

PROSPECCION DE PIE NEGRO Y POTENCIAL DE INFECCION LATENTE (*Erwinia* spp) EN SEMILLEROS DE PAPA EN LA X REGION DE CHILE¹

Black leg survey and potential of latent infection (*Erwinia* spp) in certified potato seed lots in the X Region of Chile

Ivette Acuña B.² y Paola Riffo F.²

SUMMARY

Among the main diseases associated to potatoes in South of Chile are soft rot and black leg, both caused by the bacteria *Erwinia* spp. The main source of dissemination of this pathogen is the potato seed tuber.

In order to diagnose the incidence of this diseases in the X Region of Chile, a survey was carried out with the following objectives:

- To identify the causal agent of black leg and of latent infection in seed tubers, used in comercial seed plants.
- To assess and determine the quantitative potential of latent infection.

During the survey, several comercial potato seed lots were visited recording the number of plants showing black leg symptoms. At harvest, potato tubers of some of the seed lots were collected, to assess potential of latent infection using laboratory test. In both cases the causal agent was isolated using a specific culture media, biochemical and pathogenicity test.

As a result of this study it was concluded that most of the seed lots surveyed are within the limits of tolerances imposed by the regulations of the certification seed law for potatos and, in this case, for black leg. These are 0,3% for prebasic seed category and 0,5% for basic seed. The potential of latent infection, varied from 40% to 100% after the test, for prebasic and basic seed, respectively. It implies that a high number of seed tubers carry the bacteria. The main causal agent isolated was the bacteria identified as *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*.

Key words: *Erwinia* spp, *Solanum tuberosum*, potato, plant diseases, bacteria, diagnose.

INTRODUCCION

La pudrición blanda de los tubérculos de papa y el pie negro en plantas son enfermedades serias en el sur de Chile (Ciampi y Andrade, 1984). Aunque varían las reducciones de rendimiento, se calcula que en tubérculos almacenados y plantas de papa en el campo se pierde alrededor de un 10 y 5%, respectivamente (Ciampi y Passalacqua, 1983). Según Pérombelon (1987), en ausencia de otra enfermedad, pueden ocurrir pérdidas mayores al 20% en cultivos de papa provenientes de tubérculos infectados en forma latente.

Esta enfermedad es causada por las bacterias *Erwinia carotovora* ssp *carotovora* (Ecc), *E. carotovora* ssp *atroseptica* (Eca) y *E. chrysantemi* (Ecy) (French, 1983). En el sur de Chile, Ciampi y Passalacqua (1983), detectaron la presencia de las sub-especies *E. c. carotovora* y *E. c. atroseptica*, no así la *E. chrysantemi*. Aunque otras bacterias pectolíticas están presentes en la pudrición, tales como especies de los géneros *Clostridium*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, la pudrición se inicia por las *Erwinia*, las cuales son sucedidas por otras bacterias más adaptadas a condiciones de tejido en pudrición (Pérombelon, Gullins-Handley y Kelman, 1979).

Se considera que la principal fuente de inóculo en el cultivo, es la pudrición del tubérculo madre (Lapwood, 1985); Pérombelon, 1974). Es así como las

¹Recepción de originales: 20 de enero de 1992.

²Estación Experimental Remehue (INIA), Casilla 24-O, Osorno, Chile.

bacterias se encuentran superficialmente sobre los tubérculos, en lenticelas y en heridas, aunque muchos de los tubérculos en existencia están contaminados, el pie negro y la pudrición blanca ocurre sólo cuando las condiciones ambientales favorecen el crecimiento de la bacteria (Pérombelon y Kelman, 1980).

El potencial para la pudrición blanda está influenciado por el número y la posición de las células de las bacterias de *Erwinia* en los lenticelas (Bartz y Kelman, 1985), la presencia y tipo de heridas, edad de los tubérculos, curado, cultivar, niveles de calcio y potencial de agua de los tejidos (Bartz y Kelman, 1986).

