

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas* PATÓGENAS DE KIWÍ EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Sánchez M.C.^{1,2}, Clemente G.E.¹, Yommi A.K.³, Alippi A.M.^{2,4}, Ridao AdelC.¹

Unidad Integrada Balcarce (¹FCA-UNMDP/³INTA EEA Balcarce); ²Comisión de Investigaciones Científicas, CIC;

⁴UNLa Plata. sanchez.mariaclara@inta.gob.ar

Introducción

La producción de kiwi (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. S. Liang et. A.R. Ferguson) en Argentina ha crecido sostenidamente en los últimos años. Este cultivo se desarrolla principalmente en la provincia de Buenos Aires, en el norte (La Plata, Baradero, San Pedro y Mercedes) y en el sudeste (partidos de Gral. Pueyrredón, Gral. Madariaga, Gral. Alvarado, Balcarce y Mar Chiquita). El sudeste ha duplicado la superficie dedicada al kiwi y se ha convertido en la zona más importante del país al producir la mitad del volumen nacional. En la actualidad alrededor de 800 ha se encuentran implantadas con este cultivo en el país, de las cuales el 88 % está en producción (SINAVIMO, 2014).

Las enfermedades constituyen uno de los principales factores limitantes para el desarrollo del cultivo de kiwi. Entre ellas, las de origen bacteriano son una de las causas de mayores pérdidas en la producción a nivel mundial (Gubler y Conn, 1994). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*), *P. syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), *P. viridiflava* y *P. marginalis* son bacterias patógenas que afectan al cultivo. Han sido reportadas causando manchas necróticas y angulares en hojas, tizón de flores, caída de botones florales y canchales en ramas (Wilkie *et al.*, 1973; Young *et al.*, 1988; Takikawa *et al.*, 1989; Balestra y Vavaro, 1997; Argibay y Vazquez, 1999; Mansilla y Abelleira, 1999; Gonzales y Rodicio, 2007; Balestra *et al.*, 2009; Gallelli *et al.*, 2011; EPPO, 2014). *Psa* es el agente causal del cancro bacteriano del kiwi, la enfermedad más severa y destructiva de este cultivo (EPPO, 2014). Se encuentra presente en la mayoría de las zonas productoras de kiwi del mundo (Scortichini *et al.*, 2014). Ha causado serias limitantes en Japón y Corea, y ha provocado importantes pérdidas económicas en países como Italia y Nueva Zelanda, los mayores productores mundiales (Scortichini *et al.*, 2012). En nuestro país *Psa* se considera plaga cuarentenaria A1. En el año 2013, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) declaró el alerta fitosanitario y a través de la Resolución 589/2013 se cuenta con medidas preventivas para evitar la introducción y dispersión del patógeno. Desde entonces, se ha desarrollado un plan de monitoreo en plantaciones y viveros de kiwi para detectar su presencia y evitar su diseminación en el territorio. En marzo de 2015 SENASA detectó tres muestras positivas de la bacteria en material vegetal de kiwi en el partido de Gral. Pueyrredón, procediendo inmediatamente a su erradicación.

Considerando que en el país no existen trabajos de diagnóstico e identificación fehaciente sobre enfermedades producidas por bacterias en el cultivo de kiwi, y que éstas podrían convertirse en una limitante para la producción, resulta imprescindible generar conocimientos sobre las mismas, profundizar en su etiología y caracterizar los aislamientos locales. El objetivo de este trabajo fue detectar y aislar bacterias patógenas provenientes de plantaciones comerciales de kiwi de la provincia de Buenos Aires, e identificar y caracterizar bacterias patógenas del género *Pseudomonas* por morfología, pruebas bioquímicas y fisiológicas y PCR.

Hipótesis

- Bacterias patógenas del género *Pseudomonas* se encuentran presentes en plantaciones comerciales de kiwi de la provincia de Buenos Aires.
- Entre las especies patógenas de *Pseudomonas* presentes en plantaciones de kiwi de la provincia de Buenos Aires, está *P. syringae* pv. *actinidiae*.

Materiales y Métodos

Toma de muestras: Durante primavera y otoño de 2015 y 2016 se monitorearon plantaciones de kiwi ubicadas al norte y sudeste de la provincia de Buenos Aires. El monitoreo consistió en un recorrido sistemático y completo de cada lote, siguiendo un diseño en forma de "U". Se observaron la totalidad de las plantas de un interfilas cada tres, y se tomó una muestra de una planta cada diez de la fila izquierda. Se colectaron muestras de hojas, brotes y flores, considerando aquellos órganos que presentaban síntomas

como también los que eran asintomáticos. Todas las muestras fueron acondicionadas en el laboratorio para su análisis.

Aislamiento del patógeno: Los aislamientos se realizaron desde extractos de tejido vegetal por dilución seriada a la décima sobre Agar Nutritivo enriquecido con Sacarosa (ANS). Las placas se incubaron durante dos días a 24 °C y las colonias fueron repicadas nuevamente sobre los medios ANS y King B (KB), antes de proseguir con su identificación. Sobre el medio ANS se observaron características macroscópicas de las colonias, tamaño, forma, agrupamiento y la producción de Levan. Sobre el medio de cultivo KB se evaluó la producción de pigmentos fluorescentes de las colonias.

