

DETERMINACIÓN DE LOS MECANISMOS DE DISEMINACIÓN DE *Erwinia herbicola* EN LA PROPAGACIÓN DE *Gypsophila paniculata* L. PARA ESTABLECER METODOS DE MANEJO Y CONTROL.

Cristian A. Noreña T.¹

Gerardo Martínez L.¹

Jorge Cabra²

Tatiana Gómez²

RESUMEN

La agalla de corona en *Gypsophila paniculata* L. es ocasionada por *Erwinia herbicola*. Esta enfermedad produce marchitez y muerte de plantas. El conocimiento y control de los mecanismos de diseminación evitará la propagación de la bacteria en las áreas de desarrollo y por consiguiente en el material que se utiliza en producción. El estudio se llevó a cabo en la empresa MG Consultores Ltda., en Chía, Cundinamarca y tuvo como fin contribuir a la identificación de mecanismos de diseminación de *E. herbicola* en *G. paniculata* L., con el objetivo de contar con la información necesaria para implementar un programa de manejo de la enfermedad. Las evaluaciones se realizaron en agua de riego, estancada en el piso, de canales de drenaje y de lixiviación de bancos; en una mosca de los invernaderos identificada como Díptera: Ephydridae; en sustratos de enraizamiento; en soluciones desinfectantes; en los guantes de los operarios y en las paletas de revisión de plantas.

Los resultados muestran que la bacteria estuvo presente en todos los materiales muestreados, con excepción del agua de riego y los guantes. La presencia de la bacteria en la mosca la convierte en una plaga importante en la diseminación de éste patógeno, puesto que la bacteria se encuentra en agua estancada y canales visitados frecuentemente por el insecto, que la puede transportar hasta los bancos y plantas.

¹ Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Manizales.

² MG Consultores Ltda., Chía, Cundinamarca.

SUMMARY

The crow gall on *Gypsophila paniculata* L. is caused by *Erwinia herbicola*. This disease causes wilt and dead of plants. Knowledge and control of dissemination mechanisms can avoid propagation of bacteria in areas of growth of *G. paniculata* and on production material. This investigation was carried out at MG Consultores Company Chia (Cundinamarca) Locality in order to identify the mechanisms of spreading of *E. herbicola* on *G. paniculata* to design a disease management program. The evaluations of Bacterium presence 8 sites were used: irrigation water, puddle, drain channels, and lixiviation benches. Besides, in the green house fly (Diptera: Ephydridae), rooting substrata, desinfectant solutions, gloves and plant revision blades. Results showed that bacteria was present in all the materials, but not in irrigation water and gloves. The fly is an important agent of spreading bacteria from puddles and drain channels to plants.

INTRODUCCIÓN

El género *Gypsophila* pertenece a la familia Cariophilacea, la misma a la que pertenece el clavel (Potter, citado por Díaz *et al.*, 1990; González, 2000). *Gypsophila paniculata* es una especie originaria de los países mediterráneos y del Este de Europa (Shillo, 1985; González, 2000). La planta se cultivó por primera vez en Inglaterra en 1956. Su empleo más conocido, además de ser usada como planta en jardinería, es como flor cortada (Shillo, 1985). La especie *G. paniculata* L. se cultiva comercialmente en Florida, California, Israel, Holanda, Ecuador, Perú y Colombia. Entre los muchos nombres vulgares que se le dan están: "Aliento de Bebe", "Planta nube" o "Gasa" (Shillo, 1985).

Gypsophila es atacada por nematodos, por hongos en donde se pueden citar algunos como *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y por bacterias fitopatógenas entre las que se encuentran *Pseudomonas* sp. (González, 2000) y *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* (Manulis *et al.*, 1991; Cooksey, 1986; Clark *et al.*, 1989) que produce hiperplasia en las células, síntoma muy parecido al que causa *Agrobacterium tumefaciens* (Cooksey, 1986; Clark *et al.*, 1989).

