

Identificación bioquímica, fisiológica y patogénica de aislados bacterianos asociados a la pudrición blanda y pierna negra en papa

Biochemical, physiological and pathogenic identification of bacterial isolates associated with soft rot and black leg in potato

Mylene Corzo-López✉, Madelaine L. Quiñones-Pantoja

Grupo de Fitopatología, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El objetivo del trabajo fue identificar bioquímica, fisiológica y patogénicamente aislados bacterianos asociados a los síntomas de pudrición blanda y pierna negra en plantaciones de papa (*Solanum tuberosum* L.). Las recolectas de muestras se hicieron entre los meses de noviembre de 2015 y marzo de 2016, en áreas del cultivo en los municipios Quivicán y Güines, ubicados en la provincia Mayabeque, Cuba. Se obtuvieron 15 aislados a partir de muestras de tallos y tubérculos de plantas enfermas, los que se estudiaron morfológica, bioquímica y fisiológicamente; adicionalmente se efectuó la caracterización patogénica, utilizando tubérculos de papa (cultivar ‘Atlas’) y se inocularon en hojas de plantas de pimiento verde (*Capsicum annuum* L. cv ‘Albena’). Los aislados pertenecen a los géneros *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Bacillus*. Del total de aislados, solo cuatro presentaron características bioquímicas y fisiológicas correspondientes a especies de los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya*; los cuatro aislados resultaron patogénicos en los tubérculos de papa y solo uno de ellos, el aislado cuatro, fue también patogénico en pimiento. Los resultados evidenciaron que existen diferentes bacterias asociadas a los síntomas de pudrición blanda y pierna negra en las áreas analizadas.

Palabras clave: *Dickeya* sp., papa, *Pectobacterium* sp., *Solanum tuberosum*

ABSTRACT: The aim of this study was the biochemical, physiological, and pathogenic identification of bacterial isolates associated with the symptoms of soft rot and blackleg in potato (*Solanum tuberosum* L.) plantations. A total of 15 isolates were obtained from diseased potato stem and tuber samples collected in the crop fields in the municipalities of Quivicán and Güines, Mayabeque province, Cuba, between November 2015 and December 2016. Morphological, biochemical, and physiological studies were performed for identification of the isolates that were additionally characterized pathogenically on potato (cultivar ‘Atlas’) tubers and green pepper (*Capsicum annuum* L. cultivar ‘Albena’) leaves. The isolates were identified within the bacterial genera *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, and *Bacillus*. Only four isolates presented biochemical and physiological characteristics corresponding to species within the genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. The four isolates showed pathogenicity on potato tubers, but only one of them, isolate 4, did on green pepper leaves. These results sustained the presence of different bacteria associated with the symptoms of soft rot and blackleg in the studied areas.

Key word: *Dickeya* sp., potato, *Pectobacterium* sp., *Solanum tuberosum*

✉ Autor para correspondencia: Mylene Corzo-López. E-mail: mylene@censa.edu.cu

Recibido: 10/6/2017

Aceptado: 19/11/2017

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.), tubérculo que se produce en más de 100 países, representa el cuarto cultivo de mayor importancia en el mundo después del maíz, el arroz y el trigo, con 385 millones de toneladas (t) producidas en el año 2014. Una producción de 188 millones de toneladas corresponde al continente asiático y 122 millones a la región europea (1). En Cuba, en el año 2015 se produjeron 123 938 t en un área de 5 455 hectáreas dedicadas a este cultivo (2).

El cultivo de la papa se afecta por más de 40 plagas, como son los insectos, los nematodos, los virus, bacterias y los hongos. Entre las disímiles enfermedades se encuentran aquellas causadas por bacterias que afectan, principalmente, a los tubérculos durante su almacenamiento, provocando las pudriciones blandas y el pie negro, que son lesiones de color pardo oscuras en los tallos de papa que aparecen durante el desarrollo del cultivo en el campo (3).

