

Identificación de Enterobacterias Causantes de Pudriciones Blandas en *Cucurbita pepo* L. en Veracruz, México

Mauricio Luna-Rodríguez, Universidad Veracruzana (UV), Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa, Médicos No. 5, Xalapa, Veracruz, México CP 91010; **Alicia Toledo-González**, UV, Facultad de Biología, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, Xalapa, Veracruz, México CP 91000; y **Lourdes Georgina Iglesias-Andreu**, UV, Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada, Av. de las Culturas Veracruzanos No. 101, Col. Emiliano Zapata, Xalapa, Veracruz, México CP 91090. Correspondencia: mluna@uv.mx

(Recibido: Julio 24, 2007 Aceptado: Noviembre 16, 2007)

Luna-Rodríguez, M., Toledo-González, A. e Iglesias-Andreu, L.G. 2009. Identificación de enterobacterias causantes de pudriciones blandas en *Cucurbita pepo* L. en Veracruz, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27:64-68.

Resumen. Se identificaron dos especies de *Pectobacterium* causantes de pudriciones blandas en *Cucurbita pepo* y su variabilidad de respuesta a pruebas bioquímicas. Se determinó que los aislamientos correspondieron a *P. chrysanthemi* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, sin embargo no hubo una concordancia precisa con los descriptores comúnmente usados para la identificación de las especies de este género. El análisis factorial de correspondencias mostró que la variabilidad en los resultados para las pruebas bioquímicas evaluadas, ordenó a los aislamientos en cuatro grupos: dos afines a *P. chrysanthemi* y dos a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Las variables de mayor contribución a la formación de los grupos fueron producción de ácido a partir de lactosa, sensibilidad a eritromicina (15 µg/disco), utilización de ceto-metil glucosido y producción de sustancias reductoras a partir de sacarosa.

Palabras clave adicionales: *Pectobacterium*, variabilidad fenotípica, pruebas bioquímicas, bacteria fitopatógena, calabacita.

Las bacterias del grupo entérico forman un conjunto heterogéneo de microorganismos que comprende importantes patógenos en humanos, como *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* Migula (Castellani y Chalmers). También, algunas especies de este grupo causan enfermedades en vegetales con pérdidas en la producción de frutales, ornamentales y hortalizas, entre otros. El género *Pectobacterium*, antes conocido como *Erwinia*, es representativo de este grupo y comprende especies que ocasionan pudriciones blandas por la degradación enzimática de la pectina estructural de la pared celular vegetal (Shevchik y Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003). Algunas como *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Waldee, [Sin. *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey], constituyen un taxón complejo que incluye razas con un amplio rango de

Abstract. Two species of *Pectobacterium* which cause soft rot in *Cucurbita pepo* were identified, and their variability in response to biochemical tests was determined. The isolates corresponded to *P. chrysanthemi* and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; however, there was no precise correlation between the isolations studied and the identifiers commonly used for species determination of this genus. The factorial analysis of correspondence showed that variability in results for the biochemical tests performed, classified the isolates into four groups: two related to *P. chrysanthemi* and two related to *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Variables that contributed the most to formation of groups were production of acid from lactose, sensitivity to erythromycin (15 µg/disk), the use of keto-methyl glucoside, and production of reducing substances from saccharose.

Additional keywords: *Pectobacterium*, phenotypic variability, biochemical tests, phytopathogenic bacteria, zucchini.

Abbreviated article.

Enterobacter bacteria make a heterogeneous group of microorganisms which comprises important human pathogens, like *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* Migula (Castellani and Chalmers). Likewise, some species of this group cause diseases of plants affecting the production of fruits, ornamentals, vegetables, among others. The genus *Pectobacterium*, formerly known as *Erwinia*, is representative of this group and includes species that cause soft rots as a consequence of enzymatic degradation of the structural pectin of the plant cell wall (Shevchik and Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003). Some, like *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Waldee, [Syn. *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey], make a complex taxon which includes races with a wide range of genetic, phenotypic, and biochemical characteristics, as well as hosts (Yap *et al.*, 2004); therefore, heterogeneity of group species has contributed to the lack of satisfactory descriptors of subspecies or pathovars (Schaad *et al.*, 2001). However, some studies have generated reliable phenotypic criteria for subspecies identification of *P. carotovorum* (Gardan *et al.*,

