadas. Se concluyó que la sintomatología es causada por una bacteria, que de acuerdo con los estudios morfobioquímicos y patogénicos es *Xanthomonas cucurbitae* (Bryan) Vauterin *et al.* Esta investigación constituye la primera cita de este patógeno afectando frutos en Argentina.

### ABSTRACT

During 2007/08 and 2008/09, in horticultural commercial farms in Mendoza and San Juan, numerous lesions on winter squash (*Cucurbita moschata* Duch) fruits surface were observed. They appeared as water-soaked, circular **spots of** about 3 to 6 mm in diameter, slightly depressed towards the center, where they presented a gummy amber exudate. Towards the interior of the tissues, when superficial lesions joined together, a gelatinous type of rot developed, which deepened to the seed cavity. As a final result, a dry and crusty type of rot covered the fruit, which caused it to be unmarketable. Symptoms of the disease were also observed on leaves, as chlorotic and angular spots of 2 to 3 mm, which could coalesce. The aim of this work was to determine the etiology of the disease. Samples of affected leaves and fruits were taken during both growing seasons, in order to isolate and study the causal agent. Morphobiochemical and pathogenic tests proved that the symptoms were caused by the bacteria *Xanthomonas cucurbitae* (Bryan) Vauterin *et al.* This is the first time the pathogen is cited affecting fruits in Argentina.

- 
- 1 Cát. de Fitopatología. Dpto. de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCUYO. Alte. Brown 500. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. M5528AHB. jlaf@fca.uncu.edu.ar
  - 2 Cát. de Fitopatología. Dpto. de Agronomía. Facultad de Ingeniería. Unidad Integrada Universidad Nacional de San Juan - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (UNSJ - INTA). Ing. Marcos Zalazar (Calle 11) y Vidart. (5427) Villa Aberastain. Pocito. San Juan. Argentina.

**Palabras clave**

zapallo, *Cucurbita moschata*, frutos, bacteriosis, *Xanthomonas*

**Keywords**

winter squash, *Cucurbita moschata*, fruits, bacterial disease, *Xanthomonas*

**INTRODUCCIÓN**

El zapallo es una de las principales hortalizas estivales de la región de Cuyo. El tipo de zapallo más cultivado es el coreano, calabaza, "Anco" o "Butternut" (*Cucurbita moschata* Duch) (7). En la década 2000-2010, la exportación se ha convertido en el destino principal de esta actividad productiva, fundamentalmente a la Unión Europea. Las exportaciones de calabazas se han incrementado en más de 600 toneladas por año. En 2006 se superaron los US\$ 2.000.000 valor FOB (4). Para poder exportar zapallo debe cumplirse con una serie de atributos que califican su aptitud, más aún cuando existen normas y protocolos para calidad diferenciada, que no admiten daños o defectos en los frutos (4). Durante las campañas 2007/08 y 2008/09 se monitorearon explotaciones comerciales con distintas cultivares de zapallo coreano en las zonas hortícolas de Fray Luis Beltrán (Dpto. Maipú) y del Valle de Uco en Mendoza, y de Médano de Oro (Dpto. Rawson) y de Pocito en San Juan. Como resultado de estos monitoreos se observó que la mayoría de los frutos de zapallo coreano presentaban lesiones acuosas, circulares, distribuidas aleatoriamente sobre la superficie. Además, en hojas se observaron manchas angulosas, con amarillamiento y necrosis.

Existen principalmente dos patologías capaces de afectar el fruto durante el cultivo y la postcosecha, con síntomas similares a los observados durante el monitoreo: la mancha angular y la mancha bacteriana. Éstas son causadas por dos procariontes: *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* (Smith & Brian) Young, Dye & Wilkie, y *Xanthomonas cucurbitae* (Bryan) Vauterin *et al.* (= *Xanthomonas campestris* pv *cucurbitae* (Bryan) Dye), respectivamente (10, 12). La primera ha sido observada esporádicamente en la región de Cuyo afectando frutos de cucurbitáceas como zapallo del año (*Cucurbita maxima* L.) (Linardelli, comunicación personal). La segunda fue hallada por primera vez en Estados Unidos en 1926 (3) y ha sido descrita en 1989 en Argentina afectando follaje de zapallito redondo (*Cucurbita máxima* var *zapallito*) (1), pero no frutos.

**Objetivo**

Identificar y caracterizar al agente causal de la sintomatología observada en hojas y frutos de zapallo coreano.