Las pudriciones blandas y la pierna negra son ocasionadas por bacterias que pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae*. Estas se clasifican entre los diez patógenos de mayor importancia en la agricultura, limitan el rendimiento y la calidad de los tubérculos (3). Entre estas se encuentran *Pectobacterium atrosepticum* (4) (anteriormente *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Van Hall) Dye) (Pba), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (4) (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al.) (Pcc), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (*Erwinia carotovora* subsp. *brasiliense*) (Pcb) (5), *Pectobacterium wasabiae* (*Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*) (Pwa) (6) y diversas especies del género *Dickeya* (*Erwinia chrysanthemi*), que incluye *D. dianthicola* (*Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola*), *Dickeya dadantii*, *Dickeya zea* (*Erwinia chrysanthemi* pv. *zea*) y la nueva especie *Dickeya solani* (7,8).

Estos patógenos se transmiten, principalmente, a través de tubérculos contaminados, donde las especies bacterianas pueden permanecer, de forma latente, en la superficie del tubérculo o en las lenticelas. También pueden sobrevivir en restos de cosechas, maquinarias agrícolas y aguas de riego. La humedad relativa, la disponibilidad de oxígeno y la temperatura son los factores abióticos que ejercen gran influencia en la aparición de la enfermedad y en la extensión del daño causado a las plantas. La temperatura es el elemento principal para el desarrollo y la prevalencia de un microorganismo patógeno sobre el otro, aunque estén presentes, en un inicio, en la lesión y en iguales concentraciones (9).

El exceso de agua en el cultivo permite que las células bacterianas se muevan con mayor facilidad a través del tejido de la planta; además, este fenómeno conlleva a una disminución de la disponibilidad de oxígeno, que propicia un ambiente anaeróbico en los tejidos de la planta y limita así la activación de las respuestas de defensa dependientes de oxígeno (10).

Se utilizan diferentes métodos para la detección e identificación de estas bacterias; entre ellos están el uso de medios selectivos y las pruebas bioquímicas, fisiológicas, serológicas y moleculares (11).

En Cuba, este cultivo es uno de los priorizados en la estrategia alimentaria del país y anualmente se invierten numerosos recursos para garantizar una tecnología adecuada con el fin de obtener los mayores rendimientos posibles. Sin embargo, sus rendimientos pueden ser afectados por estos patógenos bacterianos durante la cosecha y la poscosecha (12).

El objetivo de este trabajo fue identificar bioquímica, fisiológica y patogénicamente los aislados bacterianos asociados a los síntomas de pudrición blanda en el cultivo de la papa en zonas de la provincia Mayabeque, Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la campaña de papa de noviembre de 2015 hasta marzo de 2016 se recolectaron 15 muestras de *S. tuberosum* de los cultivares 'Romano', 'Barna' y 'Daifla', en el periodo de los 55 a 60 días del cultivo, en áreas de los municipios Quivicán y Güines de la provincia Mayabeque, Cuba.

Las muestras recolectadas presentaron síntomas característicos de la enfermedad (pudrición blanda en tubérculos y pierna negra en tallos). De ellas, siete correspondían a tubérculos y el resto a tallos. Las muestras se colocaron en papel secante para evitar su deterioro durante su traslado hacia el laboratorio de Bacteriología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), ubicado en Mayabeque, Cuba.

Identificación bioquímica y fisiológica de los aislados bacterianos

En el laboratorio, los tubérculos y tallos con síntomas se lavaron con agua corriente durante 15 min para eliminar los restos de suelo presentes en ellos y se secaron con papel absorbente.

A los tubérculos se les eliminó la capa más externa de piel, se colocaron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por cinco minutos y se lavaron con agua destilada estéril. Los tallos se cortaron longitudinalmente y se desinfectaron, superficialmente, con alcohol al 70 % por cinco minutos; posteriormente se flamearon en un mechero.

Se tomó una porción de 2 mm de tejido, aproximadamente (1 mm de tejido enfermo y el otro de tejido sano) y se maceró en solución salina estéril (0,85 %) y Ácido dietildihioicarbámico (0,02 %) como un antioxidante. Se tomaron 40 µl de esta suspensión y se sembraron por estrías en placas Petri de 9 cm que contenían los siguientes medios de cultivo: Luria-Bertani agar (LB) e Hidrolizado de caseína-Peptona-Glucosa agar (CPG), a razón de tres placas por muestras. Las

placas se incubaron a 28 y 37°C durante 48 horas (13).

