

***Pseudomonas viridiflava* (BURKHOLDER) DOWSON: AGENTE CAUSAL DE MANCHAS NECRÓTICAS EN HOJAS DE CEBOLLA Y AJO (*Allium* spp.) EN URUGUAY**

Pérez Faggiani E.¹, Silvera Pérez E.¹; Gepp Ward V.¹

Recibido: 22/10/04 Aceptado: 29/12/04

RESUMEN

Manchas y estrías amarillentas fueron observadas en hojas de cultivos de ajo y cebolla instalados en predios de la zona hortícola del sur de Uruguay. Se aislaron bacterias de las hojas afectadas de ambas especies, las que fueron identificadas como *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson mediante el uso de técnicas bioquímicas tradicionales. Ambos aislamientos se inocularon en plantas y bulbos de ajo y cebolla en condiciones controladas, produciendo síntomas similares en ambas especies. Este trabajo representa la primera comunicación científica referente a *P. viridiflava* como causante de enfermedad en ajo en condiciones de producción.

PALABRAS CLAVE: bacterias fitopatógenas, liliáceas, *Pseudomonas viridiflava*.

SUMMARY

***Pseudomonas viridiflava* (BURKHOLDER) DOWSON: CAUSAL AGENT OF NECROTIC SPOTS ON ONION AND GARLIC (*Allium* spp.) LEAVES IN URUGUAY**

Yellowish steaks were observed affecting garlic and onion leaves in farms located in the horticultural area in southern Uruguay. Bacteria isolated from symptomatic leaves of both crops were identified as *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson using traditional biochemical techniques. Both isolates were used to inoculate leaves and bulbs of garlic and onion in controlled conditions, and produced similar symptoms in both species. This is the first report of *P. viridiflava* causing disease in garlic crops in the field.

KEY WORDS: plant pathogenic bacteria, Liliaceae, *Pseudomonas viridiflava*.

INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.) y el ajo (*Allium sativum* L.) son especies muy difundidas en la producción hortícola de Uruguay. El área cultivada varía entre años, dependiendo de la expectativa económica que presenten los rubros. La producción se concentra principalmente en el sur del país y según datos de la última encuesta hortícola realizada por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), en 1999 se sembraron 1980 ha de cebolla y

376 ha de ajo, representando respectivamente, 2328 y 707 productores en estos rubros.

Las enfermedades más frecuentes en cebolla son producidas por *Peronospora destructor* (mildiu), *Botrytis* spp. (moho gris), *Alternaria porri* (alternaria) y *Sclerotium cepivorum* (podredumbre blanca) y en ajo por *Puccinia alli* (roya) y *Sclerotium rolfsii* (pudrición blanca). En la primavera del año 1998 se observó en hojas adultas de ambos cultivos estrías amarillas, alargadas, que llegaban a abarcar un 50% del ancho de la hoja. En ajo las estrías se

¹Unidad de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Garzón 780. CP. 12900. Montevideo. Uruguay.

ubicaban generalmente sobre la nervadura central, frecuentemente en la zona media de la hoja, donde ésta se dobla hacia abajo. Estas estrias fueron asociadas a la presencia de *Pseudomonas* fluorescentes biotipo II (Pagani, com. pers.). En el caso de cebolla, asociado a las manchas amarillas se observaron esporangios y esporangióforos de *Peronospora destructor*, pero el síntoma no presentaba las características típicas del mildiu, lo que llevó a pensar que el agente causal era otro.

Síntomas similares a los descriptos arriba se han asociado con la presencia de diferentes especies del género *Pseudomonas*: *P. syringae* pv. *porri* (Lelliot & Stead, 1987), *P. syringae* pv. *syringae* (Lelliot & Stead, 1987) en ajo y cebolla y *P. viridiflava* (Burkholder) Dowson en cebolla (Gitaitis *et al.* 1991). En Uruguay no fueron encontrados antecedentes sobre cual/es de estas especies están presentes en el país y si la misma especie afecta ambas liliáceas.

El objetivo del presente trabajo fue identificar hasta el nivel de especie aislamientos de *Pseudomonas* fluorescentes obtenidos de ajo y de cebolla, comprobar su capacidad para producir los síntomas descritos y estudiar la patogenicidad en forma cruzada de los aislamientos obtenidos en ajo y cebolla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación

Los aislamientos se obtuvieron de muestras de hojas de ajo colorado y de cebolla sintética 14 ingresados a la Clínica de Diagnóstico de la Unidad de Fitopatología de la Facultad de Agronomía - Universidad de la República.