La agalla de la corona y raíces en *Gypsophila* fue descrita en 1930 por Brown (Brown, 1932; Brown, 1934, citado por Cooksey, 1986). El organismo responsable fue descrito como una bacteria anaeróbica facultativa de color amarillo, identificada por Brown como *Bacterium gypsophilae* (Brown, 1934, citado por

Cooksey, 1986), luego cambió a *Agrobacterium gypsophilae* (Brown) Starr & Weiss (Starr *et al.*, 1943, citado por Cooksey, 1986), y ahora clasificado como *Erwinia herbicola* (Lohnis) Dye (Graham *et al.*, 1974; Krieg *et al.*, 1984, citado por Cooksey, 1986). Sin embargo, existen conflictos en los reportes sobre la habilidad de la bacteria para inducir agallas en *Gypsophila* (De Cleene *et al.*, 1981; Geesteranus *et al.*, 1966; Graham *et al.*, 1974; Miller *et al.*, 1981; Vigodsky-Haas *et al.*, 1981, citado por Cooksey, 1986).

La diseminación de las bacterias fitopatógenas de una planta a otra o a otras partes de la misma planta, se lleva a cabo principalmente a través del agua, los insectos, diversos animales y el hombre. La lluvia o el riego llevan y distribuyen bacterias de una planta a otra, de uno de sus órganos a otro y del suelo a las partes inferiores. Los insectos no solo llevan las bacterias hasta las plantas, sino que las inoculan en ellas al introducirlas en determinadas zonas, donde casi siempre se desarrollan. En algunos casos las bacterias fitopatógenas persisten también en los insectos y dependen de ellos para sobrevivir y diseminarse. En otros casos los insectos son importantes, aunque no esenciales, en la diseminación de ciertas bacterias fitopatógenas.

El hombre contribuye a la diseminación de las bacterias cuando manipula plantas o realiza prácticas de cultivo, pero también las lleva a grandes distancias al transportar plantas infectadas u órganos de ellas, hasta otras áreas nuevas o al introducir tales plantas de otras partes. Las bacterias pueden sobrevivir en o sobre las semillas, otros órganos de las plantas o insectos que viven en el suelo. Sobre las plantas, las bacterias pueden sobrevivir epifíticamente en yemas, en heridas, en sus exudados o en el interior de varios tejidos u órganos que infectan (Agrios, 2001).

Algunos hongos y bacterias (*Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Fusarium* sp. y *Ceratocystis* sp.) han aparecido portados en estiletes y extremidades de insectos (Alpízar *et al.*, 1997). La bacteriosis del mango causada por *Erwinia carotovora* (Jones) Holland y *E. herbicola* (Lohnis) Dye, previamente señalado como *E. mangiferae* (Doyge) Bergey (Elliot, 1951), se disemina por la lluvia, esquejes infectados y por insectos. La penetración de la bacteria es por heridas y aberturas naturales: estomas, hidátodos y lenticelas (Guevara *et al.*, 1985). Resultados de estudios presentados por Guevara *et al.*, (1985) muestran que la bacteria se encuentra en forma epifítica o residente en los órganos de la planta y sobre todo en el exudado de lesiones o cáncros en el tronco, de donde es diseminada por los insectos que visitan la planta, o por la lluvia y el

viento. Guevara *et al.*, (1986), en estudios realizados en cuanto a la diseminación por insectos demuestran que los diversos géneros analizados (*Anastrepha* spp, *Ceratitis capitata*, *Antiteuchus tripterus*, *Alabama* sp., *Aulacaspis* sp. y *Azteca* sp.) son capaces de portar la bacteria *Erwinia* spp, tanto externa como internamente, por lo tanto, juegan papel importante en la diseminación de la enfermedad. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el presente trabajo se realizó con el objeto de contribuir a la identificación de mecanismos de diseminación de *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* (Lohnis) en *Gypsophila paniculata* L. para lograr una mayor eficiencia en el manejo y control de la enfermedad.

METODOLOGÍA

Caracterización de *Erwinia herbicola*

Crecimiento en medio MS (Miller y Schroth, 1972), en anaerobiosis a 36°C.

Viraje del medio de verde a naranja con colonias de color rojizo.

