



PODREDUMBRE RADICAL BACTERIANA DEL ALCAUCIL EN MENDOZA (ARGENTINA)

ARTICHOKE BACTERIAL IN SOFT-ROT
MENDOZA (ARGENTINA)

José Alfredo Soto
María Carolina Puglia

Originales
Recepción: 28/08/2001
Aceptación: 14/03/2002

RESUMEN

En alcauciles (*Cynara scolymus* L.) de la variedad Bleek cultivados en Coquimbito (Mendoza, Argentina) se observó marcada detención del crecimiento y atraso en la formación de las inflorescencias. Las plantas sanas tenían aprox. 1 m de altura mientras las enfermas no llegaban a 30 cm. Las hojas más externas manifestaban clorosis y leve marchitez con posterior necrosis. Se realizaron aislamientos en APG desarrollándose colonias de aspecto mucoso, sobreelevadas, de color castaño claro. También se sembró en medio Kelman base sin TZ desarrollando colonias de iguales características pero con bordes festoneados típicos del género *Erwinia*. Pruebas bioquímicas y de patogenicidad en invernáculo resultaron positivas. Se identificó a *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *carotovora* Dye, como agente causal de esta podredumbre radical en alcaucil.

ABSTRACT

Artichoke (*Cynara scolymus* L.) crops cv. Bleek from Coquimbito (Mendoza, Argentina) presented a marked delay of the growth and tardiness on inflorescences formation. Healthy crops had 1 m of height while ill ones did not reach 30 cm. The most external leaves showed chlorosis and light wilt with subsequent necrosis. It was made isolations in PGA, where colonies of mucous aspect, over elevated of light brown colour were developed. It was isolated, too in base Kelman media without TZ where colonies of the same above characteristics were developed but they presented festooned borders typical of the *Erwinia* genus. It was made biochemical and pathological tests in greenhouse resulting positives. *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *carotovora* Dye was identified as causal agent of this soft-rot on artichoke.

Palabras clave

alcaucil • *Erwinia* • podredumbre • raíz

Key words

artichoke • bacterial • *Erwinia* • soft-rot

INTRODUCCIÓN

En Mendoza (Argentina) la superficie cultivada con alcaucil (*Cynara scolymus* L.) no supera las 200 ha ubicadas en El Pastal (Las Heras), las cercanías de Lavalle y Coquimbito (Maipú). El suelo de dichas zonas es torrifluente típico con subsuelo

pedregoso y de textura franco arcillosa, donde la permeabilidad está limitada a la profundidad del pedregal. Por lo tanto, toda patología proveniente desde el suelo tiene una alta incidencia en la obtención de alcachofas de buen tamaño y calidad. En marzo del 2000 se registraron altas temperaturas ambientales y abundantes lluvias causando el anegamiento por desborde de los cauces de riego. Una de las parcelas más afectadas -con alcauciles de 6 meses- permaneció anegada durante aprox. 72 horas. A los 15 días, gran cantidad de plantas manifestaba escaso desarrollo con follaje erecto en la parte central, flácido y necrótico en las hojas de mayor edad (fotos 1, 2, y 3).



El tallo y las raíces principales presentaban exteriormente un oscurecimiento y, en cortes transversales y longitudinales de las raíces, en el cilindro central se veía podredumbre blanda gelatinosa, pardo claro brillante, suave al tacto y sin olor extraño que -con el tiempo- tendía a desaparecer o a reabsorberse originando un progresivo ahuecamiento, sin pérdida de consistencia de la parte vascular. Desde el cuello hacia el tallo, los cortes transversales permitieron observar necrosis de vasos. También se constató un elevado número de raíces muertas (fotos 4 y 5). La gravedad de lo observado a campo, la etiología desconocida y la alta incidencia en los costos de producción, motivaron la realización del presente trabajo.

