

NOTA DE INVESTIGACION

***Bacillus polymyxa* AGENTE DEL TIZON FOLIAR DE *Pelargonium* spp.
EN INVERNACULOS, EN CORRIENTES, ARGENTINA.**

Cabrera, María G., Álvarez, Roberto E y Sosa López, Ángela A.
Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE.

RESUMEN

En cultivos de plantas ornamentales en la provincia de Corrientes se observaron plantas de malvón (*Pelargonium* spp.) con síntomas de manchas foliares rodeadas por clorosis. A lo largo del estudio se determinó en forma persistente la presencia de los síntomas en las plantas de malvón, asociados a la presencia de bacterias, de sus tejidos por lo que se decidió determinar su identidad. En la revisión de antecedentes se encontró escasa información referida a problemas patológicos en malvón. Se realizaron aislamientos y pruebas de patogenicidad con resultados positivos. Se hicieron los estudios de caracterización del patógeno aislado, y la identificación indicó que el microorganismo causante de la enfermedad bacteriana del malvón en Corrientes, es *Bacillus polymyxa*. Este patógeno no se encuentra informado en la bibliografía Argentina consultada, resultando esta una primera cita para el país.

Palabras clave: *Bacillus polymyxa*, *Pelargonium* spp, Tizón foliar.

SUMMARY

The aim of this paper was to know of ethiology of florist's geranium (*Pelargonium x hortorum* and *P. x domesticum*) disease. The disease was observed repeatedly in ornamental's greenhouses of Corrientes, Santa Rosa and Saladas cities. The plants showed necrotic symptoms. The spots on edges of the leaves as enlarged lesions, and progressive yellowing of the lower leaves. After study the disease plants, a bacterium pathogen was isolated. The symptoms was produced at high temperatures and humidity. For this purpose trials were made with isolated bacterial strain. The isolate obtained was used in pathogenity tests with the following inoculations methods: spraying a bacterial suspension on the surface of the leaf; cotton rubed inoculation through the adaxial surface of leaf and hypersensitivity test was applied. The laboratory assays with biochemical and cultural tests were applied for the pathogen characterization. The results confirmed the identification as *Bacillus polymyxa* Prazmowski y Macé. The bacterial disease of florist's

geranium caused by *B. polymyxa* is reported for the first time in Argentina.

Key words: *Bacillus polymyxa* - *Pelargonium* spp. - bacterial disease.

INTRODUCCION

El cultivo de plantas ornamentales y florales ha cobrado gran impulso en los últimos años en el país, en particular en la década del 90. En la provincia de Corrientes existen numerosas explotaciones comerciales destinadas a este fin. Si bien no existen cifras oficiales al respecto, se estima en más de 500 hectáreas la superficie ocupada por cultivos ornamentales protegidos. A esto se debe agregar la multiplicación de viveros y productores de dichos cultivos emplazados en la ciudad Capital y alrededores y en los Departamentos de Concepción y Saladas (58-59° Longitud Oeste y 28-29° Latitud Sur). Las condiciones ambientales, cálidas y de humedad elevada de la región Noreste Argentino (NEA), favorecen la presencia de numerosos organismos patógenos de plantas. El clima en esta región es subtropical húmedo, con lluvias abundantes y temperaturas templada a templada-cálidas durante la mayor parte del año. Esta situación se potencia en el microclima que caracteriza a los invernáculos de la zona, dificultando su manejo y creando condiciones muy propicias para determinados tipos de enfermedades. En reconocimientos realizados en el área mencionada, se constató la producción y venta de distintas especies de plantas de ornato, encontrándose entre las más importantes el malvón (*Pelargonium* spp L'Hérit.), *Geraniaceae*.

Con el fin de evaluar la situación fitosanitaria de especies ornamentales, en la provincia se realizaron reconocimientos periódicos en florerías y viveros de la ciudad de Corrientes y de las localidades de Santa Rosa, Saladas y Tabay, observándose con frecuencia, aún en las bocas de expendio, que las plantas de malvón híbridos (*Pelargonium x hortorum* L. H. Bailey y *P. x domesticum* L. H. Bailey) presentaban severos síntomas de una enfermedad de posible origen bacteriano (Daughtrey, et al. 1995,

Fernández Valiela, 1975; Index of plant Diseases in the Unites States. 1960; Marchionatto, 1950).

