

Estudio taxonómico de los agentes etiológicos causantes de pudriciones húmedas en tubérculos de papas¹

Luigi Ciampi P.²

INTRODUCCION

La papa, como alimento en Chile, constituye para vastos sectores de la población una de las principales fuentes de hidratos de carbono.

Debido a la distancia entre los centros productores y las zonas consumidoras del resto del país, adquiere fundamental importancia el almacenaje de tubérculos y su comercialización racional durante el año.

El almacenamiento de los tubérculos después de la cosecha representa una fase fundamental en la entrega normal y constante del producto a los consumidores, teniendo como principal propósito preservar en forma adecuada los tubérculos, tanto fisiológica como sanitariamente, en especial frente al ataque de enfermedades fungosas y bacterianas.

El presente estudio tiene como propósito determinar los agentes etiológicos causantes de pudriciones húmedas bacterianas, tanto en bodegas como en recintos destinados a la recepción de papas a través de las provincias de Cautín, Valdivia, Llanquihue y Chiloé.

La determinación de los agentes causales no es sólo de importancia teórica, dado que cada uno de ellos posee diferente ecología que exige, por tanto, la aplicación de métodos distintos de prevención y control.

REVISION DE LITERATURA

Según Walker, Ch. (1965), la pudrición húmeda bacteriana es una de las enfermedades más destructivas que atacan a la papa, tanto en el período de almacenaje como en el de transporte. Los tejidos del tubérculo, al ser atacado por las bacterias, se reblandecen por la acción de las enzimas pectolíticas que los organismos producen, las cuales disuelven la lamela media, rica en pectatos. Al avanzar la

enfermedad, los tejidos se reblandecen y exudan agua. Además se desprenden olores desagradables por la acción de bacterias secundarias.

De acuerdo con Elliot, Ch. (1951) y Breed, R., Murray, E. y Smith, R. (1957), las bacterias que atacan la papa causando pudriciones húmedas pertenecen a los géneros *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Según la capacidad de sobrevivencia en el suelo de las poblaciones bacterianas causantes de pudriciones húmedas, Buddenhagen, I. W. (1965) distingue tres grupos:

Grupo A. Especies cuyas poblaciones se desarrollan exclusivamente en el hospedero; son incapaces de multiplicarse en el suelo y no sobreviven de una temporada a otra fuera de su hospedador. Ej. *Corynebacterium sepedonicum*.

Grupo B. Especies cuyas poblaciones se desarrollan preferentemente en el hospedero; no son bacterias del suelo, ya que en condiciones normales su presencia declina lentamente en él. Sin embargo, si el suelo está contaminado en alto grado, en determinadas condiciones incluso puede aumentar su número de estación a estación. Ej. *Erwinia carotovora*.

Grupo C. Especies cuyas poblaciones se desarrollan principalmente en el suelo. Su carácter patógeno para las plantas es sólo transitorio y está en relación con condiciones ambientales anormales. Ej. especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas* verde fluorescentes.

Las pudriciones húmedas se mencionan por primera vez en Chile en el año 1941. Mujica, F. (1941), basándose en la sintomatología de las pudriciones observadas, menciona como agente etiológico al *Bacillus phytophthorus* y *Erwinia carotovora*. En los trabajos más recientes se menciona a *Erwinia carotovora* (Tollenaar, H. y Bleiholder, H., 1967) (Baillon, S., 1971) y a *Erwinia atroseptica* (Fernández, C. y Cubillos, A., 1965) (Montaldo, A., 1967) (Mujica, F., 1970). También estas determinaciones se basaron primordialmente en la sintomatología.

MATERIALES Y METODOS

Se aislaron 266 cepas a partir de tubérculos de papa con pudriciones húmedas, provenien-

¹Resumen de la tesis de grado del autor para optar al título de Ingeniero Agrónomo de la Universidad Austral de Chile. Se agradece sinceramente la cooperación dada en el desarrollo de este trabajo a los Dres. Janis Grinbergs y Edgardo Oehrens, de la Universidad Austral de Chile. También los agradecimientos al Dr. Milton Schroth, de la Universidad de Berkeley, California, por la identificación de las cepas, y a la Fundación Humboldt por los materiales enviados.

