

**SUPERVIVENCIA Y DISPERSIÓN DE *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* y *E. carotovora* subsp. *Carotovora* EN EL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO**

Leopoldo Fucikovsky Zak, Luis Villarreal García\*

**RESUMEN**

Las erwinias pectinolíticas son consideradas como las bacterias más importantes causantes de pudriciones blandas en cultivos como papa, girasol, zanahoria, lechuga, coliflor, chile y jitomate. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) y *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) pudieron ser detectadas en suelos naturales infestados bajo condiciones de campo en el Valle de Toluca hasta una profundidad de 80 cm. Las bacterias no pudieron ser detectadas en el suelo durante el invierno. Por otra parte, Ecc y Eca fueron detectadas en el medio ambiente aéreo durante todo el año, aunque en los meses de la temporada fría y seca estuvieron asociadas a partículas de material vegetal y partículas de suelo de 0.025-1 mm de diámetro. El suelo en esta zona es volcánico y alto en materia orgánica. Asimismo, erwinias pectinolíticas fueron detectadas en todos los tubérculos de papa silvestre colectados en el Valle de Toluca y en las laderas del Nevado de Toluca (altura 2600 y 2800 msnm, respectivamente). Las erwinias pectinolíticas fueron aisladas de insectos de las familias Anthomyiidae, Scatopsidae, Drosophilidae, Muscidae y Sepsidae pero también de la lombriz de la tierra (*Lumbricus terrestris*), caracoles y ácaros. Mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas se pudo determinar que Eca y Ecc fueron las erwinias pectinolíticas asociadas con la enfermedad de la *pudrición blanda y pierna negra* de la papa en el Valle de Toluca, Edo. de México.

**Palabras claves adicionales:** Erwinias pectinolíticas, supervivencia, dispersión, papa silvestre.

Aceptado para publicación: febrero 20, 1992

\* Profesor-Investigador Titular, Centro de Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. C.P. 56230 y Profesor, Univ. Autónoma de Nuevo León. Fac. De Agronomía, Apartado Postal 358, San Nicolás de los Garza, N.L. México, respectivamente.

## SUMMARY

**SURVIVAL AND DISPERSIÓN OF *Erwinia Carotovora* subsp. *Atroseptica* and *E. C.* subsp. *Carotovora* IN THE TOLUCA VALLEY, MÉXICO**

Pectolytic erwinias are considered the most important soft rotting bacteria of crops such as potato, sunflower, carrot, lettuce, cauliflower, pepper and tomato. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) and *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) were detected in naturally infested soils under field conditions in the Toluca Valley up to the depth of 80 cm, but could not be detected in the soil during winter. The bacteria were detected in the air during the whole year except in the cold dry season, when they were associated with particles of plant material and soil particles of 0.025-1 mm in diameter. (The soil is volcanic in this zone and rich in organic matter). Pectolytic erwinias were also detected in all the wild potato tubers collected in the Toluca Valley and on the slopes of the Toluca volcano (height of 2600 and 2800 masl, respectively). The pectolytic erwinias were isolated from insects of the families Anthomyiidae, Scatopsidae, Drosophilidae, Muscidae and Sepsidae, but also from earthworms (*Lumbricus terrestris*), snails and miles. By biochemical and physiological tests it was determined that Eca and Ecc were associated with *soft roí* and *black leg* of potatoes in Toluca, State of México.

***Additional index words:*** *Pectolytic erwinias, survival, dispersion, wild pota toes.*

Especies de *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Flavobacterium* pueden ser consideradas como causantes de severas pudriciones de hortalizas en campo y en almacén (2, 6, 10, 11). Las erwinias pectinolíticas son consideradas los agentes causales más importantes de pudriciones blandas; usualmente producen maceración y pudrición del tejido parenquimatoso. El síntoma inicial en el cultivo de papa es marchitamiento y amarillamiento de las hojas superiores, y pudrición de la base del tallo donde la médula está desintegrada y es factible observar lesiones blandas, mucosas y de color negro brillante en los tubérculos (4).

La epidemiología de las erwinias pectinolíticas ha sido estudiada extensivamente; sin embargo, aún no ha sido enteramente entendida y en algunos aspectos, como la transmisión por semilla o por suelo, sigue siendo controversial (1,4,5,6,11).