Bain y otros (1987), afirman que la incidencia de pie negro está también relacionada con el nivel de contaminación de la semilla por el patógeno y que la enfermedad es baja si el nivel de infección en la semilla está por debajo de 10^3 células promedio, por tubérculo.

El pie negro está asociado invariablemente con la pudrición del tubérculo madre. La infección puede ocurrir en el tallo a través del sistema vascular, en cualquier momento después de la multiplicación del patógeno en el tubérculo madre podrido. Una vez en el tallo, la bacteria puede permanecer en dormancia, o puede causar una infección si las condiciones son favorables. Al igual, la contaminación de los tubérculos progenie ocurre después que el tubérculo madre se pudre y la bacteria es liberada en el suelo y es llevada por el agua hasta los tubérculos hijos (Pérombelon, 1987).

Considerando que la X Región es la principal zona productora de papa, tanto para consumo como para semilla; que este cultivo es una alternativa interesante en la rotación para diversificar el uso del suelo, y que el pie negro y la pudrición blanda son considerados los principales problemas bacterianos en la región, se planteó el presente estudio con los siguientes objetivos:

- Identificar el agente causal de pie negro e infección latente en estos semilleros.
- Cuantificar la incidencia de pie negro en la planta y determinar el potencial de infección latente en tubérculos en semilleros de papa de categorías básica y prebásica en la X Región.

MATERIALES Y METODOS

La prospección se llevó a cabo en semilleros de papa de categorías básica y prebásica ubicados en diferentes localidades de la X Región, en la temporada 1990/91.

La etapa de análisis y determinación de los agentes causales se realizó en el Laboratorio de Fitopatología

de la Estación Experimental Remehue (INIA), ubicada en la Ruta 5 Norte, a 8 km de Osorno.

Etapa de campo

Se visitaron dieciséis semilleros, de los cuales doce eran de categoría prebásica y cuatro de básica, de variedades comercialmente importantes. Se hicieron dos prospecciones, la primera en el mes de diciembre y la segunda distante 15 días. En cada semillero se tomaron 1.000 muestras de plantas al azar, por hectárea, contabilizándose la cantidad de ellas que presentaban síntomas de pie negro. El recorrido en el campo se realizó en forma homogénea abarcando toda la superficie del cultivo. Luego, de cada semillero se recolectaron diez plantas al azar, con síntomas de pie negro y se llevaron al laboratorio para aislamiento e identificación del agente causal. Previo a la cosecha de estos semilleros se recolectaron treinta tubérculos al azar, desde el campo y se almacenaron un mes para, posteriormente, determinar el potencial de infección latente y la identificación del agente causal.

Etapa de laboratorio

Desde las plantas con síntomas de pie negro se sacó un trozo de la zona de avance, se maceró con agua estéril y se sembró en el medio agar nutriente (Shaad, 1988). Las colonias de bacterias presentes se aislaron hasta obtener un cultivo puro. Para la identificación de la especie y subespecie de bacteria presente se efectuaron las siguientes pruebas: gram, oxidasa, fluorescencia, reducción de sustancias desde la sacarosa, formación de ácidos desde el alfa-metil glucósido y maltosa, crecimiento a 37°C y la prueba de patogenidad de pudrición en rodajas de papa, según Shaad (1988).

Los tubérculos recolectados previo a la cosecha, se procesaron de la siguiente forma: se lavaron en agua corriente y se secaron, posteriormente se pincharon al azar en diez lenticelas con mondadientes estériles, se envolvieron en toalla de papel húmeda, papel celofán y se pusieron en bolsas plásticas, individualmente. El lote se puso en una caja hermética y se llevó a incubar a 26°C, por cinco días. Luego de transcurrido este tiempo se contabilizaron los tubérculos con y sin pudrición.

