

INVESTIGACIÓN

DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE *Erwinia* (grupo *carotovora*) COMO AGENTES CAUSALES DE “PUDRICIÓN BLANDA” EN CALA (*Zantedeschia* spp.)

Determination of *Erwinia* species (*carotovora* group) as causal agents of “soft rot” in calla (*Zantedeschia* spp.)

Juan Pablo Kunstmann¹, Luigi Ciampi¹, *Laura Böhm¹, Sylvia Barrera¹ y Luis Collado¹

ABSTRACT

During the 2002 growing season a research was conducted in order to establish the causal agents responsible for “soft rot” in stems and tubers of calla (*Zantedeschia* spp.) in greenhouse productions in Southern Chile. In order to compare with local bacterial isolates, “soft rot” was induced in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers from commercial productions near the city of Valdivia. To establish differences in virulence, potato isolates were inoculated on calla tissues and viceversa. 33 isolates were determined to belong to the genus *Erwinia* (*carotovora* group) (*E.c.*) accordingly to the following characteristics: Gram (-), oxidase (-), potato rot (+). Complementary and more specific tests included, sensitivity to erythromycin, utilization of palatinose, reducing substances from sucrose, acid production from α -methyl glucoside and growth at 37°C. Finally, it was possible to identify two isolates of *E.c.* subsp. *atroseptica* and 21 *E.c.* subsps. *carotovora* isolated from calla plants tubers. There was no evidence of the phytopathogenic species *E. chrysanthemi* among the isolates studied, an indication that this bacterial pathogens is absent in Chile. This is the first report indicating that isolates of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* are affecting a new crop in Chile, such as calla. The cross inoculations performed demonstrated that virulence is more aggressive with isolates obtained from calla tissues. Chances that the isolates obtained from calla came from abroad are very high, and may interfere with local crops such as potato.

Key words: *Erwinia*, soft rot, calla, *Zantedeschia*.

RESUMEN

Durante la temporada 2002 se realizó una investigación para establecer los agentes causantes de pudriciones húmedas en tallos y tuberos de cala (*Zantedeschia* spp.) provenientes de producciones bajo invernadero en el Sur de Chile. Para comparar con cepas locales se realizaron aislamientos a partir de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) obtenidas de una producción comercial cerca de la ciudad de Valdivia. Para analizar las diferencias en virulencia, las cepas de papa fueron inoculadas sobre cala y viceversa. De los aislamientos bacterianos obtenidos se determinaron 33 pertenecientes al género *Erwinia* (grupo *carotovora*) (*E.c.*) de acuerdo a las siguientes características: Gram (-), oxidasa (-) y pudrición de rodajas de papa (+). Pruebas complementarias y más específicas incluyeron sensibilidad a la eritromicina, utilización de la palatinosa, sustancias reductoras a partir de sacarosa, producción de ácido a partir de α -metil glucósido y crecimiento a 37°C. Finalmente, fue posible identificar dos cepas de *E.c.* subsp. *atroseptica* y 21 *E.c.* subsp. *carotovora* de tuberos y plantas de cala. No hubo evidencia de la presencia de la especie fitopatógena *E. chrysanthemi* entre los aislamientos estudiados, una indicación que esta especie está ausente en Chile. Este es el primer informe sobre la presencia de aislamientos de la subespecie *atroseptica* afectando un nuevo cultivo como la cala en Chile. Las inoculaciones cruzadas demostraron que la virulencia es mayor con las cepas obtenidas de tejidos de cala. Las posibilidades que estas cepas sean foráneas son bastante altas, y pueden interferir con producciones de cultivos locales como la papa.

Palabras clave: *Erwinia*, pudrición húmeda, cala, *Zantedeschia*.

¹ Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Casilla 567, Valdivia, Chile. E - mail: lciampi@uach.cl *Autor para correspondencia.

Recibido: 11 de agosto de 2004. Aceptado: 30 de diciembre de 2004

INTRODUCCIÓN

La X Región de Chile es una zona que se caracteriza por presentar en gran parte una agricultura tradicional, sin embargo, en la actualidad se están explorando nuevos rubros productivos. Existen diversas empresas y agricultores que están invirtiendo e incursionando en el cultivo industrial de calas de colores (*Zantedeschia* spp.) para la producción de flores de corte. Nuevas y llamativas variedades son producidas para ser comercializadas, tanto a nivel nacional como internacional; el volumen de unidades se ha incrementado año tras año, como también la superficie plantada. A pesar que una importante parte de esta actividad se realiza al aire libre, el cultivo intensivo bajo plástico está incrementando. Algunas de estas explotaciones se han iniciado importando túberos desde el extranjero, implicando importantes inversiones iniciales.