**MATERIALES Y MÉTODOS****Sintomatología**

Se realizó un muestreo de hojas y frutos afectados de zapallo coreano, en las distintas explotaciones monitoreadas. Las muestras, adecuadamente acondicionadas, se trasladaron a laboratorio para su análisis. Se efectuó una evaluación macroscópica y bajo lupa de los síntomas encontrados, según la metodología de Streets (11).

### **Pruebas de exudado**

Se realizaron pruebas de exudado (6) a partir de lesiones presentes en hojas y en frutos.

### **Aislamientos**

Se efectuaron aislamientos mediante la siembra directa en placas de Petri de trozos de tejidos afectados, previo lavado y esterilización superficial con hipoclorito de sodio al 3%, durante tres minutos.

Como medio de cultivo se utilizó agar papa glucosado (APG) al 2%, pH 7,0 (8). Las placas de Petri se incubaron a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  por un lapso de 96 horas.

### **Pruebas morfológicas y bioquímicas**

Las pruebas morfológicas y bioquímicas para la identificación del agente causal (2, 10) consistieron en determinar forma y tamaño de las células; efectuar tinción negativa y tinción de Gram, test de hidróxido de potasio al 3%, producción de catalasa, relación con el oxígeno, metabolismo oxidativo-fermentativo de la glucosa, hidrólisis de gelatina y de almidón, hidrólisis de Tween 80, tolerancia al 2% y al 5% de NaCl, producción de fluorescencia en medio Agar King B (KB) y crecimiento en medio semiselectivo para *Xanthomonas* (SX).

Se analizaron las características morfoculturales de las colonias bacterianas en los medios APG, agar nutritivo (AN), agar nutritivo con extracto de levadura (NYA), agar extracto de levadura con carbonato de calcio (YDC) y en SX (2, 6, 10).

### **Pruebas de patogenicidad**

Las pruebas de patogenicidad (5) se realizaron inoculando plantines de zapallo coreano cv. Cuyano INTA, de ocho semanas de edad, pulverizando en ambas caras de las hojas una suspensión bacteriana de  $10^7$  células. $\text{ml}^{-1}$  formulada en agua destilada estéril con 0,1% de Triton X-100. Las plantas inoculadas se mantuvieron en cámara húmeda por un lapso de 48 horas a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . El tratamiento testigo fue sólo pulverizado con agua destilada estéril con 0,1% de Triton X-100.

También se inocularon frutos de la misma cultivar en estado de madurez comercial. Para ello, los frutos fueron esterilizados superficialmente por inmersión en hipoclorito de sodio al 5% durante tres minutos. Posteriormente, se inocularon por medio de inyecciones subepidérmicas con una suspensión bacteriana ( $10^7$  células. $\text{ml}^{-1}$ ) en agua destilada estéril con 0,1% de Triton X-100. Los frutos se mantuvieron en cámara húmeda durante 72 horas a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ . El tratamiento testigo consistió en inyectar agua destilada estéril con 0,1% de Triton X-100.

### **Reaislamientos**

Para cumplimentar los postulados de Koch se reaisló al patógeno en los medios APG, YDC y SX a partir de hojas y frutos inoculados artificialmente, repitiendo la metodología empleada en el aislamiento.

## RESULTADOS

### Síntomatología

#### *Hojas*

Los síntomas en hojas corresponden a los característicos producidos por una bacteriosis en follaje, expresados inicialmente como manchas acuosas, luego cloróticas, angulosas, de 2 a 3 mm de lado.

Al fusionarse pueden abarcar gran parte del limbo o de los márgenes de la hoja, necrosando y rajando la zona afectada (foto 1, pág. 251).

#### *Frutos*

Exteriormente, sobre la superficie de los frutos y sin ubicación preferencial, se observan numerosas lesiones de aspecto húmedo, circulares, de aproximadamente 3 a 6 mm de diámetro, algo deprimidas hacia el centro, presentando en este punto un exudado, al principio gomoso color ámbar que luego se seca y endurece (foto 2, pág. 251).

En ocasiones, las lesiones coalescen abarcando una mayor superficie del fruto (foto 3, pág. 251).

Interiormente, al cortar la zona afectada se observan lesiones acuosas con avance semicircular hacia el interior de los tejidos de unos pocos milímetros.

Sin embargo, cuando las lesiones se agrupan, abarcando mayor superficie, se desarrolla una podredumbre de tipo gelatinoso capaz de profundizar uno o más centímetros, pudiendo llegar hasta la cavidad seminal, terminando en una podredumbre de tipo seco (foto 4, pág. 251).

### Prueba del exudado

Las pruebas de exudado resultaron positivas, tanto para las lesiones provenientes de hojas como para las de fruto, con exposición directa de abundante zooglea bacteriana en la zona del corte.

