



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

Volumen 3 No. 2 (Julio-Diciembre 2008):11-15

INVURNUS

"En busca del conocimiento"

División de Ciencias Administrativas, Contables y Agropecuarias

INVESTIGACIÓN

Mancha Bacteriana del Fruto (*Acidovorax avenae*) en Sandía (*Citrullus vulgaris*) y Melón (*Cucumis melo*) en Sonora, México

Alvarado Martínez Ana Gabriela¹, Rueda Puente Edgar Omar^{2*}, Duarte Medina Maricela¹, Tarazón
Herrera Mario Antonio², Holguín Peña Ramón Jaime², Murillo Amador Bernardo², García
Hernández José Luís² y Barrón Hoyos Jesús Manuel³

¹Estudiante de la Maestría en Ciencias Agropecuarias-Unidad Santa Ana.

²Departamento de Administración Agropecuaria. Unidad Santa Ana.

³Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad de Sonora.

Resumen

La Agricultura a nivel nacional e internacional se ha visto afectada, por problemas fitosanitarios causados por bacterias. Con el comercio internacional, se presenta movimiento de material vegetativo. Sin embargo existe material vegetal que se moviliza y que puede ser portador de agentes nocivos. Los objetivos del presente estudio consistieron en detectar *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Aac) en semilla de melón y sandía de importación y confirmar que en el estado de Sonora, no se manifiesta la enfermedad en el cultivo de sandía y melón. La investigación consistió en la obtención de semilla procedente del extranjero, donada por productores. Se realizaron muestreos en áreas productoras de sandía y melón en las áreas agrícolas. El muestreo se desarrolló en las diferentes etapas fenológicas (plántula, floración y fructificación). Para su diagnóstico, se utilizó, la técnica de detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directamente producen una reacción cuyo producto fue medido espectrofotométricamente, pruebas de patogenicidad y medios específicos. Los resultados mostraron positiva la presencia de Aac en semilla de importación. En las etapas vegetativas de plántula, floración y fructificación, fue negativa.

Palabras Claves: Mancha bacteriana del fruto, *Acidovorax avenae*, sandía, melón, ELISA.

Bacterial Fruit Blotch (*Acidovorax avenae*) in Watermelon (*Citrullus vulgaris*) and Melon (*Cucumis melo*) in Sonora, México

Abstract

National and international agriculture has been affected, by phytosanitary problems caused by bacteria. With the international trade, the movement of vegetative material can be a carrier of harmful agents. The objectives of this research consisted in detect *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Aac) in seed of melon and watermelon from others countries and confirm that this disease is not present in Sonora state. The research consisted in obtaining seed donated by producers. A sample of watermelon and melon in Sonora was developed in different phonologic stages. For its diagnosis, was carried out the detection of an antigen immobilized on a solid phase by means of antibodies that directly produce a reaction which product was measured by spectrophotometria, tests pathogenicity and specific Medias. The Aac presence was positive in seed. In vegetative stages ,the Aac agent was not detected.

Keywords: Bacterial fruit blotch, *Acidovorax avenae*, watermelon, melon, ELISA.

*Autor para envío de correspondencia: Departamento de Administración Agropecuaria. Unidad Santa Ana, Universidad de Sonora. Ciudad Santa Ana, Sonora, México. C.P. 84600. E-mail: erueda04@santana.uson.mx

Introducción

La Agricultura a nivel nacional e internacional en los últimos años se ha visto afectada, en gran parte a los problemas fitosanitarios causados principalmente por hongos, bacterias, etc. Con el comercio internacional, se presenta un gran movimiento de material vegetativo y siembras de estos productos vegetales, debido a la rapidez con que en la actualidad se transportan; existen grandes cantidades de material vegetal que se moviliza y que en algunos casos pueden ser portadores de agentes nocivos. Los aspectos negativos antes mencionados, han originado pérdidas y grandes trastornos en algunas regiones en la agricultura nacional; es conveniente contar con medidas necesarias para evitar el ingreso de agentes nocivos.

