



BACTERIOSIS DEL APIO **[*Apium graveolens pers. L*]** ***Erwinia quercina p.v. rubrifaciens* ***

BACTERIUM OF CELERY

Beatriz Velasco **

RESUMEN

Este trabajo -primera cita para Mendoza (Argentina)- intenta descubrir el agente causal de un tizón de los folíolos de apio. Se efectuaron:

- aislamientos de rutina en APG al 1,7 %,
- pruebas de exudado bacteriano y de patogenicidad en plantas sanas,
- y pruebas bioquímicas.

Se identificó como agente patógeno a la bacteria *Erwinia quercina p.v. rubrifaciens*.

SUMMARY

The object of this work was to identify the causal agent of the celery foliole blight in some celery crops in Mendoza. We isolated this pathogen in APG to 1,7 % and made the bacterial exudate proof and pathogenicity in health plants and bioquimics test. We identify the pathogen as *Erwinia quercina pv. rubrifaciens*, a bacteria cited for the first time in Mendoza, Argentina.

Palabras clave

apio • *Erwinia* • especie nueva • Mendoza • Argentina

Key words

celery • *Erwinia* • new specie • Mendoza • Argentina

INTRODUCCIÓN

Las aprox. 200 ha cultivadas con apio en 1997 demuestran su importancia dentro de la producción hortícola mendocina. En un cultivo de apio (*Apium graveolens* L) cv. Blanco, se observaron manchas pardas claras en los bordes de los folíolos,

* Primera cita para Mendoza (Argentina)

** Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Alte. Brown 500. (5505) Chacras de Coria. Mendoza. Argentina.
e-mail: caifca@uncu.edu.ar

confluentes con otras más oscuras. En algunos casos, cuando dichos folíolos estaban totalmente afectados, las hojas se necrosaban completamente, produciéndose una podredumbre en el estado final. La gravedad potencial de la enfermedad, el desconocimiento de su etiología y la carencia de referencias en la bibliografía argentina, motivaron el presente trabajo. Como antecedentes de bacteriosis sobre apio podemos citar:

- a nivel internacional: *Erwinia carotovora p.v. carotovora* (Wimalajeewa, D.L.S. 1976); *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp, 1992 y *Pseudomonas marginalis p.v. marginalis* (Brown) Stevens, 1992).
- a nivel nacional: *Erwinia aroideae* (Zunino, 1972).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sintomatología inicial: desarrollo de pequeñas lesiones necróticas en los folíolos rodeados por un halo clorótico. Al unirse varias de estas manchas se ve comprometida gran parte de la lámina foliar y la planta adquiere aspecto atizonado. También se observaron, a lo largo de los peciolo, pequeñas estrías necróticas (0,5 mm).

Pruebas efectuadas:

1. Exudado:

De los folíolos que presentaban síntomas se tomaron trozos de tejido de 0,5 a 1 cm, realizándose el exudado de rutina. La muestra se colocó sobre portaobjeto y sobre ella, se dispuso el cubreobjeto. Llevada a la platina del microscopio óptico, se agregó agua por el costado y se observó con campo oscuro.

2. Aislamientos:

Efectuados a partir de folíolos y peciolo de plantas afectadas en forma incipiente con los síntomas de atizonamiento. Se empleó la técnica clásica: 7 - 8 lavados previos; luego, alcohol 70° durante diez segundos y, a continuación, se esterilizó con hipoclorito de sodio al 5 % durante tres minutos. El material procesado se sembró:

- a. directamente en cajas de Petri con APG al 1,8 %.
- b. los trocitos se maceraron en agua destilada estéril, dejándolos reposar durante una hora, y posteriormente, se hizo estriado en cajas de Petri con la suspensión obtenida.

El medio de cultivo en ambos casos fue: Agar papa glucosado al 1,8 %, pH 7. Las cajas se incubaron a 28 °C y, a las 48 horas se efectuaron las correspondientes purificaciones en medio extracto de levadura más carbonato de calcio (YDC); medio de King B (KB); medio cristal violeta pectato (CVP); medio D-1.

3. Patogenicidad:

Se emplearon plantas provenientes de semilla de apio variedad blanco, inoculándose 4 hojas con tres folíolos cada una. Fueron cultivadas en macetas de arcilla, dentro de invernáculo a 24 - 26 °C y HR media del 50 %. El inóculo consistió en una suspensión de cultivo bacteriano de 24 horas desarrollado en APG, empleando agua destilada estéril como vehículo. Se utilizaron dos métodos de inoculación:

- a. Pulverización: se usó la suspensión bacteriana (blanco lechosa), poniendo las plantas el día previo a la inoculación en un ambiente de 98 % de HR durante 24 horas, con objeto de estimular la apertura estomática. Se pulverizó con un vilbis ambas caras de todas las hojas, tratando de producir su hidrosis.

b. Inyección en el cuello de las plantas de 1 cm³ de la suspensión bacteriana, usando aguja hipodérmica.

