

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

Determinación de subespecies de *Erwinia carotovora* (Dye) Hall como agentes causales de “pudrición blanda” en cala (*Zantedeschia spp.*)

3. MATERIAL Y METODO

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de licenciado en Agronomía.

Profesor Patrocinante: Sr. Luigi Ciampi Panno - Ing. Agr., M.Sc., Ph.D.

Juan Pablo Kunstmann Porcile

Valdivia Chile 2004

Contenido

Profesores Informantes . .

Agradecimientos .

1. INTRODUCCION .

2. REVISION BIBLIOGRAFICA . .

3. MATERIAL Y METODO . .

1

 3.1 Materiales utilizados . .

1

 3.2 Método .

3

 3.3 Inicio del proceso de identificación de Erwinia . .

7

 3.4 Determinación de las subespecies del género Erwinia .

8

4. PRESENTACION DE RESULTADOS . .

5. DISCUSION DE RESULTADOS .

6. CONCLUSIONES . .

7. RESUMEN .

8. BIBLIOGRAFIA .

3. MATERIAL Y METODO

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile. Se procedió a coleccionar material biológico (túberos y tallos de cala) con síntomas de “pudrición blanda”. También se utilizaron tubérculos de papa aparentemente sanos, a los cuales se les indujo la pudrición para la obtención de aislamientos bacterianos causantes de “pudrición blanda”.

Para la determinación de la(s) especie(s) bacterianas involucradas en la patología conocida como “pudrición blanda” se realizaron pruebas tales como tinción de Gram, prueba de la oxidasa, comprobación de la actividad pectinolítica y sensibilidad a la eritromicina. Posteriormente se aplicaron pruebas bioquímicas y fisiológicas destinadas a determinar la(s) subespecie(s) bacteriana(s) presente(s). Finalmente se realizaron pruebas de inoculaciones cruzadas para comparar el nivel de virulencia de las cepas locales con el nivel de virulencia de las cepas extranjeras obtenidas desde tallos y túberos de cala.

3.1 Materiales utilizados

A continuación se detallarán los materiales utilizados en este trabajo.

3.1.1 Material biológico. Para la obtención de los aislamientos se procedió a coleccionar 80 túberos de cala (*Zantedeschia spp.*) con síntomas de “pudrición blanda”,

provenientes de distintas zonas de la X^a Región, material recientemente importado desde Nueva Zelanda. Se colectaron las muestras durante los meses de julio a diciembre del 2002; parte de este material se encontraba en almacenaje y lo demás estaba ya plantado y presentaba síntomas de la patología.

Las variedades y el número de túberos colectados en la localidad de Cayumapu (Valdivia) 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 fueron colectados 15 túberos de la variedad “Majestic Red”. En tanto que desde la Estación Experimental Sta Rosa de la UACH (Valdivia) fueron colectados dos túberos del género *Zantedeschia*, variedad no identificada.

Además se utilizaron 20 tubérculos de papacultivar Desirée comprados durante marzo del 2003 en la feria fluvial de Valdivia. De ellos se obtuvieron aislamientos bacterianos locales, los cuales fueron comparados en cuanto a nivel de virulencia con los demás aislamientos obtenidos desde tallos y túberos de cala. Los tubérculos provenían de distintas zonas de la Décima Región (10 de Paillaco y 10 de Los Lagos). Para la obtención de los aislamientos fue necesario inducir la “pudrición blanda”.

3.1.2 Medios de cultivo. El medio base para los aislamientos fue agar peptona (AP), este medio está compuesto por extracto de carne (3g), cloruro de sodio (5g), peptona de caseína (10g), agua destilada (1L) y agar (20g) (SCHAAD, 1994).

- Se utilizó agar nutritivo + 1 % dextrosa, para realizar las pruebas de sensibilidad a eritromicina, el cual está compuesto por extracto de levadura (2g), peptona (5g), cloruro de sodio (5g), agua destilada (1L), agar (15g) y glucosa (10g) (SCHAAD, 1994).

Otros medios utilizados fueron:

- Medio sacarosa, para realizar las pruebas de sustancias reductoras a partir de sacarosa. Consta de peptona de caseína (10g), cloruro de sodio (5g), sacarosa (40g), y agua destilada (1L); el medio se ajustó a pH 7.2 (SCHAAD, 1994).

- Medio YS (Levadura y sales) para determinar el crecimiento a 37°C. El medio consta de $\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$ (0,5g), $\text{K}_2 \text{HPO}_4$ (0,5g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,2g), NaCl (5g) y extracto de levadura (5g) (SCHAAD, 1994).