### Aislamientos

De los aislamientos realizados en APG de las muestras recolectadas, se obtuvieron en su mayoría (> 90%) colonias bacterianas mucosas, brillantes, de color amarillo fuerte y de borde entero (foto 5, pág. 251).

### Pruebas morfológicas y bioquímicas

Las pruebas morfológicas permitieron caracterizar al agente causal como una bacteria con forma de bacilo, de 0,40  $\mu\text{m}$  de ancho x 1,00  $\mu\text{m}$  de largo promedio (fotos 6a y 6b, pág. 252).

Los resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas se muestran en la siguiente tabla (pág. 249).

**Tabla.** Pruebas de diferenciación bioquímica.

**Table.** Tests of biochemical differentiation.

| Prueba bioquímica                   | Resultado        |
|-------------------------------------|------------------|
| Tinción de Gram                     | Gram Negativa    |
| Test de hidróxido de potasio        | Positivo         |
| Catalasa                            | Positivo         |
| Relación con el oxígeno             | Aeróbica         |
| Metabolismo oxid-ferm de la glucosa | Oxidativo        |
| Hidrólisis de gelatina              | Positivo         |
| Hidrólisis de almidón               | Positivo         |
| Hidrólisis de Tween                 | Positivo (lento) |
| Crecimiento en NaCl 2%              | Positivo         |
| Crecimiento en NaCl 5%              | Positivo         |
| Fluorescencia en medio King B       | Negativo         |
| Crecimiento en medio SX             | Positivo         |

En APG, AN, NYA e YDC las colonias son circulares, brillantes, de bordes enteros, convexas y de aspecto mucoso. En APG, NYA e YDC el color es amarillo intenso (foto 7, pág. 252), mientras que en AN presentan un amarillo más débil y con menor mucosidad. En SX las colonias son características del género *Xanthomonas*, expresándose como colonias circulares de borde entero, planas, translúcidas y con centro azul oscuro (foto 8, pág. 252).

### Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad en plantas arrojaron resultados positivos, confirmados por la aparición en hojas de numerosas manchas de aspecto húmedo y/o cloróticas, de bordes angulosos, de 2 a 3 mm de diámetro, a los 6-7 días de inoculadas (foto 9, pág. 252). Las pruebas de patogenicidad en fruto reprodujeron, a los 21 días, la sintomatología inicialmente descrita (foto 10, pág. 252).

### Reaislamientos

Los reaislamientos en los medios APG, YDC y SX realizados a partir de hojas y frutos inoculados artificialmente resultaron satisfactorios, correspondiendo sus características con los del patógeno aislado originalmente.

## DISCUSIÓN

La observación de la masa de bacterias dispersándose desde las lesiones en las pruebas de exudado, tanto de hojas como de frutos sintomáticos, indicaron que la enfermedad era de índole bacteriana. Esto se confirmó con los aislamientos en los distintos medios de cultivo que permitieron identificar el agente etiológico *Xanthomonas cucurbitae* (Bryan) Vauterin *et al.* (12).

En concordancia con lo expresado por otros autores (1, 13), es muy difícil distinguir a campo si la sintomatología producida es debida al agente causal de la mancha bacteriana (*X. cucurbitae*) o al de la mancha angular de las cucurbitáceas (*Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*).

En este estudio, en muy pocos aislamientos (< 3%) se obtuvieron, como resultado de los mismos, colonias blanco grisáceas, de consistencia cremosa, de bordes festoneados, semejantes a las producidas por *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*.

Por otra parte, se señala que es común que los síntomas en follaje pasen inadvertidos, ya sea por su pequeño tamaño (13), o bien, por estar fuertemente enmascarados por la pulverulencia que ocasiona comúnmente el oidio de las cucurbitáceas (Lafi, comunicación personal), enfermedad endémica en la región de Cuyo.

Esto contribuiría a que la bacteriosis no sea detectada oportunamente y explicaría, en parte, la gran intensidad de enfermedad observada en frutos al momento de cosecha.

En frutos, además, la zona lesionada y la presencia de exudado en la misma, predisponen la entrada y el desarrollo de otros organismos patógenos y/o saprófitos (hongos y/o bacterias) que terminan por deteriorar el fruto en su totalidad, dejándolo sin valor comercial.

Cabe destacar que si bien en Argentina se ha citado esta bacteriosis produciendo daños en Cucurbitáceas, específicamente en zapallito redondo (*Cucurbita máxima* var *zapallito*), ésta fue sólo encontrada afectando las hojas (1).