A medida que las actividades de este rubro han ido avanzando en el tiempo, se ha podido establecer la presencia de factores que disminuyen su rentabilidad. Uno de ellos es la enfermedad que se presenta en túberos y base de tallos de plantas, conocida como “pudrición blanda”. Esta patología es universalmente atribuida a bacterias del género *Erwinia*, patógenos típicos causantes de este tipo de daños. De acuerdo a Wright y Burge (2000), Nueva Zelanda, nación que exporta un gran volumen de flores y túberos, sufre pérdidas anuales que alcanzan los dos millones de dólares.

La taxonomía del género *Erwinia* es compleja y está constituida por varios grupos. El más relevante es el grupo *carotovora* que se caracteriza por incluir la especie *E. chrysanthemi* (Ech) y las subespecies *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) y *E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca). De acuerdo a Hauben *et al.* (1998) éstas han sido clasificadas en el antiguo género *Pectobacterium*, como *P. chrysanthemi*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, sin embargo, esta nomenclatura no ha sido ampliamente aceptada por los fitopatólogos. Los síntomas causados por estas bacterias en túberos y base de los tallos son la clásica alteración enzimática de los tejidos, que se tornan blandos y húmedos. Asimismo, también como acción bacteriana se puede presentar una errática emergencia de los tallos y la posterior caída de los mismos. Otro síntoma, es el colapso del pedúnculo de la flor ya cortada durante el período

de postcosecha. Además, el tejido degradado y macerado por las *Erwinia* spp. bajo condiciones naturales es de consistencia blanda, de aspecto opaco, de color blanco y desprende un fuerte olor a podrido (Welsh, 1991; Dole y Wilkins, 1999).

En la actualidad, en Chile, y en particular en la X Región, no se han realizado estudios tendientes a determinar los agentes causantes de esta enfermedad. Como hipótesis de la presente investigación, se postula que las severas pudriciones de túberos y tallos de plantas de cala detectados en el sur de Chile son provocadas por especies de *Erwinia* pertenecientes al grupo *carotovora*. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue llevar a cabo procedimientos de aislamiento y diagnóstico bacteriológico para establecer los agentes responsables involucrados en el desarrollo de síntomas de “pudrición blanda”, en tejidos sintomáticos provenientes de túberos de cala de la X Región. Como objetivo secundario se realizaron comparaciones de virulencia entre aislamientos bacterianos provenientes de cala con aquellos que inducen similar patología en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las variedades y el número de túberos colectados con síntomas de pudrición en la localidad de Cayumapu, Valdivia (39°38' lat. Sur, 73°5' long. Oeste) fueron los siguientes: ‘Chianti’ (8), ‘Pot of Gold’ (8), ‘Sensation’ (12), ‘Florex Gold’ (8), ‘Majestic Red’ (7), ‘Aurora’ (10) y ‘Hot Shot’ (10). En Puerto Octay se obtuvieron 15 túberos de la variedad ‘Majestic Red’ y desde la Estación Experimental Santa Rosa de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, se colectaron dos túberos de una variedad no identificada. También se contó con dos muestras que presentaban tallos con pudrición blanda, la primera formada por 15 plantas de la var. ‘Hot Shot’, y la segunda por dos plantas de ‘Aurora’, ambas obtenidas de una plantación de calas de colores en las cercanías de Valdivia (Cayumapu). Para la obtención de aislamientos bacterianos causantes de pudriciones húmedas a partir de papa se utilizaron 20 tubérculos de papa cv. Desirée.

Medios de cultivo

El medio para realizar los aislamientos fue agar peptona (AP). Para determinar las pruebas de sen-

sibilidad a eritromicina se usó agar nutritivo adicionado con glucosa al 1%. Para detectar sustancias reductoras a partir de sacarosa se usó el medio sacarosa (MS). El medio levadura y sales (LS) se utilizó para determinar el crecimiento a 37°C y el medio oxidación/fermentación (O/F) para determinar la utilización de la palatinosa y del α -metil-glucósido. La composición y preparación de estos sustratos se realizó de acuerdo a Schaad (1994) y Pérombelon y Van der Wolf (1998).