Todas las plantas, después de la inoculación, fueron cubiertas durante las 24 horas siguientes con bolsas de polietileno. Se realizaron 3 repeticiones de 20 plantas cada una para las dos variantes señaladas. Los cultivos fueron plantas en las mismas condiciones y el mismo desarrollo que las inoculadas con el patógeno; solamente se reemplazó la suspensión bacteriana con agua destilada estéril.

4. Identificación de la bacteria: caracteres morfológicos y de cultivo.

La morfología celular se observó mediante coloración de Gram modificada por Hocker (S.A.B. 1957). Los flagelos se tiñeron según Bailey (modificación de Fisher y Conn) y la esporulación se determinó indirectamente por siembra de una suspensión bacteriana en agua de peptona, sometidas a 80 °C durante 20 minutos (Gottuzo y Dominguez, 1985).

Las características del cultivo se determinaron en APG. El crecimiento mucoso en agar nutritivo con 5 % de sacarosa; la podredumbre en papa (5), y la hipersensibilidad en tabaco, cv. Burley (7). Las cepas bacterianas se conservaron a 4 °C, sembradas en tubos pico de flauta mediante estriado de APG, repicándose semanalmente.

El método utilizado para la determinación del género fue: crecimiento en medio APG, coloración de Gram, colonias amarillas o naranjas en medios AN, YDC y NBY, pigmento fluorescente en medio KB, presencia de flagelos peritricos, crecimiento en D-1 agar, presencia de pared celular, forma de la bacteria y crecimiento en medio Kelman sin TZC.

Para la diferenciación de especies del grupo *amylovora* y *herbícola*, se realizaron los siguientes ensayos: movilidad; crecimiento anaerobio; mucoso, a 36 °C, en cloruro de sodio; requerimiento de factores de crecimiento; producción de ácido sulfhídrico a partir de cisteína; reducción de sucrosa; producción de acetoina; reducción de los nitratos; licuación de la gelatina; producción de indolfenilalanina diaminasa; producción de ureasa; pigmento amarillo y pigmento rosado. Además, producción de ácido a partir de los siguientes carbohidratos: L+ arabinosa, lactosa, maltosa, almidón, dextrina, manitol y sorbitol. Se utilizaron los siguientes compuestos orgánicos: citrato, formiato, lactato, tartrato y galacturonato (3), Goto et al (1980); registrada en Fahy y Persley (1983).

5. Reaislamiento:

Se efectuaron a partir de folíolos con lesiones necróticas con halos cloróticos, después de nueve días de haber sido inoculadas las hojas, con el mismo método que los aislamientos.

RESULTADOS

- **Prueba del exudado**

Positiva, con típico aspecto lechoso o de nube blanquecina, saliendo de la lesión.

- **Aislamiento**

El procesamiento de las muestras, a partir de trozos de tejidos de folíolos, dio colonias de bacterias.

- **Pruebas de patogenicidad:**

En las plantas, a los nueve días de su inoculación por pulverización se observaron numerosas manchas necróticas, de borde irregular y 1 - 1,5 mm de diámetro, con halo clorótico de color amarillo claro a su alrededor. También los pecíolos presentaban estrías necróticas de 0,5 a 1 mm. En las plantas inoculadas por medio de inyección con aguja hipodérmica no desarrolló ningún tipo de lesión. Se realizaron observaciones cada seis días a partir de la inicial. A los 30 días los folíolos estaban prácticamente atizonados, abarcando casi todas las hojas y gran parte de los folíolos, produciéndose luego la muerte de las plantas.

- **Caracteres morfológicos y del cultivo**

La bacteria es un bastón Gram negativo, móvil, con flagelos peritricos que no esporula. Longitud promedio: 2,65 μ . Ancho promedio: 0,65 μ . A las 48 horas, las colonias presentaban las siguientes características: circulares en APG, color amarillo crema, consistencia mucosa convexas en el centro y borde ligeramente festoneado. En AN, colonias amarillas. En D-1 agar, colonias amarillas brillantes. En medio Kelman, amarillas pálidas y en CVP, blanco pálido.

- **Propiedades fisiológicas y bioquímicas**

Las bacterias presentaron las siguientes características fenotípicas positivas: microorganismo anaerobio facultativo; desarrollo a 36 °C y en cloruro de sodio requiere factores de crecimiento como formiato, lactato y tartrato. Produce ácido sulfhídrico y ureasa.

En cambio resultaron negativas: reducción de la sucrosa, nitratos, licuación de la gelatina, producción de indol, fenilalanina.

En las tablas siguientes se comparan otros géneros de bacterias con las distintas especies de *Erwinia*.