Por otra parte, la afección a frutos ha sido señalada en Estados Unidos, Australia e India (8, 13), por lo que la presencia de *Xanthomonas cucurbitae* causando síntomas en follaje y frutos de zapallo coreano, se constituye en la primera cita de este procarionte en la República Argentina para las regiones productoras de San Juan y Mendoza.

## CONCLUSIONES

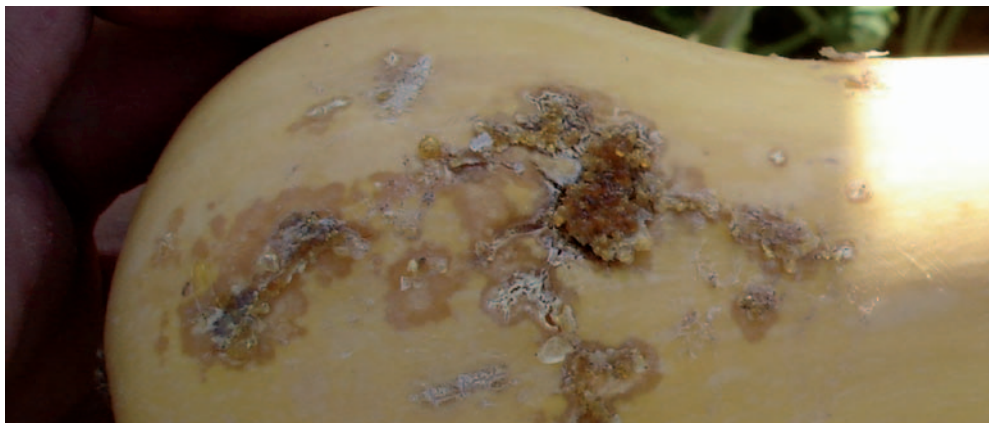
Las investigaciones realizadas permitieron concluir que el patógeno aislado, causante de la sintomatología descrita en frutos y hojas de zapallo, es *Xanthomonas cucurbitae* (Bryan) Vauterin *et al.*, responsable de la mancha bacteriana de las cucurbitáceas.



**Foto 1.** Lesiones en hoja.  
**Photo 1.** Leaf lesions.



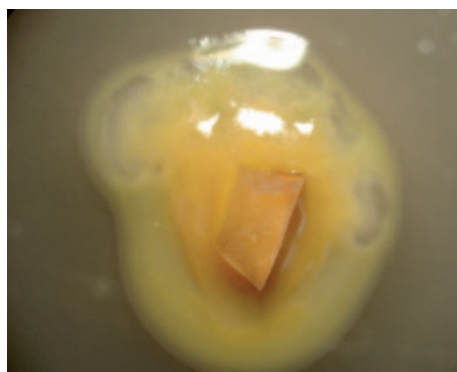
**Foto 2.** Vista macroscópica y detalle de lesiones (30 X) sobre la superficie del fruto.  
**Photo 2.** Macroscopic view and detail of a lesion (30X) on the fruit surface.



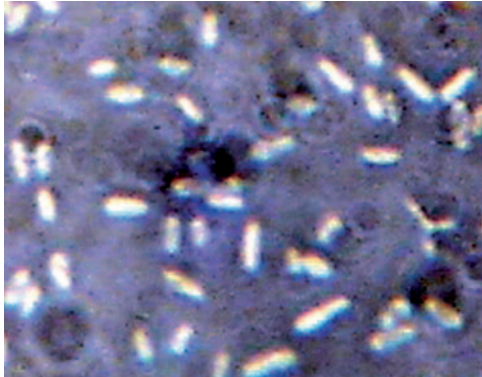
**Foto 3.** Coalescencia de lesiones con desarrollo de podredumbre seca en el área afectada.  
**Photo 3.** Coalescence of lesions with dry rot development in the affected area.



**Foto 4.** Podredumbre blanda en el interior de los tejidos. Podredumbre seca en el exterior.  
**Photo 4.** Soft rot inside the tissues. Dry rot outside.

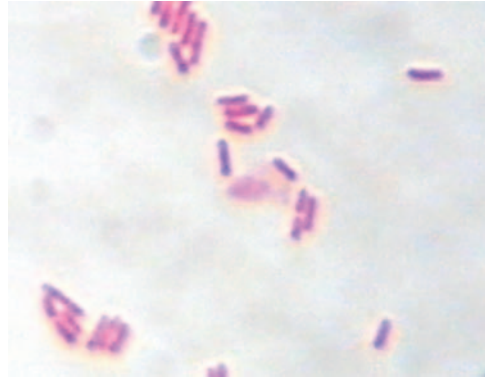


**Foto 5.** Crecimiento bacteriano aislado a partir de tejido enfermo (30 X).  
**Photo 5.** Bacterial growth isolated from diseased tissue (30 X).