Obtención de aislamientos bacterianos a partir de túberos de cala

Cada túbero se lavó con abundante agua corriente utilizando una escobilla suave, eliminando el tejido macerado. Los tejidos aún sanos y remanentes de cada uno, se desinfectaron en una solución comercial de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) durante 2 min. Luego, cada uno se sometió a tres enjuagues continuos en un recipiente conteniendo agua destilada estéril y se secó con papel absorbente estéril. En una cámara de flujo laminar se obtuvo con el asa de siembra un pequeño inóculo de la zona de avance de la pudrición de cada túbero. El inóculo se diluyó en tubos conteniendo 5 mL de agua destilada estéril. De éstos últimos se tomaron asadas que se sembraron por diseminación directamente en placas de AP, las que se incubaron durante 48 h en una cámara a 25-27°C. Se repicaron y purificaron las colonias bacterianas que presentaban características de *Erwinia*, y se guardaron en tubos de agar inclinados (AP) a 4°C.

Obtención de aislamientos a partir de tubérculos de papa

Se realizaron aislamientos bacterianos a partir de 20 tubérculos. Éstos se lavaron con abundante agua corriente y se limpiaron con una escobilla suave, luego de lo cual se aplicó durante 2 min un baño de hipoclorito de sodio al 5% (p/v) realizado a partir de una solución comercial compuesta de 50 g L⁻¹ de cloro. Luego, se secaron con papel secante estéril y se enterró una aguja flameada en 5-6 lenticelas. Cada tubérculo se cubrió íntegramente con papel absorbente estéril, se aplicó abundante agua destilada estéril, y finalmente se cubrió con tela plástica. Estos tubérculos se introdujeron en una bolsa de polietileno la que se cerró, se dejaron en una cámara de incubación durante 48 h a 25-27°C. Cuando parte de los tejidos de los tubérculos se tornaron blandos y macerados se utilizaron para realizar los respecti-

vos aislamientos. El procedimiento para la obtención de cultivos bacterianos puros fue idéntico al descrito anteriormente.

Obtención de aislamientos a partir de tallos de cala

En este caso se utilizaron tallos que presentaban síntomas de “pudrición blanda” en la base y cuello, los cuales se llevaron al laboratorio en bolsas de papel cerradas y se procesaron el mismo día. Se limpió la superficie con agua destilada estéril y mediante un bisturí flameado, se hizo un corte en la zona de avance de la pudrición, de la cual se extrajo un pequeño inóculo con una asa flameada. Éste se diluyó en agua estéril y luego se sembró por diseminación sobre placas AP y se incubó por 24-48 h en una cámara a 25-27°C. Los cultivos puros obtenidos se trataron igual que los procedimientos anteriores.

Proceso de identificación del género *Erwinia*

Este paso inicial se realizó con aquellos 58 aislamientos puros obtenidos de túberos de cala, base de tallos de plantas de cala y tubérculos de papa, cuyas características visuales de las colonias se asociaron al género *Erwinia*. Una vez transcurridas 24 y 48 h de desarrollo en AP, se comenzó corroborando a todos la pureza del cultivo, su morfología macroscópica y microscópica mediante tinción de Gram. Posteriormente se realizó la prueba de oxidasa. Finalmente, los aislamientos Gram (-) y oxidasa (-) se inocularon sobre rodajas de papa. Para realizar esta prueba se lavaron tubérculos sanos, con abundante agua y una escobilla suave, posteriormente se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5% durante 2 min, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y cada uno se secó con papel absorbente estéril. Éstos se cortaron en rodajas de 3 cm de grosor, y con un sacabocado estéril de 1 cm de diámetro se hizo un orificio en el cual se depositaron 400 μ L de la suspensión bacteriana a evaluar. Las rodajas de papa inoculadas se pusieron en una cámara húmeda e incubada a 26-28°C durante 48-72 h.

Determinación de especies y subespecies del grupo *carotovora* del género *Erwinia*

Aquellas cepas que en una primera etapa se clasificaron como pertenecientes al género *Erwinia*, se sometieron a pruebas bioquímicas y fisiológicas específicas. Éstas se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Schaad (1994) y Pérombelon y Van der Wolf (1998), y fueron: crecimiento

a 37°C, sensibilidad a la eritromicina, producción de sustancias reductoras a partir de sacarosa, utilización de la palatinosa y α -metil-glucósido.