Líquidificación del medio gelatina

Positivo.

Fermentación/Oxidación

Fermentación.

Motilidad en medio SIM

Positiva.

Crecimiento en NaCl al 5%

Positivo.

Pudrición de la papa

Negativa.

Tinción de Gram

Gram negativa. Bacilos rectos.

Diagnostico del díptero Ephydridae. En capturas con aspiradora en el bloque de planta madre de *Gypsophila paniculata*, de la Unidad de Propagación se encontró frecuentemente un díptero de la familia Ephydridae, que fue utilizado para las pruebas de diseminación.

Los insectos fueron inmovilizados para más facilidad en la manipulación, introduciéndolos en la nevera a 4°C durante 20 minutos. Luego se pasaron seis insectos por tratamiento, en cajas de Petri. En uno de los tratamientos los insectos se retiraron transcurrida una hora y en el otro permanecieron en las cajas de Petri en la incubadora durante 48 horas que se tuvieron incubando los dos tratamientos.

Diagnóstico del agua de riego. Se tomaron 500 ml, 250 ml y 100 ml de agua de riego y se filtraron por Millipores de 0,2 µm, las partículas retenidas fueron tomadas con un asa y sembradas en medio MS por el método de rayado. Las muestras fueron sometidas a anaerobiosis por 96 horas con temperatura de 36°C. El testigo negativo correspondió a un filtrado de 500 ml de agua destilada estéril y el testigo positivo a un filtrado de 100 ml de solución bacteriana a una concentración de $1,6 \times 10^2$ UFC/ml. Para establecer la concentración del testigo positivo se diluyó bacteria en 100 ml de agua destilada estéril y se hicieron las diluciones 10^{-1} - 10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5} con sus respectivas siembras.

Diagnóstico de agua de lixiviación, estancadas y canales. Aguas de lixiviación, estancadas dentro de los bloques y canales de desagüe de la Unidad de Propagación fueron tomadas en frascos estériles para determinar la presencia de la bacteria. Para este análisis se llevaron a cabo diluciones hasta 10^{-4} con dos replicas de cada una de las muestras y sembradas en superficie. Todas las muestras fueron incubadas a 36°C durante 48 horas. Como testigo negativo se tomaron 100µl de agua destilada estéril y como testigo positivo 100µl de solución bacteriana a una concentración de 9×10^3 UFC/ml, igualmente tomando dos replicas para cada uno.

Análisis microbiológico de suelos. Se tomaron dos de los sustratos utilizados en la Unidad de Propagación: cascarilla de arroz quemada y tratado con vapor en los bancos y, cascarilla de arroz quemada + cocopeat húmedo tratada con vapor previo a la adición de Nitrato de Calcio antes de ser llevada a los bancos. Estas fueron procesadas y analizadas para verificar la presencia de *E. herbicola*. Se tomaron 10g a los cuales se le agregó 10 ml de agua destilada estéril. Se llevaron a cabo diluciones hasta 10^{-2} con dos replicas de cada una de las muestras y siembra en superficie de la misma manera como se describe anteriormente para lixiviados, agua estancada y canales.

Análisis de desinfectante (timsen). En el momento en que dos colaboradoras de la Unidad de Propagación se encontraban erradicando plantas con presencia de agalla se cambió el Timsen y se inició con una solución recién preparada, para determinar el tiempo de acción desinfectante. Luego de haber pasado 15 minutos de uso del desinfectante, se tomó una primera muestra de 300ml a cada una de las colaboradoras y una segunda muestra fue tomada a los 30 minutos. Las diluciones se llevaron hasta 10^{-2} con dos replicas de cada una de las muestras y siembra en superficie como se ha descrito anteriormente.

Análisis de paletas utilizadas en la erradicación de plantas con agalla. Al final del proceso de erradicación de plantas con agalla se tomaron dos paletas de las utilizadas para la revisión de estas. Los extremos de la paleta fueron frotados en el medio MS y además fueron puestas en 10 ml de agua destilada estéril. Se realizó siembra de 100 µl en medio MS y se incubó a 36°C durante 48 horas.