A las colonias obtenidas en los medios LB y CPG se les realizaron la Tinción de Gram, las pruebas de la Oxidasa y la Catalasa y crecimiento en los medios de cultivo King B agar (KB) y MacConkey agar (McC); además, se utilizaron las pruebas descritas por Shaad *et al.* (14) para la identificación del agente causal.

Evaluación de la patogenicidad de los aislados

Se realizó la prueba de patogenicidad en tubérculos de papa y en pimiento (*Capsicum annuum* L.) verde. Se utilizaron las colonias que no produjeron pigmento amarillo en los medios de cultivo ni pigmento fluorescente en el medio KB, así como la lactosa del medio McC.

Los tubérculos de papa, del cultivar 'Atlas', se lavaron con agua corriente y se colocaron en papel absorbente para eliminar toda la humedad presente. Posteriormente se colocaron 72 h a 28°C y 72 h a 37°C para verificar que estuviesen libres de aquellos microorganismos que provocan los síntomas de pudrición blanda (síntomas a reproducir en ellos en condiciones semicontroladas). Después de verificar que los tubérculos estaban sanos, se hizo la prueba de patogenicidad utilizando la metodología descrita por Duarte *et al.* (4). Los tubérculos se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por dos minutos, se lavaron con agua destilada estéril e inmediatamente se sumergieron en una solución de etanol (70 %) por un minuto. A continuación, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel absorbente por diez minutos bajo condiciones de esterilidad.

Posteriormente, los tubérculos desinfectados se cortaron en rebanadas de 0,5 cm de grosor con un escalpelo estéril. Cada porción se colocó en una placa Petri que contenía un papel absorbente, previamente humedecido, con agua destilada estéril. El inóculo bacteriano se

preparó en solución salina estéril (0,85 %) a partir de cultivos puros de las colonias crecidas en el medio de cultivo McC incubados a 30°C por 24 horas, con una concentración de 5×10^8 UFC.ml⁻¹ (DO_{600nm} 0,05. Espectrofotómetro T60 UV PG Instruments).

Las rebanadas de papa se inocularon siguiendo el método descrito por Maisuria *et al.* (13), usando dos rodajas por cada aislado y como control negativo la solución salina estéril (0,85 %). Las rodajas de tubérculos de papa inoculadas se colocaron en cámara húmeda durante 72 horas a 30°C. La maceración del tejido se evaluó a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inoculación.

En pimiento verde, se utilizó el cultivar 'Albena' para evaluar la patogenicidad de los aislados. Esta prueba se realizó utilizando la metodología descrita por Duarte *et al.* (5). Los pimientos se lavaron con agua corriente y se colocaron en papel absorbente para eliminar la humedad presente. Posteriormente, se introdujeron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por dos minutos, se lavaron con agua destilada estéril e inmediatamente se sumergieron en una dilución de etanol (70 %) por un minuto. A continuación, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel absorbente por diez minutos bajo condiciones de esterilidad. Posteriormente, con el uso de colonias puras de cada uno de los aislados crecidos en medio McC (30 °C, 24 h), se inocularon los frutos con el método de Duarte *et al.* (4). El diámetro de la lesión, de cada aislado inoculado, se midió a las 48 h posteriores.

RESULTADOS

Identificación bioquímica y fisiológica de los aislados bacterianos

Se obtuvieron 15 aislados y solo cuatro presentaron características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas semejantes a las descritas para los patógenos de pudrición blanda, *Pectobacterium* y *Dickeya* (Tabla 1).

Dos aislados manifestaron respuestas similares a las descritas para las bacterias de los géneros mencionados anteriormente, con la diferencia que produjeron pigmentación amarilla en los medios de cultivo. Estas características son afines a las expresadas por las especies pertenecientes al género *Pantoea*.

Cinco aislados mostraron una morfología de bacilos cortos Gram negativos; reaccionaron de manera positiva ante la prueba de la oxidasa y catalasa, produjeron pigmento fluorescente en el medio KB, no crecieron en condiciones de anaerobiosis y no produjeron pigmento amarillo. Estas características son similares a las encontradas en las especies del género *Pseudomonas*.