- Se utilizó el medio OY que consta de peptona, azul de bromotimol (indicador), agua destilada, para determinar la utilización de palatinosa o bien α -metil-D-glucósido según sea el caso; se ajustó a pH 7.2 (SCHAAD, 1994).

Todos los medios fueron esterilizados en el autoclave por 15 min a 120 °C (SCHAAD, 1994).

3.1.3 Material de laboratorio. Se describen a continuación los materiales utilizados en el laboratorio, para realizar la presente investigación.

3.1.3.1 Equipos: agitador de tubos, agitador magnético, autoclave Quimis, balanza digital Sartorius Basic Cientec (Modelo BA - 610), balanza analítica Boeco, baño termorregulador, cámaras de incubación Memmert, cámara de flujo laminar Labconco (Modelo 3613 - 00b), cámara de incubación Heraeus (Modelo BK - 60), contador de colonias, cronómetro digital, refrigeradores, espectrofotómetro, estufa esterilizadora aire

caliente Memmert (Modelo ULM - 500), estufa esterilizadora aire caliente Orthmann, medidor de pH digital Parmer, microonda Somela, micropipeta Brand (200 y 1000 microlitros), microscopio óptico, refrigeradores.

3.1.3.2 Material de vidrio: embudos, matraces Erlenmeyer (25, 250, 500 y 1000 mL), matraces aforados (100 y 1000 mL), tubos de ensayo de (9 y 20 mL), pipetas graduadas (1, 5, y 10 mL), pipetas Pasteur, placas Petri (11 y 15 cm de diámetro), portaobjetos, tubos de vidrio y vasos precipitados (25, 250, 500 y 1000 mL).

3.1.3.3 Otros: algodón cardé, algodón hidrófilo, agua destilada estéril, agua destilada, alcohol de quemar, asa de siembra, bandejas de plástico, bisturí, bolsas plásticas, pinzas, etanol de 96°, filtro milipor Sartorius (0.2 micrones), gasa, hipoclorito de sodio al 5 % (producto comercial 5 %), jeringas estériles (10 mL), papel secante, parafilm, película plástica, perforadora, toalla Nova estéril, mechero a gas, papel aluminio, sacabocado y sensidiscos (5 mm).

3.1.4 Reactivos. - Azul de bromotimol

Reactivo de Benedict: - Citrato de sodio 173g

- $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100g

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 17,3g y 1000 mL de agua destilada.

3.1.5 Componentes tinción de Gram: - Violeta de Genciana

- Lugol

- Alcohol acetona

- Fucsina de Gram.

3.2 Método

A continuación se describe la metodología empleada para la obtención, aislamiento e identificación de los aislamientos obtenidos.

3.2.1 Obtención de aislamientos a partir de túberos de cala.

Se seleccionaron 60 de los 80 túberos con síntomas evidentes de pudrición (Figura 1), los cuales fueron lavados con abundante agua corriente y utilizando una escobilla suave. De esta forma se eliminó la excesiva tierra presente. Se descartó aquellos túberos con pudrición muy avanzada. Posteriormente fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 2 min, luego de lo cual se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Los túberos se secaron con papel estéril.

