

Nueva bacteriosis en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en Cuba

Marusia Stefanova¹ y Yenin Hernández²

Resumen. En plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) se observaron manchas pardas acuosas dispersas en la superficie de las hojas o lesiones en los márgenes en forma de V. De las hojas afectadas se aislaron siete cepas bacterianas que fueron identificadas como *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* en base a las pruebas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y de patogenicidad. Una parte de los aislamientos difieren por la producción de las enzimas amilasa y lipasa y la utilización de la maltosa. El inmunosuero producido mostró un alto título, se observó identidad serológica completa entre las cepas. La inoculación artificial en hojas de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) y col china (*Brassica pekinensis*), produjeron ennegrecimiento y ablandamiento de los tejidos, respectivamente. Las variedades de lechuga, Riza-15 y GR-30, fueron susceptibles a la enfermedad con infección de 55.8% y 60.5%, respectivamente.

Palabras claves: *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.

Abstract. Water-soaked, dark brown spots were scattered on the leaf surface and V-shaped lesions beginning at the leaf margins were observed on lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). Seven bacterial strains were isolated from infected leaves and identified as *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* based on morphological, physiological, biochemical and pathogenicity tests. A part of the bacterial isolates differed by their production of amylase and lipase and the use of maltose. The produced immunoserum showed a high tittle, serological identity was observed between the strains. The artificial inoculation in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and Chinence cabbage (*Brassica pekinensis*) leaves produced in the infected tissues blackening and softening, respectively. The lettuce varieties RIZA-15 and GR-30 were susceptible to the disease with infection of 55.8 and 60.5 %, respectively.

Key words: *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.

INTRODUCCION

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es atacada por microorganismos patógenos que de acuerdo a su naturaleza causan daños a la planta en forma de moteado, clorosis, manchas, achaparramiento, marchitez y pudrición, que merman los rendimientos y la calidad en el campo y el mercado (Patterson *et al.*, 1986).

En un área de producción se detectaron plantas de lechuga cuyas hojas presentaban manchas acuosas e irregulares de color pardo dispersas en la superficie o en forma de V avanzando a lo largo de las venas. Esta sintomatología fue observada también en plantas procedentes del mercado, pero en un estado más avanzado, acompañado de ruptura y desintegración del tejido. El examen microscópico efectuado a pequeñas porciones de las manchas indicó la presencia de bacterias

y sugirió el origen bacteriano del cuadro sintomatológico en cuestión.

De las bacterias fitopatógenas reportadas en el cultivo sólo cuatro son de importancia económica por tener un impacto mayor en la industria productora, ellas son: *Pseudomonas cichorii*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* y *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (Patterson *et al.*, 1986).

En Cuba en el cultivo de la lechuga está reportada solamente la especie *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Stefanova, 1990), pero los síntomas que la misma provoca no concuerdan con los descritos anteriormente.

Con el propósito de identificar el microorganismo causal de esta patología se realizó el presente trabajo.

¹ Investigador Titular, Laboratorio de Bacteriología, Área de Microbiología, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Calle 110 esq. 5^aF # 514, Playa, C. Habana, Cuba, E-mail: inisav@ceniai.inf.cu

² Aspirante a Investigador, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria Apdo. 10, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba

MATERIALES Y METODOS

El aislamiento se efectuó por estrías en placas Petri con medio de cultivo agar nutritivo (AN) a partir de hojas con síntomas iniciales de la enfermedad. A las 72 horas de incubación se obtuvieron cepas bacterianas que se denominaron LM1, LM2, LM3 y LM4 (muestras de campo) y LM 8, LM 13 y LM 14 (muestras del mercado). Las mismas fueron conservadas en cuñas de medio extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC).

Las pruebas de patogenicidad se efectuaron en plántulas de lechuga de la variedad Riza-15 que fueron asperjadas con las suspensiones bacterianas correspondientes, preparadas con agua destilada estéril de cultivos de 48 horas en AN con una concentración aproximada de 10^8 cel/ml. En todos los casos se incluyeron testigos inoculados con agua destilada estéril. Las plantas se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente hasta la expresión de los síntomas.

Los aislamientos bacterianos fueron identificados de acuerdo a los resultados de los estudios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos según las técnicas descritas por Schaad y Stall (1988).

Con dos aislamientos (LM 2 y LM 8) se inocularon plántulas de lechuga de las variedades Riza-15 y GR-30 por el método de aspersión. Se evaluaron 100 hojas por variedad tomadas al azar y se utilizó una escala de cinco valores, el índice de infección se calculó por la fórmula de Townsend - Heuberger (Ciba-Geigy, 1981).

También se inocularon por punción hojas de col (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L), variedad Hércules y de col china (*Brassica pekinensis* Rup), las heridas se hicieron en las venas centrales y marginales con las suspensiones bacterianas utilizadas en los estudios anteriores. Para las hojas testigos se usó agua destilada estéril.