características génicas, fenotípicas, bioquímicas y de hospederos, y en consecuencia de su distribución (Yap *et al.*, 2004); por lo que la heterogeneidad de las especies del grupo ha contribuido a que aún no se cuente con descriptores satisfactorios de subespecies o patovares (Schaad *et al.*, 2001). Sin embargo, para propósitos de identificación de las subespecies de *P. carotovorum*, algunos estudios han generado un criterio fenotípico confiable que diferencia dos o más subespecies (Gardan *et al.*, 2003). En consecuencia de los casos donde los resultados de pruebas para identificar aislamientos locales, no se apegan en su totalidad a la información documental empleada para la identificación, se considera que está abierta la oportunidad de indagar acerca de la variación de características génicas, fenotípicas, bioquímicas, entre otras, con el propósito de encontrar diferencias que contribuyan a ampliar el conocimiento de este grupo. El propósito de este trabajo fue identificar la especie o subespecie de *Pectobacterium* causante de pudriciones blandas en *Cucurbita pepo* L. de cultivos locales, y determinar la variabilidad de respuesta a pruebas bioquímicas ordinariamente usadas para la identificación.

Los aislamientos bacterianos se obtuvieron de tallos de plantas de *C. pepo*, comúnmente conocida como calabacita italiana, con daño evidente de pudriciones blandas de olor fétido, procedentes de un sembradío en La Tinaja, Veracruz, México. El tejido fue lavado superficialmente con agua destilada estéril y desinfectado por inmersión en solución de hipoclorito de sodio comercial (2% v/v) durante 1 a 2 min, seguido de cuatro enjuagues con agua destilada estéril. Se eliminaron las zonas vegetales con daño avanzado y se utilizó tejido periférico de la zona lesionada. Se seccionaron segmentos de tallos de 15 plantas en cortes menores a 1 cm², mismos que se homogenizaron en un mortero de porcelana con 1 mL de agua destilada. El agua y los morteros se esterilizaron previamente a 121°C/15 min/15 psi en un autoclave convencional (Felisa FE-387). Parte de esta solución fue estriada en cajas Petri con medio extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC) e incubadas a 27°C ± 2°C hasta la formación de crecimiento bacteriano evidente. De cada caja se seleccionaron dos colonias por cada tipo colonial desarrollado y se estriaron en medio de cultivo nuevo, descartando las colonias con crecimiento rápido a las 24 h. Este procedimiento se repitió las veces necesarias con la finalidad de obtener cultivos puros, evaluando la morfología y agrupación celular mediante técnicas convencionales de tinción (Schaad *et al.*, 2001) y de observación microscópica. Para comprobar su patogenicidad, cada aislamiento bacteriano fue inoculado en plantas de 8 a 10 días de germinación de *C. pepo*, en relación de cuatro plantas por aislamiento, siguiendo la metodología de Schaad *et al.* (2001). Una vez determinada la morfología y comprobada la patogenicidad, se procedió a determinar que los aislamientos presentaran un gram negativo y que tuvieran la capacidad de metabolizar la glucosa. Se seleccionaron diez aislamientos a los que se les aplicaron pruebas básicas de reacción bioquímica para el género

2003). The opportunity is open to investigate variation of genetic, phenotypic, and biochemical characteristics, in order to find differences that might contribute to enrich the knowledge of this group, in cases where results of identification assays of local isolates do not fit with the information already documented. The objective of this study was to identify the species or subspecies of *Pectobacterium* causing soft rots in *Cucurbita pepo* L. in local plots, and to determine the variability of response to biochemical assays commonly used for identification.

