

NUEVA ENFERMEDAD DE LA CEBOLLA CAUSADA POR *Pseudomonas syringae* Van Hall: OCURRENCIA, IDENTIFICACION Y PATOGENIA

Diego C. Maeso*

RESUMEN

Ante la aparición de la sintomatología de una nueva enfermedad para el cultivo de la cebolla en Uruguay, la cual se describe aquí, se realizó la determinación del agente causal de esa enfermedad y pruebas de patogenicidad en diferentes condiciones y metodología.

Los resultados de las pruebas de laboratorio permitieron establecer que el patógeno pertenecería al grupo de *P. syringae*. El estudio de su patogenicidad confirmó datos prácticos de campo en cuanto a factores ambientales y de cultivo predisponentes para la enfermedad.

SUMMARY

Due to the appearance of a new symptomatology for the onion crop in Uruguay, which is described here, it was determined causal agent and it were performed pathogenicity tests in different ways and methodology.

Laboratory tests results let us know that the pathogen belongs to the *P. syringae* group. Pathogenicity tests confirm field observations on environmental conditions and facts that increase crop susceptibility.

INTRODUCCION

El cultivo de cebollas para bulbo seco en Uruguay ocupa 2.977 ha, con un rendimiento promedio de 6.022 kg/ha, encontrándose entre las principales hor-

talizas por su área sembrada y número de predios que la cultivan (12).

Recientemente en cultivos de la zona sur del país ya sea tanto para la producción de semilla como de bulbo, se han observado pérdidas que, de acuerdo con su sintomatología, podrían atribuirse a enfermedades producidas por bacterias (1). El mismo problema ha

* Técnico (Ing. Agr.) Proyecto Protección Vegetal. Estación Experimental Granjera Las Brujas.

sido detectado también en la zona cebollera cercana a la ciudad de Salto*.

Las plantas hacia el final de su ciclo se presentan marchitas, con sus hojas decoloradas (principalmente las internas) que se desprenden fácilmente del bulbo, tomando su base una consistencia algo gelatinosa. Los bulbos de este tipo de plantas poseen una podredumbre oscura no fermentativa de tipo vascular en el "falso cuello" y parte media. Esa podredumbre puede observarse en almacenamiento, pero se da fundamentalmente en los días inmediatos a la cosecha, siendo luego otros los causantes de podredumbres en almacenamiento. En ningún momento los bulbos afectados presentan el olor característico de la podredumbre blanda causada por *Erwinia* spp.

A partir de muestras colectadas de ensayos en la Estación Experimental Granjera "Las Brujas", del cultivar Valenciana sintética 14, en 1982, se pudo establecer en primera instancia que no se trataban de los daños causados por *Erwinia* spp., sino que el organismo causal correpondería al género *Pseudomonas*.

Koch *et al.* (10) reportan la existencia de varias especies de ese género en el Uruguay atacando diversos cultivos.

Inaba, García y Lasa (6) en un relevamiento de las áreas productoras de cebollas del sur de Uruguay señalan la ocurrencia de *P. syringae* Van Hall.

En Brasil, Luzziardi (7, 11) reporta, para el estado de Río Grande del Sur, a *P. marginalis* (Brown) Stevens como agente causal de una enfermedad de síntomas muy similares a los observados en Uruguay, que ocasiona pérdidas cercanas al 30% de la producción de cebollas en cada zafra.

A nivel mundial se citan también a: *P. allii* (Burk) Starr & Burk (2, 16, 19, 20, 21), *P. cepacia* Burk (2, 15, 19, 20, 21), *P. marginalis* (Brown) Stevens (3, 15, 17), *P. cichorii* (Swin.) Stapp (15), *P. fluorescens* (Flügge) Migula (15) y *P. polycolor* Clara (15) como causantes de daños en el cultivo de la cebolla.

Los objetivos de este trabajo fueron:

- 1) determinar el organismo causal de esta enfermedad que produjo pérdidas de gravedad en la temporada de 1982;
- 2) lograr cierto conocimiento de la relación entre el organismo causal y los factores de predisposición tanto del huésped como ambientales, mediante observaciones de campo y en pruebas de inoculación.