La mancha bacteriana del fruto de melón y sandía es causada por *Acidovorax avenae* pv. *citrulli*; es una bacteria que produce la putrefacción del fruto, se considera pérdidas de hasta el 100%. La mancha bacteriana del fruto fue detectada por primera vez en las islas Marianas en 1988. En 1989 apareció en los Estados Unidos en campos comerciales de Sandía, con brotes graves aislados en Florida, Carolina del Sur e Indiana. Desde entonces, la enfermedad ha sido observada en otros estados al este de Estados Unidos (Wall *et al.*, 1990). Es la bacteria causante de la mancha bacteriana del fruto (MBF) en el cultivo de Sandía (*Citrullus Vulgaris* Schard.) y otras cucurbitáceas (Walcott *et al.*, 2000). Por el grado de devastación de esta enfermedad de *Acidovorax* ha alcanzado en diversos lugares productores de EUA, que esta bacteria haya sido catalogada como de importación cuarentenaria, dando lugar a una suspensión de venta de semilla de sandía en 1995, misma que amenazó con la eliminación definitiva de este cultivo en ese país (Hopkins, 1990; Hopkins *et al.*, 1992; Latin y Hopkins, 1995).

En años recientes, se ha detectado en algunas regiones de Estados Unidos (EUA) la bacteria *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Aac), agente causal de la mancha bacteriana del fruto (MBF) en el cultivo de sandía. Esta bacteria ocasiona una pudrición en el fruto, tallos y hojas, tiene la particularidad de diseminarse por semilla. Dado que México es un país importador de semilla de los EUA, la introducción potencial de este patógeno es significativa, especialmente en áreas donde la producción de sandía es importante (Somodi, 1991; Rueda *et al.*, 2006). Sin embargo, tal enfermedad no radica únicamente en el daño producido al fruto, sino que también tiene la capacidad de diseminarse por semilla, de ahí la importancia de que algún país importa semilla de sandía y melón de esas áreas debe de tener métodos de diagnóstico con una sensibilidad capaz de detectar al organismo. En la República Mexicana

el cultivo de sandía y melón, han aumentado considerablemente en los últimos años y debido a que México no produce su propia semilla obliga a que los productores adquieran semilla de origen extranjero, principalmente de Estados Unidos, ya que las variedades y/o híbridos adquiridos producen frutos que rinden las características preferidas por el consumidor, originando, que los grandes volúmenes de semilla que ingresan al país sea una puerta de entrada para *Acidovorax avenae* pv. *Citrulli*.

El ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas o ELISA, es una prueba confiable y rápida para la detección de organismos fitopatógenos como bacterias, virus, hongos. Ya que permite detectar, en órganos de plantas, cantidades muy pequeñas de estos agentes y además permite estimar su concentración en el tejido enfermo. El ensayo denominado sándwich de doble anticuerpo (DAS) es la variante más comúnmente utilizada de ELISA y constituye en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno, los antígenos o fitopatógenos reaccionan con los anticuerpos adheridos a la placa (Cruz, 1997).

Los objetivos del presente trabajo de investigación consistieron fueron detectar *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en semilla de melón y sandía de importación y confirmar que en las áreas agrícolas del estado de Sonora, no se manifiesta la enfermedad en el cultivo de sandía y melón.

Materiales y Métodos

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad de Sonora, Campus Santa Ana. La investigación se realizó en dos fases. La primera consistió en el incremento de la bacteria *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Aac), on medios de cultivo específicos, pruebas de patogenicidad en frutos y plántulas de sandía con fines de familiarización en los síntomas de la bacteria Aac y su identificación mediante técnica de formación de capas de inmunocomplejos y revelados enzimáticos (Rueda *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 1998; Rueda *et al.*, 2006). El kit de Aac fue proporcionado por el proyecto de fondo sectorial clave 12067, al cual pertenece esta investigación. Posteriormente la segunda fase incluyó entrevistas con productores agrícolas y ofrecimiento de pláticas sobre la importancia de las enfermedades fitopatógenas y la importancia del diagnóstico fitosanitario. Posteriormente fue solicitada semilla para siembra a los mismos productores del estado.

Se desarrolló un muestreo de plántulas, hojas desarrolladas y frutos de sandía y melón en las zonas agrícolas del estado de Sonora, y su correspondiente análisis fitopatológico para la detección de Aac. Fueron llevadas a cabo, pruebas de patogenicidad en muestras positivas a Aac. Se desarrolló muestreo de plántulas, hoja desarrollada y fruto de sandía y melón en Sonora acorde a SARH (1994), y su análisis fitopatológico para la detección de Aac mediante la técnica Randhawa (1996); una vez realizadas lo anterior se desarrollaron pruebas de conjugación de anticuerpos específicos con la bacteria en estudio, formación de capas de inmunocomplejos, revelados enzimáticos, siguiendo el protocolo general de identificación de bacterias AGDIA (Flores, 1997). Para el caso de las pruebas de patogenicidad de aquellas muestras que resultaron positivas procedentes de áreas agrícolas o semilla infectada, se realizaron en frutos de sandía y plántula.

