

Identificación de *Acidovorax avenae citrulli* en semillas de sandía en Nicaragua

Mercedes Muñoz¹
David Monterroso²

RESUMEN. A inicios de 1997 los productores de sandía en Tipitapa, Managua, Nicaragua, reportaron una enfermedad desconocida, que causaba problemas en el fruto. El problema fue introducido a Nicaragua en recipientes preparados por la Co. Petoseed. El Departamento de Protección de Plantas del Ministerio de Agricultura decomisó la semilla infestada. El organismo causal fue identificado y caracterizado. Las pruebas de patogenicidad demostraron que se trata de la bacteria *Acidovorax avenae* ssp. *Citrulli*. Este es el primer reporte que se hace de la bacteria y ha sido registrada en el listado de plagas establecidas en Nicaragua.

Palabras clave: *Acidovorax avenae citrulli*, sandía, mancha bacterial del fruto.

ABSTRACT. Identification of *Acidovorax avenae citrulli* in watermelon seeds in Nicaragua. In early 1997, watermelon growers in Tipitapa, Managua, Nicaragua, reported an unidentifiable disease attacking the fruits. The problem was traced to seeds introduced by Horsh from the Petosee Company, in Costa Rica. The Ministry of Agriculture's Crop Protection Department recalled the contaminated seed. Through a series of lab tests, the disease was characterized as caused by the bacterial fruit spot in watermelon, identified as *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*. This is the first reported appearance of this bacteria in Nicaragua and it has been added to the list of established pests.

Key words: *Acidovorax avenae citrulli*, watermelon, bacterial fruit spot.

Introducción

De todas las enfermedades que afectan la sandía, la mancha bacterial de la sandía es la más devastadora porque ocasiona pérdidas de hasta más del 90% en condiciones favorables.

La mancha bacterial de la sandía se reportó por primera vez en 1989, en los Estados Unidos. También se reporta en países como Filipinas, Italia y Taiwan.

Esta bacteria causa dos tipos de síntomas en el cultivo de sandía: uno se caracteriza principalmente por manchas que forman lesiones acuosas en los cotiledones de las plántulas; el otro tipo de síntoma corresponde a lesiones grandes acuosas de márgenes irregulares en la fruta, que con la edad pueden rajar el peridermo de la corteza del fruto y producir exudaciones.

A comienzos de este año, se introdujo un lote de semillas de sandía a Nicaragua, el cual no alcanzó la etapa de cultivo debido a la presencia de patógenos. Como consecuencia de este problema, la empresa Horsh Frutas y Vegetales solicitó a la Dirección de Sanidad Vegetal un diagnóstico exhaustivo de la semilla introducida; la Dirección la decomisó inmediatamente. Cabe mencionar que el recipiente de la semilla decomisada señalaba que: "El fabricante controló la producción de esta semilla de sandía. Una muestra fue evaluada en sus laboratorios de Patología y se encontró negativa para el organismo de la mancha bacterial del fruto de sandía. Sin embargo, el fabricante no se responsabiliza de que estas semillas estén completamente libres de otras enfermedades llevadas en las mismas".

¹ Responsable de Bacteriología, Centro Nacional de Diagnóstico y Vigilancia Fitosanitaria, SAVE-MAG, Managua, Nicaragua.

² Coordinador del Proyecto CATIE/INTA-MIP (NORAD), Managua, Nicaragua.

Actualmente, la mancha bacteriana del fruto de sandía, causada por la bacteria *A.avenae* subsp. *Citrulli*, no se reporta en el listado oficial de plagas establecidas en Nicaragua y, tomando en consideración la gran importancia que representa esta enfermedad para los cultivadores nacionales, es de principal interés para el Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Diagnósticos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura y Ganadería (CNDF) realizar el trabajo de diagnóstico, cuyos objetivos son determinar la calidad fitosanitaria de la semilla de sandía var. Mickylye, e identificar la bacteria *A.avenae* subsp. *Citrulli*.