Bacterial isolates were obtained from stems of *C. pepo* plants, known as Italian pumpkin, which showed soft rot in La Tinaja, Veracruz, Mexico. Plant tissue was rinsed with sterile distilled water and disinfested with 2% (v/v) sodium hypochlorite for 1 to 2 min, followed by four rinses with sterile distilled water. Tissue from the periphery of lesions from 15 plants were cut into segments smaller than 1 cm², then, they were homogenized in a mortar with 1 mL of distilled water, which was previously sterilized in an autoclave (121°C/15 min/15 psi). Part of this solution was streaked onto yeast-dextrose-calcium carbonate (YDC) in Petri plates and incubated at 27°C ± 2°C until bacterial growth was evident. Two colonies for type of colony developed were selected from each plate and streaked onto new culture medium, fast-growing colonies were discarded after 24 h. This procedure was repeated as many times as necessary in order to obtain pure cultures; morphology and cellular grouping was assessed using conventional staining techniques (Schaad *et al.*, 2001) and microscopic observation. For pathogenicity testing, each bacterial isolate was inoculated in four plants of *C. pepo* 8 to 10 days after seed germination (Schaad *et al.*, 2001). Once the morphology and pathogenicity were assessed, ten isolates were selected based on the capacity to metabolize glucose and that were Gram-negative; then, they were subjected to basic biochemical tests for *Pectobacterium* (oxidase, catalase, nitrate reduction, β-galactosidase, urease, sulfhydryl acid, and utilization of glucose, glycerol, and saccharose), and to complementary tests for species identification (Gardan *et al.*, 2003; Schaad *et al.*, 2001). Additionally, the system API-20 (Biomérieux) was used to corroborate and complement some tests, and the media LIA (BD Bioxon), TSI (BD Bioxon), and SIM (BD Bioxon) to assess the capacity to produce sulfhydryl acid. Data was analyzed by factorial correspondence which allows classification of isolates and variables on a same plane and the direct observation of their relationship (Estrada-Martínez *et al.*, 1997). Code data was used (positive:1; negative:2; undetermined:3, and variable:4) for descriptors of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Waldee emend., Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck, and Swings, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (van Hall) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck, and Swings, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois, Samson, Ageron, and Grimont) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck, and Swings, *P. carotovorum* subsp. *betavascularum* (Thomson, Hildebrand,

Pectobacterium (oxidasa, catalasa, reducción de nitratos, β -galactosidasa, ureasa, ácido sulfhídrico y utilización de glucosa, glicerol y sacarosa), así como pruebas complementarias para la identificación de especies (Gardan *et al.*, 2003; Schaad *et al.*, 2001). Para corroborar y complementar algunas pruebas, se utilizó el sistema API-20 (Biomeriux); y particularmente los medios LIA (BD Bioxon), TSI (BD Bioxon) y SIM (BD Bioxon) para observar la capacidad de producir ácido sulfhídrico. Los datos se procesaron mediante el análisis factorial de correspondencias, que permite clasificar a los diferentes aislamientos y las variables sobre un mismo plano y posibilita la observación directa de sus relaciones (Estrada-Martínez *et al.*, 1997). Se emplearon datos codificados (positivo:1; negativo:2; no determinado:3 y variable:4) para los descriptores de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Waldee emend., Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck y Swings, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* (van Hall) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck y Swings, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (Gallois, Samson, Ageron y Grimont) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck y Swings, *P. carotovorum* subsp. *betavascularum* (Thomson, Hildebrand y Schroth) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck y Swings, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae* (Goto y Matsumoto) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck y Swings, *P. chrysanthemi* (Burkholder, McFadden y Dimock) Brenner, Steigerwalt, Miklos y Fanning emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck y Swings y *P. cacticida* (Alcorn, Orum Steigerwalt, Foster, Fogleman y Brenner) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck y Swings y los datos generados a partir de las pruebas bioquímicas de los aislamientos en estudio. El procesamiento de los datos se realizó empleando el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc.).

Se obtuvieron colonias de color blanquecino a crema, brillantes, no mucoides, con elevación central en medio YDC; constituidas de células en forma de bacilos cortos, individuales, gram negativas, de flagelación peritrica y no esporuladas. Todos los aislamientos bacterianos examinados mostraron una respuesta negativa en las pruebas de oxidasa, ornitina descarboxilasa, ureasa y producción de ácido a partir de adonitol. Por el contrario, las pruebas de fermentación y oxidación de la glucosa (anaerobiosis facultativa), reducción de nitratos, producción de las enzimas catalasa, β -galactosidasa, triptofano desaminasa dieron resultados positivos. Además mostraron capacidad de utilizar glicerol, ramnosa, manosa, glucosa y sacarosa como fuentes de carbono. Contrastando con lo esperado, el aislamiento 7 no produjo ácido sulfhídrico. Los diez aislamientos en estudio formaron excavaciones en medio Cristal Violeta Polipectato (CVP) por la degradación de pectatos, además de que produjeron pudriciones severas y de olor fuerte en las papas y en la totalidad de las plantas de *C. pepo* inoculadas, lo que condujo, conjuntamente con los resultados de las pruebas

and Schroth) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck, and Swings, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae* (Goto and Matsumoto) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck, and Swings, *P. chrysanthemi* (Burkholder, McFadden, and Dimock) Brenner, Steigerwalt, Miklos, and Fanning emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck, and Swings, and *P. cacticida* (Alcorn, Orum Steigerwalt, Foster, Fogleman, and Brenner) Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck, and Swings, and data generated by biochemical tests of isolates. Data was analyzed using the program STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc.).