Comparación del nivel de virulencia entre los aislamientos obtenidos desde cala con los obtenidos desde papa

Para comparar el nivel de la intensidad de la pudrición entre los aislamientos, primero se inocularon aquellos obtenidos a partir de tubérculos de papa y túberos de cala sobre rodajas de papa cv. Desirée. Posteriormente, se inocularon túberos de cala con los aislamientos de ambas procedencias. Se utilizaron 10 aislamientos obtenidos al azar provenientes de papa y 10 de cala. Para esta prueba se utilizaron 20 tubérculos y 20 túberos var. Aurora sanos, los que se lavaron con abundante agua corriente y una escobilla suave y se les aplicó durante 2 min un baño de hipoclorito de sodio al 5% (p/v) realizado a partir de una solución comercial compuesta de 50 g L⁻¹ de cloro, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, y se secaron con papel absorbente estéril.

Las suspensiones bacterianas se prepararon con cepas de 24 h de desarrollo, utilizando agua destilada estéril. Para igualar las concentraciones entre las distintas cepas se ajustó la suspensión a una densidad óptica a 600 nm igual a 1 (DO₆₀₀ = 1,0), equivalente a una población bacteriana de 1 x 10⁸ UFC mL⁻¹ (UFC: Unidades Formadoras de Colonias). Una vez listas las suspensiones bacterianas, con un sacabocado estéril se hicieron dos orificios de 0,5 cm de diámetro a cada tubérculo. En cada orificio se introdujeron 400 μ L de suspensión bacteriana. Una vez inoculados, túberos y tubérculos se envolvieron con parafilm, con el propósito de otorgar un ambiente de baja tensión de oxígeno favorable a las bacterias. El material inoculado se dispuso en cámaras húmedas durante tres días a 27°C. Al cabo de este período se evaluaron los resultados, para lo cual los 20 tubérculos y 20 túberos de cala se cortaron en forma vertical en la zona en la cual se realizó el orificio. Los aislamientos se catalogaron como de virulencia escasa, baja o alta, en base a la apreciación visual. Esta medición se realizó de acuerdo a la extensión que abarcó la pudrición en el tubérculo; se clasificó como escasa cuando se perdió menos de 15% del material debido a la maceración, baja cuando la pérdida comprendió entre 15 y 30%, y alta cuando fue superior a 30%. Asimismo se utilizaron controles inoculados con agua estéril.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo al esquema desarrollado en esta investigación, una cantidad importante de cultivos puros obtenidos inicialmente en este estudio (58), fueron sometidos a las pruebas preliminares para establecer el género. De ellos, 33 aislamientos cumplían con las características del grupo *carotovora* de *Erwinia* (bacilos Gram (-), oxidasa (-) y actividad pectinolítica (+) sobre papa). En agar peptona las colonias son redondas, pequeñas, levantadas, ligeramente translúcidas. Puede mencionarse que la pudrición de la rodaja refleja indirectamente una actividad enzimática degradadora de la pectina, siendo una de las características fundamentales y típicas de este género. Así también, la prueba de la oxidasa (-), ya que evita confusiones con posibles aislamientos de *Pseudomonas*, que generalmente son oxidasa (+). Todos resultaron ser bastoncitos, unicelulares, rectos y Gram (-).

Existen evidencias que las especies *E. chrysanthemi* y subespecies de *E. carotovora* (subsp. *carotovora* y subsp. *atroseptica*) causantes de pudriciones húmedas representan una seria y constante amenaza, altamente perjudicial para el cultivo de la cala. A este respecto, Corr (1993), Funnell y MacKay (1999), Kuehny (2000) y Wright y Burge (2000), señalan que esta patología constituye la mayor problemática de la producción comercial de *Zantedeschia* spp. Esta investigación, aunque no corrobora lo expuesto por los precedentes autores, es la primera evidencia para evaluar, en futuros trabajos, si constituye una amenaza seria para el cultivo. No obstante, por el grado de dispersión geográfica de las muestras utilizadas para realizar este estudio, *Erwinia* en cala podría constituirse en una enfermedad emergente para Chile.

En efecto, y de acuerdo a lo expresado por Wright (1994), es de vital importancia prevenir y controlar la “pudrición blanda bacteriana” en este cultivo. Esto se debe principalmente al precio de cada unidad productiva. El costo de adquisición de cada túbero oscila entre US\$ 1,0 a 1,5 en el extranjero, o su equivalente en el mercado nacional. Por otra parte, cada flor alcanza un valor entre US\$ 0,3 a 1,5 en el mercado internacional (Huber, 2003. Ingeniero Forestal, Bopar S.A. Comunicación personal).