Materiales y métodos

El material utilizado como fuente de inóculo para el aislamiento de la bacteria fue semillas de sandía certificada por Petoseed var. Mickylye, Lote No.1018.

Para el aislamiento e identificación del patógeno se utilizó la siguiente metodología:

Se realizaron pruebas de germinación en el invernadero, utilizando mil semillas de sandía var. Mickylye, Lote No.1018, para determinar el porcentaje de germinación y presencia de patógenos.

Las semillas de sandía se pusieron a germinar *in vitro*. Para ello, se utilizó un germinador Astell Hearson, modelo No.SCB006. El patógeno se aisló a partir de las semillas infectadas.

La purificación de bacterias se realizó en medios de cultivos generales y específicos para su identificación.

Para la identificación de la bacteria fitopatógena, nos basamos en varias propiedades de la colonia en medio de cultivo: color, forma y margen de la colonia. Otras de las propiedades que se consideraron son las bioquímicas, como la habilidad de degradar ciertos componentes selectivos que juegan un papel importante en la identificación.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en plantas sanas de sandía y otras cucurbitáceas (melón y pepino), usando una solución salina 0.8% de NaCl estéril como dispersante de la bacteria. La prueba testigo consistió de plantas sanas inoculadas con agua estéril.

Resultados y discusión

Durante la etapa de germinación en el invernadero se observó el desarrollo de áreas acuosas en el envés de la hoja cotiledonal en un 75%, otras presentaron lesiones necrosadas foliares circundadas por un halo amarillo que se extendía a lo largo de la vena central y tallos completamente deformados que no llegan a desarrollarse (Fig. 1).

La bacteria se desarrolló en todos los aislamientos de semillas de sandía germinadas. La bacteria aislada de semillas var. Mickylye presentó un color cremoso, típico del género *Acidovorax* (*Pseudomonas*) en los medios NA, YDC y PDA; y para la determinación de la especie *avenae* se utilizó el medio selectivo SNR descrito por Schaad (1988) (ver Recuadro 1). La bacteria no mostró fluorescencia en el medio KB, por lo tanto, pertenece al grupo no fluorescente de *Acidovorax* (*Pseudomonas*), al cual también pertenece *A.avenae*, el agente causal de la mancha bacteriana de la sandía; se propone la subespecie *citrulli*, por el hospedante del cual se aisló la bacteria en estudio (Fig. 2).

En las pruebas de patogenicidad realizadas en plantas sanas de sandía var. Charlenton Gray, se produjeron las lesiones típicas de la mancha bacteriana del fruto de sandía (Fig. 3). También en pepino y melón se expresaron los síntomas de acuosidad y necrosis (Figs. 4 y 5).

Lo anterior ocurre cuando la bacteria penetra en los espacios intercelulares de la planta y comienza a multiplicarse, produciendo cambios drásticos en la permeabilidad de las membranas de las células del vegetal en la zona aledaña a la penetración.

En resumen, los síntomas observados en las plántulas sembradas en arena estéril coinciden con los descritos para la mancha bacteriana de la sandía. Los aislamientos efectuados en los diferentes medios de cultivo, las pruebas fisiológicas y bioquímicas y, principalmente, las pruebas de patogenicidad realizadas en cultivos de sandía, melón y pepino, indican que la bacteria aislada es la causante de la mancha bacteriana de la sandía.

De acuerdo con los registros de los análisis realizados en el Laboratorio de Bacteriología del CNDF, es la primera vez que se reporta la presencia de la bacteria *A.avenae* subsp. *Citrulli* en Nicaragua.

Es posible evitar la expansión de *A.avenae* subsp. *Citrulli*, ya que está limitada a cucurbitáceas y suponemos que hasta el momento se halla solamente en la Finca El Quemado, propiedad del Sr. Tragot Horsh.