Antecedentes bibliográficos

Las primeras investigaciones sobre enfermedades bacterianas del alcaucil se realizaron en Italia (12). Se mencionó a *Erwinia carotovora* (Jones) Holland como agente causal de la podredumbre radical bacteriana en Italia (4) y a *Erwinia carotovora* en Izmir, Turquía (21). Contradictoriamente se afirmó que la remolacha y el alcaucil eran resistentes a : var. *atroseptica* y var. *carotovora* (3). Posteriormente se estableció que el patógeno penetra por heridas causadas en la raíz durante el laboreo del suelo y luego se trasloca al tallo (15) siendo el agua de riego el vehículo de transporte y diseminación de la bacteria (13). En 1983 se aisló a *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* en Victoria (Australia)(7). Se estimó que el 20 % de las plantas de alcaucil ARA-85-7-10 morían infectadas con *Erwinia* sp. a los 6 meses de transplantadas (14). Se determinó a *Erwinia chrysanthemi* como causante de detención del crecimiento, marchitez y podredumbre del cuello en alcaucil cultivado en California (5). Además, la deficiencia de calcio en el suelo predispone a la planta a una infección con *Erwinia* (8). Las condiciones ambientales, sumadas a la anaerobiosis del suelo y temperaturas de 30 °C, aumentan la vulnerabilidad del tejido vegetal y la capacidad de multiplicación del patógeno. Esta bacteria puede sobrevivir de un año a otro en el residuo de la vegetación espontánea (18). En Mendoza (Argentina) se aisló en 1997 a *Erwinia nigrifluens* provocando seria necrosis de las brácteas de las inflorescencias (20). En Tucumán (Argentina) se ha citado a *Erwinia carotovora* como agente de podredumbre húmeda y daño al sistema vascular en alcaucil (11).

Objetivos

Determinar la etiología de la enfermedad, las condiciones ambientales que favorecen su desarrollo y la severidad del daño ocasionado, sin llegar a un estudio epidemiológico profundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Hipótesis de trabajo

La observación sintomatológica de cortes transversales y longitudinales de tallos y raíces de plantas afectadas, el resultado de los aislamientos y la información bibliográfica disponible fundamentaron la hipótesis de que una bacteria es el agente causal de la podredumbre radical del alcaucil.

II. Aislamientos

Se realizaron a partir del tallo y raíces correspondientes a plantas del origen citado. Para ello se cortaron cubos de tejido de aprox. 5-6 mm de lado que se sembraron en cajas de Petri con Agar Papa Glucosado (APG) al 2 % pH 7 (16). A las 48 horas y con las colonias obtenidas se preparó una suspensión concentrada (blanco lechosa) y se realizó estriado en caja con medio de cultivo Kelman base sin TZ.

III. Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron plantas obtenidas de semilla de la variedad Bleek. Se inocularon plantas de 4-6 hojas verdaderas, cultivadas en macetones dentro de invernáculo a temperatura ambiental de 28 °C como máximo y 50 - 60 % de humedad relativa. El suelo, traído del lugar de origen y esterilizado con bromuro de metilo en la dosis corriente, se mantuvo 26-30 °C, humedad a saturación durante las primeras 72 horas después de la inoculación y en capacidad de campo durante el resto del ensayo.

Para las mediciones de humedad de suelo se empleó el método de bloques de resistencia granular Watermark®. El inóculo se obtuvo de colonias en medio Kelman sin TZ y consistió en una suspensión bacteriana de 10^6 ufc/ml en agua estéril, cuya concentración se determinó por el método de dilución y recuento en placa. La inoculación se realizó provocando heridas sobre el cuello y las raíces principales de las plantas mediante dos procedimientos:

1. Heridas longitudinales superficiales efectuadas con aguja gruesa común introduciendo trocitos de agar con colonias de bacterias que luego se cubrieron con algodón humedecido y cinta engomada.
2. Inyección de 1 cm³ de suspensión bacteriana a 1 cm de profundidad utilizando agujas hipodérmicas.

En ambos casos se realizaron 3 repeticiones de 20 plantas cada una. Los testigos fueron plantas cultivadas en las mismas condiciones y con igual desarrollo que las inoculadas con el patógeno pero insertando trocitos del medio de cultivo sin colonias bacterianas e inyectando agua destilada estéril, respectivamente.

IV. Reaislamientos

Se hicieron a partir de tallos y raíces de las plantas en invernáculo a los 15 días de su inoculación llevando a cabo los mismos procedimientos realizados en los aislamientos.