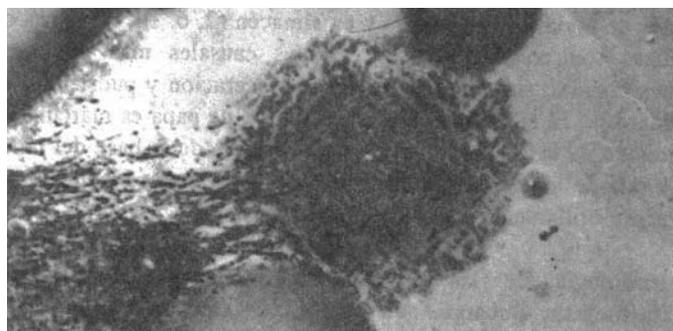
Lo anterior sugirió un estudio sobre aspectos de supervivencia, dispersión y patogenicidad de erwinias pectinolíticas. Los objetivos fueron determinar la presencia de erwinias pectinolíticas en el Valle de Toluca en diferentes niveles de profundidad de suelo cultivado con papa e infestado en forma natural con erwinias pectinolíticas en el ambiente aéreo durante diferentes épocas del año en la papa silvestre, lombriz de tierra, insectos, moluscos y ácaros. También se caracterizaron taxonómicamente los aislamientos bacterianos obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Supervivencia y dispersión de erwinias pectinolíticas en campo.*

Supervivencia en diferentes profundidades de suelo cultivado con papa e infestado en forma natural.

En el Valle de Toluca, Estado de México, se seleccionaron dos cultivos de papa de temporal afectados por la enfermedad de la *pierna negra*. Dentro de estos cultivos se consideraron cuatro sitios, donde plantas en pleno crecimiento estaban afectadas por la bacteria. La siembra de papa se realizó en verano comenzando en el mes de abril. Del 30 de julio de 1983 hasta el 30 de agosto de 1984, se realizaron muestreos mensuales del suelo en superficie y cada 10 cm, hasta una profundidad de 80 cm. Las muestras fueron tomadas con una barrena espiral, que se lavó con agua destilada y se desinfectó con fenol al 5% por 5 minutos después de la obtención de cada muestra. Las muestras fueron procesadas mediante la técnica modificada de Meneley y Stanghellini en 1976 (9). Posteriormente se seleccionaron y purificaron para su caracterización algunas de las colonias que en medio de casaminoácidos-peptona-glucosa (CPG) presentaban enrejillado al ser observadas al microscopio estereoscópico con luz oblicua (Figura 1) para su caracterización, ya que este aspecto es característico de las erwinias pectinolíticas (y en menor grado de algunas pseudomonas fluorescentes).



**Figura 1.** Colonia de *Ecc* mostrando el enrejillado típico. Observación hecha al microscopio estereoscópico con luz oblicua (x 100).

### ***Monitoreo de erwinias pectinolíticas en ambiente aéreo.***

Para este estudio se utilizó una estructura de madera de 1.20 m de altura con tres pequeños brazos cada 20 cm desde los 20 cm de altura. Esta estructura soportaba hasta 18 cajas Petri. La estructura fue colocada una vez al mes durante un año en las localidades donde se muestreó el suelo; las placas (con agar nutritivo y 0.02% de cloruro de tetrazolio) permanecieron expuestas durante 3 horas, se incubaron a 28°C durante 12 horas. Colonias con aspecto enrejillado se seleccionaron y se purificaron para su posterior caracterización.

### ***Superviviendo de erwinias pectinolíticas en papa silvestre, lombriz de tierra, insectos, moluscos y ácaros.***

Setenta tubérculos de papa silvestre (*Solanum stoloniferum*) Schelchdt et Bché (8) aparentemente sanos colectados en los meses de verano de 1983 en el Valle de Toluca y en la ladera del Nevado de Toluca fueron colocados bajo condiciones anaeróbicas en papel parafilm, con el fin de propiciar las condiciones para el desarrollo de bacterias en el tubérculo. De la médula del tubérculo se aislaron las bacterias, que fueron seleccionadas por el aspecto enrejillado de las colonias en luz oblicua y pruebas bioquímicas (7,12).

Las erwinias se aislaron también de los invertebrados colectados, mediante maceración o disección de insectos (entre 30-40 ejemplares), ácaros (15 o más), lombrices de tierra (15 a 20) y caracoles (10 o más).