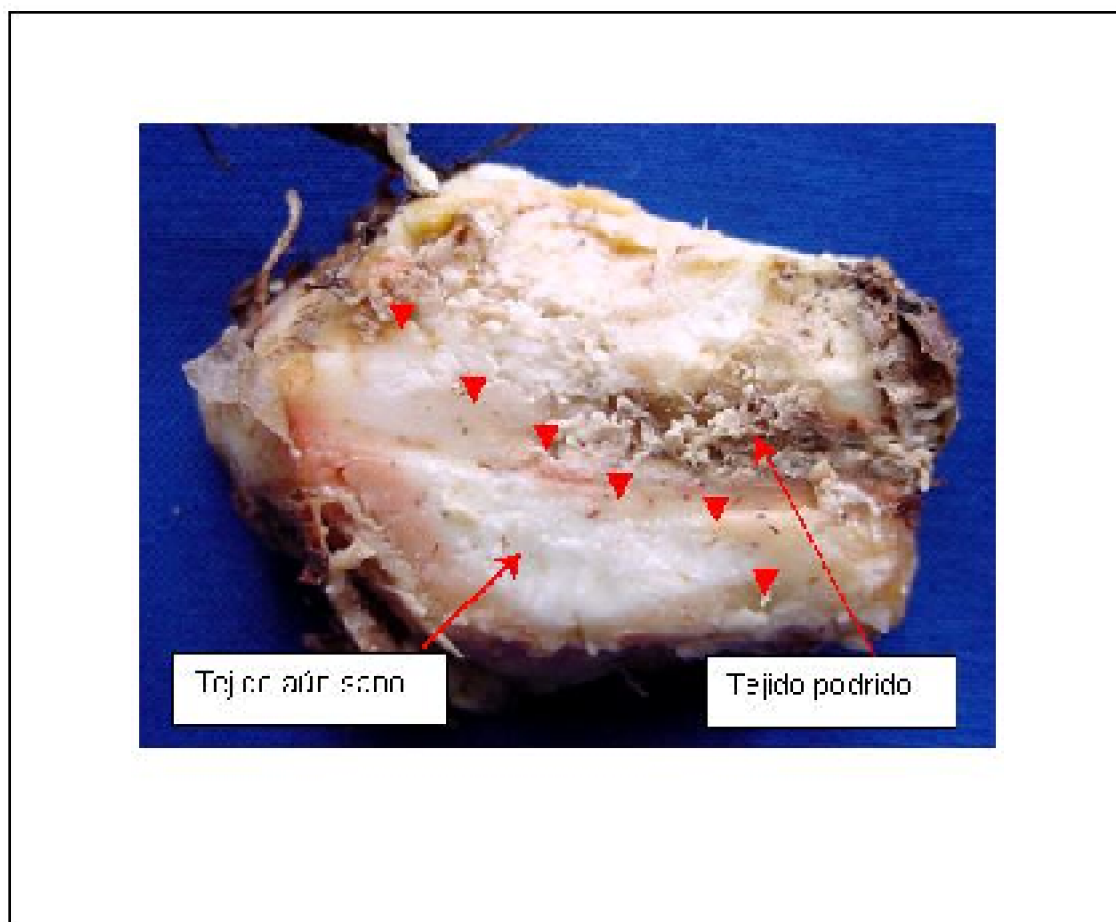


FIGURA 1. Túbero de cala variedad “Hot Shot” evidenciando síntomas de “pudrición blanda”. La zona de avance (flechas) separa el tejido enfermo del aún sano.

En la cámara de flujo laminar se procedió a cortar cada túbero con un bisturí estéril, de manera tal de obtener con el asa de siembra un pequeño inóculo de la zona de avance de la pudrición (Figura 2).

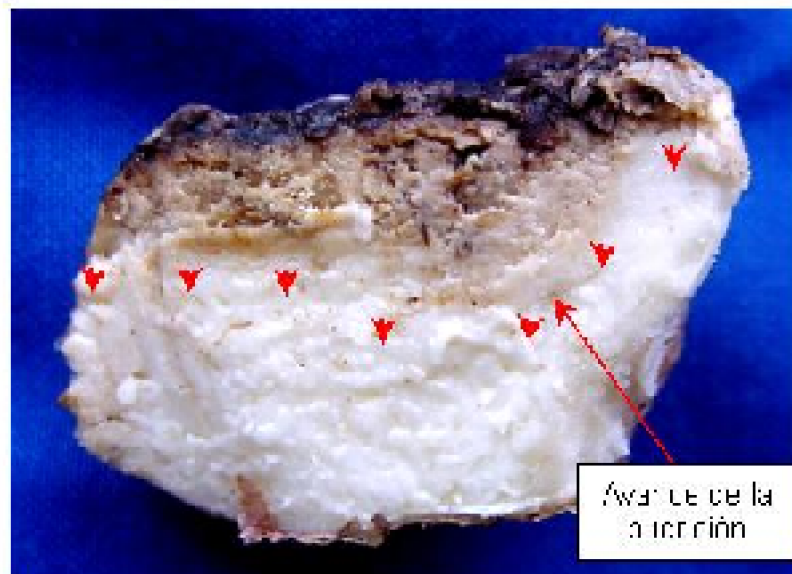


FIGURA 2. Túbero de papa variedad "Majestic Red" evidenciando síntomas de "pudrición blanda". De la zona de avance se sacaron las muestras de tejido para la posterior obtención de aislamientos bacterianos.