Conclusiones

Se identificó *A.avenae* subsp. *Citrulli* en semillas de sandía var. Mickylye, registrada y envasada por la empresa Petoseed.



Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

Figura 1. Pruebas de germinación, hojas cotiledonales acuosas y necrosadas.

Figura 2. Reacción en medios de cultivo YDC y KB.

Figura 3. Síntomas provocados en sandía, con inoculación artificial.

Figura 4. Síntomas provocados en pepino con inoculación artificial.

Figura 5. Síntomas provocados en melón con inoculación artificial.

Recomendaciones

Como la semilla ya ha sido sembrada, recomendamos lo que a continuación se detalla.

Cuarentenar la finca El Quemado, propiedad de Horsh Frutas y Vegetales, bajo una constante supervisión; a su vez, esta empresa tendrá que cuarentenar el lote para evitar la diseminación de la bacteria a lotes sanos. Tendrá que aplicar medidas de desinfección de los instrumentos utilizados en el trabajo de campo, como maquinarias, zapatos de los trabajadores, etc.

Prohibir el cultivo de cucurbitáceas por un período de dos años en el lote en el cual fue detectada la bacteria.

Como la bacteria sobrevive en la corteza del fru-

to y las plantas voluntarias, se recomienda sembrar gramíneas o yuca.

Los agricultores deben cooperar, exigiendo en conjunto con las unidades de cuarentena un certificado de análisis de las semillas que quieran importar.

Realizar muestreos de suelo para así determinar viabilidad de *A. Avenae*.

Realizar muestreos periódicos en fincas donde se cultiva sandía, aledañas a la finca El Quemado.

Literatura citada

Schaad, NW. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacterial. 2nd. Edition. Minnesota, The American Phytopathological Society. p. 36-38.

Recuadro 1. Medios de cultivos básicos para el diagnóstico de enfermedades bacterianas en las plantas**Medio NA (Nutriente Agar)**

El medio NA es un medio sólido para propósitos generales.

Composición

Extracto de levadura	2 g/l
Extracto de carne	1 g/l
Bacto Peptona	5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar-Agar	15 g/l
Agua destilada	1 l

Medio KB

El medio KB es un medio sólido diferencial para bacterias del grupo fluorescente de *Pseudomona*.

Composición

Proteasa Peptona	20 g/l
Glicerina	10 ml/l
K ₂ HPO ₄	1.5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5 g/l
Agar-Agar	15 g/l

Medio XA

El medio XA es un medio sólido, específico para el análisis de bacterias del género *Xanthomonas*. Alrededor de las colonias de bacterias pertenecientes a este género se forma una zona clara casi amarilla en el medio azul.

Composición

Bacto Peptona	1 g/l
Almidón Soluble	10 g/l
KH ₂ PO ₄	0.5 g/l
NaCl	5 g/l
Agar-Agar	15 g/l
Azul de Bromotimol 2%	6 ml
Agua destilada	1 l

Medio YDC (levadura – dextrosa – carbonato)

El medio YDC, es un medio sólido para propósitos generales, como determinar el color típico de las colonias bacterianas.

Composición

Parte I	
Carbonato de Calcio (CaCO ₃)	20 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
Agar-Agar	15 g/l
Agua destilada	900 ml

Parte II	
Dextrosa	20 g/l
Agua destilada	100 ml

Medio SNR Agar (sorbitol rojo neutral)

El medio específico para el aislamiento de *Pseudomonas avenae*

Composición

Parte I	
K ₂ HPO ₄	3.00 g/l
NaH ₂ PO ₄	1.0 g/l
KNO ₃	1.0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g/l
Neutral Red, 0.2% solución Acuosa (69% activo)	10 ml/l

Parte II
Una vez autoclavado, agregar 2 ml de una solución alcohólica de 100 mg/ml de cicloheximide y 50 ml de una solución de D-sorbitol al 10%.