V. Agente causal

a. Caracteres morfológicos y de cultivo

La morfología celular se observó mediante coloración de Gram, modificada por Hucker (S.A.B., 1957). Los flagelos se tiñeron según Bailey (modificación de Fisher y Conn). La esporulación se determinó en forma indirecta por siembra de una suspensión bacteriana sometida a 80 °C durante 20 minutos en agua de peptona (9). Las características del cultivo se determinaron en APG; el crecimiento mucoso en agar nutritivo con 5 % de sacarosa y la podredumbre en papa (10). Se mantuvieron las cepas bacterianas en heladera a 4 °C, sembradas en tubos pico de flauta en estrías con APG. Otros tubos, conservados a temperatura ambiente, se repicaron respectivamente cada 30 días y cada semana. También se guardaron tiras de papel de filtro estéril, embebidos previamente con suspensión concentrada de bacterias (blanco lechoso), dentro de tubos de vidrio.

b. Propiedades culturales, fisiológicas y bioquímicas

El género se determinó según el método de Schaad (17). Crecimiento en medio APG. Coloración de Gram (17). Desarrollo de colonias amarillas o anaranjadas en agar nutritivo con glucosa (NGA); agar extracto de levadura más CaCO₃ (YDC), agar caldo nutriente extracto de levadura (NBY), pigmentos fluorescentes en medio King et al. B (KB), cristal violeta pectato (CVP) y D-1 agar. Crecimiento anaerobio y aeróbico. Coloración de flagelos. Formación de esporas y micelio aéreo. La diferenciación de la especie dentro del grupo *carotovora* (soft-rot group) se efectuó mediante las siguientes pruebas: degradación de los pectatos, podredumbre blanda en papa, licuación de la gelatina, producción de acetoina, de gas a partir de glucosa, de indol, de pigmento, de ácidos a partir de D-lactosa, maltosa, metil α -d-glucósido, reducción de la sucrosa. Crecimiento a 36-37 °C.

c. Otras propiedades: viabilidad

Después de 7 meses se inocularon plantas en invernáculo con inóculo proveniente de tiras de papel de filtro estéril embebidas previamente en suspensión concentrada de bacterias sembradas en medio Kelman sin TZ.

RESULTADOS

Aislamientos y reisolamientos

Se procesó material de raíces y tallos provenientes de campo e invernáculo. De estos aislamientos se obtuvieron colonias de bacterias con las características descriptas. Los reisolamientos dieron como resultado colonias bacterianas similares a las inoculadas.

Pruebas de patogenicidad

A los 7 días las plantas inoculadas con aguja gruesa común (III 1) no presentaban síntomas. Las inyectadas (III 2) manifestaban podredumbre del cilindro central, como la descrita en la introducción de este artículo. Se llevaron a cabo observaciones semanales para comprobar la evolución de la enfermedad.

- Entre los 7 y 10 días posteriores a la inoculación se observó clorosis de las hojas inferiores y marchitez. Entre los 15 y 20 días, las plantas tenían una marcada marchitez de todas las hojas externas, permaneciendo vivas sólo las del centro, pero con notable clorosis.

- A los 25 días las hojas externas manifestaban necrosis y las internas, clorosis muy marcada.

- En días subsiguientes, las plantas fueron muriendo. Al extraer las mismas del suelo y realizar cortes transversales y longitudinales de las raíces se observó la podredumbre del cilindro central con las mismas características que la de campo (foto 5, pág. 36).

Caracteres morfológicos y de cultivo (tabla 1)

Se realizaron estudios comparativos de las distintas características de las bacterias y su crecimiento en medios de cultivo. El patógeno es un bastón Gram negativo, móvil, flagelos peritricos, largo promedio: 2,65 μ y ancho promedio: 0,65 μ . Observadas las colonias a las 48 horas se detectaron las siguientes características: en APG y Kelman base sin TZ eran circulares, amarillo pálido, consistencia mucosa, convexas en el centro, borde liso o ligeramente ondulado y festoneado, respectivamente.

Tabla 1.

Caracteres	Bacteria problema	Erwinia	Pseudo monas	Xantho monas	Agrobacterium	Clavibacter	Streptomyces
Crecimiento en APG	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en medio Kelman base s/tz	+	+	-	-	-	-	-
Colonias amarillas en NGA, YDC, NBY	-	-	+V	+	-	+	-
Pigmento fluorescente en KB	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento anaerobio	+	+	+	-	-	-	-
Crecimiento aerobio	+	+	-	+	+	+	+
Más de 4 flagelos peritricos	+	+	-	-	-	-	-
Crecimiento en D-agar	-	-	-	-	+	-	-
Coloración de Gram	-	-	-	-	-	+	+
Formación de esporas	-	-	-	-	-	-	-
Micelio aéreo	-	-	-	-	-	-	+

+: 80 % o más de razas positivas
-: 20 % o menos de razas positivas

v: variable
*: no determinada

También hubo desarrollo en medio aeróbico como anaerobio. No se desarrolla en D-1 Agar. No forma colonias amarillas en NGA, YDC y NBY. No posee pigmentos fluorescentes, esporas y micelio aéreo.