Tanto el asa de siembra como el bisturí fueron flameados y enfiados antes de ser utilizados. Los inóculos obtenidos fueron sembrados en placas Petri de agar peptona, previa dilución en tubos con agua destilada estéril; una vez sembrados se incubaron por 48 h en una cámara a 25 - 27°C. Cuando las diferentes colonias bacterianas estuvieron desarrolladas se procedió a repicar aquellas que cumplían con las características de *Erwinia* y constituían colonias aisladas. A partir de estas colonias aisladas se procedió a realizar nuevas diluciones bacterianas en agua destilada estéril, luego de lo cual se sembraron en agar peptona. Lo anterior fue realizado con el objetivo de obtener cultivos puros. Para comprobar que los aislamientos, presumiblemente del género *Erwinia* sean tales se realizó tinción de Gram, prueba de oxidasa y pudrición en rodajas de papa. A continuación se presenta un esquema con los pasos realizados para obtener aislamientos bacterianos (Figura 3).

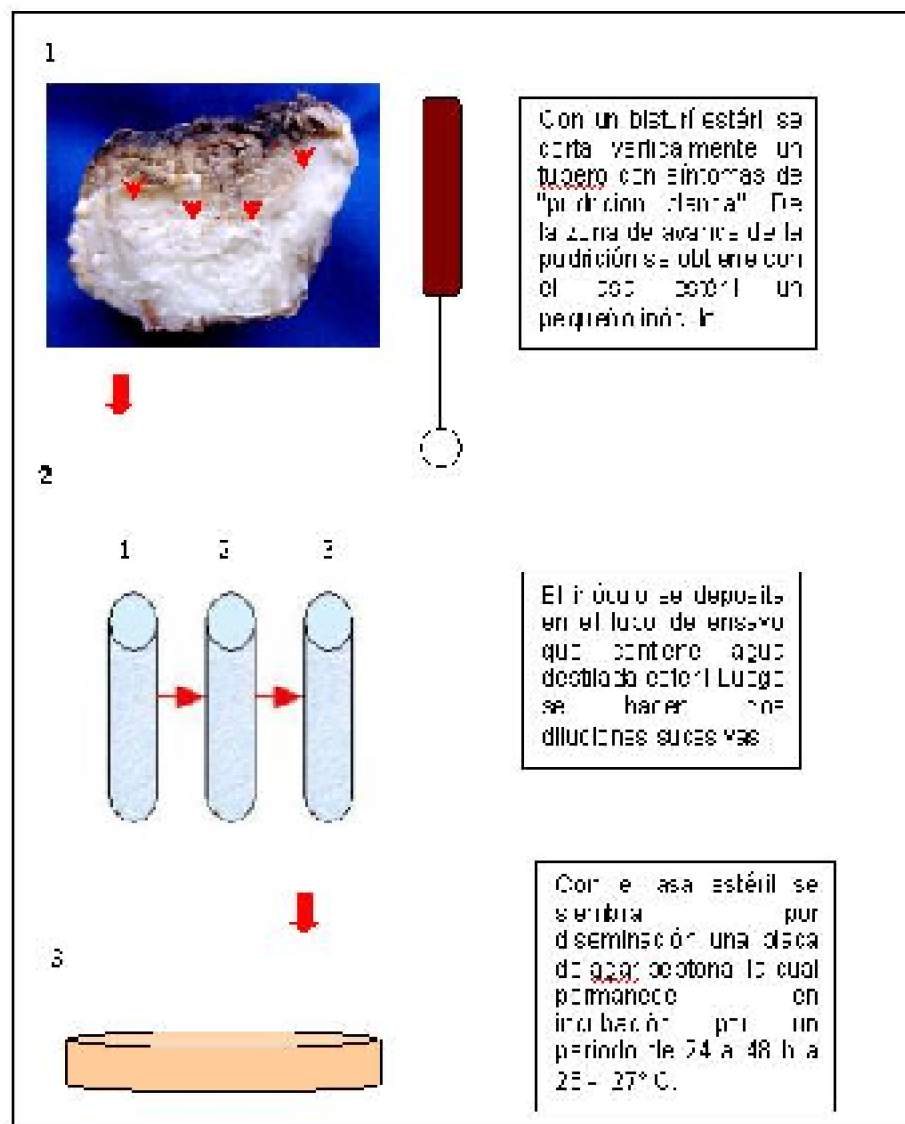


FIGURA 3. Generación de colonias bacterianas en placas con agar peptona para la selección de colonias tipo *Erwinia* spp y posterior confección de cultivos puros.

3.2.2 Obtención de aislamientos a partir de tubérculos de papa. Se procedió a realizar aislamientos a partir de 20 tubérculos, los cuales fueron lavados con abundante agua corriente y una escobilla suave, luego de lo cual se aplicó un baño de hipoclorito de sodio al 5% por dos minutos. Luego los tubérculos fueron secados con papel estéril.

