

**DETERMINACION DE *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (BROWN)
STEVENS, CAUSANDO PUDRICION DEL TALLO EN HABA
(*Vicia fabae* L.), EN CHILE¹**

**Identification of *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* (Brown) Stevens,
causing stem rot on faba bean (*Vicia fabae* L.), in Chile**

Paulina Sepúlveda R.²

S U M M A R Y

During 1990/91 season a disease was detected on faba bean fields in the central region of Chile, South America. The diseased plants showed stunting, yellowing and necrotic soft rot of the stems.

Pseudomonas marginalis pv. *marginalis* was identified as the causal organism of the symptomatology affecting faba bean plants on the field, being this one the first determination of this bacteria in this plant in Chile. The determination was based upon pathogenicity tests and other culture characteristics of the bacteria. The bacterial culture was also pathogenic in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.).

Key words: diseases, bacteria, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, bacteriosis, faba bean, *Vicia fabae*, legumes, rots, necrosis.

INTRODUCCION

A nivel mundial existen pocas enfermedades causadas por bacterias en el cultivo del haba en comparación con las provocadas por hongos o virus. Salt (1983), señala que ciertas pudriciones de raíces y tallo, como también afecciones en hojas, vainas y semillas son causadas por bacterias. Las especies *Pseudomonas fabae* (Yu) Burckholder y *P. marginalis* pv. *marginalis* (Brown) Stevens, han sido mencionadas por Yu (1936) y Bradbury (1986), respectivamente, como causantes de enfermedades en haba. *P. marginalis* pv. *marginalis* es considerada por este último autor, como un patógeno que afecta un gran número de especies muy diferentes como leguminosas (haba, fréjol, arveja), crucíferas (repollo, brocoli, coliflor), además de lechuga, tabaco, etc.

La distribución geográfica de la bacteria corresponde al sector Este de Africa, Japón, Australia, diversos países de Europa, Argentina y Brasil (Bradbury 1986). En nuestro país, no existía hasta el momento ninguna información de enfermedades causadas por bacteria en haba.

Los síntomas más frecuentes causados por *P. marginalis* pv. *marginalis* corresponden a necrosis marginal de las hojas. Las áreas necróticas tienen una consistencia acuosa, en un comienzo, para volverse secas una vez avanzada la enfermedad.

Durante la temporada 1990/91 se detectó en siembras de haba de semilla grande (tipo Exportación), ubicadas en la zona central de Chile, una enfermedad que afectaba a las plantas en los primeros estados de desarrollo, con aproximadamente 20 a 25 cm de altura. Estas plantas presentaban menor desarrollo, amarillez y una severa pudrición necrótica de consistencia acuosa en el sector basal del tallo, que avanzaba hacia el ápice, produciendo la muerte de las plantas.

La coincidencia entre los síntomas encontrados en el campo y los descritos en el extranjero para *P. marginalis* pv. *marginalis*, permitió establecer como objetivo del presente trabajo, el verificar si la enfermedad ocurrente en nuestro país, efectivamente era provocada por este patógeno.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento

Para realizar el aislamiento de la bacteria se lavaron en agua corriente las plantas afectadas, luego con un bisturí, previamente esterilizado, se cortaron

¹Recepción de originales: 17 de Junio de 1991.

²Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

pequeños trozos de tejido enfermo tomando los márgenes del avance de la lesión, los que se colocaron en una gota de agua destilada estéril, se maceraron y el extracto se sembró por el método del rayado en placas Petri con agar de extracto de levadura con dextrosa y CaCO_3 (YDC) (extracto de levadura 10 g/L; dextrosa 20 g/L; CaCO_3 20 g/L y agar 15 g/L). Las placas se incubaron en cámara de cultivo a 28 °C bajo oscuridad por 24 a 48 horas. Se subcultivaron colonias aisladas en placas con YDC y medio B de King (King, Ward y Raney, 1954) y se incubaron a 28 °C bajo oscuridad antes de seguir con la caracterización de la bacteria encontrada.

Caracterización morfo-fisiológica

El aislamiento obtenido se caracterizó respecto a la tinción de Gram, forma celular, color, forma y aspecto de la colonia en YDC y medio B de King.

Se estudió también la capacidad del aislamiento para reducir el nitrato en un medio constituido por extracto de levadura 5 g/L; KNO_3 10 g/L; agar 1 g/L; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 g/L; KCl 0,2 g/L y $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L (Shaad, 1988).

Preparación del inóculo

El inóculo utilizado en la prueba de hipersensibilidad en tabaco y pruebas de patogenicidad se obtuvo pre-cultivando el aislamiento en medio de B de King por 24 horas. Con el cultivo, se preparó una suspensión bacteriana en agua estéril, con una concentración de 10^6 unidades formadoras de colonia (UFC).

Hipersensibilidad en tabaco

Hojas de tabaco cv. Samsun, se infiltraron con la suspensión bacteriana de acuerdo a la metodología descrita por Klement, Farkas y Lovrekovich (1964). Como testigo se infiltraron hojas de tabaco del mismo cultivar con agua destilada estéril. Las plantas se mantuvieron en invernadero a temperatura de 20 a 24 °C por 24 a 48 horas.

Prueba de patogenicidad

Veinte plantas de haba de aproximadamente 15 días se inyectaron con 0,5 ml de la suspensión bacteriana en la parte basal del tallo y en las axilas de la inserción de las hojas. Como testigo, se utilizó un número igual de plantas inyectadas con agua destilada estéril. Las plantas inoculadas se mantuvieron en condiciones de alta humedad y temperatura de 28 °C por 24 horas.