Recepción originales: 6 de octubre de 1971.

²Ing. Agr. Universidad Austral de Chile. Casilla 567, Valdivia, Chile.

tes de 32 localidades de las provincias de Cautín, Valdivia, Llanquihue y Chiloé, tomando nota de su sintomatología. Los tubérculos se lavaron y luego se desinfectaron durante 5 minutos sumergiéndolos en una solución al 5% de hipoclorito de sodio. Se eliminó la parte blanda de los tejidos afectados y con un bisturí esterilizado se trituraron los tejidos de la zona limítrofe entre la pudrición y la parte aún no atacada. A partir de este material se sembró con asa en placas de agar-papa con glucosa al 1% y se incubó durante ocho días a 25°C. Los cultivos puros obtenidos se mantuvieron refrigerados en agar-peptona al 0,5% hasta proceder a las pruebas de virulencia y, posteriormente, a la identificación de las cepas virulentas.

Las pruebas de virulencia se efectuaron en placas de vidrio de 12 cm de alto por 25 cm de diámetro cuyo interior se revistió con papel de filtro y algodón; en ellas se depositaron tapas de placas Petri. Una vez esterilizadas estas cámaras de vidrio y en el momento de usarlas, se humedeció el algodón con agua estéril.

Los tubérculos (variedad Desirée) se inocularon en cámaras asépticas usando material e instrumental esterilizado. Para este fin se lavaron con agua y se sumergieron durante 5 minutos en una solución al 5% de hipoclorito de sodio. Posteriormente se depositaron durante otros 5 minutos en una solución de bicloruro de mercurio al 1%. Se lavaron durante 10 minutos con agua y se secaron con papel de filtro; se partieron en dos mitades y con un bisturí se trituró la superficie a una profundidad de 2 a 3 mm depositándose las mitades sobre las placas Petri en el interior de las cámaras de cultivo humedecidas. Sobre la superficie de las papas se inoculó suspensión bacteriana (cultivo de 24 horas) mediante pipeta Pasteur, dejando un control sin inocular. Cada cámara húmeda permitió detectar la virulencia de cuatro cepas.

Una vez finalizado el proceso de inoculación, las cámaras húmedas fueron trasladadas a una estufa de cultivo e incubadas a 25°C. por 10 días, anotando detalladamente la sintomatología en los casos de presencia de pudrición húmeda. A partir de los tubérculos atacados en las pruebas de virulencia, se hicieron reaislamientos para compararlos con las cepas inoculadas.

Para la identificación de las cepas que causaron pudriciones húmedas se aplicó el siguiente criterio:

1. llegar a una identificación precisa de las especies patógenas pertenecientes a los grupos 1 y 2 de Buddenhagen, I. W. (1965).

2. llegar a la identificación de los patógenos accidentales [Grupo 3 de Buddenhagen, I. W. (1965)] sólo hasta el nivel de género.

Las cepas virulentas se identificaron en base a las descripciones y claves dadas por Elliot, Ch. (1951), Smith, N. R., Garden, R. Z. y Clark, E. F. (1952), Breed *et al.* (1957), Kundrat, W. (1963) y Stanier, R., Danderoff, M. y Adelberg, E. (1970).

Además, estas cepas fueron enviadas al Dr. Milton Schroth de la Universidad de California, Berkeley, California, para corroborar la identificación.

RESULTADOS

Con cada cepa aislada (266 en total) se efectuó la correspondiente prueba de virulencia, detectándose 40 cepas causantes de pudriciones húmedas.

Las características morfológicas, tintóreas, bioquímicas y síntomas de los tubérculos afectados en las pruebas de virulencia, permitieron reunir las 40 cepas en cinco grupos diferentes.

Los síntomas en la prueba de virulencia, para cada uno de los grupos, fueron los siguientes:

Grupo 1: en los tubérculos se observaron dos zonas diferentes a partir del centro de la pudrición hacia los bordes de la misma. La zona central era de color crema brillante, donde los tejidos habían perdido toda estructura; además, era acuosa y maloliente. Alrededor de ella se encontraba un anillo de color pardo negruzco, más consistente que la masa central. Al cabo de 8 a 10 días, las mitades de los tubérculos fueron atacadas en su totalidad, quedando intacta la cutícula de los mismos (Figura 1).