Propiedades culturales, fisiológicas y bioquímicas (tabla 2)

La comparación de las características fenotípicas del patógeno investigado con las distintas especies patógenas de *Erwinia* dio los siguientes resultados: microorganismo anaeróbico facultativo, desarrolla a 36-37 °C, produce la degradación de los pectatos; inoculado en tubérculos de papa se desarrolla produciendo una podredumbre blanda (aspecto y textura de puré), sin olor; licua la gelatina, produce acetoina y ácidos a partir de D-lactosa, melobiosa y celobiosa. Resultaron negativas: la producción de gas a partir de glucosa, producción de indol y pigmento. La comparación de las pruebas realizadas permite establecer con certeza que la cepa aislada se asemeja a *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

Tabla 2.

Test	Erwinia problema	E. carotovora subsp.			E. chrysanthemi	E. cypripedii	E. rhapontici
		Carotovora	Atroseptica	Betavasculorum			
Degradación pectatos	+	+	+	+	+	-	-
Soft-rot papa	+	+	+	+	+	-	W
Licua gelatina	+	+	+	+	V	-	-
Acetoina	+	+	+	+	+	-	+
Gas a partir de glucosa	*	-	-	-	V	+	-
Indol	-	-	-	-	V	-	-
Pigmento	-	-	-	-	V	-	+
Producción de ácidos							
D-lactosa	+	+	+	+	V	-	+
D-Maltosa	*	-	V	+	-	V	+
Metil α -d glucósido	*	-	+	+	-	-	V
Melobiosa	+						
Celobiosa	+						
Reducción sucrosa	*	-	V	+	V	-	V
Crecimiento a 36 - 37 °C	+	+	-	+	+	+	V

+: 80 % o más de razas positivas

-: 20 % o menos de razas positivas

w: reacción en trigo

*: no determinada

v: variable

Otras propiedades: viabilidad

A los 8 meses se aislaron colonias de bacterias de características semejantes a las originalmente inoculadas.

DISCUSIÓN

Las colonias aisladas del alcaucil traído desde el campo y del inoculado en invernáculo presentaban las siguientes características: Gram negativas, móviles, flagelos peritricos, anaerobias facultativas, de color amarillo crema brillante en APG y crema pálido brillante en Kelman sin TZ.

A pesar de la diversidad de criterios existentes entre los diversos autores que han estudiado las características fenotípicas de esta bacteria, se han llevado a cabo 20 observaciones con el objeto de analizar las propiedades fisiológicas, bioquímicas y de cultivo (2, 6, 17). Las pruebas realizadas con las colonias aisladas desde el alcaucil traído de campo, como de las plantas cultivadas en invernáculo, permiten considerar como perteneciente al género *Erwinia* (Winslow et al.) y a la especie *carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Dye, grupo *carotovora* o soft-rot (6).

E. carotovora subsp. *carotovora* es una bacteria que produce la desintegración de los tejidos (podredumbre blanda) y necrosis vascular de los órganos infectados (1). Se mencionan a *E. carotovora* como un microorganismo que ataca tejidos blandos, succulento de numerosas plantas (19). No se le conoce especificidad por un hospedante en particular y con frecuencia se presenta como contaminante o patógeno secundario de muchas especies cultivadas. Cuando las condiciones ambientales son favorables, se multiplica rápido y produce los típicos síntomas de podredumbre. La presencia de agua condensada sobre la superficie de los tejidos es reconocida como un factor desencadenante de los procesos patogénicos de esta bacteria.

La sintomatología observada a campo es la misma que se reprodujo en las pruebas de patogenicidad. De repetirse las condiciones favorables, que no necesariamente deben ser una inundación del suelo por lluvias estivales o desborde de cauces de riego, sino también un mal manejo del agua de riego, un mal trazado de las pendientes o el uso intensivo de este suelo ya contaminado, puede ocasionar daño a los cultivos de distintas especies en el futuro. También se debe tener en cuenta que se trata de una bacteria que persiste poco tiempo viable en el suelo pero su mayor supervivencia depende de temperaturas frescas y suficiente humedad. Es muy probable que el patógeno no sea endémico en el suelo y que la reinfestación ocurra con uso intensivo del mismo. Otro factor es el laboreo del suelo que siempre ocasiona corte de raíces provocando las heridas que son puerta de entrada para la bacteria.