En la bibliografía disponible hay escasas referencias de enfermedades bacterianas que afectan plantas de malvón, además de algunas producidas por hongos. (Daughtrey, *et al.* 1995., Index of plant Diseases in the Unites States., 1960; Marchionatto, 1950). Esta información indica a varios géneros y especies bacterianas como posibles causantes de enfermedad con síntomas similares (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia* y *Ralstonia* spp.).

El objetivo del trabajo fue determinar la etiología de la enfermedad que afecta al malvón (*Pelargonium* spp.), y caracterizarla bajo los aspectos de su sintomatología y epidemiología.

MATERIALES Y METODOS

En el transcurso de tres años se realizaron 36 reconocimientos de viveros y florerías de las localidades de Corrientes, Santa Rosa, Saladas y Tabay donde se recolectaron 170 muestras enfermas de plantas de malvón (*Pelargonium x hortorum* y *P. x domesticum*). También se recolectó material de predios particulares y paseos de la ciudad de Corrientes y alrededores.

Se tomaron entre 5 y 6 muestras de hojas del hospedante con síntomas, en cada reconocimiento.

Los métodos y técnicas empleadas son las de uso común para el estudio de enfermedades parasitarias de plantas (Bradbury, 1994; Buchanan y Gibbons, 1974; French, 1989; Halperin, 1975; Marchionatto, 1950). Se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas de cada muestra (con microscopio estereoscópico 35 x, y microscopio compuesto 600 x), montando el material en una gota de agua destilada estéril y/o agua peptonada.

Para identificar la causa patológica se realizaron aislamientos en placas de Petri, partiendo de trozos de hojas con síntomas de la enfermedad, de 0,5 cm² aproximadamente, los que previamente fueron desinfectados con alcohol, pasándolos luego por hipoclorito de sodio al 2,5%, enjuagando finalmente en agua destilada estéril.

El medio de cultivo utilizado para las siembras fue agar papa glucosado (APG) al 2%, pH 7. Las cajas sembradas se incubaron en estufa de cultivo a temperatura constante de 27°C durante 48 horas.

Para la obtención de aislamientos puros se realizaron diluciones de las cepas así obtenidas, pasándolas a tubos con agua destilada estéril, con relaciones 1:10; 1:100; 1:1000 y 1:10.000. Los tubos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante una hora y se procedió a estriar cada

dilución en placas del mismo medio APG, incubándolas del mismo modo.

Para conocer el comportamiento patogénico de las cepas aisladas, se procedió a cumplir con los Postulados de Koch, de la siguiente manera:

Como hospedantes se usaron plantas de malvón variedad Orbix F1 Mix, (mezcla de 14 colores), de 3-4 meses de edad, cultivadas en macetas.

El inóculo utilizado en las pruebas experimentales se preparó raspando con un ansa estéril la masa bacteriana de 48 horas de desarrollo en tubos inclinados en pico de flauta con el mismo medio APG, y se las diluyó en tubos con agua destilada estéril, con relación 1:1000, agitándolos hasta observar una opacidad homogénea de la suspensión.

Métodos de Inoculación.

A fin de determinar el modo de penetración al hospedante se emplearon los siguientes métodos de inoculación (Bradbury, 1994; Schaad, 1988). Tratamiento 1 (T1)- Aplicación superficial de la suspensión bacteriana frotando con hisopo de algodón.

Tratamiento 2 (T2)- Por aspersion de una suspensión acuosa de bacterias.

Tratamiento 3 (T3)- Infiltración subepidérmica con jeringa hipodérmica (a la manera de test de hipersensibilidad).

Se realizaron tratamientos Testigo (T0) para cada caso, empleando agua destilada estéril en reemplazo de la suspensión de bacterias.

Cuando el método de inoculación fue con hisopo (T1), el mismo fue embebido con la dilución bacteriana para luego pasarlo por la superficie de las hojas.

En el método por aspersion (T2), la dilución bacteriana fue vertida en un aspersor multiuso para la distribución de la misma sobre la superficie de las hojas.