Resultados y Discusión

Primera etapa

De las semillas embebidas en la suspensión bacteriana de 10^8 UFC/ml. El 14% no germinó, y las que lograron germinar entre los 7 y 15 días bajo condiciones favorables de la enfermedad, presentaron una acuosidad en tallo y marchites. Los cotiledones mostraron manchas irregulares de aspecto más oscuro y grasoso con relación al área sana, y finalmente se presentó la muerte de la plántula. Las semillas que no lograron germinar presentaron la testa acuosa, blanda y abierta con presencia del epicotilo. En plántula también se utilizó el mismo número que en semillas; los síntomas en esta etapa fueron manchas irregulares, en un principio son claras y posteriormente oscuras y de aspecto grasoso, y al cabo de siete días la muerte, mientras que las plántulas consideradas como testigo negativo se desarrollaron adecuadamente.

Para el caso del fruto, al cabo de 15 días los inoculados mostraron en un principio exudados bacterianos y posteriormente manchas grasosas que con el paso del tiempo fueron coalesciendo y agrietando la superficie del fruto. A los frutos se les hizo un corte transversal en el cual se observó un avance de la enfermedad hacia el interior, lo cual concuerda con Hopkins *et al.* (1992); en los frutos considerados como testigo negativo, las lesiones mostraron un aspecto áspero, seco y rugoso. Otra de las finalidades de la confirmación de la bacteria mediante pruebas de patogenicidad, fue el familiarizarse con los síntomas, ya que sería de gran utilidad para el muestreo y detección de la bacteria en Sonora.

Segunda etapa

Semilla de Sandía. Usando la técnica de Randhawa se demostró la presencia de Aac en la semilla de sandía, únicamente en la que se obtuvo de productores de los municipios de Cajeme, Guaymas, Hermosillo y Navojoa (Tabla 1). Las características que presentaron las colonias, los medios específicos, el selectivo y la reacción en la prueba de oxidasa fueron similares a las indicadas por Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996); Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.* (2006). Un resultado similar ocurrió con la semilla obtenida de Caborca pero con la diferencia de que al llevar a cabo la prueba de oxidasa, las colonias no presentaron una reacción positiva al cabo de 10-15 seg como lo menciona Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996); Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.* (2006), indicativo para considerar negativa la presencia de Aac. Para la técnica ELISA, los resultados indicaron que la semilla obtenida de productores de Cajeme, Guaymas y Hermosillo resultó ser positiva a la presencia de Aac. Por otra parte, las muestras provenientes de agricultores de los municipios de Caborca y Navojoa fueron negativas a la presencia de la mancha bacteriana del fruto

Tabla 1. Detección de *Acidovorax avenae pv. citrulli* en semilla de sandía y melón de importación proporcionada por productores del estado Sonora, México.

Cultivo	Municipio	BDK	POX	ELISA
Sandía	Cajeme	+	+	+
	Guaymas	+	+	+
	Hermosillo	+	+	+
	Caborca	+	-	-
	Navojoa	+	+	-
Melón	Cajeme	-	-	-
	Guaymas	-	+	+
	Hermosillo	-	+	+
	Caborca	-	-	+
	Navojoa	+	+	-

+ = Prueba positiva.

- = Prueba negativa,

T125 y MS153= Medios de cultivo específicos para Aac.

BDK= Medio de cultivo selectivo serie Schaad.

POX= Prueba de Oxidasa.

Semilla de Melón. Por otra parte, respecto a la semilla de Melón, usando la técnica de Randhawa se demostró la presencia de Aac, únicamente en la que se obtuvo de productores de los municipios de Guaymas, Hermosillo y Navojoa (Tabla 1); las características que presentaron las colonias, los medios específicos, el selectivo y la reacción en la prueba de oxidasa fueron similares a las indicadas por Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996); Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.*

(2006). Un resultado similar ocurrió con la semilla obtenida de Caborca y Cajeme pero con la diferencia de que al llevar a cabo la prueba de oxidasa, las colonias no presentaron una reacción positiva. Los resultados obtenidos mediante la técnica de de ELISA indicaron resultados positivos excepto para los municipios de Navojoa y Cajeme.