Para la aislación de las bacterias presentes, se sacó un trozo desde la zona de avance en los tubérculos con pudrición y se sembró en el medio Cristal Violeta Pectato Modificado (Cuppels y Kelman, 1974; Pérombelon y Bumett, no publicado). Las colonias que degradaron pectato se aislaron en el medio agar nutriente y se sometieron a las pruebas anteriormente descritas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se efectuó mediante una prueba de probabilidades (P), por medio del procedimiento de aproximación binomial a la normal, planteándose la hipótesis nula de que las plantas presentarían pie negro, no excedieran el 0,5% para las categorías básicas y 0,3% para las categorías prebásicas (Chile, Ministerio de Agricultura-SAG, 1991), contra la hipótesis alternativa de que P fuera mayor que 0,5 y 0,3%, según sea la categoría.

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1 se presenta el porcentaje de plantas con síntomas de pie negro y el potencial de infección latente en los tubérculos.

CUADRO 1. Plantas (%) que presentaron síntomas de pie negro y potencial de infección latente en tubérculos de categorías básica (B) y prebásica (PB) en semilleros de papa en la X Región

TABLE 1. Plantas (%) showing symptoms of black leg and potential of latent infection in tuber of prebasic (PB) and basic (B) categories in potato seed lots in the X Region

Semillero	Categorías	Plantas con pie negro (%)		Potencial de infección latente en tubérculos (%)
		Muestreo 1	Muestreo 2	
1	PB	0,03a	0,12a	90
2	PB	0,02a	0,07a	100
3	PB	0,46b	0,60b	60
4	PB	0,20a	0,60b	90
5	PB	0,40a	0,42a	90
6	B	0,06a	0,15a	100
7	PB	0,19a	0,43a	100
8	PB	0,10a	0,23a	100
9	PB	0,18a	0,25a	80
10	PB	0,04a	0,19a	40
11	PB	0,00a	0,00a	100
12	B	0,02a	0,04a	100
13	PB	0,00a	0,00a	100
14	B	0,17a	0,47a	100
15	PB	0,25a	0,00a	100
16	B	0,53a	0,47a	100

a: Se aprueba la hipótesis nula, por lo tanto, el semillero cumple con la norma de 0,3% de plantas con pie negro en categorías prebásica y 0,5% para la categoría básica.

b: Se rechaza la hipótesis nula y se concluye que el semillero no cumple con la norma de 0,3% de plantas con pie negro en categorías prebásica y 0,5% en la categoría básica.

En cuanto a pie negro se observa que casi todos los semilleros cumplen con las normas de certificación establecidas para cada categoría excepto el semillero 3, en ambos muestreos y el semillero 4, en el muestreo 2; cabe destacar que en estos semilleros se efectuó descarte de plantas, lo que ayuda a que el porcentaje de pie negro sea bajo. A pesar de esto último, se aprecia un aumento del porcentaje de pie negro en el muestreo 2.

En cuanto al potencial de infección latente, estas cifras son bastante altas, indicando que entre un 40 y 100% de los tubérculos muestreados tienen la bacteria presente, aun cuando estos tubérculos no provenían todos de plantas con síntomas de pie negro.

En estudios realizados por Bedin y Malet (1990), con el fin de detectar la importancia de los síntomas en el follaje según el grado de contaminación del tubérculo madre, obtuvo una amplia relación entre el uso de tubérculos madre de contaminación dudosa o positiva, y la alta infección de la descendencia de esta semilla, llegando al 30 y 50% de los tubérculos hijos por planta.

Se ha demostrado, además, que la incidencia de la enfermedad está correlacionada con el nivel de inóculo de la semilla (Aleck y Harrison, 1978), aun cuando el desarrollo de la enfermedad es afectado por otros factores, en particular, el nivel de humedad del suelo, lo que hace difícil predecir el nivel de enfermedad en un cultivo sobre la base del nivel de contaminación de la semilla (Bain y Pérombelon, 1987, citado por Pérombelon, 1987). Los resultados obtenidos, por lo tanto, dan un precedente del nivel de contaminación de los semilleros muestreados y la potencialidad del desarrollo de la enfermedad al presentarse condiciones adecuadas para su expresión, o bien frente a la exportación, ya sea de la región o del país, de la semilla con un alto potencial de inóculo presente.