Para inocular por infiltración (T3), se empleó una jeringa descartable de 1 ml, inyectando el inóculo directamente al interior de los tejidos foliares de las plantas.

Las pruebas se realizaron con material esterilizado, en la mayor asepsia posible.

Previamente a la inoculación parte de las hojas fueron laceradas suavemente, frotando con ligera presión entre los dedos pulgar e índice, para favorecer la entrada de las bacterias al producirse heridas microscópicas. Este método se implementó, al comprobarse en una prueba preliminar, que la laceración con polvo de *carborundum* de 100 mallas es agresiva, y daña a las hojas.

Las inoculaciones se realizaron sobre las hojas, empleando para cada tratamiento el siguiente esquema: 8 hojas fueron inoculadas en su cara adaxial y otras 8 hojas en la cara abaxial. Se

inyectó 1 ml de la suspensión bacteriana distribuido en tres lugares del limbo. Se protegió la herida con un pequeño apósito de algodón humedecido sujeto con cinta engomada, para evitar desecación o contaminaciones con otras bacterias.

Cada tratamiento se realizó por duplicado y con una planta testigo.

Veinticuatro horas antes, las plantas fueron rociadas con abundante agua y cubiertas con bolsas de polietileno para crear un ambiente saturado de humedad. Luego de realizadas las inoculaciones se cubrieron nuevamente manteniéndolas en invernáculo hasta la aparición de los primeros síntomas.

De las plantas con reacción positiva se aisló la cepa patógena del mismo modo que para el aislamiento inicial.

Para la caracterización del patógeno se utilizaron los métodos propuestos por Halperín (1975) y Schaad (1988).

Para conocer características fisiológicas y bioquímicas del organismo patógeno se realizaron pruebas *in vitro* con la cepa patógena siguiendo a los mismos autores y algunas innovaciones de Bradbury (1994). Para la identificación se utilizaron los trabajos de Bradbury (1986, 1994); Buchanan y Gibbons, (1984); Fernández Valiela, (1950); y French, (1989).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los síntomas más conspicuos observados en forma continua afectando a las plantas de malvón, fueron grandes áreas necrosadas, irregulares, de coloración castaño amarillento, extensivas, casi siempre desde los márgenes foliares hacia el centro, rodeadas de una amplia zona clorótica, en las hojas inferiores de la planta. Inicialmente tienen aspecto húmedo, adquiriendo más tarde consistencia acartonada y quebradiza, al evolucionar la enfermedad. Esta ocasiona la muerte de las hojas las que en principio se mantienen péndulas y luego se produce defoliación ascendente.

Las plantas muy enfermas con aspecto de deterioro notable en la mayor parte de las hojas más jóvenes, ya estaban defoliadas en su parte inferior.

En cortes histológicos se observó abundante presencia de bacterias en relación a los tejidos lesionados.

Las extensas áreas cloróticas indicaban presencia de toxinas, por lo que al principio se pensó en la posible presencia de *Pseudomonas syringae* (Daughtrey, *et al.* 1995), pero la defoliación intensa de las hojas inferiores hacían presuponer que también podría tratarse de *Xanthomonas*

campestris pv. *pelargonii* (Brown) Dye, Daughtrey, *et al.* (1995). Estos aspectos de la sintomatología descritos por otros autores sin embargo son contradictorios pues las plantas infestadas con *P. syringae* manifiestan aspecto clorótico casi generalizado, lo cual no sucedía con las plantas observadas en Corrientes, mientras que en las infecciones con *X. c.* pv. *pelargonii* se describe finalmente una sistematización con marchitamiento de las plantas enfermas, síntoma éste que tampoco coincidía con lo observado en las plantas en estudio. Este patógeno es polífago ostentando un amplio rango de hospedantes y se cita a *Pelargonium x hortorum* como uno de ellos, (Daughtrey, *et al.*, 1995). Ambos géneros bacterianos son Gram negativos pero las cepas aisladas manifestaron variaciones que dificultaron su identificación.

La misma bibliografía refiere que los síntomas causados por *P. syringae* van Hall son indistinguibles de los ocasionados por *P. cichorii* (Swingle) Stapp, sobre el mismo hospedante, excepto la variabilidad que manifiesta este último patógeno ante cambios en las condiciones del medio ambiente, lo cual dificulta su identificación etiológica.