Análisis de guantes utilizados en la erradicación de plantas con agalla. Después de una jornada de erradicación de plantas con agalla se tomaron los guantes y se les hizo un frotis del pulgar e índice derecho y del pulgar e índice izquierdo además se enjuagaron en 20ml de agua destilada estéril, se les hizo diluciones hasta 10⁻² y se sembró en superficie en medio selectivo MS el cual se incubó a 36°C durante 72 horas.

RESULTADOS

Diagnóstico del díptero Ephydriidae. Para la mayoría de los diagnósticos se obtuvo crecimiento de *Erwinia herbicola* cuando los insectos tuvieron la oportunidad de caminar sobre el medio MS, excepto para las replicas 1 y 4 de los insectos que se expusieron una hora. Las pruebas bioquímicas fueron positivas para *Erwinia herbicola* excepto la replica 1 correspondiente a los insectos que permanecieron por 48 horas (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de las pruebas de diagnóstico de presencia de *Erwinia herbicola* en el díptero Ephydriidae.

TRATAMIENTO	REPLICA	MS	GEL	OF	SIM	NaCl 5%	PAPA	<i>Erwinia sp.</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
48 Horas Exposición	1	+	+	+	-	+	-	+	
	2	+	+	+	+	+	-		+
	3	+	+	+	+	+	-		+
	4	+	+	+	+	+	-		+
1 Hora Exposición	1	-							
	2	+	+	+	+	+	-		+
	3	+	+	+	+	+	-		+
	4	-							

Diagnóstico del agua de riego. Los tratamientos fueron negativos indicando que la bacteria no está presente en el agua de riego. En el rayado del testigo positivo hubo crecimiento bacteriano en una concentración de 2 UFC/100 ml. La concentración de bacteria de la suspensión del testigo positivo fue de 1,6 x 10² UFC/ml determinada por medio de siembra en superficie (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de los diagnósticos del agua de riego a través de microfiltrado en membrana millipore de 0,2 µm por medio de siembra en rayado.

Agua de riego Rayado de lo retenido	MS	GEL	OF	SIM	NaCl 5%	PAPA	<i>Erwinia sp.</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
500 ml	-							
250 ml	-							
100 ml	-							
Testigo negativo (500 ml)	-							
Testigo positivo (100 ml)	2*							
Siembra 10 ⁻¹ Testigo pos.	16**	+	+	+	+	-		+
Siembra 10 ⁻² Testigo pos.	-							
Siembra 10 ⁻³ Testigo pos.	-							
Siembra 10 ⁻⁴ Testigo pos.	-							
Siembra 10 ⁻⁵ Testigo pos.	-							
Siembra 10 ⁻⁶ Testigo pos.	-							

* UFC/100 ml

** UFC/ ml

Diagnóstico de agua de lixiviación, estancada y canales. La bacteria se encontró en los tres sitios analizados, con mayor concentración en lixiviados seguido del agua estancada y en baja concentración en agua de canales (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de los diagnósticos de aguas de canales, estancadas y lixiviados del área de propagación.

Diagnóstico de agua de canales, estancada y lixiviados	MS	GEL	OF	SIM	NaCl 5%	PAPA	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Erwinia herbicola</i>
Estancada Rosas	+*	+	+	+	+	-		+
Estancada Enraizamiento	9**	+	+	+	+	-		+
Estancada Ambientación	+*	+	+	+	+	-		+
Estancada Núcleo	+*	+	+	+	+	-		+
Estancada Planta Madre	+*	+	+	+	+	-		+
Canal Derecho Rosas	11**	+	+	+	+	-		+
Canal Izquierdo Rosas	2**	+	+	+	+	-		+
Canal Derecho Enraizam.	+*	+	+	+	+	-		+
Canal Izquierdo Enraizam.	1**	+	+	+	+	+	+	
Canal Derecho Núcleo	+*	+	+	+	+	-		+
Canal Izquierdo Núcleo	+*	+	+	+	+	-		+
Canal Derecho Planta Madre	1**	+	+	+	+	-		+
Canal Izquierdo Planta M.	9**	+	+	+	-	+	+	+
Lixiviado banco 106 P.M.	+*	+	+	+	+	-		+

Para 10⁻¹: * UFC/ml incontables.