**Foto 6a.** Bacilos de 0,40  $\mu\text{m}$  x 1,00  $\mu\text{m}$  (tinción negativa, 1000X).

**Photo 6a.** Size of bacilli: 1.00  $\mu\text{m}$  x 0.40  $\mu\text{m}$  (negative stain, 1000X).



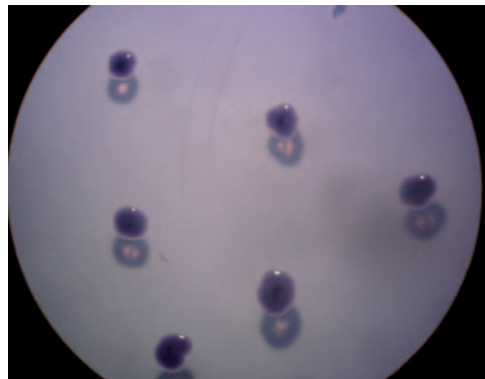
**Foto 6b.** Bacilos Gram negativos (1000 X).

**Photo 6b.** Gram negative bacilli (1000 X).



**Foto 7.** Colonias bacterianas típicas de *Xanthomonas cucurbitae* en YDC (30 X).

**Photo 7.** Typical bacterial colonies of *Xanthomonas cucurbitae* on YDC (30 X).



**Foto 8.** Colonias bacterianas típicas de *Xanthomonas cucurbitae* en SX (30 X).

**Photo 8.** Typical bacterial colonies of *Xanthomonas cucurbitae* on SX (30 X).



**Foto 9.** Lesiones bacterianas sobre hojas resultantes de la prueba de patogenicidad.

**Photo 9.** Bacterial lesions on leaves obtained in pathogenicity tests.



**Foto 10.** Síntomas en frutos resultantes de la prueba de patogenicidad.

**Photo 10.** Bacterial lesions on fruits obtained in pathogenicity tests.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Alippi, A. M. 1989. Caracterización de *Xanthomonas campestris* pv *cucurbitae* agente causal de la mancha bacteriana del zapallo. Revista Argentina de Microbiología 21: 15-20.
2. Bradbury, J. F. 1984. Genus II. *Xanthomonas*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore. The Williams & Wilkins Co. Vol 1: 199-210.
3. Bryan, M. K. 1926. Bacterial leaf spot of Hubbard squash. Science 63: 165 p.
4. Curcio, N.; Colamarino, I. 2008. Resultados de una estrategia de calidad. Disponible en: [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r\\_37/articulos/Resultados\\_estrategia.htm](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_37/articulos/Resultados_estrategia.htm) (fecha de consulta: marzo 2009).
5. Dhingra, O. D.; Sinclair, J. B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. 2<sup>nd</sup> ed. Lewis Publishers. 434 p.
6. Goszczynska, T.; Serfontein, J.; Serfontein, S. 2000. Introduction to practical phyto bacteriology. Ed. Safrinet. 83 p.
7. Instituto de Desarrollo Rural (IDR). 2008. Programa Relevamiento Hortícola. Relevamiento Hortícola Provincial. Superficie con hortalizas invernales y estivales. Periodo 2007/08. Disponible en: [http://www.idr.org.ar/contenido/documento/relev\\_hort\\_07\\_08\\_2009-07-27-134.pdf](http://www.idr.org.ar/contenido/documento/relev_hort_07_08_2009-07-27-134.pdf) (fecha de consulta: marzo 2009).
8. Moffet, M. L.; Croft, B. J. 1983. *Xanthomonas*. In: Fahy, P. C.; Persley, G. J. (Eds.). Plant bacterial diseases. A diagnostic guide. Sidney. Academic Press. p. 189-228.
9. Norris, J. R.; Ribbons, D. W. 1969. Methods in Microbiology. New York. Academic Press. 685 p.
10. Schaad, N.; Jones, J.; Chun, W. (eds). 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3<sup>ra</sup> ed. St. Paul, Minnesota. APS Press. 373 p.
11. Streets, R. B. 1992. The diagnosis of plant diseases. 5<sup>th</sup> ed. The University of Arizona Press. 232 p.
12. Vauterin, L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 472-489.
13. Zitter, T. A.; Hopkins, D. L.; Thomas, C. E. 1996. Compendium of Cucurbit Diseases. St. Paul, Minn. APS Press. 87 p.