Cada especie botánica fue procesada separadamente. Trozos de hojas con síntomas fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio 1% durante 1 minuto y enjuagados seis veces con agua estéril. Se maceraron las muestras con agua estéril, en mortero previamente esterilizado y alícuotas del macerado se sembraron por el método de estrias en placas de Petri con agar nutritivo (2,8% p/v) con dextrosa (1% p/v) (Lelliot & Stead, 1987). Las colonias obtenidas se analizaron según sus características morfológicas y se repicaron a placas con medio "B de King" (Lelliot & Stead, 1987) y a tubos con medio Hugh and Leifson (Lelliot & Stead, 1987). Las colonias con características típicas del género *Pseudomonas*: Gram negativas, oxidativas y que produjeron pigmentos fluorescentes en medio "B de King" se repicaron a tubos roscados con agar nutritivo dextrosa y se conservaron a 4° C. Como control positivo para la fluorescencia se utilizó un aislamiento previamente caracterizado de *Pseudomonas* fluorescente.

La identificación de los aislamientos se realizó utilizando el esquema LOPAT (Lelliot *et al.*, 1966) que se basa en las siguientes pruebas: convexidad de las colonias en sucrosa nutriente agar; reacción oxidasa, pudrición de tubérculos de papa o liquefacción de pectatos, arginina dihidrolasa, producción de 2-keto gluconato, reacción en medio yema de huevo, reducción de nitrato y producción de ácido a partir de sacarosa. Las pruebas: reacción oxidasa, liquefacción de pectatos, arginina dihidrolasa y reducción de nitratos fueron realizadas según pruebas bioquímicas API 20NE, el resto de las pruebas fueron realizadas según Lelliot & Stead (1987).

Prueba de patogenicidad

Para confirmar la patogenicidad se realizaron pruebas de hipersensibilidad en tabaco y de patogenicidad en ambas especies en estudio.

La prueba de hipersensibilidad en tabaco y la prueba de patogenicidad en plantas de ajo y cebolla se realizaron inyectando en hojas verdaderas 100 µL de una suspensión de bacterias en agua estéril, ajustada a 1x10⁶ UFC/mL. Los testigos fueron plantas inoculadas con la misma cantidad de agua destilada estéril y plantas sin inocular. Las plantas se mantuvieron en invernáculo hasta la aparición de los síntomas. Posteriormente de las plantas de ajo y cebolla se reaislaron las bacterias desde la zona de avance y se procedió a la identificación de los aislamientos.

Los bulbos de cebolla y dientes de ajo fueron desinfectados superficialmente con alcohol 70% e hipoclorito de sodio 1%. Tres trozos de aproximadamente 0,5 cm de grosor de cada órgano botánico fueron colocados en placas de Petri, sobre porta objetos estériles apoyados sobre papel de filtro humedecido con agua estéril. Cada trozo fue inoculado, estriando sobre el mismo el contenido de un ansa de 10 µL. Como testigo negativo, un trozo fue inoculado con agua estéril de forma similar a la descrita previamente.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación del patógeno

En medio agar nutritivo dextrosa se observaron a las 48 horas de crecimiento, colonias achatadas, de aproximadamente 1 mm de diámetro, coloración crema-amarillenta y exuberante mucosidad que en medio "B de King" produjeron pigmentos fluorescentes.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se presentan en el Cuadro 1 y de acuerdo al esquema patrón LOPAT la única bacteria que presenta estas características es *Pseudomonas viridiflava*.

Cuadro 1. Resultado del esquema de LOPAT para la caracterización de *Pseudomonas fluorescentes*.

	Bacteria aislada	<i>P. viridiflava</i> *
Colonias convexas en medio NDA	-	-
Reacción oxidasa	-	-
Liquefacción de pectatos	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-
Reducción de Nitratos	-	-
Producción de 2-keto gluconato	-	-
Reacción en yema de huevo	-	-
Producción de ácido a partir de sacarosa	-	-

* (Lelliot *et al.*, 1966).

Prueba de patogenicidad

La reacción de hipersensibilidad en tabaco fue positiva para los aislamientos de ajo y de cebolla, lo que confirma su fitopatogenicidad.

En bulbos de cebolla y dientes de ajo (Fig. 1) ambos aislamientos provocaron una pudrición relativamente firme, de color marrón rojizo, con crecimiento mucoso en la superficie cortada, no existiendo diferencias en los síntomas para la misma especie botánica según el origen de los aislamientos.