Una vez que los tubérculos estuvieron bien secos se procedió a enterrar una aguja flameada cada vez, en las lenticelas. Posteriormente se cubrió íntegramente el tubérculo con papel estéril y se aplicó abundante agua destilada estéril, luego de lo cual se cubrió con tela plástica. Los tubérculos se introdujeron en una bolsa plástica, la cual fue cerrada y fueron dejados en una cámara de incubación por 48 h a 25 - 27°C. Cuando los tubérculos se tornaron blandos y con olor a pudrición, se extrajo inóculo de igual forma como se describió en el caso de los túberos de cala. Los pasos posteriores son iguales a los descritos para el caso anterior.

3.2.3 Obtención de aislamientos a partir de tallos de cala. Los 15 tallos fueron recolectados en una plantación de calas de colores en las cercanías de Valdivia. Todos presentaban síntomas de “pudrición blanda” en el cuello de la planta, causada probablemente por *Erwinia* (Figura 4). Una vez colectados, los tallos fueron llevados al laboratorio en bolsas plásticas cerradas. Mediante la utilización de un bisturí estéril se hizo un corte en la zona de avance de la pudrición, para extraer un pequeño inóculo con el asa estéril. Éste se diluyó en agua estéril y luego se sembró en placas con AP. Posteriormente se puso a incubar por 24 - 48 h en una cámara a 25 - 27°C.

3.3 Inicio del proceso de identificación de *Erwinia*

Este proceso se realizó con aquellos 58 aislamientos que cumplían con las características de *Erwinia*, es decir, colonias casi transparentes, redondas y con un pequeño relieve en altura.

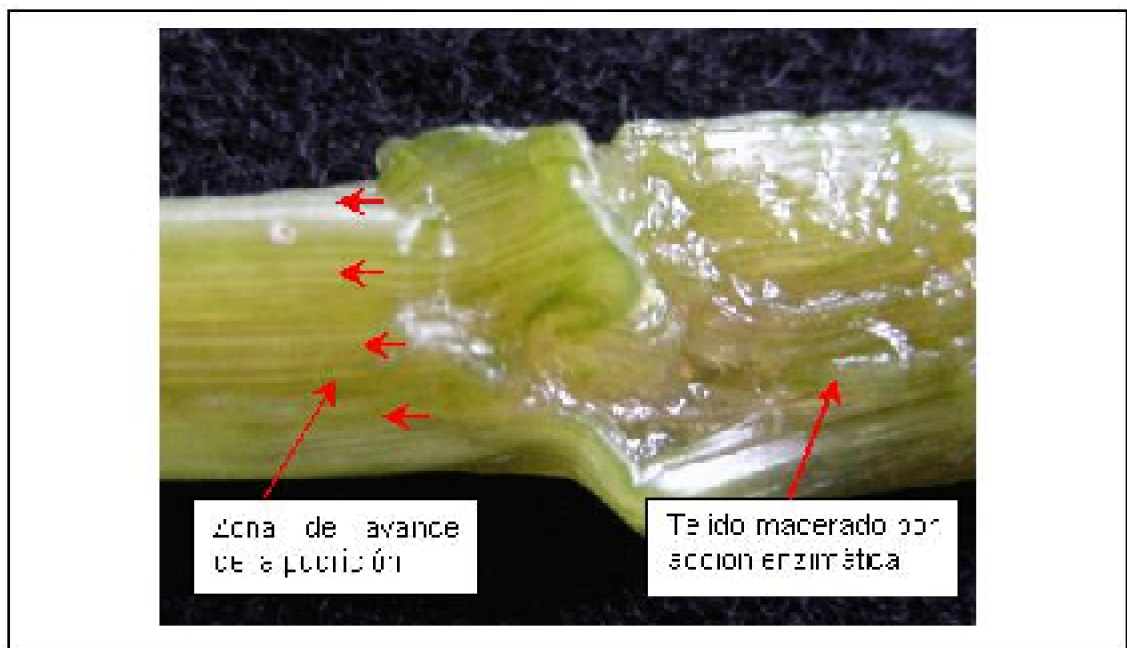


FIGURA 4. Tallo de cala variedad “Hot Shot” proveniente de Cayumapu, el cual muestra síntomas de “pudrición blanda”.

A continuación se describen las pruebas generales de laboratorio, las cuales permiten la identificación del género *Erwinia*. Estas pruebas constituyen el paso previo para posteriormente realizar las pruebas bioquímicas y fisiológicas.