Plántula, hoja desarrollada y Fruto- Sandía y Melón

Respecto a la detección de Aac en semilla, plántula, hoja desarrollada y fruto por la técnica ELISA, los municipios muestreados fueron negativos a la presencia de la bacteria bajo las técnicas utilizadas (Tabla 2). La comparación de los resultados obtenidos en el diagnóstico de semilla con los de la plántula, hojas, fruto, indicaron que la semilla viene infectada por Aac. Sin embargo, las condiciones adversas al patógeno en la región, como una media alta temperatura (35 °C) y baja humedad relativa que varía entre 40 y 55%,

podiese causar que el patógeno no tenga la capacidad de sobrevivir y por lo tanto no producir una infección en la planta de Sandía y melón; esto podría traer como consecuencia que al procesar las muestras vegetativas mediante diferentes métodos de detección para Aac resulten negativas.

Pruebas de patogenicidad a bacterias positivas mediante los tres métodos de detección

Estas pruebas solamente se realizaron en colonias bacterianas positivas obtenidas de la semilla de sandía y melón que fueron utilizadas como testigos positivos en la primera fase. Las pruebas mostraron que al inocular plántulas de 25-30 días bajo condiciones favorables para la enfermedad, dieron resultados positivos acorde a las características descritas por Randhawa acorde a Rueda *et al.* (1996); Sánchez *et al.* (1998) y Rueda *et al.* (2006).

Tabla 2. Detección de *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en plántula, hoja y fruto de sandía y melón muestreado en áreas agrícolas del estado de Sonora

Cultivo	Municipio	Órgano vegetal	T125	MS153	BDK	POX	Prueba ELISA
Sandía	Cájeme	plántula	-	-	+	-	-
		hoja	-	-	-	+	-
		fruto	-	-	-	+	-
	Guaymas	plántula	+	-	+	-	-
		hoja	-	-	+	+	-
		fruto	-	-	+	-	-
	Hermosillo	plántula	-	-	+	-	-
		hoja	-	-	+	+	-
		fruto	-	-	+	-	-
	Caborca	plántula	-	-	-	-	-
		hoja	-	-	-	+	-
		fruto	+	-	-	+	-
	Navojoa	plántula	+	+	+	+	-
		hoja	+	-	+	+	-
		fruto	-	-	+	-	-
Melón	Cájeme	plántula	-	-	-	-	-
		hoja	-	-	+	+	-
		fruto	-	-	+	+	-
	Guaymas	plántula	+	-	-	-	-
		hoja	-	-	+	+	-
		fruto	-	-	+	-	-
	Hermosillo	plántula	-	-	+	-	-
		hoja	-	-	+	+	-
		fruto	-	-	+	-	-
	Caborca	plántula	-	-	-	-	-
		hoja	-	-	-	+	-
		fruto	+	-	-	+	-
	Navojoa	plántula	+	+	+	+	-
		hoja	+	-	+	+	-
		fruto	-	-	+	-	-

T125 y MS153= Medios de cultivo específico.

BDK= Medio de cultivo selectivo.

POX= Prueba de oxidasa.

Posterior a las pruebas de patogenicidad, la bacteria se aisló de tejido enfermo en los medios T-125 y MS153 y se confirmó mediante ELISA, el cual resultó positivo. Es importante señalar que se trataron de llevar a cabo pruebas de patogenicidad de la solución madre de la semilla de sandía procedente de Cajeme, Guaymas y Hermosillo, Navojoa, además en semilla de melón, procedente de Guaymas, Hermosillo y Navojoa, Sonora, que resultaron positivas a la presencia de Aac. Sin embargo, al tratar de crecer las bacterias en los medios T-125 y MS153, no se obtuvieron crecimientos bacterianos para su posterior prueba de patogenicidad, esto último tal vez debido a la contaminación con bacterias saprófitas que inhibieron el crecimiento de Aac después de 7 días de incubación sobre los medios específicos. Este resultado pudo deberse al tiempo prolongado que estuvieron sometidas las células bacterianas de Aac en la solución salina al 0.85%, que pudo repercutir para que estas no se multiplicaran en los primeros 7 días que es cuando deben de crecer en los medios utilizados; de lo contrario, el crecimiento de bacterias saprófitas se ve favorecida (Rueda *et al.*, 2006).