Whitish to cream, opaque, not mucoid colonies were obtained, with a central elevation in YDC; cells were short rods, individual, Gram-negative, with peritrichous flagella, not sporulated. All isolates were negative to oxidase, ornithine descarboxilase, urease and production of acid from adonitol. Fermentation tests, oxidation of glucose (facultative anaerobiosis), nitrate reduction, production of enzymes catalase, β -galactosidase, and tryptophane desaminase were positive. They utilized glycerol, rhamnose, mannose, glucose, and saccharose as carbon sources. Isolate 7 did not produce sulfhydic acid. All ten isolates formed cup-like depressions in crystal violet pectate medium, and caused severe rots with strong smell on potatoes and all inoculated plants of *C. pepo*, characteristic of *Pectobacterium* (Schaad *et al.*, 2001). The factorial analysis showed variability, the first two axes extracted 64.2% of the variation detected, so isolates could be classified in four groups (A, B, C, and D) (Fig. 1). Also, the analysis indicated that the main variables that contributed to formation of groups were lactose fermentation, sensitivity to erythromycin (15 μ g/disc), utilization of keto-methyl glucoside, and production of reducing substances from saccharose (Table 1). Although, a strict relationship between the ten isolates and species of *Pectobacterium* was not established based on the descriptors indicated by Schaad *et al.* (2001), group D (isolate 7) and particularly group A (isolates 1, 2, 5, 6, 8, and 10), showed phenotypic affinity to *P. chrysanthemi* (Fig. 1), as they were sensitive to erythromycin (15 μ g/disc). It is clear why this test is considered of great diagnostic value for differentiation of *P. chrysanthemi* from the rest of the species of the genus (Clark and Moyer, 1988; García, 2000), although *P. cypripedii* (Hori) Brenner, Steigerwalt, Miklos, and Fanning emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck, and Swings is also positive for this test; however, it is usually reported to be pathogenic on orchids of *Cypripedium* spp. (Hauben *et al.*, 2005). Group D (isolate 7) showed the same response as group A to erythromycin, but it was classified as a separate group because it did not produce sulfhydic acid. In this respect, LIA was the best medium for analysis of sulfhydic acid production after five days, since only isolate 10 was positive on TSI and SIM media. According to Schaad *et al.* (2001), this test does not show variation, however, based results of this study, culture medium and time of incubation

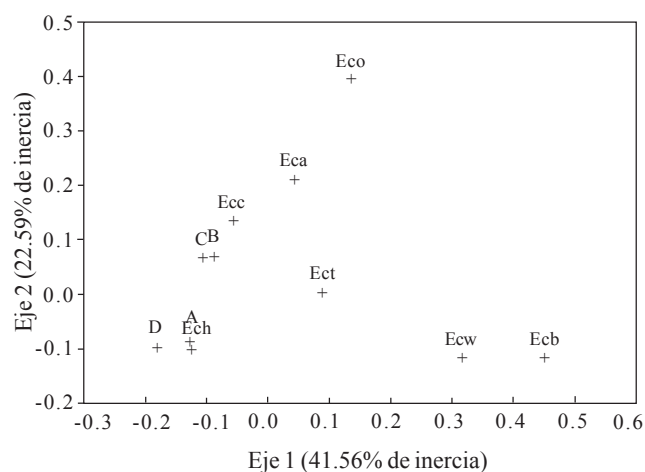


Fig. 1. Distribución de los grupos fenotípicos según la respuesta a pruebas bioquímicas, de acuerdo al análisis factorial de correspondencias (64.2 % de inercia acumulada de los primeros dos ejes) utilizando los datos para las especies de *Pectobacterium*, reportados por Schaad *et al.* (2001), Gardan *et al.* (2003) y los datos resultantes para los aislamientos en estudio. Eca: *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; Ecc: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; Ecb: *P. carotovorum* subsp. *betavascularum*; Eco: *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*; Ecw: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae*; Ech: *P. chrysanthemi*; Ect: *P. cacticidae*. A, B, C y D: Grupos fenotípicos.

