

## Presencia de *Pseudomonas marginalis* y *P. viridiflava* sobre Kiwi en Galicia

JOSÉ PEDRO MANSILLA VÁZQUEZ Y ADELA ABELLEIRA ARGIBAY

*Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas marginalis* han sido identificados como agentes causantes de la pudrición y caída del botón floral. Estos patógenos fueron aislados de muestras de plantaciones de kiwi (*Actinidia deliciosa*) de la provincia de Pontevedra.

JOSÉ PEDRO MANSILLA VÁZQUEZ Y ADELA ABELLEIRA ARGIBAY: Estación Fitopatológica «Do Areiro», Servicio Agrario, Exema. Diputación Provincial de Pontevedra, Subida a la Robleada s/n, 36153 Pontevedra.

**Palabras clave:** *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas marginalis*, Kiwi.

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de Kiwi (*Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson) se inicia en España en 1969. Las primeras plantaciones se van a establecer en la Comunidad Gallega, en las zonas de Gondomar y Tuy. En 1983 la extensión ocupada era de 80 Ha, alcanzando en 1990 las 1000 Ha, de las cuales, un 50% se encuentran en Galicia y, más concretamente, en la provincia de Pontevedra (SALINERO, M. C. y DEL RÍO, C., 1992).

En la actualidad, la totalidad de la superficie dedicada a este cultivo se mantiene prácticamente igual y, aunque el tamaño de las explotaciones se ha visto reducido, queda compensado por el aumento del número de plantaciones de menor superficie (SALINERO, M. C. comunicación personal).

La Estación Fitopatológica «Do Areiro» ha compaginado el estudio de la dinámica del cultivo del kiwi en la provincia de Pontevedra con la investigación de su problemática fitosanitaria. Desde el momento en que han

ido surgiendo los primeros problemas fitopatológicos, éstos han sido analizados para poder hacer una evaluación de la incidencia y repercusión que pudieran tener sobre el kiwi. Así, en las primeras publicaciones realizadas sobre estos estudios con respecto a la presencia de diferentes enfermedades de etiología bacteriana detectadas en Galicia, ya se hizo referencia a *Agrobacterium tumefaciens*. (MANSILLA, J. P. et al 1988).

Es a partir del año 1988, cuando comienza el estudio de la posible presencia de *Pseudomonas* spp. que podrían ser causantes de enfermedades en el botón floral. Estos problemas aparecen, en primavera, en las plantaciones de la provincia de Pontevedra (MANSILLA y ABELLEIRA, 1990) y manifiestan los síntomas que a continuación se detallan:

1. **Sobre botón floral** los sepalos toman una tonalidad ferruginosa que evoluciona a una necrosis marrón aceitosa responsable de la podredumbre y caída del botón afectado. En estados fenológicos más avanzados se observan los pétalos marrones, continuando

este marchitamiento hacia el interior de la flor, lo que provoca una pudrición blanda del gineceo y la consiguiente caída del botón floral. Se ha podido observar que en algunos casos, el botón afectado permanece durante largo tiempo unido al pedúnculo sin caer, hasta que se seca totalmente.

2. **En las hojas** se presentan dos tipos distintos de manchas; unas son pequeñas, angulosas, necróticas, rodeadas de un halo clorótico que no evolucionan; otras son negruzcas, comienzan desde el borde del limbo y alcanzan a toda la hoja provocando su caída.

3. **En ramas y tronco** no se aprecia ninguna sintomatología que pudiera asociarse a esta enfermedad.

En las plantas que manifestaron esta sintomatología se realizaron aislamientos y test de patogenicidad. Tales pruebas, detalladas a continuación, confirmaron la presencia de *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens y *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson 1939, como las responsables de la pudrición del botón floral.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Aislamientos:** Para el aislamiento de las bacterias se tomaron muestras (botones y hojas) que presentaban los síntomas anteriormente señalados. Las muestras fueron lavadas por separado en agua estéril; de las zonas de avance de la enfermedad se cortaron pequeños trocitos que fueron puestos a macerar en agua estéril durante 20 minutos. Posteriormente se procedió a su siembra en distintos medios; **King B** (Proteosa pectona [n.º 3 Difco, Oxoid 146] 20g.; glicerol 10g.; PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 1,5g.; SO<sub>4</sub>Mg. 7H<sub>2</sub>O 1,5g.; Agr 15 g.; Agua destilada 1 Litro. Ajustar el pH a 7,2 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos), **LPGA** (Extracto de Levadura 5 g.; Proteosa pectona 5g.; D-glucosa 10g.; Agar [Oxoid n.º 3] 12 g.; Agua destilada 1 litro) y **NA** (Extracto de carne 1g.; Extracto de levadura 2g.; Peptona de carne 5g.; Cl Na 5 g.; Agar 15 g.; Agua destilada 1 litro). Incubándose a 25°C durante dos días.

Paralelamente se procedió a la colocación en cámara humedad de numerosos botones florales que presentaban la sintomatología señalada, ya que estos daños también se pueden asociar a la presencia de *Botrytis cinerea*.