Grupo 2: los tubérculos presentaron una pudrición pardo oscura con exudaciones de color verde brillante, de aspecto húmedo y no maloliente. Además, en varios sectores la pudrición tomó tonalidades amarillo-verdosas (Figura 2).

Grupo 3: los tubérculos presentaron una pudrición pardo clara, con una película rugosa cubriendo la superficie; la consistencia de los tejidos era blanda, acuosa, y al cabo de 10 días los tubérculos estaban totalmente podridos (Figura 3).

Grupo 4: el ablandamiento causado por las bacterias fue leve y los tejidos afectados presentaron granulaciones al tacto. La pudrición se caracterizó por presentar un color grisáceo. La masa bacteriana era mucosa y abundante (Figura 4).

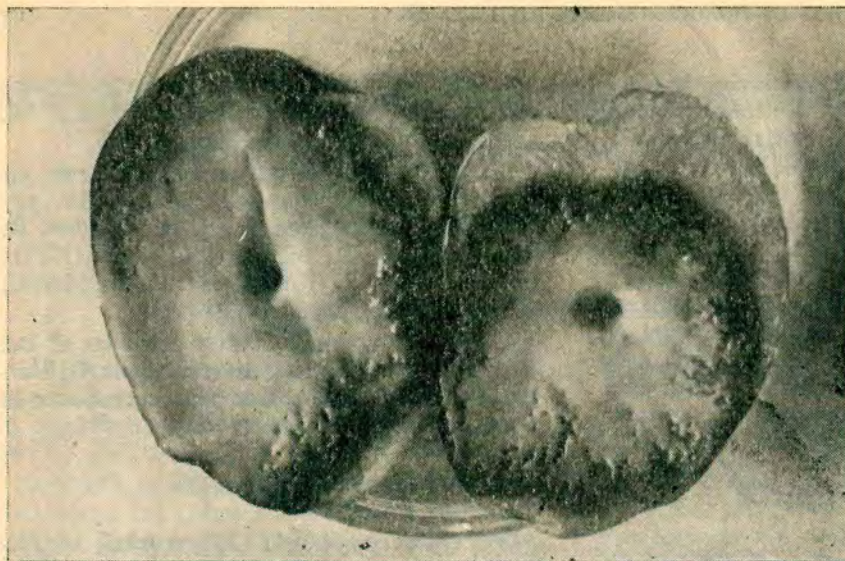


Figura 1 — Tubérculos variedad Desirée in-
oculados con la cepa
37 B (*Erwinia caroto-
vora*), e incubados
en cámara húmeda
durante seis días a
25°C.



Figura 2 — Tubérculos
variedad Desirée in-
oculados con la cepa
35 D (*Pseudomonas*
spp.), e incubados en
cámara húmeda du-
rante seis días a
25°C.