Fig. 1. Distribution of phenotypic groups based on response to biochemical tests, according to the factorial analysis of correspondence (64.2 % inertia accumulated in the first two axes) using data for species of *Pectobacterium*, reported by Schaad *et al.* (2001), Gardan *et al.* (2003), and data from isolates in this study. Eca: *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; Ecc: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*; Ecb: *P. carotovorum* subsp. *betavascularum*; Eco: *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*; Ecw: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *wasabiae*; Ech: *P. chrysanthemi*; Ect: *P. cacticidae*. A, B, C, and D: Phenotypic groups.

anteriormente referidas, a señalar que se trataba de bacterias del género *Pectobacterium*, según Schaad *et al.* (2001). El análisis factorial de correspondencias aplicado a los resultados de las pruebas bioquímica básicas y complementarias que mostraron variabilidad, reveló que los dos primeros ejes extrajeron el 64.2% de la variación detectada, lo que contribuyó a que se pudieran clasificar a los aislamientos en cuatro grupos (A, B, C y D) (Fig. 1). Adicionalmente, el análisis reveló que las principales variables que contribuyeron a la formación de los grupos fueron fermentación de la lactosa, sensibilidad a la eritromicina (15 µg/disco), utilización de ceto-metil glucosido y producción de sustancias reductoras a partir de sacarosa (Cuadro 1). Aunque no se logró establecer una relación estricta de los diez aislamientos con las especies de *Pectobacterium* al considerar los descriptores indicados por Schaad *et al.* (2001), el grupo D (aislamiento 7) y particularmente el grupo A (aislamientos 1, 2, 5, 6, 8 y 10), mostraron afinidad fenotípica con la especie *P. chrysanthemi* (Fig. 1), como consecuencia

are key factors. Groups B (isolates 3 and 9) and C (isolate 4) showed to be closely related to *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Fig. 1), especially group B since it was positive for production of reducing substances from saccharose. Unexpectedly, isolates of both groups produced indole, and therefore, they showed a tendency of similarity to *P. chrysanthemi*. Similar results were reported by Seo *et al.* (2002) and Yap *et al.* (2004) for races of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. As indicated by Schaad *et al.* (2001), the heterogeneity shown by species of *Pectobacterium* has contributed to the lack of satisfactory descriptors of subspecies or pathovars. Despite sample size, results of this study show the lack of precise descriptors for species of the genus to be applied to isolates. Studies on variation of response to biochemical tests contribute to the knowledge of genetic variation shown by local phytopathogenic enterobacteria, as a first step for a more detailed study in different hosts, and for phylogenetic analysis based on current techniques that could establish relationships between variants of this type of microorganism, with the objective to contribute to the taxonomic classification of the group.

CONCLUSIONS

Enterobacteria phenotypically close to *P. chrysanthemi* and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* cause soft rot of *Cucurbita pepo* in La Tinaja, Veracruz, Mexico. There are response differences to biochemical tests among isolates close to *Pectobacterium*. Acid production from lactose, sensitivity to erythromycin (15 µg/disc), utilization of keto-methyl glucoside, and production of reducing substances from saccharose, are the assays that contribute the most to variation classification of isolates.

End of the abbreviated article.

de presentar sensibilidad a la eritromicina (15 µg/disco). Es claro porqué ésta ha sido considerada como una de las pruebas con mayor valor diagnóstico para la diferenciación de *P. chrysanthemi* del resto de las especies del género (Clark y Moyer, 1988; García, 2000), aunque *P. cyripedii* (Hori) Brenner, Steigerwalt, Miklos y Fanning emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck y Swings también es positiva para esta prueba, sin embargo esta especie usualmente es reportada como agente patógeno para orquídeas del género *Cypripedium* spp. (Hauben *et al.*, 2005). El grupo D (aislamiento 7) presentó la misma respuesta a la eritromicina que el grupo A, no obstante se clasificó como grupo separado debido a que no produjo ácido sulfhídrico. Al respecto, se encontró que fue LIA, el medio adecuado para el análisis de la producción de ácido sulfhídrico a partir del quinto día, dado que en los medios TSI y SIM únicamente el aislamiento 10 resultó positivo para esta prueba. Es conveniente indicar que en los descriptores para el grupo de *Pectobacterium*, según Schaad *et al.* (2001), esta prueba no se reporta que sea variable; no obstante, de acuerdo con

Cuadro 1. Contribución de las variables a la formación de los primeros dos ejes del análisis factorial de correspondencias, que explican el 64.2% de la variabilidad de respuesta a pruebas bioquímicas de los aislamientos de enterobacterias fitopatógenas estudiadas.

Table 1. Contribution of variables to formation of the first two axes of the factorial analysis of correspondence, which explain 64.2% of the variability of response of phytopathogenic enterobacteria under study, to biochemical tests.