Identificación preliminar: Las características bioquímicas y metabólicas de los aislamientos se evaluaron a través de las pruebas propuestas en el protocolo EPPO (2014): Reacción Gram, basada en solubilidad en hidróxido de potasio (KOH) 3%, prueba de Óxido/Fermentación (test de Hugh y Leifson), presencia de la enzima Citocromo oxidasa y Test de Hipersensibilidad en tabaco.

Determinación por PCR: La identidad de los aislamientos cuyas características bioquímicas y fisiológicas coincidían con las de la especie *Pseudomonas syringae* fue confirmada mediante PCR. Para diferenciar entre ambos patógenos (*syringae* y *actinidiae*) se realizó una PCR-duplex que amplifica segmentos específicos para *Psa*. La reacción utiliza dos pares de iniciadores dirigidos a distintas regiones cromosómicas (KN-F/R, obtenido por análisis de RAPD y RFLP, y Avr/DdxF/R para la secuencia del gen AvrD1). Como templado se utilizaron colonias lisadas y se incluyeron un control positivo de ADN de *Psa* y un control negativo (sin templado).

Resultados y Discusión

Durante octubre y noviembre del año 2015 se muestrearon seis plantaciones de kiwi, una ubicada en Balcarce, una en Gral. Alvarado y cuatro correspondientes al partido de Gral. Pueyrredón. Durante abril y mayo del año 2016, se tomaron muestras de dos plantaciones del partido de La Plata, cinco de Gral. Pueyrredón, y una de Balcarce. En total se recolectaron aproximadamente 200 muestras de las distintas zonas consideradas en este estudio.

Se obtuvieron 120 aislamientos bacterianos que provenían tanto de muestras de órganos con síntomas como asintomáticos. Los síntomas correspondieron a manchas pequeñas, necróticas y angulares en las hojas, algunas con presencia de halo clorótico, botones florales con manchas necróticas y acuosas en los sépalos, tizón de flores y pétalos necrosados.

Las bacterias del género *Pseudomonas* pueden clasificarse a partir de las pruebas LOPAT: producción de Levan, reacción de la enzima Citocromo Oxidasa, mancha necrótica de Papa, Arginina dehidrolasa y reacción de hipersensibilidad en Tabaco (Goszczyńska *et al.*, 2000). Takikawa *et al.* (1989) y Scortichini (1994), identifican a *Psa* y *Pss* con un perfil LOPAT (+---+). Estas pruebas son suficientes para una primera caracterización de los aislamientos, pero insuficientes para discriminar *Psa* de *Pss*. Ferrante y Scortichini (2009) y Everett *et al.* (2011) entre otros, describen la morfología de las colonias de *Psa* en medio NAS como: lisas, convexas, redondas de borde definido, nacaradas de color blanquecino. *P. marginalis* presenta un perfil LOPAT (++++-), mientras que *P. viridiflava* (--+-) (Mansilla y Abelleira, 1999; Gonzales y Rodicio, 2007). Las colonias de esta última especie son blanco-amarillas, medianas y mucoides, con centros verde oscuros en medio ANS (Wilkie *et al.*, 1973; Balestra y Varvaro, 1997). En la Tabla 3 se muestran las características de las principales especies de *Pseudomonas* patógenas citadas para el cultivo de kiwi (Young *et al.*, 1988; Mansilla y Abelleria, 1990; Balestra y Varvaro, 1997; Goszczyńska *et al.*, 2000).

Tabla 3. Características bioquímicas y fisiológicas de las principales especies de *Pseudomonas* patógenas del cultivo de kiwi (Young *et al.*, 1988; Mansilla y Abelleria, 1990; Balestra y Varvaro, 1997; Goszczyńska *et al.*, 2000)

	Reacción Gram	Reacción Óxido/Fermentación	Fluorescencia	Producción de Levan	Presencia de la enzima Citocromo Oxidasa	Mancha necrótica en Papa	Arginina dehidrolasa	Hipersensibilidad en Tabaco
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	+/-	(+) la mayoría					
<i>P. viridiflava</i>	-	+/-	+	-	-	+	-	+
<i>P. marginalis</i>	-	+/-	+	+	+	+	+	-
<i>P. syringae</i>	-	+/-	+	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	-	+/-	(-)*	+	-	-	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	-	+/-	+	+	-	-	-	+

*Se han registrado mundialmente aislamientos fluorescentes y no fluorescentes.