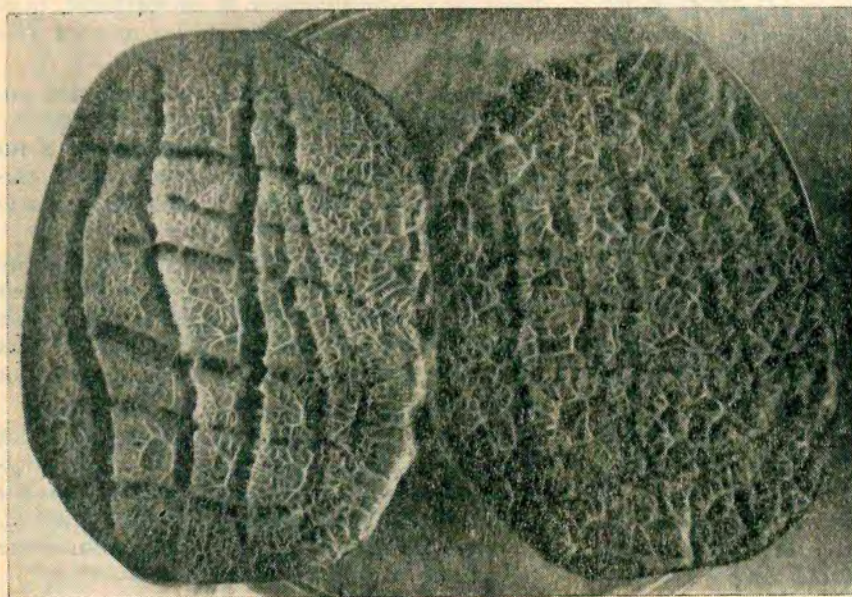
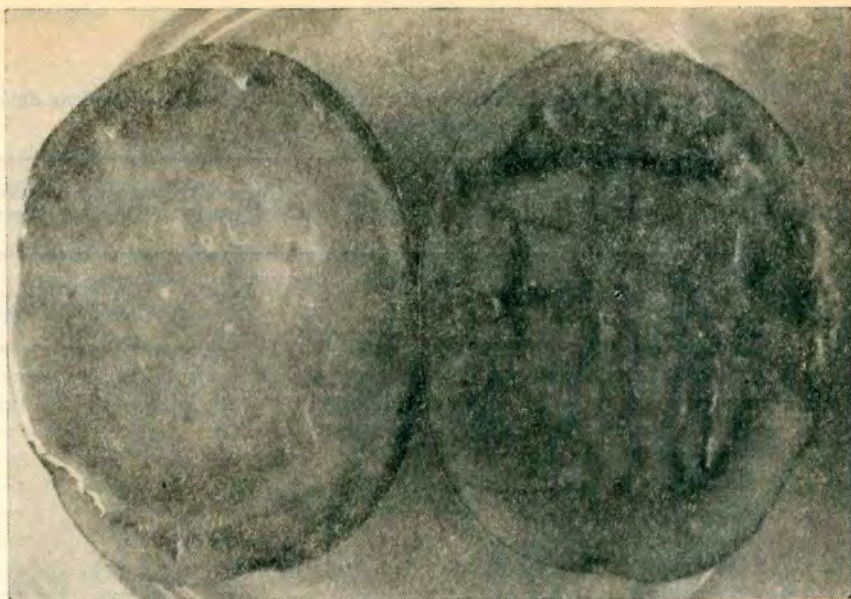


Figura 3 — Tubérculos
variedad Desirée in-
oculados con la cepa
25 H (*Bacillus* spp.),
e incubados en cá-
mara húmeda duran-
te seis días a 25°C.

Figura 4 — Tubérculos variedad Desirée inculados con la cepa 11 C (*Bacillus* spp.), e incubados en cámara húmeda durante seis días a 25°C.



Grupo 5: los tubérculos mostraron una pudrición de aspecto húmedo y superficie brillante de color crema. La pudrición no presentó olores característicos y al cabo de 10 días los tubérculos estaban totalmente atacados (Figura 5).

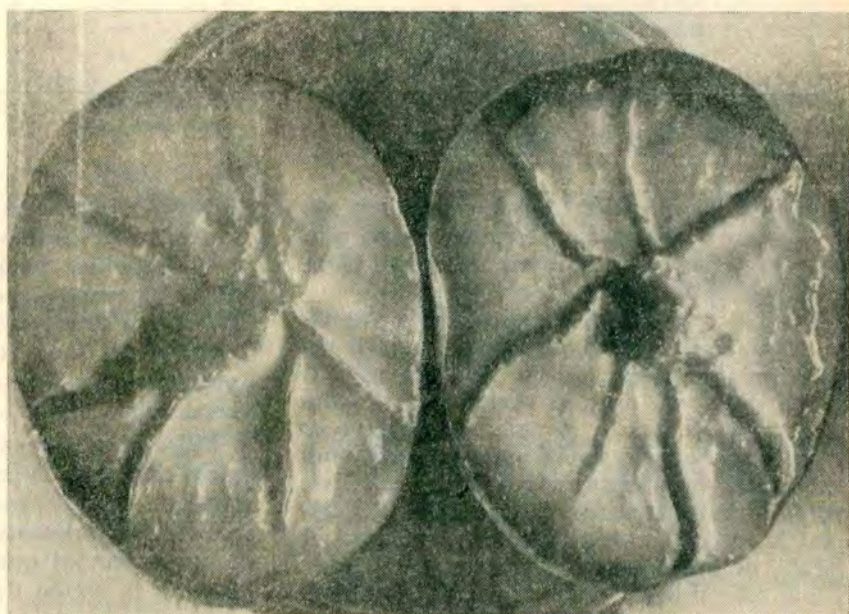
Las cepas obtenidas en los reaislamientos de las pruebas de virulencia se incluyeron junto a las originales. En todos los casos, la cepa madre y la reaislada resultaron idénticas, presentando características que se reúnen en el Cuadro 1.