### ***Determinación taxonómica de los aislamientos.***

Durante los estudios de campo, se seleccionaron y purificaron diez de las colonias que morfológicamente tuvieron aspecto enrejillado. Con el cultivo puro de estas colonias se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas para su caracterización (3, 7,12).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***Estudios de supervivencia y dispersión de erwinias pectinolíticas en el campo.***

Supervivencia y detección de erwinias pectinolíticas en diferente profundidad de suelo cultivado con papa e infestado en forma natural. Los muestreos de suelo mensuales mostraron que las erwinias pectinolíticas tenían distribución vertical en el suelo. De julio a octubre las bacterias pectinolíticas pudieron ser detectadas continuamente hasta 80 cm. de profundidad en ambas localidades. De noviembre a diciembre del mismo año en la Localidad 1, estas bacterias no pudieron ser detectadas en los sustratos superiores, antes de 30 cm.,

pero la detección fue positiva a mayor profundidad (Tabla 1) y en la localidad 2, las erwinias pectinolíticas fueron detectadas a 40 y 50 cm. De enero a marzo de 1984, la detección de estas bacterias fue negativa en la localidad 1, pero a partir de abril se detectaron en el estrato superficial y hasta 30 cm de profundidad (Tabla 1). En la localidad 2, esta bacteria no se detectó en ningún estrato durante enero y febrero, sólo superficialmente a partir de marzo y hasta 10 cm a partir de junio (Tabla 1).

**Tabla 1. Detección de erwinias pectinolíticas a diferente profundidad de suelo infestado en forma natural, durante julio de 1983 a agosto de 1984. (+) = presencia, (-) = ausencia.**

PROFUNDIDAD	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO
<b>Localidad 1. Km 19 Carretera Toluca-Temascaltepec</b>														
SUPERFICIE	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
cm														
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
20	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
30	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
40	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
50	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
70	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
80	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Localidad 2. Km 20 Carretera Toluca-Ixtapan de la Sal</b>														
SUPERFICIE	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
cm														
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
20	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
50	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
60	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
80	+		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Estos resultados indican que durante los meses fríos y secos en estas regiones las erwinias pectinolíticas no sobrevivan en el suelo. También existe la posibilidad de que las bacterias no sobreviven en capas superiores por la elevada radiación solar durante estos meses. Sin embargo, la presencia de estas bacterias se detectó solamente en estratos superficiales y no a mayor profundidad el año siguiente, posiblemente por la rotación de cultivos, ya que en la localidad 1 no hubo cultivo y en localidad 2 se sembró maíz.

**Monitoreo de erwinias pectinolíticas en ambiente aéreo.**

Las erwinias pectinolíticas pudieron ser colectadas del aire, en las dos localidades durante todo el año (Tabla 2); sin embargo, la frecuencia de éstas (determinadas por el número de colonias por caja petri) varió de acuerdo a la humedad relativa y a la velocidad de los vientos (Figuras 2 y 3).

**Tabla 2. Presencia de erwinias pectinolíticas en ambiente aéreo durante julio a agosto de 1984, en dos localidades. Localidad 1: Km. 19 carretera Toluca-Temascaltepec y Localidad 2: Km. 20 carretera Toluca-Ixtapan de la Sal, Mex. México.**

	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO
LOCALIDAD 1	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++	++	+	+	+
LOCALIDAD 2	+	+	+	+	++	+	+	++	++	+	++	+	+	+

+ = 1-30 colonias, ++ = 31-60 colonias, +++ = 61-100 o más colonias/caja.