Del total de aislados, cuatro de ellos presentaron una forma bacilar alargada y reaccionaron, de forma positiva, ante la Tinción de Gram, características encontradas en las especies pertenecientes al género *Bacillus*.

Evaluación de la patogenicidad de los aislados bacterianos

Esta evaluación se efectuó solamente a los aislados con características bioquímicas y fisiológicas similares a las descritas para las bacterias de los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya*.

En tubérculos de papa

Los cuatro aislados evaluados (A1-A4) maceraron el tejido de la papa (Figura 1), producto a la degradación de la pectina de la pared celular presente en el tejido vegetal. Los síntomas observados en las rebanadas de papa inoculadas fueron semejantes a los informados en la literatura para estos patógenos.

En pimiento verde

Solo uno de los aislados, el número cuatro, produjo maceración del tejido celular alrededor del punto de inoculación en el fruto de pimiento verde. El resto de los aislados inoculados no provocaron lesión en el tejido, las mismas permanecieron semejantes al control negativo (Figura 2).

TABLA 1. Respuestas de 15 aislados bacterianos, procedentes de plantaciones de papa (*S. tuberosum*) en Mayabeque, Cuba, a las pruebas bioquímicas y fisiológicas utilizadas para su identificación a nivel de género. / *Responses of 15 bacterial isolates from potato (S. tuberosum) fields in Mayabeque, Cuba, to the biochemical and physiological tests used for their identification at the genus level.*

Pruebas	A- 1	A- 2	A- 3	A- 4	A- 5	A-6	A- 7	A-8	A- 9	A- 10	A- 11	A- 12	A- 13	A- 14	A- 15
Tinción de Gram	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
Citocromo Oxidasa	-	-	-	-	-	+	-	NR	NR	+	NR	NR	+	+	+
Prueba de la Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	NR	NR	+	NR	NR	+	+	+
Crecimiento Anaeróbico O/F	+	+	+	+	+	-	+	NR	NR	-	NR	NR	-	-	-
Producción de pigmento fluorescente en KB	-	-	-	-	-	+	-	NR	NR	+	NR	NR	+	+	+
Producción de pigmento amarillo	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en McC (lactosa+)	+	+	+	+	NR	+	NR	NR	NR	+	NR	NR	+	+	+
Crecimiento a 37°C	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Reducción de azúcar a partir de sacarosa	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Sensibilidad a Eritromicina	-	-	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Producción de Indol	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Producción de ácido a partir de :															
Sorbitol	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Melibiosa	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Citrato	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Rafinosa	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Arabinosa	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Lactosa	+	+	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Leyenda: + positiva; - negativa; NR no reactiva



FIGURA 1. Respuesta patogénica (pudrición blanda) de los aislados A1, A2, A3 y A4 evaluados en rodajas de papa (cultivar ‘Atlas’). / *Pathogenic response (like soft rot) of isolates A1, A2, A3, and A4 evaluated on potato slices (cultivar ‘Atlas’).*



FIGURA 2. Respuesta patogénica (maceración de tejidos) de los aislados A1, A2, A3 y A4 evaluados en pimiento verde (cultivar ‘Albena’). / *Pathogenic response (like tissue maceration) of isolates A1, A2, A3, and A4 evaluated on green pepper (cultivar ‘Albena’) leaves.*

DISCUSIÓN

Existen alrededor de seis géneros bacterianos que provocan pudriciones blandas en papa, entre los que se encuentran *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* y *Pantoeas* (14). En este estudio, la utilización de medios de cultivos como CPG, LB, McC y Kb, así como las pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas permitieron diferenciar aquellos aislados pertenecientes a los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya* de otros géneros bacterianos que están asociados a esta enfermedad en la papa. Las características culturales, morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de los aislados estudiados coinciden con las notificadas por Schaad *et al.* (14) y Benner *et al.* (16) para las especies de los géneros bacterianos mencionados anteriormente.