Las diferencias entre lo descrito en la bibliografía y lo observado en los materiales enfermos, radica principalmente en que los síntomas causados por el patógeno *P. cichorii*, se inician como manchas puntiformes oscuras y coalescentes en cualquier parte de las hojas y días más tarde se rodean de halos cloróticos y en las muestras siempre la clorosis fue simultánea a la necrosis. Sin embargo en regla general los síntomas ocasionados por los tres patógenos mencionados se asemejan al final del proceso patológico.

Ante tal situación se aislaron los microorganismos para luego realizar las pruebas de patogenicidad y la posterior identificación patógena. Se realizaron 28 aislamientos de bacterias de colonias con características similares.

Se realizaron pruebas de patogenicidad en cinco oportunidades, con 10 cepas seleccionadas de las 28 iniciales, de las cuales dieron patogenicidad positiva cinco cepas. Las pruebas se llevaron a cabo entre los meses de octubre y noviembre, observándose clara reacción recién a los 25 días de la inoculación, coincidiendo con la época de temperaturas más altas lo cual indicaría que las óptimas para el desarrollo del patógeno son temperaturas elevadas, pero en general oscilaron por debajo de 30 °C, las que pudieron influir en el desarrollo más lento de los síntomas.

En la experiencia, las plantas inoculadas por aspersión presentaron en la cara abaxial síntomas semejantes a los observados en plantas naturalmente infectadas, asemejándose bastante a la descripción ofrecida por Daughtrey et al. (1995) al describir como agente a *X. c. pv. pelargonii*, cuya sinonimia además es confusa, de acuerdo a Bradbury (1986, 1994).

Xanthomonas pv. pelargonii es mencionada como patógeno específico de *Pelargonium* y *Geranium* spp. Las diferencias básicamente estriban en que este patógeno ocasiona podredumbre de tallos y marchitamiento, lo cual no se observó en la enfermedad estudiada y en su característica de tinción Gram negativos. Tampoco se observaron exudaciones bacterianas notables.

Las pruebas de hipersensibilidad en hojas manifestaron síntomas a las 48 hs.

En la caracterización del patógeno se observó un bacilo de extremos redondeados, móvil, aunque se observaron células inmóviles, de 0,5 x 2,5 µm, Gram positivo o variable. En la reacción de KOH al 3 % no formó hilo mucoso, confirmando la reacción positiva de Gram. De acuerdo a Schaads (1998) el género es variable en su comportamiento a esta reacción lo cual coincide con las características del patógeno aislado.

El contraste con tinta china muestra delgada refringencia alrededor de las células, pero no se observó cápsula.

Debido a que ciertas especies bacterianas, en particular de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*, producen elementos de resistencia denominados esporas o endoesporas que se forman dentro de la célula a razón de una por célula, cuyo origen es por condensación citoplásmica y formación de gruesas paredes, se realizó su tinción para ponerlas de manifiesto (Schaads, 1998).

A diferencia de la célula vegetativa que la produce, la spora es muy resistente a condiciones adversas tales como alta temperatura, baja humedad, radiaciones y agentes químicos. Es una forma de vida latente que puede permanecer largos períodos como tal y cuando desaparecen las condiciones adversas pueden germinar. Las esporas observadas fueron variables también en su forma de globosas a casi bacilares oblongas en un extremo de la célula.

El desarrollo de la bacteria patógena en medio APG (Fig. 1), formó colonias de bordes lisos, convexas, aspecto cremoso, brillante de color blanco-amarillento; en medio nutritivo (AN) produjo colonias de bordes levemente ondulados, superficie plana, aspecto oleoso, brillante, de color crema que se oscurece con el tiempo, características que coinciden con la descripción

de Buchanan y Gibbons (1974) para el género *Bacillus*.

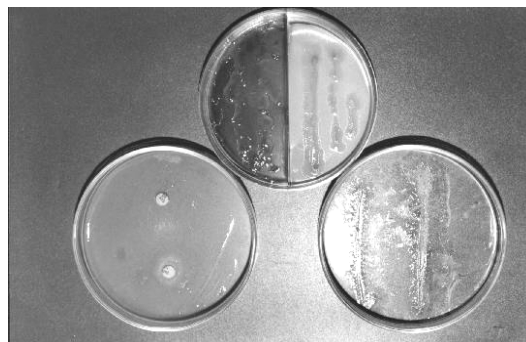


Figura 1: Comportamiento de *B. polymyxa* en APG, YDC y AN, (de derecha a izquierda).