Variable	Inercia relativa en la formación de los ejes
Crecimiento a 37°C en medio CPG	0.054977
Sustancias reductoras de sacarosa	0.085531
Sensibilidad a eritromicina (15 µg/disco)	0.139719
Producción de ácido a partir de sorbitol	0.056634
Producción de ácido a partir de melibiosa	0.021620
Producción de ácido a partir de lactosa	0.270011
Utilización de citrato	0.070782
Utilización de ceto-metil glucósido	0.112384
Actividad fosfatasa	0.055982
Producción de ácido sulfhídrico	0.066233
Producción de indol	0.066128

estos resultados, el medio y el tiempo de incubación, constituyen factores importantes para su determinación. Los grupos B (aislamientos 3 y 9) y C (aislamiento 4) mostraron ser afines a *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Fig. 1). Particularmente para el grupo B, el hecho de haber dado resultados positivos para la prueba de sustancias reductoras a partir de la sacarosa contribuyó a que su afinidad con la especie no se estrechara. Cabe mencionar que los resultados mostrados por estos aislamientos para esta prueba fueron débiles, en comparación con el resto de los aislamientos examinados; sin embargo, para los fines de este estudio se consideró la prueba como positiva. De forma adicional y contraviniendo lo esperado, los aislamientos de ambos grupos produjeron indol, razón por la que mostró una tendencia de similitud con *P. chrysanthemi*. Resultados similares fueron reportados para esta prueba en la tercera parte de las razas de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* estudiadas por Seo *et al.* (2002) y por Yap *et al.* (2004). Como lo indica Schaad *et al.* (2001), la heterogeneidad que caracteriza a las especies de *Pectobacterium* ha contribuido a que no se cuente con descriptores satisfactorios de subespecies o patovares. Lo anterior se refleja en los resultados obtenidos, donde a pesar del tamaño de la muestra, se evidencia la falta de una concordancia precisa de los aislamientos estudiados con los descriptores referidos por el autor para las especies de este género. Estudios de variación de la respuesta a pruebas bioquímicas contribuyen al conocimiento de la variación genética que se presenta en especies de bacterias entéricas fitopatógenas locales, como un primer paso para un estudio detallado de respuesta en diferentes hospederos y más aún, un análisis filogenético basado en técnicas actuales que establezcan las relaciones entre variantes de este tipo de microorganismo con el objetivo de contribuir en la taxonomía del grupo.

CONCLUSIONES

Enterobacterias fenotípicamente afines a *P. chrysanthemi* y *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* son causantes asociados de pudriciones blandas en *Cucurbita pepo* en la localidad de La Tinaja, Veracruz, México. Existen diferencias de respuesta a pruebas bioquímicas entre aislamientos afines de *Pectobacterium*. La producción de ácido a partir de lactosa, sensibilidad a eritromicina (15 µg/disco), utilización de ceto-metil glucosido y la producción de sustancias reductoras a partir de sacarosa, son las pruebas que más contribuyen a la clasificación de la variación en los aislamientos.

LITERATURACITADA

Clark, C.A., and Moyer, J.M. 1988. Compendium of Sweet Potato Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 74 p.

Estrada-Martínez, M.E., Piñón, D.R. y Capote, M.C. 1997. Variabilidad de las esterases de *Metarhizium anisopliae*. Revista Iberoamericana de Micología 14:29-30.

García, R. 2000. Especies y sub-especies de *Erwinia*, causantes de pudrición blanda y pierna negra en la papa cultivada, en el estado de Mérida-Venezuela. Revista Forestal Venezolana 44:107-114.

Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., and Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53:381-391.

Hauben, L., Van Gijsegem, F., and Swings, J. 2005. Genus XXIV. *Pectobacterium* Waldee 1945, 469AL emend. Hauben, Moore, Vauterin, Steenackers, Mergaert, Verdonck and Swings 1999a, 1. pp. 721-730. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two. The Proteobacteria. Part B, The Gammaproteobacteria. Second Edition. Springer. New York, USA. 1106 p.

Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.

Seo, S.T., Furuya, N., Lim, C.K., Takanami, Y., and Tsuchiya K. 2002. Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strains from Asia. Phytopathology 150:120-127.

Shevchik, V.E., and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. 2003. PaeX, a second pectin acetyltransferase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. Journal of Bacteriology 185:3091-100.

Yap, M.N., Barak, J.D., and Charkowski, A.O. 2004. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. Applied and Environmental Microbiology 70:3013-3023.