** UFC/ml

Análisis microbiológico de suelos. La muestra de cascarilla de arroz quemada del área de enraizamiento fue negativa para la presencia de *E. herbicola*, pero en cambio en la cascarilla de arroz + cocopeat ya humedecida y con nitrato de calcio se obtuvo una concentración $3,6 \times 10^6$ UFC/ml de *Erwinia herbicola* (Tabla 4).

Tabla 4. Resultado de los diagnósticos de sustratos.

SUSTRATOS	MS	GEL	OF	SIM	NaCl 5%	PAPA	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Erwinia herbicola</i>
Cascarilla +cocopeat +Nitrato de Calcio ¹								
Siembra 10 ⁻¹	+							
Siembra 10 ⁻²	+							
Siembra 10 ⁻³	+							
Siembra 10 ⁻⁴	+							
Siembra 10 ⁻⁵	36*	+	+	+	+	-		+
Cascarilla de arroz quemada								
Siembra 10 ⁻¹	-							
Siembra 10 ⁻²	-							
Siembra 10 ⁻³	-							
Siembra 10 ⁻⁴	-							
Siembra 10 ⁻⁵	-							

¹ El Nitrato de Calcio se adiciono después de la desinfección. En el proceso de adición ocurrió recontaminación.

* UFC/ml

Análisis de desinfectante (timsen). Para una de las colaboradoras no se obtuvo presencia de bacteria a los 15 minutos pero a 30 minutos se encontró en el medio MS en una concentración de $2,6 \times 10^4$ UFC/ml. Para el desinfectante de la segunda colaboradora se encontró bacteria a los dos tiempos en una concentración de $1,3 \times 10^5$ UFC/ml a los 15 minutos e incontable a los 30 minutos (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados del diagnóstico del desinfectante Timsen en dos tiempos y en dos colaboradores laborales.

DESINFESTANTE (TIMSEN)	MS	GEL	OF	SIM	NaCl 5%	PAPA	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Erwinia herbicola</i>
Colaboradora 1 15 m								
Siembra 10 ⁻¹	-							
Siembra 10 ⁻²	-							
Siembra 10 ⁻³	-							
Colaboradora 1 30 m								
Siembra 10 ⁻¹	+							
Siembra 10 ⁻²	+							
Siembra 10 ⁻³	26*	+	+	+	+	-		+
Colaboradora 2 15 m								
Siembra 10 ⁻¹	+							
Siembra 10 ⁻²	+							
Siembra 10 ⁻³	130*	+	+	+	+	-		+
Colaboradora 2 30 m								
Siembra 10 ⁻¹	+							
Siembra 10 ⁻²	+							
Siembra 10 ⁻³	+	+	+	+	+	-		+

* UFC/ml

Esto indica que el desinfectante se inactiva en un tiempo menor de lo 15 minutos contribuyendo a partir de ese momento, a la contaminación y no al control.

Análisis de paletas utilizadas en la erradicación de plantas con agalla. En el rayado de los extremos de dos paletas hubo presencia de bacteria y además en la siembra de la suspensión del enjuague de las mismas se presentó un crecimiento de colonias que a 10⁻¹ fue incontable (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados del diagnóstico de las paletas de erradicación de plantas con agalla por medio de rayado de sus extremos y siembra de una muestra de la suspensión resultante del enjuague.

PALETAS DE ERRADICACIÓN	MS	GEL	OF	SIM	NaCl 5%	PAPA	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Erwinia herbicola</i>
Paleta 1								
Siembra 10 ⁻¹	+	+	+	+	+	-		+
Extremo 1	+							
Extremo 2	-							
Paleta 2								
Siembra 10 ⁻¹	+	+	+	+	+	-		+
Extremo 1	+							
Extremo 2	-							

Análisis de guantes utilizados en la erradicación de plantas con agalla. No se presentó crecimiento bacteriano en ninguna de las formas de análisis de los guantes (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados del diagnóstico de los guantes para erradicación de plantas con agalla por medio de rayado de índices y pulgares y siembra de muestras de las diluciones resultante del enjuague de los mismos.