En el Cuadro 2 se presenta el género de *Erwinia* identificado como causante de pie negro e infección latente en los semilleros prospectados. Al observar este Cuadro se aprecia que la principal bacteria aislada fue la *E. carotovora* ssp *atroseptica* (*Eca*). Solo en un caso se logró aislar *E. carotovora* ssp *carotovora* (*Ecc*). Ciampi y Passalacqua (1983), indican que en el sur de Chile están presentes las subespecies *Ecc* y *Eca*, con mayor abundancia de *Ecc* sobre *Eca*, además, dicen que tanto *Ecc* como *Eca* pueden causar indistintamente síntomas de pie negro en plantas y pudriciones húmedas en tubérculos. Pero, Pérombelon y Kelman (1980), indican que *Eca* está principalmente asociado al tallo. Al igual Elphinstone (1987) nombra a *Eca* como principal bacteria que ataca el cultivo de la papa en climas fríos a templados.

CUADRO 2. Bacterias del género *Erwinia* spp identificadas como causantes de pie negro en plantas e infección latente de tubérculos en semilleros de papa de las categorías prebásica (PB) y básica (B) en la X Región

TABLE 2. *Erwinia* spp bacteria identified as causal agents of black leg in potato plants and of latent infection in tubers from certified potato seed lots of prebasic (PB) and basic (B) categories in the X Region

Semillero	Categorías	Agente causal		
		Pie negro		Infección latente
		Muestreo 1	Muestreo 2	
1	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
2	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
3	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
4	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
5	PB	<i>Eca</i>	<i>Ecc</i>	<i>Eca</i>
6	B	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
7	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
8	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
9	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	+
10	PB	+	+	<i>Eca</i>
11	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
12	B	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
13	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
14	B	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
15	PB	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>
16	B	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>	<i>Eca</i>

+: Agente causal no aislado.

Eca: *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*.

Ecc: *Erwinia carotovora* ssp *carotovora*.

CONCLUSIONES

- Gran parte de los semilleros de papa en la Décima Región cumplen con las tolerancias impuestas por las normas de certificación de semilla para la enfermedad pie negro, las cuales son de 0,3% para las categorías prebásicas y 0,5% para las básicas.

- Existe un alto porcentaje de tubérculos semilla de papa que poseen la bacteria del género *Erwinia* spp en forma latente.

- La principal bacteria aislada de muestras de plantas de papa con síntomas de pie negro e infección latente en tubérculos semilla fue *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*.

RESUMEN

Una de las enfermedades que ataca el cultivo de la papa en Chile es el pie negro y la pudrición blanda, causada por la bacteria del género *Erwinia* spp. La principal fuente de diseminación de este problema es el tubérculo semilla infectado. Para valorar la incidencia de esta enfermedad en la X Región, se efectuó una prospección con los siguientes objetivos: a) Identificar el agente causal de pie negro e infección latente. b) Cuantificar el pie negro y determinar el potencial de infección latente en tubérculos de semilleros de papa.

Para llevar a cabo el estudio, se visitaron los semilleros de papa, contabilizándose las plantas que presentaban síntomas de pie negro. Al momento de la cosecha se recolectaron tubérculos y se evaluaron, en laboratorio, para potencial de infección latente. En ambos casos se aisló e identificó el agente causal mediante un medio de cultivo específico, pruebas bioquímicas y de patogenicidad.