En hojas de plantas de ajo inoculadas se observaron los mismos síntomas que a campo (Fig. 2) y no hubo diferencias entre las plantas inoculadas con la bacteria aislada de ajo y la aislada de cebolla.

DISCUSIÓN

A pesar de que no se encontraron antecedentes que manifiesten la presencia de *P. viridiflava* en Uruguay, los datos obtenidos concuerdan con reportes realizados en otros países. *P. viridiflava* fue reportada en Estados Unidos por primera vez afectando cebolla dulce en 1991 (Gitaitis *et al.* 1991). Por otra parte, se mostró que bajo condiciones controladas esta bacteria era capaz de infectar plantas de ajo inoculadas artificialmente (Wright & Grant, 1998). Si bien hasta el presente, no se había detectado que afectara a este cultivo en condiciones de producción (Gitaitis, com. pers. 2004) en el presente trabajo fue posible poner en evidencia su participación como orga-



Figura 1. Crecimiento mucoso marrón rojizo, en la superficie cortada de diente de ajo inoculado con la bacteria.

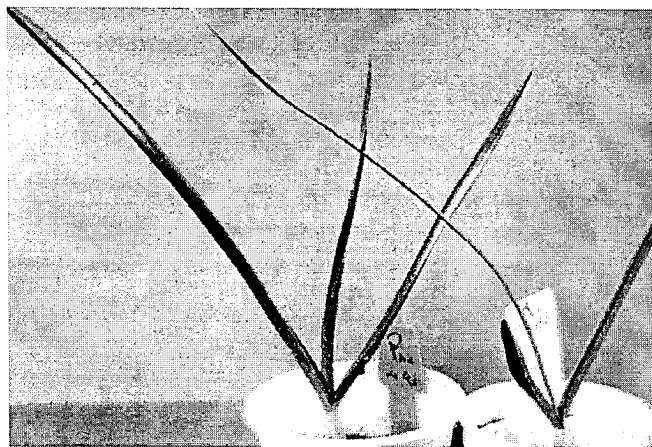


Figura 2. Manchas cloróticas en hojas de ajo inoculadas artificiales.

nismo causal de la sintomatología descrita en ajo. Diferentes trabajos indican que esta especie es patógena también en otras especies hortícolas como melón (*Cucumis melo* L.) (Goumans & Chatzaki, 1998), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Alippi *et al.*, 2003; Goumans & Chatzaki, 1998; Jones *et al.*, 1984), pimiento (Alippi *et al.*, 2003) y berenjena (Goumans & Chatzaki, 1998).

Varios investigadores consideran que *P. viridiflava* es una bacteria oportunista (Goumans & Chatzaki, 1998; Lukezic *et al.* 1983; Hunter & Cigna, 1981; Suslow and Mc Cain, 1981) que solamente puede atacar plantas debilitadas. Brotes epidémicos de la enfermedad en invernáculo se han asociado con temperaturas menores a 15° C y alta humedad por períodos prolongados, plantas suculentas por la fertilización excesiva con nitrógeno, baja luminosidad y una inadecuada protección de la planta con productos cúpricos (Goumans & Chatzaki, 1998). Por otro lado, esta enfermedad se ha manifestado en el campo en un periodo de excesiva lluvia en invierno (Jones *et al.*, 1984) y en plantas que habían recibido fertilización en exceso durante el invierno, pero no en plantas con fertilización adecuada (Gitaitis *et al.*, 1991). Las muestras de cebolla analizadas en el presente trabajo fueron obtenidas al final de la primavera (noviembre y diciembre), coincidiendo con un período de abundantes lluvias. Según los datos registrados en la Estación Agrometeorológica de la Facultad de Agronomía ubicada en Sayago, las precipitaciones acumuladas en los meses de noviembre y diciembre fueron de 100 mm y 246 mm, respectivamente. Estos valores están muy por encima del valor de la media histórica obtenidos en la Estación Meteorológica Prado que son de 89 y 84

mm para los meses de noviembre y diciembre, respectivamente. Es probable que este exceso de precipitaciones haya constituido un factor de estrés para las plantas, haciendo posible la infección oportunista por *P. viridiflava* tal como ha sido señalado por Jones *et al.* (1984).