Las 25 cepas del Grupo 1 provienen de muestras recolectadas entre Cautín y Chiloé. Según las características morfológicas, tintó-

reas y bioquímicas observadas (Cuadro 1), pertenecen a *Erwinia carotovora* (Jones) Holland. Estas cepas constituyen el 62,5% de las 40 cepas virulentas detectadas.

Las cuatro cepas del Grupo 2, según las características morfológicas, tintóreas y bioquímicas observadas (Cuadro 1), pertenecen al género *Pseudomonas* Migula. Estas bacterias presentan pigmentos verde-fluorescentes en caldo común y en leche tornasolada ("litmus milk"). Según Buddenhagen I. W. (1965), las bacterias productoras de estos pigmentos pertenecen a la flora normal del suelo; su capacidad de causar pudriciones húmedas es sólo accidental y está relacionada con condiciones

Figura 5 — Tubérculos variedad Desirée inculados con la cepa 25 F (*Bacillus* spp.), e incubados en cámara húmeda durante seis días a 25°C.



Cuadro 1 — Características tintóreas, morfológicas y bioquímicas de los cinco grupos de cepas causantes de pudriciones húmedas.

	GRUPO 1 (25 CEPAS)	GRUPO 2 (4 CEPAS)	GRUPO 3 (7 CEPAS)	GRUPO 4 (1 CEPA)	GRUPO 5 (3 CEPAS)
Tinción de Gram	—	—	+	+	+
Presencia de esporas	—	—	+	+	+
Motilidad	+	+	—	—	—
Presencia de cápsulas	—	—	—	—	—
Licuação de la gelatina	+	+	—	+	+
Desprendimiento de hidrógeno sulfurado	+	—	—	—	—
Reducción de nitratos	+	+	—	+	—
Producción de indol	—	—	—	—	—
Voges Proskauer	—	—	—	—	—
Rojo metilo	+	—	—	—	—
Utilización de urea	—	—	—	—	—
Hidrólisis de almidón	—	—	—	+	—
Pigmentos fluorescentes en caldo común	—	+	—	—	—
Leche tornasolada:					
reducción de tornasol	+	+	+	+	+
coagulación	+	+	—	—	—
peptonización	+	+	—	—	—
Producción de ácido y gas a partir de diferentes hidratos de carbono:					
glucosa	A	A	A	AG	A
sacarosa	A	A	A	AG	A
fructosa	A	A	A	AG	A
manitol	A	A	A	AG	A
ramnosa	A	A	A	AG	A
xilosa	A	A	A	AG	A
galactosa	A	A			
celobiosa	A	A			
glicerol	A	A			
lactosa	A	—	—	AG	—
rafinosa	A	—	—	AG	A
maltosa	A	—	A	AG	A
arabinosa	A	—	A	AG	A
salicina	A	—	A	AG	A

+ positivo; — negativo; A ácido; AG ácido y gas.

ambientales anormales. Constituyen el 10% de las 40 cepas virulentas detectadas y han sido aisladas de las muestras provenientes de Llanquihue y Chiloé.

Las 11 cepas de los Grupos 3-4-5 presentaron endosporas; por tanto, pertenecen al género *Bacillus* Cohn. Según Buddenhagen I. W. (1965), estas especies pertenecen a la flora normal del suelo y su carácter patógeno es transitorio estando en relación con condiciones anormales de temperatura y humedad. Esta opinión es confirmada por Goodman, R., Zoltan, K. y Zaitlin, M. (1967); constituyen el 27,5% de las 40 cepas virulentas detectadas, y han sido aisladas de las muestras provenientes de Llanquihue y Chiloé.

De lo expuesto se desprende que de las 40 cepas virulentas detectadas, el 62,5% pertenece a la especie patógena *Erwinia carotovora*. El 37,5% restante, perteneciente a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, abarca gérmenes saprófitos del suelo, cuya capacidad de causar pudriciones se debe a las defectuosas condiciones de almacenaje.