El aspecto económico implicado es relevante, por cuanto, reponer en una unidad productiva comer-

cial una importante cantidad de túberos de cala que se pierden debido a “pudriciones blandas” durante el almacenaje o plantas durante el cultivo, afecta directamente la actividad económica de una empresa. Por lo tanto, establecer con claridad las causas responsables de las patologías es importante para generar sistemas de manejo y control.

El proceso para determinar las especies bacterianas involucradas en pudriciones húmedas tiene dos etapas. Una, es asignar a los aislamientos obtenidos el género taxonómico, para este caso el *Erwinia* spp. La segunda consiste en someter las cepas establecidas como *Erwinia* spp. en la primera etapa, a diferentes pruebas que permiten diferenciarlas en Ecc, Eca o bien Ech. De acuerdo a este esquema, las pruebas iniciales separan este género de otros, como son el *Pseudomonas* y *Bacillus*, y otros asociados a suelos y plantas. Las segundas, son aquellas que permiten separar a las tres *Erwinia* ya mencionadas.

Cabe señalar que el tipo de pudrición inducida por los cultivos puros sobre rodajas de papa puede variar en su aspecto, dependiendo de la especie involucrada, sea esta de *Erwinia*, *Pseudomonas*, o *Bacillus* (Goto, 1990). La pudrición causada por los representantes del grupo *carotovora* de *Erwinia* es profunda, brillante, de color blanco a pardo claro, y rodeada por un anillo negro. Todas las inoculaciones sobre rodaja de papa que se realizaron en la primera etapa correspondieron a este tipo de degradación.

La segunda etapa de este proceso de identificación etiológica, contempló la realización de las pruebas bioquímicas y fisiológicas específicas de caracterización a las 33 cepas determinadas como *Erwinia* spp. Del total de cepas, 19 se aislaron de túberos, cuatro de tallos florales y 10 de tubérculos de papa. Los resultados se presentan en el Cuadro 1. Éste resume las subespecies de *E. carotovora*, las cuales pueden estar presentes indistintamente, tanto en cala como papa.

Se detectaron dos cepas de Eca y 21 de Ecc afectando a túberos y tallos de cala. Por otro lado, de los aislamientos realizados a papa se determinaron siete Eca y tres Ecc. De acuerdo a estos resultados, se demuestra que ambas subespecies de *E. carotovora* se encuentran afectando a papa y cala como agentes causantes de pudriciones húmedas. Por otro lado, los resultados de estas pruebas no arrojaron eviden-

cias sobre la presencia de Ech, especie pectinolítica del grupo *carotovora* de *Erwinia*.

Estos resultados apoyan lo ya señalado por Ciampi (1990), quien indica que Ech no se encuentra en el territorio nacional. A este respecto se deben establecer estrictas normas tendientes a exigir certificados fitosanitarios al material de cala y papa que ingresa al país para excluir esta especie fitopatogena.

En Chile, los trabajos relacionados con patógenos causantes de pudriciones húmedas en cala son escasos. Besoain *et al.* (2002) encontraron que los agentes causantes de “pudrición blanda” en el valle de Quillota se concentran en una sola especie bacteriana: *E. carotovora*. A pesar de constituir el único estudio realizado a este respecto, no se entregan mayores evidencias etiológicas, ni se ahonda en subespecies u otras posibles especies pectinolíticas.

La información obtenida en la presente investigación clarifica hasta ahora el panorama etiológico de estas bacterias fitopatogénas sobre cala. La presencia de cepas de Eca como causantes de pudriciones en túberos de cala implica que esta subespecie no está circunscrita solamente a papa. Efectivamente, Eca se ha asociado normalmente al género *Solanum*, y más directamente a la sintomatología descrita como “pie negro” en la base de tallos de plantas de papa. El presente trabajo describe por primera vez para el país, la presencia de Eca en un nuevo hospedero, como la cala. Se debe recalcar que la contaminación de partes vegetales por Ecc y Eca es casi inevitable y ocurre mayoritariamente en zonas superficiales en lenticelas y tejidos suberizados (Pérombelon y Van der Wolf, 1998).