La patogenicidad del aislamiento se verificó en otras especies leguminosas como fréjol, arveja, garbanzo y lenteja. Se inocularon con suspensión bacteriana inyectada en la parte basal del tallo 10 plantas respectivas (de aproximadamente 15 días), de fréjoles cvs. Tórtola-INIA y Pinto 114, arvejas cv. Amarilla-INIA, garbanzos cv. California-INIA, lentejas cv. Araucana-INIA y haba corriente. Como testigo, se utilizaron igual número de plantas de cada cultivar inoculadas con agua destilada estéril. Las plantas se mantuvieron en cámara húmeda a 27 a 28 °C por 24 a 48 horas.

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización morfo-fisiológica

Las colonias aisladas se caracterizaron en medio B de King por la presencia de pigmentos fluorescentes bajo luz ultravioleta. La forma de las colonias era esférica, con márgenes definidos, brillantes o vidriosas. En medio YDC las colonias presentaban forma similar, pero de una coloración crema tornándose rosado-anaranjado a medida que pasaba el tiempo.

La superficie de la colonia en ambos medios se apreció fina convex, mucóide y de márgenes enteros.

Las células bacterianas aisladas fueron Gram negativas con forma de bastones. Se determinó una capacidad positiva para la reducción de nitrato. Estas características permiten identificar el aislamiento bacteriano como perteneciente al género *Pseudomonas* (Hildebrand, Schroth y Sands, 1988).

Hipersensibilidad en tabaco

La reacción de hipersensibilidad en hojas de tabaco, fue positiva, observándose necrosis en las zonas de infiltración a las 24 horas, mientras los testigos permanecieron sanos.

Pruebas de patogenicidad

A las 10 horas de la inoculación, se observaron los primeros síntomas de la enfermedad en las plantas de haba y correspondían a una necrosis de consistencia acuosa en el sector circundante al punto de inyección. Esta necrosis avanzaba sobre y bajo el punto de la inoculación (Figura 1). A las 24 horas las plantas presentaban severos daños de pudrición en el tallo que comprometía seriamente su rigidez, observándose un quiebre del mismo y muerte de las plantas.

El aislamiento de *Pseudomonas* resultó además ser patógeno en fréjol y garbanzo. Los síntomas se



FIGURA 1. Necrosis en tallo de haba producido por *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*.

FIGURE 1. Necrotic soft rot on faba bean stem caused by *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*.

presentaron a las 24 horas después de la inoculación como una pudrición necrótica de consistencia acuosa y posterior muerte en el caso de fréjoles y habas. En garbanzo, los síntomas fueron más leves, observándose sólo necrosis en el tallo. Las arvejas y lentejas, no presentaron ningún

síntoma. Las plantas testigos permanecieron sanas durante todo el tiempo que duró el experimento. De las plantas afectadas, se aisló una bacteria con características idénticas a las que presentaba la utilizada en la inoculación.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demostraron la patogenicidad del aislamiento bacteriano de plantas de haba de la zona central.

Los síntomas originalmente observados correspondieron a la acción de la bacteria aislada. Además, fue posible establecer la patogenicidad de la bacteria en otras especies leguminosas como fréjol y garbanzo.

De acuerdo a las características morfo-fisiológicas y pruebas de patogenicidad, la bacteria fue clasificada como perteneciente al género *Pseudomonas*. Aislamientos de la bacteria, fueron enviados al Commonwealth Mycological Institute (C.M.I.) para su identificación, donde se identificó como *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*; quedando registrada con el número 346520.

RESUMEN

De acuerdo a los antecedentes recopilados por la autora, no existe información sobre la presencia de la bacteria anteriormente en Chile.

Durante la temporada 1990/91 se detectó en siembras de haba de la zona central de Chile, VI Región, una enfermedad que afectaba a las plantas en los primeros estados de desarrollo. Las plantas presentaban menor crecimiento, amarillez y una severa pudrición necrótica de consistencia acuosa en el sector basal de los tallos. Dicha necrosis avanzaba hacia el ápice produciendo la muerte de las plantas afectadas.

Pseudomonas marginalis pv. *marginalis*, fue identificada como el agente causal de la sintomatología encontrada en el campo, basándose en prueba de patogenicidad y características morfo-fisiológicas. Además el aislamiento bacteriano resultó ser patogénico en fréjol y garbanzo.

Esta corresponde a la primera determinación de *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis* afectando el cultivo de haba, en Chile.

Palabras claves: enfermedades, bacteria, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, bacteriosis, haba, *Vicia fabae*, leguminosas, pudriciones, necrosis.

LITERATURA CITADA

BRADBURY, J.F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International. 332 p.

HILDEBRAND, D.C.; SCHROTH, M.V. and SANDS, D.C. 1988. *Pseudomonas*. In: Schaad, N.W. (ed.). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 2nd. edition. APS Press. 158 p.

KING, E.O., WARD, M.K. and RANEY, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-107.

KLEMENT, Z.; FARKAS, G.L. and LOVREBOVIC. 1964. Hipersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 54: 474-477.

SALT, G.A. 1983. Root diseases of *Vicia fabae* L. pag. 393-419.
In: Hebbethwaite P.D. (ed.). The faba bean (*Vicia fabae* L.).
Butherworths, London. 573 p.

YU, T.F. 1936. A bacterial stem blight of broad bean. Bulletin
of the Chinese Botanical Society 1: 32-42.

SCHAAD, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of
plant pathogenic bacteria. 2nd. edition. APS Press. 158 p.