En medio YDC (levadura, dextrosa, calcio) hubo desarrollo de colonias grandes, de color crema, de forma irregular, parte central redondeada, bordes planos, más lisas y brillantes en el centro, con resultado de "Levan" positivo. En medios líquidos, en los tubos de ensayo se produjo hidrólisis de gelatina infundibuliforme, lenta, dejando pequeño depósito en el fondo del tubo con gelatina sin digerir a las 72 hs, continuando la digestión lenta al pasar los días resultando un líquido transparente sobrenadante.

En cuanto al uso de sustratos naturales, la inoculación en rodajas de papa produjo putrefacción blanda de consistencia cremosa. Sobre cada disco se observó crecimiento abundante de bacterias. Finalmente se produjo digestión total por actividad enzimática, con producción de olor fuerte y picante.

En otros sustratos vegetales, entre 24-36 hs hubo escasa reacción, pero a las 72 hs se observó podredumbre total de hojas de lechuga. En catáfilas de cebolla la reacción positiva se manifestó por el aspecto traslúcido de los tejidos, debido a la invasión total por la bacteria. Hubo formación de mucosa sobre la superficie pero no desintegración de tejidos, con desprendimiento de olor acre.

La prueba de Oxido/Fermentación dio positivo en el tubo sin aceite, indicando condición de organismo aerobio, desarrollando color amarillo en el medio (reacción ácida) y crecimiento superficial sin burbujas (no fermentación). Estos resultados coinciden con los ofrecidos por Bradbury, (1994); Buchanan y Gibbons, (1974) para *Bacillus* sp

En condición de anaerobiosis (tratamiento con aceite), no hubo desarrollo, ni reacción: no oxidó ni fermentó. Esto indica que la bacteria requiere oxígeno libre para su crecimiento, a diferencia de lo mencionado por estos autores.

La cepa es nitrato reductasa negativa (el medio siguió transparente, ya que el organismo no reduce nitratos a nitritos), resultado también diferente a los aportados por Fernández Valiela, (1975); French, (1989).

La reacción de Amilasa fue positiva, provocando decoloración del medio y la de Catalasa positiva (+) con efervescencia. La prueba de hemólisis resultó positiva por presencia de un halo decolorado alrededor de la colonia en agar sangre.

La cepa patógena da reacción ácida en leche tornasolada, con viraje de color. En los tubos con leche, inoculados, se observó que a las 72 hs comenzó a manifestarse en el medio, la

separación de dos fases con líquido claro sobrenadante. Finalmente hubo peptonización por actividad proteolítica e hidrólisis de caseína, coincidiendo estos resultados con Bradbury, (1994) y Buchanan, (1974).

En el cultivo en caldo nutritivo sin reacción aparente, el medio no se modificó.

En el cuadro 1 se volcaron algunos de estos resultados para compararlos con los de Buchanan y Gibbons, en el Manual de Bergey's, (1974). Se observan las coincidencias que sirven para apoyar el diagnóstico al que se arribó: el patógeno es una bacteria del género *Bacillus* Cohn.

Cuadro 1. Comparación de datos del Manual de Bergey's, (1974), con los resultados de este trabajo. AN: agar nutritivo. APG: agar papa glucosado.

| Pruebas realizadas | <i>Bacillus polymyxa</i> | Bacteria problema |
|--------------------|---|--|
| Forma | bacilos | bacilos |
| Gram | variable | + |
| Catalasa | + | + |
| Movilidad | variable | + |
| Oxidasa | variable | + |
| AN | colonias amarillentas, delgadas a menudo sin borde entero | colonias crema, lisas, brillante superficie plana |
| APG | Colonias mucoides, opalescentes, algo elevadas, color crema | colonia mucosa lisa, aceitosa, convexas, amarillenta |
| Levan | + | + |
| Red. nitratos | + | - |
| Oxígeno | anaerobio | aerobio o poco anaerobio |
| Caseinaza | + | + |

Al comparar los resultados obtenidos con los datos de la bibliografía (Bradbury, 1986, 1994, Buchanan y Gibbons, 1974; Fernández Valiela, 1975; French, 1989; Schaad, 1988), se dedujo que el agente patógeno de la enfermedad estudiada en malvón es *Bacillus polymyxa* Prazmowski y Macé (1889), (*Syn Clostridium* Prazmowski 1880).