Por otra parte, la presencia de una gran cantidad de cepas de Ecc confirma la capacidad de esta subespecie para afectar a una mayor variedad de hospederos que Eca, la cual está circunscrita a papa provocando “pie negro” (Agris, 1997). Esta diferencia en rangos que manifiesta Ecc por sobre Eca es clásica e implica serias complicaciones en las unidades productivas que no disponen de espacio para realizar rotaciones, como lo constituyen los invernaderos. Este aspecto debe ser tomado en consideración, para enfrentar “pudriciones húmedas” en un monocultivo, ya que la enfermedad incrementa su agresividad año tras año. Las determinaciones de Ecc y Eca realizadas en este trabajo coinciden plenamente con las descripciones de Schaad (1994) y Seo *et al.* (2003).

Cuadro 1. Utilización de palatinosa, α -metil glucósido, producción de sustancias reductoras a partir de sacarosa, sensibilidad a eritromicina y crecimiento a 37°C, de 33 aislamientos de *Erwinia* spp. obtenidos a partir de tuberos y tallos de cala y tubérculos de papa.

Table 1. Utilization of palatinose, α -methyl glucoside, production of reducing substances from sucrose, sensibility to erythromycin and growth at 37°C, of 33 isolates of *Erwinia* spp. obtained from tubers and stems of calla and potato tubers.

Origen	Aislamiento	Utilización de palatinosa	Utilización de α -metil - glucósido	Sensibilidad a eritromicina	Sustancias reductoras de sacarosa	Crecimiento a 37° C	Subespecie
Aislamientos obtenidos a partir de tuberos de cala							
Puerto Octay	I	-	-	-	-	+	Ecc
"	II	-	-	-	-	+	Ecc
"	III	-	-	-	-	+	Ecc
"	IV	-	-	-	-	+	Ecc
Cayumapu	2.2	-	-	-	-	+	Ecc
"	2.3	-	-	-	-	+	Ecc
"	2.5	-	-	-	-	+	Ecc
"	2.6	-	-	-	-	+	Ecc
"	2.7	-	-	-	-	+	Ecc
"	2.8	-	-	-	-	+	Ecc
"	3	+	+	-	+	-	Eca
"	B1	+	+	-	+	-	Eca
"	B2	-	-	-	-	+	Ecc
"	C	-	-	-	-	+	Ecc
"	D	-	-	-	-	+	Ecc
"	F	-	-	-	-	+	Ecc
"	G	-	-	-	-	+	Ecc
"	H	-	-	-	-	+	Ecc
Sta. Rosa	2	-	-	-	-	+	Ecc
Aislamientos obtenidos a partir de tallos de cala							
Cayumapu	1 T	-	-	-	-	+	Ecc
"	2 T	-	-	-	-	+	Ecc
"	3 T	-	-	-	-	+	Ecc
"	4 T	-	-	-	-	+	Ecc
Aislamientos obtenidos a partir de tubérculos de papa							
Paillaco	1	+	+	-	+	+	Eca
"	2	+	+	-	+	+	Eca
"	3	-	-	-	-	+	Ecc
"	4	+	+	-	+	+	Eca
"	5	+	+	-	+	+	Eca
Los Lagos	6	+	+	-	-	+	Ecc
"	7	+	+	-	+	+	Eca
"	8	+	+	-	+	+	Eca
"	9	+	+	-	-	+	Ecc
"	10	+	+	-	+	+	Eca

- = prueba negativa, + = prueba positiva,

Ecc = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; Eca = *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*.

Otra fase de esta investigación consistió en seleccionar al azar 10 cepas de *Erwinia* aisladas de papa y compararlas en su agresividad con otras 10 provenientes de calas. Un sistema similar al de este trabajo fue utilizado por Lapwood y Read (1985) para evaluar susceptibilidad de cultivares de papa a *Erwinia*. Todas estas cepas fueron utilizadas en inoculaciones cruzadas. Los resultados fueron claros y se presentan en el Cuadro 2. Se aprecia que las cepas provenientes de cala son más virulentas que aquellas aisladas de papa. El daño se manifiesta tanto en un avance más rápido de la pudrición como en una mayor agresividad hacia los tejidos, indistintamente sean de papa o cala.

Existe una alta posibilidad que sean foráneas las cepas más agresivas, y que originalmente fueron aisladas de *Zantedeschia* spp. Los tuberos y tallos utilizados para realizar los aislamientos se usaban por primera vez en una explotación comercial en Chile y eran provenientes de Nueva Zelanda. Es conocida la capacidad de dispersión por todo el mundo de agentes fitopatógenos en órganos como los utilizados en esta investigación (Ciampi, 2002). Para confirmar este hecho sería recomendable, en trabajos futuros, realizar pruebas moleculares para diferenciar con más precisión el origen de las cepas, debiéndose contar con cultivos de *Erwinia* que sean realmente foráneas.