Las muestras fueron tomadas en un periodo de dos años sucesivos siguiendo el protocolo de aislamiento anteriormente descrito (en adelante se hará referencia a estas muestras como aislamiento del primer año y aislamiento del segundo año).

**Pruebas bioquímicas:** En los aislamientos de los dos años se determinó el Gram y la presencia de pigmentos fluorescentes, así como la reducción de nitratos e hidrólisis de la gelatina (estas dos últimas solo para un aislamiento).

Para la identificación de los aislamientos se ha seguido el método de LOPAT propuesto por LELLIOT *et al* en 1966 (LELLIOT, R. A. y STEAD, D. E. 1987) para la determinación de *Pseudomonas* fluorescentes. En el se realizan las siguientes pruebas: Producción de levano, reacción de la oxidasa, podredumbre de la patata, arginina dihidrolasa e hipersensibilidad al tabaco.

**Pruebas de patogenicidad:** Se realizan durante dos años, ya que cada año se obtuvieron aislamientos diferentes, el primer año *Pseudomonas marginalis* y el segundo año *P. viridiflava*.

### Primer año

Con el aislamiento de *Pseudomonas marginalis* se realizó el test de patogenicidad; para ello se preparó una suspensión bacteriana a una concentración de  $3 \sim 10^8$  CFU/ml. en agua estéril, procedente de cultivo de 48 horas. Se procedió a la inoculación de esta suspensión en hojas y brotes, infiltrando con ayuda de una jeringuilla la cantidad de 0,4 ml. de cada vez.

Las inoculaciones se realizaron sobre hojas jóvenes, hojas más viejas y brotes terminales. El material vegetal elegido fueron plantas de *Actinidia deliciosa* variedad Hayward, de dos años, que se encontraban en vivero bajo sombrero.

Cuadro 1. - Resultados de la pruebas de caracterización de los aislamientos obtenidos y claves para la determinación de *P. marginalis* y *P. viridiflava* (1)

Pruebas caracterización	Caracterización de <i>Pseudomonas marginalis</i>	Aislamiento primer año	Caracterización de <i>Pseudomonas viridiflava</i>	Aislamiento segundo año
Gram	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Levano	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
Oxidasa	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
Podredumbre de la patata	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Arginina	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
Hipersensibilidad del tabaco	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Hidrólisis de la gelatina	Positivo	Positivo	Positivo	
Reducción de nitratos	Positivo	Positivo	Negativo	

(1) Datos de la clave para determinación de *Pseudomonas* fluorescentes. Fahy y Lloyd (1983).

### Segundo año

Este año la inoculación se realizó con *P. viridiflava*. Para proceder a las pruebas de patogenicidad se tomaron, esta vez, plantas de vivero de varias especies de *Actinidia* (*A. deliciosa*, *A. arguta*, *A. poligona*), cuatro por cada especie. Se inocularon los brotes con el método del año anterior, en las hojas se adoptó la técnica de raspar con aguja hipodérmica sobre su limbo. Posteriormente se pulverizaron estas heridas con ayuda de un frasco atomizador que contenía la suspensión de la bacteria anteriormente aislada a la concentración de  $3 \times 10^8$  CFU/ml. en agua estéril. Finalmente se cubrieron durante 48 horas con una bolsa negra, dos plantas de cada especie.

## RESULTADOS

### Aislamiento y caracterización del patógeno

La lectura del crecimiento en las placas se efectuó a las 48 horas, observándose la presencia de colonias fluorescentes pequeñas y aisladas sobre el medio King B. En LPGA aparecieron pequeñas colonias claramente diferenciadas de tonalidad blanquecina. A las

48 horas de la primera lectura se repicaron las colonias de King B para ver con más claridad la fluorescencia y proceder a su caracterización. Hasta el momento lo que se tenía eran *Pseudomonas* fluorescentes.

Para proceder a la caracterización de los aislamientos se ha realizado el test de LOPAT, así como otras pruebas bioquímicas. Los resultados son los siguientes (Cuadro 1):

Las lecturas de tabaco y patata se efectuaron a las 24 horas.

Todas estas pruebas fueron realizadas para los aislamientos de las muestras de botones florales, y hojas, dando en todos los casos los mismos resultados.

Con estos datos y utilizando la clave que citan FAHY y LLOYD (1983) para la determinación e identificación de *Pseudomonas* fluorescentes, se ha llegado a la conclusión de que las bacterias fitopatógenas aisladas de los daños anteriormente citados corresponden el primer año a *Pseudomonas marginalis* y el segundo año a *Pseudomonas viridiflava*, ambas no asociadas hasta el momento en nuestro país a este cultivo.

Los botones que se pusieron en cámara húmeda para determinar la presencia de *Botrytis cinera*, resultaron afectados en un 2% por lo que se descartó que fuese el patógeno principal.



Fig. 1 - Síntomas en hoja de *Pseudomonas viridiflava*.

