

***Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, infectando plantas de cuarentona (*Zinnia elegans* Jacq.) en Venezuela**

Xanthomonas campestris pv. *zinniae*, infecting *Zinnia* plants (*Zinnia elegans* Jacq.) in Venezuela

Y. Hernández y G. Trujillo

Resumen

Se colectaron muestras foliares de plantas de cuarentona provenientes de algunas localidades del estado Aragua, cuyas hojas presentaban manchas necróticas abundantes de 1-20 mm de diámetro o más, con un margen clorótico sobre la mayor parte del follaje. De las hojas con los síntomas descritos se aisló consistentemente una bacteria que produjo colonias de color amarillo, las cuales resultaron patogénicas al ser inoculadas en plantas sanas de cuarentona. La bacteria fue Gram negativa, aeróbica y con forma de bastón. De acuerdo a estas y otras características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, se identificó a la bacteria como *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, siendo el primer reporte de este patógeno para Venezuela.

Palabras clave: *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, *Zinnia elegans*, bacteria, cuarentona

Abstract

Foliar samples of zinnia plants from some localities of Aragua state were collected whose leaves showed abundant necrotic spots on most of the foliage with a diameter of 1-20 mm with chlorotic edges. From leaves with the described symptoms was consistently isolated a bacteria that was pathogenic when inoculated on healthy zinnia plants, reproducing the symptoms observed on the infected zinnia plants on the field. The bacteria was a Gram negative rod, aerobic, and based on the morphological, biochemical and physiological characteristics, it was identified as *Xanthomonas campestris* pv. *zinnia*, being for Venezuela the first report of this pathogen.

Key word: *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae*, *Zinnia elegans*, Bacteria, Zinnia.

Recibido el 16-12-1999 • Aceptado el 05-04-2000

1. Laboratorio de Bacterias Fitopatógenas. Instituto de Botánica Agrícola. Universidad Central de Venezuela. Apartado 4579. Maracay 2101-A, Edo. Aragua, Venezuela.

Introducción

La planta ornamental *Zinnia elegans* Jaqc. conocida en Venezuela comúnmente como cuarentona y menos frecuente como flor de maravilla, pertenece a la familia Compositae, es muy vistosa por sus flores, las cuales se presentan con una gran variedad de colores (22). En México y Estados Unidos de América, existe en numerosas variedades, utilizada ya sea para flores de jardín o de corte. En Venezuela esta planta es común en muchos jardines, formando setos y se vende en floristerías, principalmente en forma de ramos y arreglos florales. Por su vistosidad, duración, poco mantenimiento y fácil propagación, esta planta tiene un alto potencial como flor de corte en nuestro país.

En los últimos años se ha venido

observando, durante el período lluvioso, una sintomatología en las hojas de cuarentona, muy similar a la producida por bacterias. Se analizaron muestras foliares provenientes de algunas zonas del estado Aragua, cuyas hojas se caracterizaban por presentar manchas necróticas abundantes con halos cloróticos, estas manchas se presentaban en forma irregular, pequeñas, de color marrón que con el tiempo y en condiciones de alta humedad coalescían, abarcando casi toda la hoja.

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la identidad del agente causal de la sintomatología observada en plantas de cuarentona. Un adelanto de este trabajo ya se ha publicado (9).

Materiales y métodos

Recolección de muestras.

Fueron recolectadas muestras de hojas de plantas de cuarentona, las cuales presentaban manchas necróticas abundantes de 1-20 mm o más y con un margen clorótico (figura 1). Las muestras fueron recolectadas en tres zonas diferentes del estado Aragua; asentamiento campesino Santa María (vía Villa de Cura) donde las plantas crecían en forma espontánea, en un vivero comercial ubicado en La Guacamaya y en los jardines de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Las muestras herborizadas fueron trasladadas al laboratorio y mantenidas a

temperaturas de 20-24°C para su reconocimiento preliminar y uso posterior.