Es relevante que los aislamientos obtenidos a partir de tubérculos de papa, es decir, patógenos presentes en los suelos y cultivos chilenos, hayan mostrado una virulencia menor a la presentada por los aislamientos obtenidos de cala. La mayor virulencia de las cepas provenientes de cala se debería principalmente a la pobre rotación que se realiza para este cultivo en Nueva Zelanda (Vanneste y Cornish, 1995), y donde esta enfermedad es realmente grave (Wright, 1998). Por tratarse de un cultivo de invernadero la rotación es complicada e impracticable. Por otro lado, el hecho de utilizar un suelo con el mismo cultivo durante varios años, determina que las poblaciones de patógenos se hagan cada vez más virulentas y se incrementen en número en los tejidos y suelo. Esta realidad ha planteado un manejo integrado y una agricultura de precisión para minimizar los impactos de los sistemas agrícolas intensivos (Welbaum *et al.*, 2004). A este respecto se reconoce que *E. carotovora* tiene una tendencia a perpetuarse como saprófito en el suelo y a estar presente en tejidos vegetales en forma asintomática (Goto, 1990; Pérombelom, 2002).

Todos estos antecedentes deben constituir un aviso, ya que se está frente a microorganismos que no solamente pueden causar daño a la producción de flores de corte de cala, sino también a otras, tales como el cultivo de la papa, el cual tiene gran relevancia en la X Región de Chile. Este problema puede llegar a alcanzar gran magnitud e importancia fitosanitaria, debido al gran volumen de material propagativo vegetativo de tuberos de cala que Chile importa desde países como Holanda y Nueva Zelanda.

Cuadro 2. Intensidad de virulencia presentada por los aislamientos obtenidos a partir de cala y de papa al ser inoculados en tejidos de tubérculos de papas y en tuberos de cala sanos.

Table 2. Level of virulence presented by the isolates obtained from calla and potato after being inoculated on potato and calla healthy tissues.

	Nivel de virulencia en tubérculos de papa	Nivel de virulencia en tuberos de cala
Aislamientos obtenidos desde tubérculos de papa		
1 Eca	+	-/+
2 Eca	+	-/+
3 Ecc	+	-/+
4 Eca	-	-/+
5 Eca	+	-/+
6 Ecc	++	-/+
7 Eca	+	-/+
8 Eca	-	+
9 Ecc	+	-/+
10 Eca	+	-/+
Aislamientos obtenidos desde tuberos de cala		
B ₁ Eca	-	-/+
F Ecc	-	-/+
C Ecc	+	++
3T Ecc	+	++
B ₂ Ecc	++	++
2.2 Ecc	++	++
2.3 Ecc	++	++
3 Eca	+	++
2.5 Ecc	+	++
I Ecc	++	++

-/+ = Escasa virulencia.

+ = Baja virulencia (entre 15 y 30% del material inoculado se pierde debido a la maceración).

++ = Alta virulencia (más del 30% del material inoculado se pierde debido a la maceración).

Ecc = *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; Eca = *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*

CONCLUSIONES

Los estudios bacterianos realizados a partir de tejidos de túberos de plantas y tallos de cala y de tubérculos de papa permitieron determinar 33 cepas como pertenecientes a *Erwinia* spp. grupo *carotovora*. Todos los aislamientos obtenidos a partir de tallos de cala resultaron ser *E. c.* subsp. *carotovora* (4). Aquellos provenientes de túberos de cala fueron *E. c.* subsp. *atroseptica* (2) y *E. c.* subsp. *carotovora* (21). Los obtenidos a partir de tubérculos de papa correspondieron a *E. c.* subsp. *atroseptica* (7) y *E. c.* subsp. *carotovora* (3).

Se determinó por primera vez en Chile que cepas de *E. c.* subsp. *atroseptica*, que son típicas causantes de "pie negro" en plantas de papa, se encuentran afectando a un nuevo hospedero como la cala. Los mismos resultados indican que dentro del material analizado no se encuentra la bacteria fitopatógena pectinolítica *E. chrysanthemi*, especie que no está

presente en el territorio nacional, debiéndose tomar resguardos de exclusión para prevenir su ingreso.