MATERIALES Y METODOS

I. Determinación del organismo causal

Luego de aplicar los postulados de Koch a los aislamientos logrados a partir de las muestras procesadas, se estudiaron los aspectos más importantes tendientes a la determinación del género y especie de la bacteria en cuestión.

a) Crecimiento en medios de cultivo semisintéticos. Se cultivó a la bacteria en agar nutriente y agar papa dextrosa observándose: elevación, forma, tipo de borde, color y consistencia de las colonias desarrolladas. Además, se registró el tipo y la velocidad de crecimiento en esos medios.

b) Reacción de Gram y observación al microscopio óptico. La reacción de Gram se llevó a cabo siguiendo el método rápido de tinción citado por French (4) y el método de Ryu (13). Además se tomaron datos de forma y dimensiones al microscopio óptico con 1.500 aumentos, usando un micrómetro ocular.

c) Número y posición de los flagelos. Fueron determinados por observación al microscopio electrónico

de colonias jóvenes, usando los métodos de tinción negativa y de sombreado.

d) Producción de ácido y/o gas a partir de glucosa. Para esta prueba se empleó el medio de Hugh - Leifson (13), creándose anaerobiosis en los tubos mediante una capa de parafina líquida estéril y también se utilizaron los Oxi/Ferm Tubes Roche®.

e) Crecimiento a 40 °C. Se cultivó en medio Nishiyama sin la adición de agar (papa-peptona-glucosa) (12) incubándose por tres días en un baño con temperatura controlada, al cabo de los cuales se evaluó la existencia o no de crecimiento bacteriano.

f) Actividad de la oxidasa. Para ponerla en evidencia se puso en contacto (en condiciones de asepsia) una porción de la colonia bacteriana problema, con un trozo de papel de filtro estéril mojado con una solución al 1% de dihidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina.

g) Actividad de la hidrolasa de la arginina.

h) Producción de ácido sulfhídrico e indol.

i) Ureasa.

j) Producción de sales a partir de ácido cítrico.

k) Producción de N₂.

l) Xilosa.

Estas reacciones fueron realizadas usando la serie de medios apropiados provistos por los "Oxi/Ferm Tubes Roche®", incubando a 37 °C durante cuatro días.

II. Pruebas de patogenicidad

Se llevaron a cabo con tres tipos de estado del huésped: plantín, planta nacida de bulbo y bulbo. En todos los casos se usó el cultivar "Valenciana sintética 14".

La inoculación se realizó de tres formas:

- 1) haciendo un orificio con una aguja estéril a través de una gota de suspensión en la zona del "falso cuello" de la planta o bulbo (zona superior del bulbo);
- 2) sujetando un algodón impregnado en suspensión bacteriana sin realizar heridas en las capas externas del huésped;
- 3) riegos con suspensiones de la bacteria a los plantines y plantas nacidas de bulbo, sin herir las plantas.

Cada prueba constaba de 10 repeticiones. Las suspensiones bacterianas utilizadas tenían una concentración entre 10⁶ y 10⁹ células/mililitro, medida por dilución en placas.

Las plantas y los bulbos luego de inocularlos se mantuvieron a 100% de humedad cubriéndolos con bolsas de nylon y agregando agua periódicamente, por cinco días. Se colocaron en un invernáculo calefactado a 20-25 °C (temperaturas extremas: 12-30 °C). A la semana de la inoculación se evaluó la presencia o no de la enfermedad en los diferentes tratamientos.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se presenta un resumen de los resultados de las pruebas de laboratorio.

Las colonias desarrolladas en agar nutriente y en agar papa dextrosa eran de forma circular, con bordes enteros, color blanco perlado, con el centro más elevado que el resto, lisas y de consistencia mucosa. Crecían abundantemente en estos medios.

Observado al microscopio óptico, el organismo causal era un bacilo gramnegativo (según ambas metodologías empleadas) variando sus dimensiones entre 0,5-1 × 1-3 μ, siendo esta última medición de relativa

* Bernal, R. 1983. Comunicación personal.

Cuadro 1. Resumen de los resultados de las pruebas efectuadas con la bacteria problema comparados con algunas de las especies citadas para cebolla.

Prueba	Bacteria problema	<i>P. syringae</i> (3, 5, 8, 13)	<i>P. marginalis</i> (3, 5, 8, 13)
Número de flagelos	4	>1	1-3
Dextrosa			
en condiciones aeróbicas	+/-	+	+
en condiciones anaeróbicas	-	-	-
Crecimiento a 40 °C	-	-	-
Oxidasa	-	-	+
Arginina	-	-	+
H ₂ S	-	-	-
Indol	-	-	-
Ureasa	+	SI	SI
Citrato	-	+	-
Producción de N ₂	-	-	SI
Xilosa	+	+	+

+: reacción positiva en el 90% de los casos.

+/-: reacción positiva en el 50% de los casos.

-: reacción negativa en el 90% de los casos.

SI: sin información.

exactitud al no seguirse todas las normas usuales para su determinación.

La ubicación de los flagelos era polar y en número de cuatro, ubicándose dos en cada extremo.

No se produjo fermentación de la glucosa en medio anaeróbico en los dos métodos empleados.