Aislamientos. Se verificó la presencia de bacterias a través de la observación del flujo bacteriano (12,18). Luego se procedió a realizar los aislamientos para lo cual, las muestras se lavaron suavemente con agua destilada estéril (ADE). Posteriormente el tejido fue dividido en trocitos de aproximadamente 1 cm², se maceró en un mortero estéril que contenía 6 ml de ADE y se sembró por estriación y agotamiento en placas de Petri que contenían los medios de cultivo agar nutritivo (AN), agar

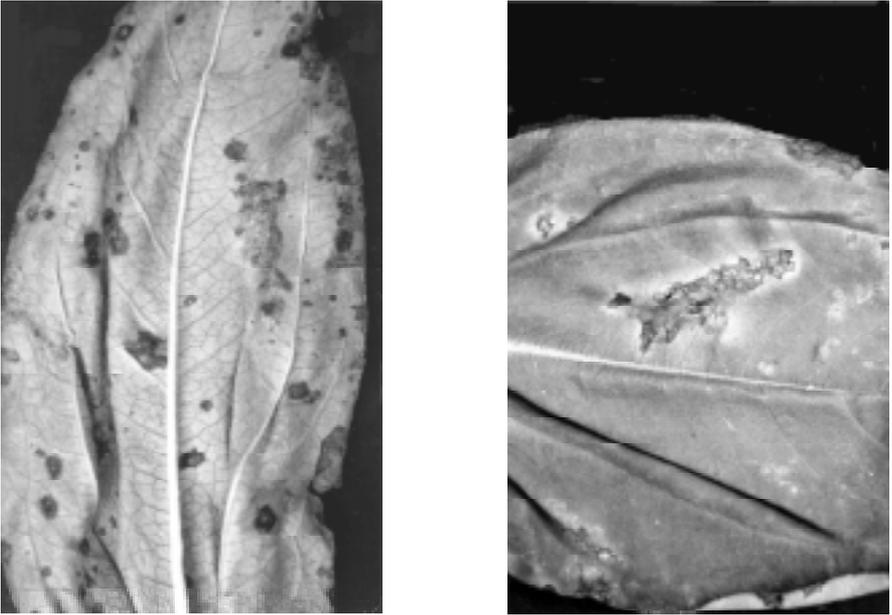


Figura 1. Hojas de cuarentona (*Zinnia elegans*) con síntomas de bacteriosis: observe las manchas irregulares con el halo amarillo y de aspecto húmedo.

extracto de levadura carbonato de calcio (YCA) y agar carbonato de calcio dextrosa levadura (YCDA). Paralelamente se realizaron diluciones seriadas a partir del macerado y se sembró por estriación y agotamiento en placas de Petri que contenían los medios AN y YCDA. Así mismo, se realizaron diluciones seriadas a partir del macerado y se sembró por extensión en superficie sobre los medios de cultivo antes mencionados. Las placas fueron revisadas diariamente y se descartaron aquellas colonias que aparecieron entre las 24 y 36 h por considerarlas saprófitas. Finalmente, las colonias individuales obtenidas después de las 48 h se repicaron en los medios de cultivo AN, YCA y YCDA, para la

obtención de cultivos puros. Las placas con los aislamientos permanecieron dentro de bolsas plásticas para evitar contaminación con ácaros u otros organismos.

Los cultivos puros fueron conservados por recubrimientos de los mismos con aceite mineral (parafina) y liofilizados y guardados a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, y fueron repicados semanalmente durante la duración del trabajo.

Pruebas de patogenicidad y reaislamiento. se utilizaron semillas de cuarentona, recolectadas de plantas aparentemente sanas, que se sembraron a razón de 4 semillas por potes de 1 Kg de capacidad y que contenían una mezcla de tierra y arena en la proporción 3:1 (v/v) previamente esterilizada

mediante calor húmedo. Posteriormente las plantas se mantuvieron en un umbráculo con temperatura promedio de 26-28 °C y humedad relativa 60-70 % hasta el momento de la inoculación. Semanalmente se les aplicó un fertilizante foliar (Crescal, 1 ml/ litro de agua) y un insecticida sistémico (Jardín Flor, 5 ml/ litro de agua). Las plantas fueron regadas diariamente y mantenidas en un estado óptimo de crecimiento.