La patogenicidad de los aislados, con características bioquímicas y fisiológicas similares a las descritas para los géneros bacterianos *Pectobacterium* y *Dickeya*, se evaluó en rodajas de papa y pimiento. Los síntomas descritos fueron similares a los informados por Pérombelon *et al.* (9) y Maisuria *et al.* (13) para especies bacterianas pertenecientes a los géneros mencionados anteriormente. La evaluación de la patogenicidad en estas dos especies vegetales sirvió para diferenciar los aislados con dualidad patogénica, característica que solo está presente en aquellas especies bacterianas pertenecientes al género *Pectobacterium*. Estas dos plantas de

cultivos también se utilizaron con anterioridad por Duarte *et al.* (5) para la diferenciación de bacterias patógenas del cultivo de la papa pertenecientes a los géneros de *Dickeya* y *Pectobacterium*.

El estudio demostró que existen diferentes géneros bacterianos asociados a los síntomas de pudrición blanda en las áreas analizadas de Mayabeque en Cuba. Las pruebas bioquímicas, fisiológicas y patogenicidad solo permitieron llegar hasta la identificación de los géneros bacterianos que pueden estar afectando el cultivo de la papa. Teniendo en cuenta la diversidad de géneros que pueden estar relacionados con la expresión de esta sintomatología (10,16), se hace necesario ampliar el estudio de prospección de síntomas de pudrición blanda y pierna negra, coleccionar un mayor número de aislados en estas localidades y hacer uso de herramientas moleculares que permitan la identificación específica de las especies bacterianas que producen la enfermedad en estas áreas. Sin embargo, este estudio debe ser un llamado de atención a productores y técnicos vinculados al cultivo en la región, para extremar las medidas de manejo que permitan disminuir la incidencia de estas bacterias en un producto alimenticio de amplia demanda en el país.

REFERENCIAS

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) [Internet]. 2016 [citado abril de 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/>

2. Oficina Nacional de Estadística e Información. ONEI [Internet] Anuncio Estadístico de Cuba 2015. Disponible en: <http://www.one.cu/>. Fecha de consulta: mayo, 2016.
3. Fiers M, Edel-Hermann V, Chatot C, Le Hingrat Y, Alabouvette C, Steinberg Ch. Potato soil-borne diseases. A review. Agron. Sustain. Dev. 2012; 32:93–132
4. Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003; 53, 381–391.
5. Duarte V, De Boer SH, Ward LJ, De Oliveira AMR. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. Journal of Applied Microbiology. 2004; 96, 535–545.
6. Pitman AR, Wright PJ, Galbraith MD, Harrow SA. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand. Australia in Plant Pathology. 2008; 37, 559–568.
7. Toth IK, van derWolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsrör (Lahkim) L, Elphinstone JG. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant Pathology. 2011; 60, 385–399
8. van der Wolf J.M., Nijhuis E.H., Kowalewska MJ, Saddler GS, Parkinson N, Elphinstone JG, Pritchard L, Toth IK, Lojkowska E, Potrykus M, Waleron M, de Vos P, Cleen-werck I, Pirhonen M, Garland L, Hélias V, Pothier JF, Pflüger V, Duffy B, Tsrör L, Manulis S. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.). Int J Syst Evol Microbiol. 2013; 64, 768–774.
9. Pérombelon M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinia*: an overview of pathogenesis. Plant Pathol. 2002; 51: 1-12.
10. Toth I, Bell K, Holeva M, Birch P. Soft rot *Erwinia*: from genes to genomes. Molecular Plant Pathol. 2003; 4,17-30.
11. Czajkowski R, Pérombelon MCM, Jafra S, Lojkowska E, Potrykus M, van der Wolf JM, Sledz W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. Ann Appl Biol . 2015;166: 18–38.
12. Stefanova NM, Franco CY, Coronado IM F, Villa GPM. Efecto antagónico “*in vitro*” de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS contra aislamientos de *Pectobacterium carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi*. Fitosanidad. 2007; 11 (4):47-49.
13. Maisuria, B V, Nerurkar S A. Characterization and differentiation of soft rot causing *Pectobacterium carotovorum* of Indian origin. Eur J Plant Pathol. 2013; 136:87–102
14. Schaad NW. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Minnesota, U.S: The American Phytopathological Society. 2001:175-199.
15. Elbanna K, Elnaggar S, Bakeer A. Characterization of *Bacillus altitudinis* as a new causative agent of bacterial soft rot. Phytopathol. 2014; 162:712-722.
16. Benner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Second ed. 2005; 345-370.