3.3.1 Tinción de Gram. Con el objetivo de poder comprobar su pureza, además de su morfología y agrupación se procedió a realizar una tinción de Gram a los aislamientos seleccionados, los cuales tenían entre 24 y 48 h de desarrollo.

3.3.2 Prueba de oxidasa. Para la segunda prueba, o test de la oxidasa, se procedió a colocar sobre papel filtro una porción de inóculo bacteriano obtenido desde las placas

de agar peptona; sobre el papel filtro se aplicó reactivo de oxidasa. Se esperó un par de segundos para ver el resultado; en el caso de *Erwinia* este debería ser oxidasa (-), es decir, no hay cambio de color. La respuesta positiva en esta prueba implica la aparición de color rosado y se descarta la presencia de *Erwinia* (PEROMBELON y VAN DER WOLF, 1998).

3.3.3 Inoculación en rodajas de papa. Esta prueba solamente se realizó con aquellos aislamientos Gram (-) y oxidasa (-). Una vez realizadas las dos pruebas anteriores se procedió a inocular 33 rodajas de papa de 5 cm de grosor con suspensiones bacterianas provenientes de los 33 aislamientos que respondieron según pruebas anteriores en la forma característica de *Erwinia*. Esto se realizó con el propósito de comprobar si los aislamientos poseían actividad pectinolítica, la cual es característica de *E. carotovora*. Las inoculaciones en rodajas de papa fueron realizadas sin repeticiones.

Para realizar esta prueba se procedió a tomar tubérculos aparentemente sanos, los cuales fueron lavados con abundante agua y una escobilla suave, posteriormente se sumergieron en hipoclorito de sodio al 5% por 2 min, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con papel estéril. Los tubérculos fueron cortados en rodajas, y con un sacabocado estéril de 1 cm de diámetro se hizo un orificio en el cual se depositó con una micropipeta estéril 400 uL de suspensión bacteriana.

La suspensión bacteriana se preparó previamente en tubos de ensayo, los cuales tenían en su interior 2 - 3 mL de agua estéril. Con un asa estéril se tomó inóculo de las cepas de 24 h de desarrollo, el cual fue depositado en el interior de cada tubo de ensayo, y homogenizado con un agitador.

Las rodajas de papa inoculadas fueron puestas en una cámara húmeda, dentro de la cual cada rodaja de papa se puso sobre un portaobjeto y a su vez sobre tubos de vidrio. La cámara húmeda fue puesta en incubación a 26 - 28°C por 48 - 72 h. Cabe señalar que todo el material utilizado era estéril.

3.4 Determinación de las subespecies del género *Erwinia*

Aquellas cepas que en la etapa anterior fueron clasificadas como pertenecientes al género *Erwinia* fueron sometidas a pruebas bioquímicas y fisiológicas específicas, mediante las cuales se determinaron subespecies bacterianas presentes. Es importante destacar que para determinar la o las subespecies bacterianas presentes hay que tomar todas las pruebas realizadas en su conjunto, de lo contrario puede llevar a error. Las respuestas características de cada subespecie a las pruebas utilizadas se señalan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Pruebas fisiológicas y bioquímicas para diferenciar especies y subespecies de *Erwinia carotovora*.

Prueba	*Eca	** Ecc	***Echry
Crecimiento a 37 ° C	No hay desarrollo	Hay desarrollo	Hay desarrollo
Sensibilidad a eritromicina	-	-	+
Producción de sustancias reductoras a partir de sacarosa	+	-	-
Utilización de palatinosa.	+	-	-
Utilización de α - metil - glucósido.	+	-	-

FUENTE: Adaptado de PEROMBELON y VAN DER WOLF (1998).

E. carotovora* subsp. *atroseptica* *E. carotovora* subsp. *carotovora*

*** *E chrysanthemi*

3.4.1 Sensibilidad a eritromicina. Esta prueba se realizó con los 33 aislamientos que supuestamente corresponden a *Erwinia*, con el objeto de comprobar qué respuesta tenían los aislamientos al antibiótico eritromicina. Cabe señalar que para ninguna de las pruebas bioquímicas y fisiológicas se realizaron repeticiones.

Para esta prueba primero se preparó agar nutritivo con 1 % dextrosa, el cual se agregó como capa basal en las placas Petri, luego de lo cual permanecieron por 2 h en el refrigerador para que solidifique el medio de cultivo. Sobre el medio frío se adicionaron 5 mL de agar nutritivo inoculado con una gota de suspensión bacteriana. El agar nutritivo se mantuvo en tubos de ensayo de 12 ml. Para evitar que los tubos de ensayo con el medio solidifiquen se utilizó un baño termostático a 35 - 40°C. Cada uno de los tubos con agar nutritivo fue inoculado con una gota de suspensión bacteriana, luego de lo cual se agitó para homogenizar el contenido. Sin permitir que los tubos se enfríen se procedió a depositar su contenido sobre la capa basal de agar nutritivo previamente preparada en las placas Petri, proceso que se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar.