Para la inoculación se utilizaron cultivos puros de 48 h de crecimiento en medio YCA y se prepararon suspensiones bacterianas en ADE ajustada a una concentración aproximada de 9×10^8 cel/ml, correspondiente al tubo N° 3 de la Escala de McFarland (1). Esta suspensión fue inoculada en plantas de 30 días de edad que presentaban igual tamaño y buen vigor. La inoculación se realizó asperjando las hojas con un aspersor manual, hasta formar una película acuosa por el haz y el envés, las hojas fueron previamente punzadas con un alfiler. Luego las plantas se sometieron a condiciones de alta humedad relativa (≈ 100 %) cubriéndolas con bolsas plásticas transparentes durante 48 h y posteriormente colocadas en condiciones de umbráculo, donde se observaron hasta la aparición de los síntomas. Se dejaron plantas testigos que recibieron el mismo tratamiento, pero se asperjaron con ADE.

Una vez que aparecieron los síntomas se procedió al reaislamiento del organismo causal, siguiendo la metodología antes descrita para comprobar la identidad del inóculo.

Características culturales.

Se determinaron las características de las colonias, tales como forma, tamaño, elevación, velocidad de crecimiento en los medios de cultivo AN, YCA y YCDA.

Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

Las características morfológicas se determinaron mediante la tinción de Gram y la tinción negativa de Rojo Congo (7, 19, 24).

Las propiedades fisiológicas y bioquímicas estudiadas fueron las siguientes: requerimientos de oxígeno, determinado por los métodos de inoculación profunda en agar y medio de Hugh y Leifson (19, 21, 25); producción de catalasa, oxidasa, gelatinasa, amilasa, sulfuro de hidrógeno (H_2S); capacidad fermentativa mediante la prueba del agar dextrosa rojo fenol (4, 6, 13, 16, 21, 25, 26); hipersensibilidad en tabaco, proteólisis de la leche, crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl (1-5%), indol, fosfatasa, acetoin, hidrólisis del asculin (19,21) y producción de ácido de los azúcares: arabinosa, celobiosa, dulcitol, fructosa, galactosa, glucosa, glicerol, lactosa, manitol, sucrosa, xilosa, thehalosa, maltosa, adonitol, salicín, manosa, ribosa, sorbitol, rafinosa, entritol y xilitol (13, 26).

Finalmente, se realizaron pruebas de crecimiento sobre diferentes medios selectivos, usados para la diferenciación de algunos géneros y especies bacterianas tales como Sx de Schaad (20), D_3 , D_4 , y D_5 de Kado y Heskett (11), M-71 de Leben (19), Tetrarazolium de Kelman (TZC) (18,19) y Tween 80 (14).

Resultados y discusión

Los síntomas que presentaron las hojas de cuarentona recolectadas en el campo, coinciden con lo señalado por Hopkins y Dowson (10) y Miller (15) para una enfermedad bacteriana en plantas de cuarentona en Brasil y Estados Unidos de América respectivamente.

De las hojas con síntomas, se obtuvieron consistentemente, aislamientos bacterianos, los cuales resultaron patogénicos al ser inoculados en plantas de cuarentona sanas. A las 48 h después de la inoculación, las plantas presentaban manchas húmedas alrededor de los puntos de inoculación los cuales al pasar los días se iban agrandando hasta colapsar toda la hoja. A los 5 días toda la planta se marchitaba. Mientras las plantas testigos permanecieron sanas. Los aislamientos realizados a partir de tejidos infectados experimentalmente, confirmaron los postulados de Koch.

En 1949, se describió una enfermedad bacteriana en plantas de cuarentona, en el Sur de Rodesia, la cual se caracterizaba por producir sobre las hojas manchas circulares, amarillentas, traslúcidas de 1-2 mm de diámetro en ataques iniciales, que posteriormente bajo condiciones de alta humedad se alargaban tornándose angulares (10). Las manchas también se extendían a las flores donde se formaban manchas pequeñas de color marrón, llegando a abarcar toda la flor, en condiciones adecuadas para el desarrollo de la enfermedad; en nuestro caso encontramos síntomas sólo a nivel foliar.

Características culturales.

Las colonias se hicieron visibles en los medios de cultivo AN, YCA y YCDA a las 48 h. En AN las colonias fueron amarillo pálido con un tamaño de 1-2 mm de diámetro, redondas, elevadas, lisas, brillantes y traslúcidas. En YCA y YCDA tuvieron las mismas características, pero presentaron un amarillo más intenso.

Los aislamientos mostraron un crecimiento diferencial en los medios de cultivo: en AN fue lento y con poca mucosidad, en YCA crecimiento mayor que en el caso anterior y no mucoide y en YCDA fue abundante, rápido y mucoide.

Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Los aislamientos presentaron forma de bastón, fueron Gram negativo, estrictamente aeróbicos, catalasa y oxidasa positivos, hidrolizaron el almidón y licuaron la gelatina, produjeron H_2S , toleraron hasta 2 % de NaCl, proteolizaron la leche, fueron fosfatasa positivo, la producción de indol y acetoin fue negativa al igual que la reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco, pudrió levemente rodajas de papa, crecieron formando colonias típicas para el género *Xanthomonas* en el medio Sx de Schaad, e igualmente tuvieron un buen crecimiento en el medio TZC de Kelman, formando colonias rojizas. En el medio M-71 de Leven el color de la colonia fue similar al del TZC de Kelman, pero no mucoide. No hubo crecimiento en el medio D_3 y D_4 de Kado, mientras que si lo hubo en el D_5

de Kado, pero en forma moderada.

Las características que presentan los aislamientos, tales como forma de bastón, de color amarillo, catalasa positivos, aeróbicos, negativos al agar dextrosa rojo fenol, licuaron la gelatina, hidrolizaron el almidón, crecieron en el medio D₅ de Kado y produjeron H₂S, los ubica en el género *Xanthomonas* (2, 3, 8, 17, 19, 23, 25).

Con relación a la especie, el hecho de que los aislamientos proteolicen la leche, toleren hasta 2 % de cloruro de sodio para crecer, hidrolicen la ausculina, produzcan ácido a partir de celobiosa, los ubica en la especie *campestris*; corroborado esto por la producción de colonias típicas para *Xanthomonas campestris* en los medios Sx de Schaad y Tween 80 (14, 20).

Con respecto al patovar, se realizaron comparaciones con las bacterias *Xanthomonas nigromaculans* (ahora *X.c. pv. nigromaculans*) (5) y con *X.c. pv. zinniae* (antes llamada *X. nigromaculans forma specialis zinniae f.n. sp.*) (10) (cuadro 1) encontrándose que los aislamientos en estudio se diferencian de *X. nigromaculans* en características tales como, hidrólisis del almidón y producción de ácido a partir de sucrosa, lactosa, manitol y glicerol, mientras que al compararlos con *X.c. pv. zinniae*, la única diferencia encontrada es la producción de ácido a partir de salicin, la cual es negativa para esta bacteria y positiva para los aislamientos obtenidos de cuarentona.

Conclusión

En relación a las comparaciones realizadas con los aislamientos obtenidos en esta investigación y las bacterias señaladas en la literatura que afectan a cuarentona, se considera mínima la diferencia con *X. c. pv.*

zinniae, por lo que se puede ubicar en esta especie perfectamente a nuestros aislamientos. Es la primera vez que se reporta en Venezuela un patógeno bacteriano en plantas de cuarentona.

Literatura citada

1. Barret, T.J. 1975. Preparation of bacterial vaccine. pp. 1-6. In: Proceedings of the first workshop of phytobacteriology. R.N. Goodman (ed.). Columbia, University of Missouri.
2. Bradbury, J.F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB, International Mycological Institute. pp. 1-6.
3. Bradbury, J.F. 1984. *Xanthomonas*. pp.199-210. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1.N.R. Krieg and J.G. Holt (eds.). Baltimore. Williams and Wilkins Co.
4. Dowson, W.S. 1949. Manual of Bacterial Plant Disease. Adam & Charles Black. Londres. 153 p.
5. Elliot, C. 1951. Manual of Bacterial Plant pathogens. Waltham, Mass. USA 126 p.
6. Fahy, D.C. and A. C. Hayward. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. pp. 337-374. In: Plant Bacterial Diseases. A diagnostic guide. P.C. Fahy and G.J. Persley (eds.). New York. Academic Press.

Cuadro 1. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de *Xanthomonas nigromaculans*, *X. campestris* pv. *zinniae* y los aislamientos en estudio.