Para obtener un antisuero policlonal se empleó un protocolo de inmunización que constó de seis inyecciones intravenosas proporcionando una dosis total de 12 ml del inmunógeno que se aplicaron con un intervalo de dos días. La suspensión fue preparada con suero fisiológico al 0.85% de cultivos de 48 h en medio de cultivo AN, lavados dos veces por centrifugación a 6000 rpm durante 15 minutos. El inmunosuero fue utilizado para el estudio de las relaciones serológicas de los aislamientos mediante inmunodifusión según Ouchterlony (1949).

RESULTADOS Y DISCUSION

En las placas de AN a las 72 horas se desarrollaron colonias de color amarillo, circulares, de bordes enteros y brillantes.

A los cuatro días todos los aislamientos causaron en las hojas de la lechuga manchas acuosas y translúcidas, irregulares o redondas que se fueron agrandando y causaron el deterioro total del foliolo y el peciolo, seguido de un colapso de las plantas a los 11 días de efectuada la inoculación.

En el medio de cultivo YDC el crecimiento fue más abundante, las colonias eran amarillas, elevadas, lisas, con bordes enteros y amarillas, de un tamaño aproximado entre 3 y 5 mm. Los aislamientos LM-8, LM-13 y LM -14 (muestras de mercado) desarrollaron colonias más pequeñas que las restantes; el 4% de cloruro de sodio en el medio inhibió el crecimiento de las cepas.

El metabolismo de la glucosa resultó oxidativo; la bacteria no reduce los nitratos, ni forma indol, pero alcaliniza y peptoniza la leche tornasolada, además produce las enzimas catalasa y gelatinasa y el gas sulfídrico. Sólo las cepas LM-8, LM-13 y LM-14 no hidrolizaron el almidón ni el Tween 80 (Cuadro 1). Los carbohidratos utilizados como fuente de carbono fueron glucosa, lactosa, trehalosa y sacarosa. La maltosa fue asimilada solamente por los aislamientos de las muestras de campo (Cuadro 2).

Cuadro 1. Resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas de los aislamientos estudiados

Pruebas	Aislamientos LM						
	1	2	3	4	8	13	14
Metabolismo de la glucosa (O/F)	O	O	O	O	O	O	O
Producción de:							
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+
Amilasa	+	+	+	+	-	-	-
Lipasa	+	+	+	+	-	-	-
Nitritos	-	-	-	-	-	-	-
Gas sulfídrico	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Acción sobre la leche	AP	AP	AP	AP	AP	AP	AP

O - oxidativo
A - alcalinización
P - peptonización
C - coagulación

Cuadro 2. Utilización de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos por los aislamientos de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.

Pruebas	Muestras de campo				Muestras de mercado		
	1	2	3	4	8	13	14
Utilización de:							
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Tartrato	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+	+	+
Succinato	+	+	+	+	+	+	+

Estos resultados concuerdan con los señalados para el género *Xanthomonas* y las especies del grupo *campestris* (Bradbury, 1984) donde está incluida la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*X. c. v.*). Los síntomas observados en las muestras de partida y en las plantas de lechuga inoculadas concuerdan con los descritos (Moffet y Croft, 1983; Patterson *et al.*, 1986; Sahin y Miller, 1997) para la mancha bacteriana de la lechuga que causa la especie mencionada. Todo lo anterior permite concluir que el patógeno de referencia es el causante de la problemática estudiada.

Los aislamientos relativos a la muestra del mercado se diferencian de los restantes por la producción de las enzimas amilasa, lipasa y por la utilización de la maltosa lo cual sugiere la posible presencia de dos biovares. Estudios posteriores con más aislamientos pueden ofrecer información más precisa en este sentido.

Los peciolos de las hojas de la col china inoculadas presentaron a las 72 horas un ablandamiento de los tejidos alrededor del punto de inoculación, en las hojas de col los aislamientos provocaron el ennegrecimiento de los tejidos donde se introdujo el inóculo. Las hojas testigos se mantuvieron sanas.

En la literatura generalmente se informa a la lechuga como hospedante natural de *X. c. v.*, sin embargo, Isuchiya *et al.* (1981) examinaron la patogenicidad de esta bacteria en diferentes plantas y provocaron síntomas en un gran número de ellas incluyendo la col china, nabo (*Brassica rapa* var. *glabra*), mostaza de la China (*Brassica japonica*) y coliflor (*Brassica eleracea* var. *botrytis*).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo aportan elementos a favor del criterio sobre las especies inoculadas como hospedantes potenciales de *X. c. v.*

Las dos variedades presentaron manchas pardas, acuosas y transparentes en las hojas, marchitez y achaparramiento y un alto índice de infección que evidenció su sensibilidad al patógeno (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de infección de las variedades de lechuga inoculadas con aislamientos de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.

Variedad	LM 8	LM 12
GR30	60.5	80.8
Riza- 15	55.8	64.5

El inmunosuero obtenido mostró por inmunoprecipitación un título de 1/2560 lo cual indica la efectividad del esquema de inmunización empleado, se observó una identidad serológica completa entre los aislamientos estudiados.