### Pruebas de patogenicidad

Con respecto a la metodología seguida el primer año que se inoculó *P. marginalis*, los síntomas de la prueba de patogenicidad comenzaron a manifestarse a las 48 horas de haber realizado la inoculación observándose una desecación en las zonas marginales de las hojas jóvenes que se iba acentuando a medida que pasaban los días. Paralelamente, también se producía un desecamiento en los brotes terminales, que llegaban a secarse, al igual que las hojas jóvenes. Por el contrario, en las hojas más viejas no aparecían síntomas.

De los brotes y hojas que presentaban necrosis y desecaciones marginales se volvió a repetir el proceso de aislamiento y caracterización, obteniéndose *P. marginalis*. Estos resultados confirman los obtenidos en el aislamiento (Cuadro 2).

El segundo año en que se aisló *P. viridiflava* los síntomas de la prueba de patogenicidad comenzaron a manifestarse a los tres días de la inoculación, apareciendo los primeros síntomas de necrosis en los brotes, por el contrario en las hojas tan sólo se apreciaban las heridas provocadas por la aguja.

Finalmente estas heridas sólo evolucionaron en *Actinidia deliciosa* observándose una



Fig. 2 y 3. - Daños en botón floral.

Cuadro 2. - Inoculación de *Pseudomonas marginalis* sobre *Actinidia deliciosa*

Zonas de inoculación	Plantas inoculadas	Testigos
Brotes	+	-
Hoja joven	+	-
Hoja adulta	-	-

Cuadro 3. - Inoculación de *Pseudomonas viridiflava* sobre *Actinidia spp*

Zonas de inoculación	A. poligona			A. arguta			A. deliciosa		
	Pc	Psc	T	Pc	Psc	T	Pc	Psc	T
Brotos	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Hoja joven	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Pc: Plantas cubiertas con bolsa negra

Psc: Plantas sin cubrir

T: Testigo

necrosis tanto en los márgenes de las hojas como en los brotes terminales que se habían inoculado, siendo éstos síntomas más acusados en las plantas que fueron cubiertas.

De las partes afectadas se volvió a tomar muestra para proceder a su aislamiento y caracterización obteniéndose de nuevo *P. viridiflava*, por lo que se confirmaba la presencia de esta bacteria patógena en el cultivo de *A. deliciosa* (Cuadro 3).

## CONCLUSIÓN

- Actualmente en las plantaciones de kiwi de nuestra Comunidad se ha aislado e identificado *Pseudomonas marginalis* y *Pseudomonas viridiflava* como causante de la pudrición y caída del botón floral.

- Los daños ocasionados hasta la fecha han variado, tanto en diferentes plantaciones como en los distintos años que llevamos analizando las muestras que presentaban los síntomas señalados, siendo en algunos casos importante el porcentaje de botones afectados (40%), con la consiguiente pérdida de fruto.

- Hasta el momento no se ha detectado en nuestra zona la especie *Pseudomonas syringae pv syringae* van Hall y *P. syringae pv actinidiae* Takikawa et al, citada en otros países donde esta implantado el cultivo del kiwi, estando esta enfermedad principalmente asociada al marchitamiento y a la producción de chancros en ramas y tronco de kiwi, aunque pueden aislarse igualmente de botones florales necrosados (SCORTICHINI, M. 1995).

## ABSTRACT

MANSILLA VÁZQUEZ, JOSÉ PEDRO Y ABELLEIRA ARGIBAY, ADELA, 1999: Ponencia de *Pseudomonas marginalis* y *P. viridiflava* sobre Kiwi en Galicia. *Bol. San Veg. Plagas*, 25 (2): 175-180.. *Pseudomonas viridiflava* and *Pseudomonas marginalis* have been identified as causal agent of blight and fall down of floral buds. These pathogens have been isolated on a samples from kiwi orchards in Pontevedra province.

**Key words:** *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas marginalis*, Kiwi.

## REFERENCIAS

- FAHY, P. C. y LLOYD, A. B., 1983: *Pseudomonas*: The Fluorescent *Pseudomonads*. p 141-188. In :Plant Bacterial Diseases FAHY, P. C. y PERSLEY, G. J. Academic Press, Australia. 393 pp
- LELLIOT, R. A. y STEAD, D. E., 1987: Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. BSPP 216 pp.
- MANSILLA, J. P., VÁZQUEZ, R. A., ABELLEIRA, A. y SALINERO, M. C., 1988: Problemática fitosanitaria de la *Actinidia* en Galicia. Boletín Sanidad Vegetal. Plagas 14 (2): 279-283.
- MANSILLA, J. P. y ABELLEIRA, A., 1990: Detección de *Pseudomonas marginalis* (Brown) Stevens en plantaciones de kiwi (*Actinidia deliciosa*) en la provincia de Pontevedra. I Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas. Lisboa (Portugal).p 380-384.
- SALINERO, M. C. y DEL RÍO, C., 1992: *Actinidia deliciosa* en España. Antecedentes y desarrollo de su implantación. Hortofruticultura 6:42-54.
- SALINERO, M. C.: Comunicación personal.
- SCORTICHINI, M., 1995: *Malttie Bacteriche delle colture agrarie*. Edagricole.436pp.

(Recepción: 30 junio 1998)  
(Aceptación: 18 enero 1999)