Prueba	<i>X. nigromaculans</i> *	<i>X. c. pv. zinniae</i> **	Aislamientos en estudio***
Color	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Forma	Bastón	Bastón	Bastón
Gram			
Requerimiento O ₂	Aeróbica	Aeróbica	Aeróbica
Licuefacción gelatina	+ ligera	+	+
Hidrólisis del almidón		+	+
Producción de H ₂ S	ND	+	+
Leche tornasolada	Forma coágulo	Lig. alcalino	ND
Reducción de nitratos	+	ND	ND
Producción de amonio	+	ND	ND
Indol		ND	-
Proteólisis de la leche	ND	ND	+
Fosfatasa	ND	ND	+
Acetoin	ND	ND	-
Hidrólisis de la ausculina	ND	ND	+
Acido de:			
Sucrosa	-	+	+
Dextrosa	-	ND	ND
Lactosa	-	+	+
Manitol	-	ND	+
Glicerol	-	ND	+
Salicin	ND		+
Glucosa	ND	+	+
Maltosa	ND	+	+

* = De acuerdo a Elliot, 1951. ** = De acuerdo a Hopkins y Dowson, 1949. ***= Para cada prueba se utilizaron 5 aislamientos y fueron repetidas dos veces. + = Reacción positiva. - = Reacción negativa. ND= Reacción no determinada.

7. French, E.R. and T.T. Hebert. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Costa Rica. IICA. 289 p.
8. Goto, M. 1990. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. Academic Press, New York. 341 p.
9. Hernández, Y y G. Trujillo. 1997. *Xanthomonas campestris* pv. *zinniae* atacando plantas de cuarentona (*Zinnia elegans*). Fitopatol. Venez. 10 (2): 25 (Resumen).
10. Hopkins, J.C. and W.J. Dowson. 1949. A bacterial leaf and flower disease of zinnia in Southern Rhodesia. Trans. Brit. Mycol. Soc. 32:252-254.
11. Kado, C.I. and M.G. Heskett. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology 60: 969-976.
12. Kiraly, Z., Z. Klement., F. Dolymosy and J. Voros. 1974. Methods in plant pathology. Akademiai Kiadó, Budapest. pp. 135-143.
13. MacFaddin, J.F. 1975. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore. Williams and Wilkins Co. 312 p.
14. McGuire, R.G., J.B. Jones and M. Seasser. 1986. Tween media for semiselective isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from soil and plant material. Plant Diseases. 70:887-891.
15. Miller, J.W. 1975. Bacterial leaf spot of zinnia. Plant Pathology. Circular N° 159. 2 p.
16. Moffet, M.L. and B. J. Craft. 1983. *Xanthomonas*. pp. 182-222. In: Plant Bacterial Disease. A diagnostic guide P.C. Fahy and G.J. Persley (eds.) New York. Academic Press.
17. Noval, C. 1991. Género *Xanthomonas*. pp. 282-312. In: Manual de Laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de Sanidad de la Producción Agrícola. Madrid.
18. Rudolph, K.; M.A. Roy. M. Sasser, D.E. Stead, M. Davis, J. Swings and F. Gossele. 1990. Isolation of bacteria. pp. 43-94. In: Method in phyto bacteriology. Z. Klement, K. Rudolph and D.C. Sands (eds.). Akademiai Kiadó, Budapest.
19. Schaad, N.W. (ed.) 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2nd, ed. Minnesota, APS Press. 164 p.
20. Schaad, N.W. and W.C. White. 1974. A selective medium for soil isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris*. Phytopathology 64:876-880.
21. Schaffer Jr. W.A. 1975. Procedures for the identification of bacterial plant pathogens. p. 68-73 In: Proceedings of the first workshop on phyto bacteriology. 3th ed. R.N. Goodman (ed). Columbia, University of Missouri.
22. Schnee, L. 1960. Plantas comunes de Venezuela. Rev. Fac. Agron. (UCV) (Maracay). Alcance N° 3. 663 p.
23. Starr, M.P. 1986. The genus *Xanthomonas*. pp. 741-763. In: The prokaryotes M.P.S. Starr; H. Stalp; H. G. Truper; A Bolows; H.G. Schelegel (eds.). Springinverlangs, Berlin.
24. Suslow, T.V., M.N. Schroth and M. Isaka. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72:917-918.
25. Swings, J.G., L. Vauterin and K. Kersters. 1993. The bacterium *Xanthomonas*. p. 121-156. In: *Xanthomonas*. J.G. Swings and L. Civerolo (eds.). Chapman & Hall. London.
26. Weller, D., D. Ritchie and J. White. 1975. Isolation and identification of plant pathogenic bacteria. P. 33. In: Phytopathology Congress. Minnesota. APS.