No hubo crecimiento alguno luego de tres días de incubación a 40 °C.

La colonia bacteriana no cambió su color luego de 30 segundos de exposición al dihidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina, indicando la no actividad de la oxidasa.

No se produjo la conversión anaeróbica de la arginina. Tampoco hubo producción de ácido sulfhídrico e indol, indicando que el organismo en cuestión es incapaz de degradar aminoácidos sulfurados y triptófano, o sea que no podría descomponer proteínas por un proceso de putrefacción.

El medio de cultivo usado para determinar ureasa tomó una coloración rosada-brillante, indicando la presencia de esta enzima.

No se produjo cambio alguno en los medios utilizados para citrato y N₂ luego de cuatro días de incubación a 37 °C.

El color del medio con xilosa varió al amarillo, poniendo de manifiesto la producción de ácido a partir de ese azúcar.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad aparecen en el cuadro 2; allí se observa que los valores mayores de infecciones se obtienen inoculando con heridas y que los bulbos y las plantas nacidas de bulbo son más susceptibles que los plantines.

Cuadro 2. Porcentaje de plantas y bulbos afectados en pruebas de patogenicidad con la bacteria problema.

Estado del huésped	Método de inoculación		
	(1) con herida	(2) sin herida	(3) riego con suspensión bacteriana
1. Plantines	10	0	0
2. Plantas crecidas de bulbo	60	0	0
3. Bulbos	70	0	-

DISCUSION

Los resultados obtenidos en las pruebas fisiológicas coincidirían fundamentalmente, salvo algunas ex-

cepciones con los descriptos para *P. syringae* (3, 5, 8, 13, 14, ver cuadro 1). En ese sentido son de importancia las reacciones negativas a la presencia de arginina-dehidrolasa y oxidasa. En cambio, la apariencia de la colonia y la formación de álcalis a partir de ácido cítrico se asemeja al comportamiento de *P. marginalis*.

Es importante destacar la posición existente en cuanto a la taxonomía de las *Pseudomonas* fitopatógenas, considerando que muchas de las especies citadas en la bibliografía serían abarcadas como *P. syringae* de acuerdo con su comportamiento similar en el laboratorio, y diferenciándose sólo por su rango de huéspedes (5), creándose incluso el grupo *syringae* con un comportamiento homogéneo, el cual reuniría a las *Pseudomonas* fluorescentes fitopatógenas (8).

Por lo anterior se desprende que con los resultados obtenidos se puede decir que el organismo analizado correspondería a la especie *P. syringae* en su sentido global, existiendo un alto grado de similitud en los resultados de las pruebas de laboratorio que permite sostener que también corresponde a esa denominación según el otro criterio taxonómico.

En cuanto al estudio de la patogenia, es claro el efecto favorable de las heridas en el desarrollo de esta enfermedad, lo cual coincide con lo citado por Kawamoto y Lorbeer (9).

Este aspecto explicaría su aparición en un cultivo luego de haber sufrido éste los efectos del granizo.

Otro punto a destacar es la posible susceptibilidad del bulbo ya sea como parte de la planta o luego de ser cosechado, ya que los valores más altos de infección en la inoculación se obtuvieron cuando ésta se hizo a bulbos o en la zona del falso cuello en plantas que los poseían. En cambio, esos porcentajes de infección no se lograron con plantines. Esto estaría relacionado con observaciones prácticas de campo que indican que la incidencia de esta enfermedad es próxima a la cosecha en cultivos para la producción de bulbos y durante todo el ciclo en cultivos para la producción de semillas. Según Kawamoto y Lorbeer (9), esto se debería en parte a que el patógeno para desarrollarse necesita de zonas embebidas en agua, lo cual ocurriría en la zona del vegetal que se encuentra a nivel del suelo en plantas adultas con hojas bien desarrolladas, que reciben el agua que escurre del follaje, provocando un mayor porcentaje de humedad en esa zona.

La ocurrencia de esta enfermedad en la temporada de producción estudiada confirma los efectos favorables de la alta humedad atmosférica y las frecuentes precipitaciones citadas por la bibliografía para enfermedades muy similares (9).

La fertilización con altas cantidades de nitrógeno también estaría favoreciendo esta enfermedad ya que varias de las muestras colectadas provenían de un cultivo fertilizado con 225 unidades de nitrógeno por hectárea, lo cual coincidiría con las observaciones de Luzziardi* (11).

CONCLUSIONES

Según los resultados de las pruebas de laboratorio y comparándolos con la bibliografía, la especie en cuestión pertenecería al grupo de *P. syringae* coincidiendo con el diagnóstico preliminar de Inaba, García y Lasa (6).