En ajo, la enfermedad se manifestó en el mes de setiembre cuando las condiciones de temperatura y humedad en los tres meses anteriores fueron similares a las medias históricas (Cuadro 2). Sin embargo, las precipitaciones fueron bajas en los meses de junio y julio y altas en el mes de agosto (Cuadro 2). Posiblemente, el período de sequía haya sido en este caso el factor de estrés en la planta que permitió el desarrollo de la enfermedad luego de un período de lluvia. Las condiciones climáticas del mes de septiembre son generalmente favorables para el desarrollo de la enfermedad en el sur del país y posiblemente en presencia del patógeno, algunas plantas debilitadas pueden ser afectadas por *P. viridiflava*.

CONCLUSIONES

La bacteria aislada de plantas enfermas de ajo y cebolla fue identificada como *P. viridiflava* (Burkholder) Dowson según técnicas bioquímicas clásicas. Los aislamientos obtenidos en cada una de las especies hospedero fueron capaces de infectar a la otra.

No se conoce la prevalencia de esta bacteria, la severidad de los daños ocasionados y las condiciones que llevan a la expresión de la enfermedad en el Uruguay, para lo cual se deben realizar prospecciones y estudios epidemiológicos que analicen la relación entre las condiciones ambientales y/o de las plantas y la manifestación de la enfermedad en campo.

Cuadro 2. Promedio mensual histórico y de un periodo de 1998 de las variables climáticas Precipitaciones, Temperatura y Humedad Relativa Ambiente.

Mes	HRA ¹ (%)		Precipitaciones (mm)		Temperatura (° C)	
	1998 ²	Promedio ³	1998 ²	Promedio ³	1998 ²	Promedio ³
Junio	84	82	16,7	83	10,8	11,1
Julio	80	80	59,5	86	9,6	10,9
Agosto	80	77	141	88	13,2	11,7
Septiembre	76	74	42,5	94	11,9	13,4

¹ HRA: Humedad relativa ambiente.

² Datos de la estación agrometeorológica INIA_Las Brujas.

³ Promedio histórico (1961-1990) de la estación Prado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Alberto Paradedá de la Unidad de Sistemas Ambientales por facilitar los datos climáticos registrados en la estación agrometeorológica de la Facultad de Agronomía en la localidad de Sayago.

BIBLIOGRAFÍA

- ALIPPI, A. M.; DAL BO, E.; RONCO, L. B.; LÓPEZ, M. V.; LÓPEZ, A. C. & AGUILAR, O. M. 2003. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathology* 52: 287-302.
- GITAITIS, R. D.; BAIRD, R. E.; BEAVER, R. W.; SUMNER, D. R.; GAY J. D. & SMITTLE D. A. 1991. Bacterial Blight of Sweet Onion caused by *Pseudomonas viridiflava* in Vidalia, Georgia. *Plant Disease* 75:1180-1182.
- GOUMANS, D. E. & CHATZAKI, A. K. 1998. Characterization and host range evaluation of *Pseudomonas viridiflava* from melon, blite, tomato, chrysanthemum and eggplant. *European Journal of Plant Pathology* 104:181-188.
- HUNTER, J. E. & CIGNA, J. A. 1981. Bacterial blight incited in parsnip by *Pseudomonas marginalis* and *P. viridiflava*. *Phytopathology* 71:1238.1241.
- JONES, J. B.; JONES J. P.; MCCARTER, S. M. & STALL, R. E. 1984. *Pseudomonas viridiflava*: Causal agent of bacterial leaf Blight of Tomato. *Plant Disease* 68:341-342.
- LELLIOT, R. A. & STEAD D. E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 216 p. (Methods in Plant Pathology; 2).
- LELLIOTT, R. A.; BILLING, E. & HAYWARD, A. C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas. *Journal of Applied Bacteriology* 29: 470-489.
- LUKEZIC, F. L.; LEVINE R. G. & MC NAB, A. A. 1983. *Pseudomonas viridiflava* associated with root and crown rot of alfalfa and wilt of birdsfoot trefoil. *Plant Disease* 67:808-811.
- MGAP. La Horticultura en el Uruguay, Primera caracterización de la región sur. Año 1998/99. <http://www.mgap.gub.uy/Diea/Trabajos%20Especiales/LAHORTIC/default.htm>.
- SUSLOW, T. V. & MC CAIN, A. H. 1981. Greasy canker of poinsettia caused by *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Disease* 65:513-514.
- WRIGHT, P. J. & GRANT, D. G. 1998. Evaluation of Allium germplasm for susceptibility to foliage bacterial soft rot caused by *Pseudomonas marginalis* and *Pseudomonas viridiflava*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 26:17-21.