Una vez solidificada la capa superficial, se colocaron en cada placa Petri cuatro sensidiscos de 5 mm de diámetro, tres de los cuales contenían una concentración de 15 microlitros de eritromicina; el otro sensidisco contenía antibiótico.

Los sensidiscos se confeccionaron con papel secante estéril, el cual fue perforado y luego esterilizado en el autoclave por 15 min a 120°C. Luego de lo cual en una placa Petri estéril se les adicionó una solución de eritromicina disuelta en 9 mL de agua y 1 mL de etanol 96°, la cual previamente fue filtrada a través de un filtro milipor de 0.20 micrones. Las 33 placas con los sensidiscos fueron incubadas a 27°C por 48 h en una cámara, luego de lo cual se procedió a evaluar los resultados (PEROMBELON y VAN DER WOLF, 1998).

3.4.2 Producción de sustancias reductoras a partir de sacarosa. Esta prueba permite determinar la(s) subespecie(s) bacteriana(s) presente(s).

Se preparó medio sacarosa a pH 7.2, del cual se adicionó 3 mL a cada uno de los 33 tubos de ensayo. Cada tubo fue inoculado con una asada de inóculo bacteriano del cepario conformado por 33 aislamientos. Los tubos fueron incubados por 48 h a 27°C;

terminado este período se procedió a adicionar a cada tubo 3 mL de reactivo de Benedict y se sometió los tubos a ebullición durante 10 min, luego de lo cual se evaluó el resultado. El cambio desde color azul a amarillo, con o sin precipitado implica una respuesta positiva (PEROMBELON y VAN DER WOLF, 1998).

3.4.3 Crecimiento a 37°C. Se rellenaron 33 tubos con 10 mL del medio de cultivo YS y se procedió a inocular con los 33 aislamientos seleccionados, esto se hizo con el asa de siembra estéril. Los tubos se mantuvieron por un período de 7 a 14 días a 37°C en una cámara de incubación. Luego de lo cual se evaluó el resultado. De ser los resultados poco claros se evaluará también a los 14 días. La turbidez permite determinar el desarrollo de la bacteria. Los tubos permanecieron dentro de un recipiente con agua, con el objeto de regular en mejor forma las pequeñas fluctuaciones de temperatura en el interior de la cámara (PEROMBELON y VAN DER WOLF, 1998).

3.4.4 Utilización de compuestos orgánicos (palatinosa y α - metil - glucósido). Esta prueba también permite clasificar a la bacteria dentro de la subespecie *carotovora* o *atroseptica*. Solamente la segunda subespecie utiliza ambos compuestos en su metabolismo.

Se prepararon los medios de cultivo OY a pH 7.2, un medio contenía α - metil - glucósido y el otro palatinosa. Con cada medio se llenaron 33 tubos de ensayo hasta completar 12 mL. Estos medios se inocularon con las suspensiones bacterianas a evaluar mediante pipetas Pasteur estériles, incorporando una gota de suspensión bacteriana que contenía bacterias frescas de 24 - 48 h de desarrollo, provenientes del cepario confeccionado con los 33 aislamientos obtenidos. Los medios inoculados se incubaron por 7 días a 27°C. (PEROMBELON y VAN DER WOLF, 1998).

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

Para comparar el nivel de virulencia entre los aislamientos obtenidos, primero se inocularon aquellos obtenidos a partir de tubérculos de papa y túberos de cala, en tubérculos de papa cultivar Desirée. Posteriormente se inocularon túberos de cala con los aislamientos de ambas procedencias. Se utilizaron 10 aislamientos obtenidos desde papa y 10 obtenidos desde cala, los cuales fueron seleccionados al azar dentro del cepario confeccionado. Los aislamientos seleccionados provenientes desde tejidos de cala fueron los siguientes: B₁, F, C, 3T, B₂, 2.2, 2.3, 3, 2.5 y I. En el caso de los aislamientos aislados a partir de tubérculos de papa se utilizaron los siguientes: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10.

Para esta prueba se seleccionaron 20 tubérculos y 20 túberos variedad Aurora aparentemente sanos, los cuales se lavaron con abundante agua corriente y una escobilla suave, luego se dejaron por 2 min en una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con papel estéril.