Además, se constató que los agentes etiológicos causantes de las pudriciones húmedas no pueden identificarse en bodegas basándose sólo en la sintomatología, puesto que ésta es muy similar, lo que posiblemente pueda deberse a la acción de la flora saprófita secundaria.

RESUMEN

Se investigan los agentes etiológicos causantes de pudriciones húmedas de papas en los recintos comerciales mayoristas y bodegas de predios agrícolas en el sur de Chile (provincias de Cautín, Valdivia, Llanquihue y Chiloé).

Se aislaron 266 cepas, de las cuales 40 resultaron virulentas. Para la identificación de éstas se procedió mediante los antecedentes aportados por Elliot, Smith *et al.*, Breed *et al.*, Kundrat y Stanier *et al.*

Las cepas causantes de pudriciones húmedas estuvieron distribuidas bajo los siguientes grupos taxonómicos: 25 cepas de *Erwinia carotovora* (Jones) Holland, 11 del género *Bacillus* Cohn y 4 del género *Pseudomonas* Migula.

SUMMARY

The etiological agents that cause soft-rots in potato stored in forms and marketing stores in the South of Chile (Provinces of Cautín, Valdivia, Llanquihue and Chiloé) were studied.

Two hundred and sixty six cultures were isolated, 40 of them were virulent. For the identification of these the antecedents of Elliot, Smith *et al.*, Breed *et al.*, Kundrat and Stanier *et al.*, were used.

The strains that cause soft rot were distributed among the following taxonomic groups: 25 types of *Erwinia carotovora* (Jones) Holland, 11 of *Bacillus* Cohn and 4 of *Pseudomonas* Migula.

LITERATURA CITADA

- BAILLON, S. 1971. Determinación de microorganismos causantes de pudriciones radiculares en zanahoria (*Daucus carota* L.). Concepción, Chile. Universidad de Concepción. 41 p. (Tesis Ing. Agr., mimeografiada).
- BREED, R., MURRAY, E. and SMITH, R. 1957. Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams & Wilkins Co., New York. 1094 p.
- BUDDENHAGEN, I. W. 1965. The relation of plant pathogenic bacteria in the soil. In Ecology of soil borne plant pathogens. Univ. Calif. Press: 269-282.
- ELLIOT, CH. 1951. Manual of bacterial plant pathogens. Cronica Botanica Co., Waltham. Mass. USA. 186 p.
- FERNÁNDEZ, C. y CUBILLOS, A. 1965. Clave para identificar las enfermedades más comunes de la papa en el sur de Chile. Estación Experimental Carillanca, Temuco, Chile. Bol. Tec. Div. 2: 19.
- GOODMAN, R., ZOLTAN, K. and ZAITLIN, M. 1967. The biochemistry and physiology of infectious plant disease. Van Nostrans Co., USA. 354 p.
- KUNDRAT, W. 1963. Zur Differenzierung aerober Sporenbildner (genus *Bacillus* Cohn). Zbl. vet. Med. 8: 418-426.
- MONTALDO, A. 1967. Bibliografía latinoamericana sobre papas. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Suplemento Nº 1. 183 p.
- MUJICA, F. 1941. Nómima de las enfermedades y pestes de las papas cuya existencia se ha comprobado en el país. Bol. San. Veg. 1: 70-72.
- . 1970. Virosis, nematosis y bacteriosis. Univ. de Chile. Bol. Tec. 22 (mimeografiado).
- SMITH, N. R. GARDEN, R. Z. and CLARK, E. F. 1952. Aerobic sporeforming bacteria. USDA. Agricultural Monograph. Nº 16. 148 p.
- STANIER, R., DAUDEROFF, M. and ADELBERG, E. 1970. The microbial world. Prentice Hall Inc. N. Jersey. 873 p.
- TOLLENAAR, H. y BLEIHOLDER, H. 1967. Pudrición bacteriana blanda y cercosporiosis, dos nuevas enfermedades para zanahoria (*Daucus carota* L.) en Chile. Agricultura Técnica (Chile) 27 (4): 163-165.
- WALKER, CH. 1965. Patología vegetal. Ed. Omega. España. 818 p.