GUANTES PARA ERRADICACION	MS
Guante derecho	
Índice	-
Pulgar	-
Guante izquierdo	
Índice	-
Pulgar	-
Siembra 10 ⁻¹	-
Siembra 10 ⁻²	-
Siembra 10 ⁻³	-

CONCLUSIONES

El díptero de la familia Ephydriidae es portador de la bacteria *Erwinia herbicola* y sumado a su alta población puede desempeñar un papel importante en la diseminación de esta bacteria.

Erwinia herbicola no se detectó en el agua de riego pero si en agua de lixiviación, estancada y canales.

La presencia de *Erwinia herbicola* en algunos de los sustratos tratados con vapor muestra que se está incurriendo en recontaminación en las labores de adición de correctivos y en su manejo.

El efecto del desinfectante "Timsen" es menor a 15 minutos.

Erwinia herbicola no se encontró en los guantes de las colaboradoras.

BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G.N. Enfermedades de las plantas causadas por procariontes. Fitopatología. 2ed. México, España, Venezuela, Colombia: Noriega, 2001. p. 531-543.

ALPÍZAR, M.D; FALLAS, G.M; OESLCHLAGER, C; GONZÁLEZ, L.M. Efecto de una feromona de agregación combinada para *Rhynchophorus palmarum* y *Metamasius hemipterus* sobre la incidencia de bacterias, hongos y sobre algunas variables de producción en el cultivo de palmito, Guápiles, Limón. Resúmenes IV Congreso costarricense de Entomología. San José, Costa Rica, 17-21 noviembre. 1997. 58p.

CLARK, E.; VIGODSKY-HAAS, H.; GAFNI, Y. Characteristics in tissue culture of hyperplasias induced by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. In: Physiological Molecular Plant Pathology. Vol.35, 1989; p. 383-390.

COOKSEY, D.A. Galls of *Gypsophila paniculata* caused by *Erwinia herbicola*. In: Plant Disease. Vol.70, 1986; p.464-468.

DIAZ, A.; OROZCO, M.. Efecto de la zona de localización del esqueje en la planta madre, sobre el enraizamiento de *Gypsophila paniculata* L. En: Agronomía Colombiana, Santafé de Bogotá. Vol.7, 1990; p. 47-53.

ELLIOT, C. Manual of bacterial plant pathogens. 2d. ed. Withman, Mass. Chronica Botanical. 1951. p. 47.

GONZALES, R. *Gypsophila paniculata* [En línea]: Holanda: Oficina Holandesa de flores, 2000. <<http://florvertical.com>> [Consulta: 22 Junio. 2002].

GUEVARA, Y.; RONDON, A.; ARNAL, E.; SOLÓRZANO, R. Perpetuación y diseminación de la bacteriosis de mango (*Mangifera indica* L.) (Res.) In: Seminario Nacional de Fitopatología (9., 1985, Maracay, Ven.). Memorias. Maracay, Sociedad Venezolana de Fitopatología. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 1985. p.1.

GUEVARA, Y.; RONDON, A.; ARNAL, E.; SOLÓRZANO, R. Bacteriosis del

mango (*Mangifera indica* L.) en Venezuela, distribución, perpetración, diseminación y evaluación de la resistencia de variedades. Agronomía Tropical. 35(4-6) 1986. 63-75.

MANULIS, S.; GAFNI, Y.; CLARK, E.; ZUTRA, D.; OPHIR Y.; BARASH, I. Identification of a plasmid DNA probe for detection of strains of *Erwinia herbicola* pathogenic on *Gypsophila paniculata*. Phytopathology 81. 1991. 54-57.

SHILLO, R. *Gypsophila paniculata*. In: Handbook of flowering. Florida: CRC Press. 1985. 83-87.