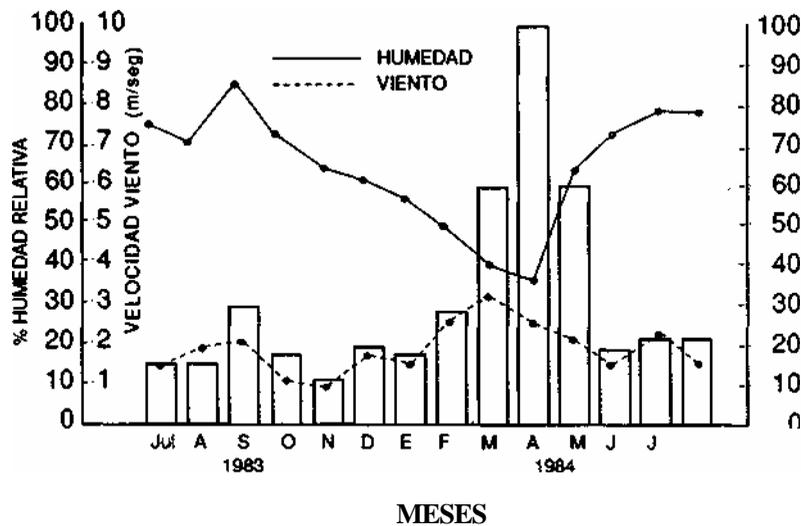


Figura 2. Correlación entre humedad relativa y la velocidad de viento con la concentración de erwinias pectinolíticas en ambiente aéreo, dada por el número de colonias colectadas por caja de petri. Localidad 1 Km., 19 carretera Toluca-Temascaltepec.

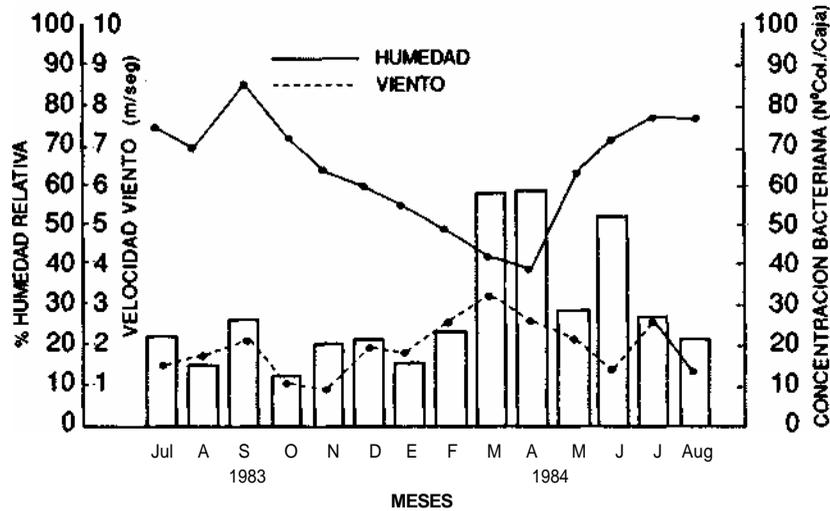


Figura 3. Correlación entre la humedad relativa y la velocidad de viento con la concentración de erwinias peptonolíticas en ambiente aéreo, dada por el número de colonias colectadas por caja de petri. Localidad 2 Km 20 carretera Toluca-Ixtapan de la Sal

De julio a diciembre de 1983, las poblaciones de erwinias se colectaron en relación directamente proporcional a la humedad relativa; por el contrario, de enero a marzo de 1984 dichas poblaciones tuvieron un comportamiento inverso a la humedad relativa y proporcional a la velocidad del viento (Figuras 2 y 3). Se observó que durante los meses de mayor sequía las colonias de erwinias colectadas se formaron a partir de pequeñas partículas de suelo y material vegetal. Resumiendo, se puede, decir que las erwinias peptonolíticas fueron colectadas continuamente durante todo el año en el ambiente aéreo.

***Supervivencia y detección de erwinias peptonolíticas en papa silvestre, lombriz de tierra, insectos, moluscos y ácaros.***

Erwinias peptonolíticas (Eca o Ecc) fueron aisladas en un 100% de los tubérculos de *S. stoloniferum* aparentemente sanos colectados entre agosto y octubre de 1983 en el Valle de Toluca y alrededores del Nevado de Toluca. Estos resultados obtenidos son relevantes debido a que la papa silvestre evidentemente está sirviendo de reservorio natural a la bacteria cuando no hay cultivo y estas bacterias pueden ser el inoculo primario en el siguiente ciclo agrícola dispersadas por vía del agua superficial o el aire.

Se pudieron aislar ambas subespecies de erwinias pectinolíticas del exterior de ácaros, del exterior e interior de *Lumbricus terrestris* y de caracoles. También se aislaron estas bacterias de *Drosophila* sp. y de otros insectos de las familias Anthomyiidae, Scatopsidae, Sepsidae y Muscidae. Aunque no existen referencias sobre estas bacterias en ácaros, lombriz de la tierra y caracoles, sí se han aislado anteriormente de individuos de las familias ya mencionadas con excepción de Anthomyiidae actuando como transmisores de *Erwinia* spp. en la pudrición blanda de girasol (6). Estas bacterias en caso de ácaros no se conocen de otros trabajos. Esto implica que las erwinias pectinolíticas pueden ser recirculadas y protegidas en la naturaleza por medio de estos organismos y así pueden sobrevivir. En el caso de la lombriz de la tierra se conoce que su movimiento es en forma vertical (hasta de 2 m) y horizontal, y esto puede facilitar la dispersión de estas bacterias en el suelo y darles oportunidad para poder sobrevivir en ciertas profundidades probablemente en condiciones anaeróbicas, bajo las cuales pueden subsistir o inclusive multiplicarse con mucha facilidad.