La enfermedad causada por este patógeno hasta el momento ha sido del tipo esporádico y condicionada a factores predisponentes como ser ambientales (alta humedad relativa, lluvias), de estado del cultivo (no ataca plantines ni plantas jóvenes), fertilizaciones elevadas con nitrógeno y heridas producidas por granizo, maquinaria, etcétera.

Sin embargo, no debe subestimarse su incidencia

* Luzziardi, G. C. 1982. Comunicación personal.

ya que se desconocen datos de permanencia en el terreno, pudiéndose además producir cambios en su agresividad. Por ello, en vista de los datos aquí expuestos se deberían evitar aquellos factores que aumentan la susceptibilidad del cultivo a esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS "ALBERTO BOERGER". 1983. Informe de Progreso 1982-3, p. 261. (Circulación interna.)
2. CHUPP, C. y SHERF, A. 1960. Vegetable diseases and their control. Nueva York, The Ronald Press Company, 693 pp.
3. FERNANDEZ VALIELA, M. V. 1975. Introducción a la fitopatología. 3a. ed., Buenos Aires. Colección científica del INTA, Tomo VII, Volumen II. Bacterias, fisiogénicas, fungicidas, nematodos. 822 p.
4. FRENCH, E. R. y HEBERT, T. T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 289 p.
5. HOLT, J. G. 1977. The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology. 8a. ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 356 p.
6. INABA, T., GARCIA, S. y LASA, C. 1980. Enfermedades de los vegetales encontradas en Uruguay. Agosto a noviembre de 1980. Informe interno. Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger", Ministerio de Agricultura y Pesca, 7 p.
7. ISOLADA BACTERIA que ataca a cebolla. 1982. Correo do Povo, Pelotas, Brasil, Octubre 22.
8. KADO, C. I. 1971. Methods in plant bacteriology. Department of Plant Bacteriology, University of California, Davis, 71 p. (mimeografiado).
9. KAWAMOTO, S. O. y LORBEER, J. W. 1974. Infection of onion leaves by *Pseudomonas cepacia*. Phytopathology, 64 (11): 1440-1445.
10. KOCH de BROTONS, L. et al. 1981. Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprófitas en el Uruguay. Ministerio de Agricultura y Pesca, Dirección General de Servicios Agronómicos, Dirección de Sanidad Vegetal, Informe Técnico No. 9, 140 p.
11. LUZZIARDI, G. C. Nova doença bacteriana da cebola para a Estado do Rio Grande do Sul. In Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Itabuna, Bahia.
12. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA. 1983. Censo General Agropecuario 1980. Montevideo, Uruguay, 242 p.
13. NISHIYAMA, K. 1978. Rapid method for identification of plant pathogenic bacteria, 12 p.
14. RITCHIE, D., WELLER, D. y WHITE, J. 1975. Isolation and identification of plant pathogenic bacteria. Michigan State University, Department of Botany and Plant Pathology (P. Irr.) (mimeografiado).
15. ROBBS, C. F., AKIBA, F. y SUDO, S. 1969. Bacterias patogénicas à cultura e armazenagen da cebola (*Allium cepa* L.) no Brasil. Río de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2 p. Trabajo presentado en la IX Reunión de la Sociedad de Olericultura do Brasil, Goiana. In Cebola: Resumos Informativos Volume 1. EMBRAPA, Brasília, 1980, 313 p.
16. ----- y KIMURA, O. 1977. Uma bacteriose da cebola (*Allium cepa* L.) armazenada, nova para o Brasil. Río de Janeiro, Universidad Federal do Rio de Janeiro, 2 p. In Anais do XVII Congresso da Sociedade de Olericultura do Brasil, Juazeiro/Petrolina, p. 53.
17. -----, KIMURA, O. y AKIBA, F. 1980. Duas enfermidades bacterianas de cebola, novas para o Brasil. Fitopatologia brasileira, Brasília, 2 (1): 100-1, fev. 1977. In Cebola: Resumos Informativos. Volume 1, EMBRAPA, Brasília, 313 p.
18. -----, Doenças da cebola e meios de controle. B. Campo, Río de Janeiro, 17 (148): 7-18, nov. 1961. In Cebola: Resumos Informativos, Volume 1, EMBRAPA, Brasília, 313 p.
19. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 1960. Index of Plant Diseases in the United States. Agriculture Handbook No. 165, 531 p.
20. WALKER, J. C. 1952. Diseases of vegetable crops. Nueva York, McGraw-Hill Book Company Inc., 529 p.
21. WESTCOTT, C. Plant disease handbook. 3a. ed., Nueva York, Van Nostrand Reinhold Company, 843 p.