Conclusiones

La importación de semilla mejorada para la siembra en cucurbitáceas, ha aumentado en México. Dicha semilla en

su mayoría es proveniente de Estados Unidos de América. Se identificó Aac mediante pruebas de patogenicidad y ELISA, también se detectó en semilla de sandía y melón importada de los Estados Unidos de América para siembra en Sonora, México, mediante la técnica de Randhawa, ELISA, así como en pruebas de patogenicidad.

El estado de Sonora es libre de la bacteria *Acidovorax avenae* pv. *citrulli* en las diferentes etapas fenológicas del cultivo de melón y sandía. Esto último pudiere deberse principalmente a las condiciones climatológicas del estado de Sonora. No obstante ello, es importante que en el estado de Sonora se realicen diferentes pruebas de detección y además que se lleven a cabo monitoreos en semillas de importación y durante las diferentes etapas fenológicas de sandía y melón para evitar la introducción de fitopatógenos. ☞

Agradecimientos

A la Universidad de Sonora-Campus Santa Ana, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación por el proyecto aprobado 12067: Detección de bacterias de importancia cuarentenaria en la zona noroeste de México.

Bibliografía

- Cruz, F. M. 1997. Ensayo de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas (ELISA) para la detección de virus fitopatógenos. En: manual de métodos de detección e identificación de fitopatógenos. Departamento de fitopatología. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Chapingo, México. D.F. 30 p.
- Flores, M. C. 1997. Ensayo de Inmunoadsorción de Enzimas Ligadas (ELISA). México. p. 1.
- Hopkins, D. L. 1990. Differences in cultivar resistance to bacterial fruit blotch of watermelon. (Abstr.) *Phytopathology*. 80:435.
- Hopkins, D., Gay, D., and Cook, W. 1992. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon. The Hybrid Vegetable Seed Company. Gainesville, Florida, USA. p.4.
- Latín, R. X., and Hopkins, D. L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical question becomes reality. *Plant Disease*. 79:761-765.
- Randhawa, P. 1996. Fruit Blotch Testing Protocol. California Seed and Plant Lab. Roseville, California, USA. p. 5.
- Rueda, P. E. 1996. Producción de antisuero contra *Acidovorax avenae* pv. *Citrulli* y su detección en La Comarca Lagunera; Tesis de Maestría en ciencias. Departamento de parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. p. 87.
- Rueda, P. E., M. A. H. Tarazón., F. A. Hernández; y García, L. J. 2006. Producción de antisuero contra la mancha bacteriana del fruto [*Acidovorax avenae* pv. *citrulli* (Schaad, Sowell, Goth, Colwell y Webb) Willems, Goor, Thielemans, Gillis, Kersters y De Ley] y detección en el Cultivo de Sandía (*Citrullus vulgaris* Schrad) en la Comarca Lagunera, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: (2) 129-135.
- SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos) (1994) Manual de muestreo y procesamiento para la identificación de los principales patógenos de la papa. Dirección General de Sanidad Vegetal. México, D.F. 16 P.
- Sánchez, A. A., E. M. C. Galindo., L. G. Bustamante. y Salazar, G. J. L. 1998. Métodos para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en semilla de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Rev Agraria*. 14 (2) 1-17.
- Somodi, G. C., Jones, J. B., Hopkins, D. L., Stall, R. E., Kuchareck, T. A., Hodge, N. C. and Watterson, J. C. 1991. Occurrence of bacterial watermelon fruit blotch in Florida. *Florida. Plant Disease*. 75:1053-1056.
- Walcott, R. R., and R. D. Gitanis. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. *Plant Disease*. 84:470-474.
- Walcott, R. R., D. R. Gitaitis. and Castro, A. C. 2003 Role of Blossoms in Watermelon Seed Infestation by *Acidovorax avenae* Subsp. *citrulli*. *Phytopathology*. 93: 528-534.
- Wall, G. C., V. M. Santos, F. J. Cruz, y D. A. Nelson. 1990. Outbreak of watermelon fruit blotch in the Marianas Islands. *Plant Disease*. 74:80.