La mancha bacteriana o bacteriosis de la hoja está favorecida por la alta humedad relativa, rocío o lluvia y temperaturas cálidas, condiciones climáticas existentes en Cuba durante la época del cultivo. La enfermedad raras veces extermina la planta, pero la cosecha puede tornarse no vendible, de acuerdo a la gravedad de la infección (Patterson *et al.*, 1986). El estado de las plantas procedentes del mercado indican el deterioro que puede sufrir la lechuga en condiciones de almacenamiento por causa de la bacteria.

Isuchiya *et al.* (1981) inocularon con aislamientos de *X. c. v.* a 99 especies de plantas cultivables y 97 especies silvestres de 50 familias e informaron más de 28 como hospedantes potenciales, entre ellas crucíferas que se cultivan en Cuba. Zoina y Volpe (1992) detectaron a *X. c. v.* en diversas especies de maleza dentro y fuera de los campos de lechuga. La bacteria puede estar en los hospedantes epifíticamente sin provocar síntomas hasta que las condiciones ambientales se tornan favorables, (Zoina y Volpe, 1992; Sahin y Miller, 1997) además sobrevive por largos períodos de tiempo en el suelo y en restos del cultivo (Zoina y Volpe, 1992).

La bacteriosis causada por *X. c. v.* ha sido señalada como una enfermedad severa en varios lugares (Pernezny *et al.*, 1995, Zoina y Volpe, 1992, Sahin y Miller, 1997). En

Cuba actualmente el cultivo está muy extendido en la agricultura urbana por lo que se hace necesario aplicar una estrategia efectiva de manejo para evitar pérdidas. De acuerdo a lo planteado anteriormente, el uso de semillas sanas, la eliminación de restos de cosecha y la rotación de cultivos deben estar comprendidos entre las medidas de control. Se recomienda el uso de fungicidas a base de cobre, pero dentro de las prácticas culturales para evitar la aparición de resistencia (Ritchie y Dittapongpith, 1991; Sahin y Miller, 1997). La siembra de variedades resistentes y tolerantes después de un estudio de comportamiento varietal es otra medida apropiada para el control de la enfermedad.

LITERATURA CITADA

- Bradbury, J.F. 1984. Genus *Xanthomonas* Dawson 1939. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg, N.R. y Holt, J.G.(ed.) Williams & Wilkins, Baltimore, vol.1, p.199-210.
- CIBA-GEIGY.1981. Manual de ensayos de campo en protección vegetal, Basilea, Suiza. p. 34
- Isuchiya, Y., K. Ohata, K. Azegami y M. Matzuzahi. 1981. Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* to various crops (99 especies) and weeds (97 especies) Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences, Plant Pathology and Entomology (Japan) 35:57-71.
- Lelliot, R. A. y D. E. Stead. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. p. 69- 79. In: Methods in Plant Pathology Volume 2, Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford.
- Moffet, M. L. y B. J. Croft. 1983. *Xanthomonas*. p. 189-228. In: Plant Bacterial Disease. A Diagnostic Guide, Fahy, P.C. and G. J. Persley(ed.) Sidney, Academic Press.
- Ohata, K., K. Azegami, A. Shirata y S. S. Serisawa. 1982. Possibility of seed transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the pathogen of bacterial spot of lettuce. Bulletin of the National Institute of Agricultural Sciences, Plant Pathology and Entomology (Japan) 36: 81-88.
- Ouchterlony, O. 1949. Antigen- antibody reaction on gels. Acta Pathol. Microbiol Scand 26: 507.
- Patterson, C..L., R.G. Grogan y R.N. Campbell. 1986. Economically important diseases of lettuce. Plant Disease 70: 982-987.
- Permezny, K., R.N. Raid, R.E. Stall, N.N. Hodge y J.Collins. 1995. And outbreak of bacterial spot of lettuce in Florida caused by *Xanthomonas campestris* pv *vitians*. Plant Disease 79: 359-360.
- Ritchie, D.F y V. Dittapongpith. 1991. Copper and streptomycin-resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. Plant Disease 75: 733- 736.
- Sahin, A. y S.A. Miller. 1997. Identification of the bacterial leaf spot pathogen of lettuce, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in Ohio, and assessment of cultivar resistance and seed treatment. Plant Disease 81: 1443-1446.
- Schaad, N. W. y R. E. Stall. 1988. *Xanthomonas*. p. 81-94 In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd ed., N. W. Schaad (ed.) American Phytopathological Society, St Paul . MN.
- Stefanova, M. 1990. Lista de bacterias fitopatógenas de Cuba . INISAV - CID, 8 p.
- Zoina, A y E. Volpe. 1994. Epidemiological aspects of lettuce bacterial spot induced by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. p.797-802 In: Plant Pathogenic Bacteria, Versailles (France), june 9-12 ,1992 ,INRA ed., Paris (Les Colloques, N. 66)