Se pudo establecer que las cepas pectinolíticas de *Erwinia* aisladas de tallos y túberos de cala son mucho más agresivas y virulentas que las de tubérculos de papa.

De acuerdo a los resultados obtenidos se vislumbra que *Erwinia* puede constituirse en una limitante para el cultivo de cala, tal como lo es en el de papa, en particular, en aquellas producciones bajo plástico, ya que las temperaturas son más altas y favorables para estas bacterias. En este sentido, es recomendable adquirir túberos de calas libres de patógenos y derivados de cultivos meristemáticos *in vitro*. Asimismo, se deben evitar las plantaciones tardías en invernadero, de manera de no entrar a las épocas primaverales con sustanciales incrementos de temperatura que estresan a la planta y favorecen la expresión de *Erwinia*.

LITERATURA CITADA

- Agrrios, G. 1997. Plant pathology. 635 p. 4th ed. Academic Press, New York, USA.
- Besoain, X., M. Saavedra, G. Verdugo, E. Briceño, L. Baeza, y G. Chain. 2002. Pudrición blanda cremosa de la cala de color (*Zantedeschia* sp.). p. 78. XII Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología, Puerto Varas, Chile. 8-7 oct. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, CRI Remehue, Osorno, Chile.
- Ciampi, L. 1990. Enfermedades bacterianas del cultivo de la papa: Aspectos etiológicos, epidemiológicos y control. p. 55-79. IV Curso Internacional de Producción y Almacenamiento de Papa INIA - CIP - PNUD, Osorno, Chile.
- Ciampi, L. 2002. Introducción a la patología vegetal. 232 p. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Valdivia, Chile.
- Corr, B. 1993. *Zantedeschia* research in the United States, past, present and future. Acta Hort. 337:177-187.
- Dole, M.J., and H.F. Wilkins. 1999. Floriculture, principles and species. 613 p. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Funnell, K.A., and B.R. MacKay. 1999. Directions and challenges of the New Zealand calla industry, and the use of calcium to control soft rot. p. 30-40. In Sheen T-F, Chen J-J, Yang T-C and Liu M-C (eds.) The International Symposium on Development of Bulbous Flower Industry. Taiwan Seed Improvement and Propagation Station (TSIPS). Taiwán.
- Goto, M. 1990. Fundamentals of bacterial plant pathology. 342 p. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Hauben, L., E. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck, and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Syst. Appl. Microbiol. 21:384-397.
- Kuehny, J. 2000. Calla history and culture. Hort Technology 10:267-274.
- Lapwood, D.H., and P.J. Read. 1985. A simplified slice method for assessing tuber susceptibility of potato cultivars to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Plant Pathology 34:284-286.
- Pérombelon, M.C.M., and J.M. Van der Wolf. 1998. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes. Occasional Publication Nº 10. 76 p. Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, Scotland.
- Pérombelon, M.C.M. 2002. Diseases caused by soft rot erwinias: an overview on pathogenesis. Plant Pathology 51:1-12.
- Seo, S.T., N. Furuya, C.K. Lim, Y. Takamami, and K. Tsuchiya. 2003. Phenotypic and genetic characterization of *Erwinia carotovora* from mulberry (*Morus* spp.). Plant Pathology 52:140-146.

- Schaad, N.W. 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 164 p. 2nd ed. The American Phytopathological Society Press, Saint Paul, Minnesota, USA.
- Vanneste, J., and D. Cornish. 1995. Development of quantitative bioassay to study the interaction between biological control agents and soft rot *Erwinia*. Proceedings of the 48th New Zealand Plant protection Conference. Hastings, 8-10 August, N. Zealand. p. 354.
- Welbaum G., A. Sturz, Z. Dong, J. Nowak. 2004. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro ecosystems. *Critical Reviews in Plant Science*. 23:175-193.
- Welsh, T. 1991. The New Zealand calla. Combined Proceedings International Propagators Society 41:478-484.
- Wright, P. J. 1994. Controlling soft rots in callas. Available at <http://www.crop.cri.nz/psp/articles/docs/callarot.htm> Accessed 26 April 2003.
- Wright, P.J. 1998. A soft rot of calla (*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*. N. Z. J. Crop Hortic. Sci. 26:331-334.
- Wright, P.J., and G.K. Burge. 2000. Irrigation, sawdust mulch, and enhance biocide affects soft rot incidence, and flower and tuber production of calla. N. Z. J. Crop Hortic. Sci. 28:225-231.