Por las características morfológicas, culturales y de patogenicidad obtenidas como resultados de este trabajo podemos afirmar que las plantas de malvón (*Pelargonium* spp.), son sensibles a patógenos bacterianos entre los cuales se incluyen las cepas estudiadas que corresponden a *Bacillus polymyxa*. Esto concuerda con lo expresado por autores (Bradbury, 1986, 1994; Buchanan y Gibbons, 1974; Fernández Valiela, 1975 y French, 1989), que informan que esta bacteria es una especie peptonolítica, común en suelos y generalmente epífita, frecuentemente asociada con podredumbres en plantas o de materiales vegetales después de cosecha en tránsito o productos almacenados, o bien como patógeno ocasional.

Otro resultado es que la bacteria es favorecida por condiciones de elevadas temperaturas y humedad de los ambientes protegidos, que actúan de activadores predisponiendo a las plantas hospedantes para manifestar los síntomas descritos de enfermedad. Dado que las condiciones descritas favorecen la aparición de la enfermedad se puede aconsejar el manejo adecuado de ventilación y riego como prioridad para el manejo fitosanitario del cultivo de malvón en invernaderos.

El trabajo demuestra además que *B. polymyxa* se incluye entre el complejo de patógenos de plantas cultivadas en invernaderos de Corrientes.

CONCLUSIONES

El agente patógeno estudiado responde a las características de *Bacillus polymyxa* Prazmowski y Macé (1889). El patógeno afecta a las especies híbridas de *Pelargonium x hortorum* y *P. x domesticum* cultivadas en condiciones de invernadero en la provincia de Corrientes. Las condiciones del ambiente cálido y húmedo de la región influyen en la aparición y

gravidad de los síntomas en las plantas infectadas. La bacteria habitualmente epífita, bajo esas condiciones se convierte en patógeno virulento.

Esta es la primera mención de *Bacillus polymyxa* afectando las plantas de malvón en la región.

BIBLIOGRAFIA

- Bradbury, J. F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey, England, U.K. 332 p.
- Bradbury, J.F. 1994. Identification of cultivable Bacteria from plants and plant tissue cultures by use of simple classical methods. CAB. International Mycological Institute. Kew, Surrey, England, U.K.: 27-37.
- Buchanan, R. E. y N.E. Gibbons, eds. 1974. BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 8th. ed. The Waverly Press Inc. Mt. Royal and Guilford Aves., Baltimore, Md, USA. 1268 p.
- Daughtrey, M.L; Peterson, L. y Robert, L. 1995. Compendium of Flowering Potted Plant Diseases. APS PRESS, St. Paul, MN, USA. 90 p.
- Fernandez Valiela, M. V. 1975. Introducción a la Fitopatología. 3ra. ed. Colección Científica INTA. Vol. II, Bacterias. Fisiogénicas, Fungicidas, Nemátodes. Bs. As. Argentina. 821 p.
- French, E.R. 1989. Revisión Taxonómica de las Bacterias Fitopatógenas. Fitopatología. Vol 24 (1) :29-36.
- Halperin, L. 1975. Métodos para el conocimiento de las Bacterias Fitopatógenas. (En: Sarasola, A.A. y Roca de Sarasola M. Fitopatología. Curso Moderno. Tomo IV : Fisiogénicas. Prácticas en Fitopatología). Hemisferio Sur, Bs. As. Argentina.: 230-243.
- Index Of Plant Diseases In The Unites States. 1960. Agriculture Handbook N° 165. Agricultural Researches Service. Washington. 531 p.
- Marchionatto, J.B. 1950. Enfermedades de las plantas florales. Sudamericana, Bs. As. Argentina. 135 p.
- Schaad, N.N. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2d. ed. APS PRESS, St. Paul, MN, U.S.A. 164 p.