Como resultado de este estudio se desprende que gran parte de estos semilleros cumplen con las tolerancias impuestas por las normas de certificación

de semilla para pie negro en papa, de 0,3% para las categorías prebásica y 0,5% para las básicas. En cuanto al potencial de infección latente, los porcentajes variaron entre un 40 y 100% en ambas categorías, implicando una alta cantidad de tubérculos-semilla que tiene la bacteria presente. La principal

bacteria aislada fue identificada como *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*.

Palabras claves: *Erwinia* spp, *Solanum tuberosum*, papa, enfermedades de plantas, bacteria, diagnóstico.

LITERATURA CITADA

- ALECK, J.R. and HARRISON, M.A. 1978. The influence of inoculum density and environment on the development of potato blackleg. *Amer. Potato J.* 55: 479-494.
- BAIN, R.; PEROMBELON, M.C., TSIOR, L. and NACHRIAS, A. 1987. Epidemiology and etiology of blackleg. *Rept. Scot. Crop. Res. Inst.* 1986. 163 p.
- BARTZ, J.A. and KELMAN, A. 1986. Reducing the potential for bacterial soft rot in potato tubers by chemical treatments and drying. *Amer. Potato J.* 63: 481-493.
- BARTZ, J. A. and KELMAN, A. 1985. Infiltration of lenticels of potato tubers by *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* under hydrostatic pressure in relation to bacterial soft rot. *Plant Disease* 69: 69-74.
- BEDIN, P. et MALET, M. 1990. Contribution a l'étude sur *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. 11 Triennial Conference of the European Association of Potato Research (EAPR), (Edinburgo, UK. Abstracts): p.: 446.
- CHILE, MINISTERIO DE AGRICULTURA, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. DIVISION DE PROTECCION AGRICOLA. 1991. Normas específicas de certificación de papas. SAG. Unidad Técnica de Semillas. Santiago, Chile. 9 p.
- CIAMPI, L. and ANDRADE, N. 1984. Preliminary evaluation of bacterial soft rot resistance in native chilean potato clones. *Amer. Potato J.* 61: 109-112.
- CIAMPI, L. y PASSALAGUA, P. 1983. Bacterias del género *Erwinia* (grupo *carotovora*) aislados de plantas y tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) *Fyton*: 43: 221-226.
- CUPPELS, D. and KELMAN, A. 1974. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* 64: 468-475.
- ELPHINSTONE, J. 1987. La pudrición blanda y la pierna negra de la papa, *Erwinia* spp. Centro Internacional de la Papa (CIP). Perú. Boletín de Información Técnica Nº 21. 18 p.
- FRENCH, E. 1983. Combate de la pudrición blanda y pierna negra causada por *Erwinia* spp y expectativas de resistencia. Seminario taller sobre bacterias de la papa. San José, Costa Rica. 5-9 septiembre 1983. 8 p.
- LAPWOOD, D.H. 1985. The ecology of the bacteria as it effects disease epidemiology association with potato tubers. In: Graham, D.C. and Harrison, M.D. (ed.). Report of the International Conference on Potato Association of American. 95 p.
- PEROMBELON, M.C. 1987. Ecology of *Erwinia* causing stem and tuber diseases. In: Bacterial Disease of the Potato. Report of the Planning Conference on bacterial diseases of the potato. International Potato Center (ed.). Lima, Perú. 243 p.
- PEROMBELON, M.C. 1974. The role of the seed tuber in the contamination by *Erwinia carotovora* of potato crops in Scotland. *Potato Res.* 17: 187-199.
- PEROMBELON, M.C. and KELMAN, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Am. Rev. Phytopathology* 18: 361-387.
- PEROMBELON, M.C.; GULLINGS-HANDLEY, J. and KELMAN, A. 1979. Population dynamics of *Erwinia carotovora* and pectolytic *Clostridia* in relation to decay of potatoes. *Phytopathology* 69: 167-173.
- SHAAK, N.W. (ed.). 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd. Edition. APS. Press. Minnesota. 164 p.