Las suspensiones bacterianas se prepararon con aislamientos de 24 h de desarrollo, utilizando agua destilada estéril. Para igualar las concentraciones se utilizó un espectrofotómetro a 600 nm (nanómetros) a una absorbancia de 1.5, lo cual equivale a (1×10^8) UFC/mL. Una vez listas las suspensiones bacterianas se hicieron dos orificios de 0.5 cm de diámetro a cada tubérculo y túbero, lo cual se realizó con un sacabocado

estéril. En cada orificio se introdujo con una micropipeta con puntas estériles 400 microlitros de suspensión bacteriana. Una vez inoculados, tanto los túberos como los tubérculos se envolvieron con film plástico, con el propósito de otorgar un ambiente de anaerobiosis a las bacterias.

El material inoculado se llevó a cámaras húmedas por tres días a 27° C. Al cabo de este período se procedió a evaluar el resultado, para lo cual los 20 tubérculos y los 20 túberos de cada fueron cortados en forma vertical en la zona en la cual se realizó el orificio, las evaluaciones consistieron en determinar el nivel de virulencia de cada aislamiento, clasificándose los aislamientos como de virulencia nula, baja o alta en base a la apreciación visual.

A continuación se presenta un esquema con los pasos seguidos en la presente investigación (Figura 5).

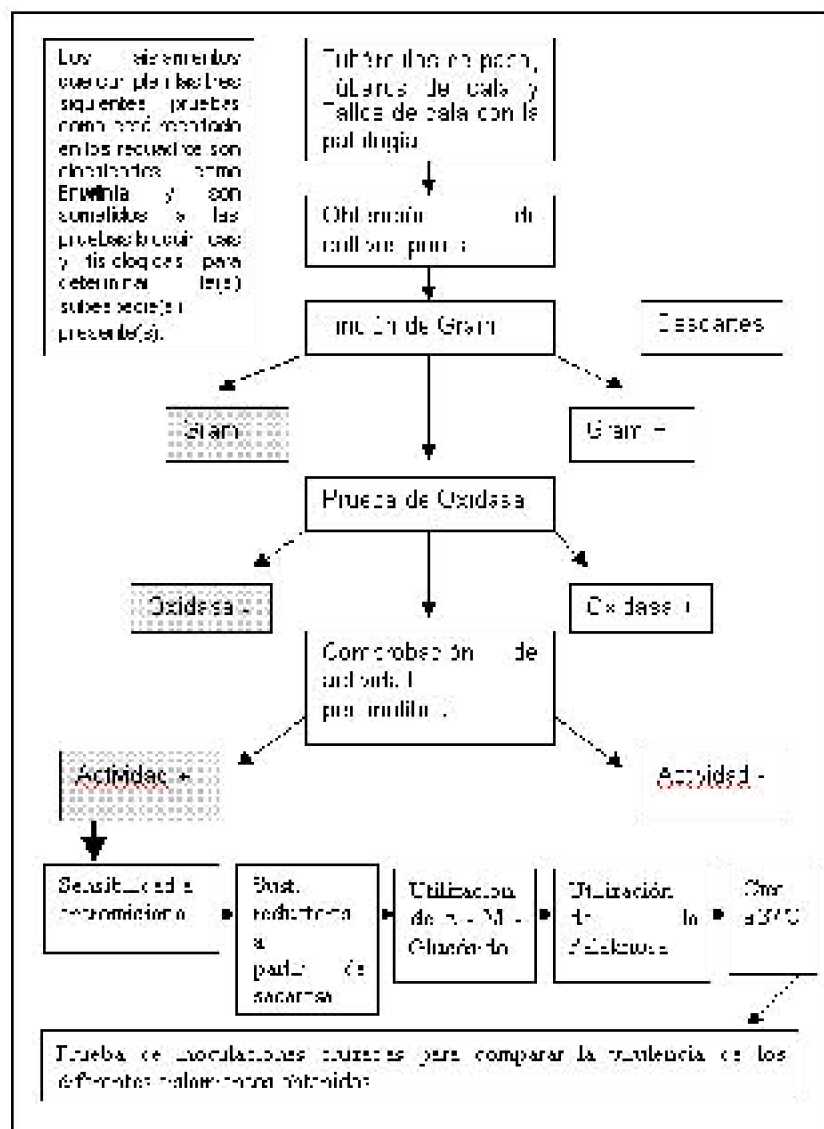


FIGURA 5. Esquema demostrativo de los pasos seguidos en la presente investigación.