**Tabla 3. Características de las dos erwinias pectinolíticas aisladas de papa silvestre, del suelo, aire, insectos, lombriz de la tierra, ácaros y caracoles.**

CARACTERÍSTICAS	Eca	Ecc
Pudrición de papa	+	+
Hipersensibilidad en tabaco	-	-
Crecimiento a 19° C	+	-
a 37° C en PDA	-	+
Reacción de Gram	-	-
Flagelación peritrica	+	+
Oxidación/fermentación de glucosa	+/+	+/+
Producción de oxidasa	-	-
Producción de levana	-	-
Actividad pectinolítica en medio de polipeptato a: pH5.2	+	+
pH8.5	+	+
Producción de ácido a partir de:		
lactosa	+	+
maltosa	+	-
metilglucósido	+	-
Crecimiento en presencia de:		
cloruro de trifetil tetrazolio	+	+

En el caso de los insectos, las bacterias pueden ser transportadas por ellos y mantenerse vivas más tiempo cuando las larvas pasan su vida en material de descomposición.

Las erwinias pectinolíticas fueron aisladas del ambiente y de varios organismos relacionados con el suelo y también de la papa silvestre (*S. stoloniferum*) lo que implica que estas bacterias son muy versátiles y pueden sobrevivir en diferentes nichos ecológicos y en el futuro no debe subestimarse su potencial patogénico.

#### ***Determinación taxonómica de los aislamientos***

En base a una caracterización mediante pruebas fisiológicas, y microscopía electrónica para ver morfología y flagelación de las bacterias obtenidas durante los estudios de campo, se pudo determinar que las erwinias pectinolíticas involucradas en todos los casos fueron Eca y en algunos Ecc o ambas (Tabla 3).

### **AGRADECIMIENTO**

Se agradece sinceramente el apoyo del Centro de Fitopatología y la Estación Meteorológica de Toluca, así como a los agricultores cooperantes para la realización de esta investigación.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Aleck, J.R.; Harrison, M.D. 1978. The influence of inoculum density and environment on the development of potato blackleg. *Am. Potato J.* 55:479-493.
2. Arsenijevic, M. 1978. Erwinia soft-rot bacteria originating from pepper and tomato fruits. *Proc. 4th. Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers. Ed. I.N.R.A.* 11:531-537.
3. Buchanan, R.E.; Gibbons, M.E. (eds.). 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 8th. ed. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1126p.
4. Cartin, L.F.; Fucikovsky, L. 1980. Distribución de la pierna negra de la papa en México y la supervivencia de las bacterias causales. *Agrociencia* 39:59-66.
5. De Boer, S.H.; Allan, E.; Kelman, A. 1979. Survival of *Erwinia carotovora* in Wisconsin soils. *Am. Potato J.* 56:243-351.
6. Fucikovsky, L.; Galindo, J.; De la I. de Bauer, M. de L. 1979. Pudrición blanda del capítulo del girasol. *Agrociencia* 34:31-44.

7. Graham, D.C. 1972. Identification of softrot coliform bacteria. Proc. 3rd. Int. Conf. Plant Path. Bact. Wageningen. p. 273-279.
8. Hawkes, J.G. 1990. The potato evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, London. p. 189-191.
9. Meneley, J.C.; Stanghellini, M.E. 1976. Isolation of soft rot *Erwinia* spp. from agricultural soils using an enrichment technique. *Phytopathology* 66:367-370.
10. Perombelon, M.C.M. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. *Ann. Rev. Phytopathology* 18:361-387.
11. Perombelon, M.C.M.; Guillings-Handley, J.; Kelman, A. 1979. Population dynamics of *Erwinia carotovora* and pectolytic *Clostridium* spp. in relation to decay of potato. *Phytopathology* 69:167-173.
12. Schaad, M.W. 1980. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Am. Phytopath. Soc., St. Paul, Minn. 72 p.