CONCLUSIONES

- * Los resultados obtenidos en los aislamientos, reaislamientos y pruebas de patogenicidad permiten asegurar que los síntomas observados en el alcaucil son producidos por una bacteria. Por lo tanto, la hipótesis de trabajo es verdadera.
- * La técnica de inoculación por heridas demuestra que éstas son las puertas de entrada en el huésped.
- * Las condiciones meteorológicas y de suelo son predisponentes para la infección.
- * Se trata de un patógeno resistente a la desecación "in vitro" y con una viabilidad "in vivo" de ocho meses o más.
- * De acuerdo con lo expuesto, la bacteria aislada del alcaucil es *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute. Kew. UK. 332 pp.
2. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 1974. Bergey's manual of determinative Bacteriology. William's & Wilkins Co. Baltimore. USA. 1246 pp.
3. Caron, M. et al. 1978. Pathogenicity of *Erwinia carotovora*: var. *atroseptica* and var. *carotovora*, on different vegetables in relation to the temperature. Phytoprotection. Vol. 59. 3: 142-149.
4. Cicarrone, A. 1967. Attuali cognizione sulle malattie del carciofo. Atti 1° Congr. Intern. Studi sul carciofo. pp. 181-192.
5. Colbert, S. et al. 1990. Two new pathogens of artichoke in California. Phytopathology Abstracts. Vol. 80. 9: 887.
6. Dye, D. W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. The *carotovora* group. New Zealand Journal of Science N° 12. 81-97.
7. Fahy, P. C. and Persley, G. J. 1983. Plant bacterial diseases. Academic Press. Sydney. Australia. 393 pp.
8. François, L. E. et al. 1991. Calcium deficiency of artichoke buds in relation to salinity. Hort. Science. Vol. 26. 5: 549 - 553.
9. Gotuzzo, E. A. de y Domínguez, A. G. de. 1982. Cancro bacteriano del nogal (*Juglans regia* L.). Sintomatología y características del agente causal. 2° Congr. Latinoam. Fitopatol. Bs. As. pp. 80-96.
10. Hidalgo, O. A. 1987. Diagnósis de enfermedades bacterianas en plantas. Curso sobre semilla de papa. Tucumán. Argentina.
11. Jayat, A. et al. 1999. Enfermedades del alcaucil (*Cynara scolymus* L.) en Tucumán. X Jorn. Fitos. Arg. Jujuy . p.57.
12. Marras, F. 1966. Marciume radicale del carciofo (*Cynara scolymus* L.) e cardo (*Cynara carunculus* L.) causato da *Pectobacterium carotovorum* (Jones) Waldee in Sardegna. Atti 1° Congr. Unione Fitop. Medit. pp. 160-167.
13. Marras, F. et al. 1985. La difesa del carciofo dalle malattie crittogamiche. Informatore Fitopatologico. 9: 19-24.
14. Maynard, D. N. and Howe, T. K. 1987. Evaluation of specialty crops for production in W. Central Florida. Proceed. Flo. St. Hort. Soc. 99: 293-300.
15. Perombelon, M. C. and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft-rot erwinias. Ann. Rev. Phytopathol. 18: 361-387.
16. Riker, A. J. and Riker, R. S. 1963. Introduction to research of Plant diseases. J. S. Swift. St. Louis. USA. 117 pp.
17. Schaad, N. W. 1990. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS. St. Paul. USA. 157 pp.
18. Scortichini, M. 1991. Alcune batteriosi pericolose per l'orticoltura Laziale. L'Informatore Agrario. Vol. 47. 42: 63-66.
19. Smith, I. M. et al. 1992. Manual de enfermedades de plantas. Mundi Prensa. Madrid, España. 671 pp.
20. Soto, J. A. (1997). Necrosis violeta del alcaucil: *Erwinia nigrifluens* . Rev. Fac. C. Agr. UNCuyo. Tomo XXIX. N° 1. pp. 43-55.
21. Turkmenoglu, Z. et al. 1973. Preliminary work on globe artichoke bacterial disease (*Erwinia carotovora*) in the Izmir region. Plant Protection Research Annual N° 7. 200 pp.