Características	Coryneb.	Agrob.	Erwinia	Pseudomonas	Xanthom.
Crece s/ medio APG	+	+	+	+	+
Colonias Gram	+	-	-	-	-
Colonias amarillas. naranjas s/NA. YDC. NBY	+	-	- v	-	+
Pigmento fluorescente s/KB	-	-	-	+v	-
Crecimiento anaerobio	-	-	+	-	-
4. o más flagelos peritricos	-	-	+	-	-
Crece en D-1 agar	-	+	-	-	-
Posee pared celular	+	+	+	+	+
Forma	B	B	B	B	B
Crece en medio Kelman s TZC	-	-	+	-	-

v. Variable + o -

B. Bacilo

Características	Amylovora	Saltivora	Salicis	Tracheifila	Nigrifluens	Rubrifaciens	Quercina
Crece en medio M.S.	+	-	-	ND	+	+	+
Hipersens. en tabaco	+	+	-	ND	-	-	-
Decrad. Pectato	-	-	+	-	+	+	+
Medio c/factores de crec.	+	+	-	+	-	-	+
Piom.rosa en YCD	-	-	-	-	-	+	-
Crece a 36 °C	-	-	-	-	+	+	+
Produce SH ₂	-	-	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	+	-	-
Prod. Ac. salicílico	-	-	+	-	+	-	+

Características	amylovora	saltivora	nigrifluens	quercina nv. rubrifaciens	salicis nv. rubrifaciens	tracheifila
Movilidad	+	+	+	+	+	+
Crecimiento anaerobio	W	+	+	+	+	W
Crecimiento Mucos.	+	+	-	+	+	W
Crecimiento a 36° C	-	-	+	+	+	-
2 crecimiento ClNa	+	-	+	+	+	+
R.F.Crecimiento	+	+	-	+	-	-
SH ₂ Cistei	-	-	+	+	+	+
R-sucrosa	+	+	-	+	-	+
L-Gelatin	-	-	-	-	-	-
P. indol.	-	-	-	-	-	-
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-
P. ureasa	-	-	+	-	-	-
Pio. amarilla	-	-	-	-	-	-
Pig. rosada	-	-	-	+	-	-

DISCUSIÓN

Las colonias aisladas de apio presentaban las siguientes características: Gram negativo, móviles, flagelos peritricos, anaeróbicos facultativos, catalasa positiva, desarrollan colonias color amarillo crema en APG, amarillo en YDC y crecen en MS. Se la considera como perteneciente al género *Erwinia*, grupo "amylovora" (3). Lo sorprendente de la bacteria aislada es su mención para nogal, produciendo canchros en la corteza: *Erwinia rubrifaciens* (Wilson et al, 1967) y, a veces, canchros en el floema (Gotuzzo y Domínguez, 1985). Las diferencias observadas en las distintas tablas anteriores señalan la dificultad de determinar exactamente a la especie. Sin embargo: "la desviación de una especie en una o dos pruebas bioquímicas no significa que ella no pertenezca a la misma" (7). Por ello, se considera necesario el conocimiento de otras propiedades, utilizando técnicas diferentes a las empleadas en el presente trabajo: por ejemplo, serología y espectrografía. La *Erwinia* es una bacteria que en el apio, penetra por heridas y aberturas naturales, necesitándose, para que se difunda la enfermedad, temperatura media y humedad relativa altas en la zona de cultivo.

CONCLUSIONES

- * La prueba del exudado, aislamientos, las pruebas de patogenicidad y reaislamientos permiten asegurar que los síntomas observados en apio se deben a una bacteria.
- * Característica del género, demostrada por las técnicas de inoculación utilizadas en invernáculo, es la penetración de la bacteria por aberturas naturales -como los estomas- y por heridas. Factor predisponente que facilita la infección, la humedad relativa del ambiente.
- * Las pruebas realizadas no fueron suficientes para determinar con certeza la especie. Por lo tanto, es indispensable completarlas con otras técnicas de mayor especificidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Buchanam, R. E. y Gibbons, N. E. 1974. Bergery's manual of determinative bacteriology. The William's and Wilkins Co. 8 ed. Baltimore. USA. 1246 pp.
2. Caron, M et al. 1978. Pathogenicity of *E. carotovora* var. *atroseptica* and *E. carotovora* var. *Carotovora* on vegetables in relation to the temperature. Phytoprotection 59(3):142/49.
3. Dye, D. W. 1988. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I The "amylovora" group, New Zeland Journal of Science 12:590-607.
4. Fahy, P. C. y Persley, G. J. 1983. Plant bacterial diseases. Academic Press 2 ed. Sydney. 393 pp.
5. Hidalgo, O. A. 1987. Diagnósis de enfermedades bacterianas en plantas. Curso Internacional sobre Producción y Fiscalización de semilla de papa. Tucumán, Argentina.
6. Riker, A. J. y Riker, R. 1937. Introduction to research on plant diseases. Swift Co.St. Louis.117 pp.
7. Shaad, N.W. 1980. Laboratory guide for indentificación el plant pathogenic bacteria. Am. Phyt. Soc. Minessota 72 pp.
8. Wimalajeewa, D.L.S. 1976. Studies on bacterial soft rot of celery in Victoria. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Hussandry 16:915-920.