De los 120 aislamientos obtenidos, 70 fueron Gram negativos y de reacción oxidativa (o aeróbicos) por lo que se seleccionaron como posibles *Pseudomonas* spp. (Goszczyńska *et al.*, 2000). Los aislamientos que presentaron producción de levan en medio ANS y fueron fluorescentes o no en medio KB, se eligieron como posibles *P. syringae* (Takikawa *et al.*, 1989; Scortichini, 1994). La fluorescencia no fue utilizada como criterio de clasificación, ya que a nivel mundial se han citado aislamientos de *Psa* fluorescentes y no fluorescentes en KB (Everett *et al.*, 2011; Vanneste *et al.*, 2011; Froud *et al.*, 2015). De los 70 aislamientos, 30 presentaron características de las colonias coincidentes con lo citado para *Psa* (Ferrante y Scortichini, 2009; Everett *et al.*, 2011; EPPO, 2014;). Éstas eran color grisáceo, nacaradas, convexas, redondas, de borde definido. Aquellos aislamientos que eran fluorescentes en KB, pero no producían levan en ANS, podrían ser clasificados como *P. viridiflava* (Wilkie *et al.*, 1973; Young *et al.*, 1988; Balestra y Vavaro, 1997). *P. marginalis* se diferencia de las anteriores, por poseer enzima citocromo oxidasa positiva, y reacción de hipersensibilidad en tabaco negativa (Mansilla y Abelleira, 1999; Gonzales y Rodicio, 2007).

Los 30 aislamientos bacterianos elegidos como posibles *P. syringae* fueron sometidos a PCR-duplex propuesta por Gallelli *et al.* en 2011 para confirmar si se trataba de aislamientos de *Psa*. Todas las reacciones resultaron negativas. Este resultado demuestra la ausencia de *Psa* en las muestras analizadas. La identificación del resto de los aislamientos asociados con manchas necróticas en hojas, manchas en sépalos y tizón de flores será realizada consiguientemente a través de las correspondientes pruebas.

Bibliografía

- ARGIBAY, A.A. y VÁZQUEZ, J.P.M. 1999. Presencia de *Pseudomonas marginalis* y *P. viridiflava* sobre kiwi en Galicia. Boletín de sanidad vegetal. Plagas, 25(2): 175-180.
- BALESTRA, G.M. y VARVARO, L. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. Journal of Phytopathology, 145(8) -378375
- BALESTRA, G.M.; PERESTRELO, L.; MAZZAGLIA, A.; ROSSETTI, A. 2009. First report of blossom blight caused by *Pseudomonas syringae* on kiwifruit plants in Portugal. Journal of Plant Pathology, 91(1): 231-240.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO). 2014. PM 7/120 (1) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Boletín 44 (3), 360-375.
- EVERETT, K.R.; TAYLOR, R.K.; ROMBERG, M.K.; REES-GEORGE, J.; FULLERTON, R.A.; VANNESTE, J.L.; MANNIN, M.A. 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. Australasian Plant Pathology Society Inc. 6:67-71.
- FERRANTE, P. y SCORTICHINI, M. 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. Journal of Phytopathology, 157(11) -772:768
- FROUD, K.J.; EVERETT, K.R.; TYSON, J.L.; BERESFORD, R.M.; COGGER, N. 2015. Review of the risk factors associated with kiwifruit bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Insects and diseases in apple and kiwifruit. New Zeland Plant Protection 68: 313-327.
- GALLELLI, A; L'AURORA, A y LORETI, S. 2011. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. Journal of Plant Pathology 93 (2), 425-435.
- GONZÁLEZ, A. J. y RODICIO, M.R. 2007. Caída del botón floreal en kiwi causada por *Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas syringae* en el Principado de Asturias. Boletín de sanidad vegetal. Plagas. 33(4): 517-526.
- GOSZCZYŃSKA, T.; SERFONTSEIN, J.J.; SERFONTSEIN, S. 2000. Introduction to Practical Phytobacteriology. Bacterial Diseases Unit, ARC-PPRI, South Africa SDC, Swizerland. 83 p.
- GUBLER, W. y CONN, K. 1994. Diseases in Kiwifruit: growing and handling. Hasey, J. Johnson, R., Grant, J and Reil. (Eds.) publication 3344. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 134 p.
- MANSILLA, J P; ABELLEIRA, A. 1999. Detección de *Pseudomonas marginalis* (Brown)Stevens en plantaciones de kiwi (*Actinidia deliciosa*) en la provincia de Pontevedra. I Congreso Ibérico de Cincias Horticolas. Lisboa (Portugal).380-384.
- SCORTICHINI, M. 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. Plant Pathology, 43(6): 1035-1038.
- SCORTICHINI, M.; FERRANTE, P.; MARCELLETTI, S.; PETRICCIONE, M. 2014. Omics, epidemiology and integrated approach for the coexistence with bacterial canker of kiwifruit, caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Italian Journal of Agronomy 9:606.
- SCORTICHINI, M; MARCELLETTI, S; FERRANTE, P PETRICCIONE, M. y FIRRAO, G. 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pahogen. Molecular Plant Pathology. 9 p.
- Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SINAVIMO). 2014. Situación Fitosanitaria del Cultivo de Kiwi en Argentina. [En línea] <http://www.senasa.gov.ar/> [consulta: 27 de Marzo de 2015]
- SENASA 2015. Comunicado SENASA: Sur bonaerense: detección de tres muestras positivas de la bacteria PSA en material vegetal de kiwi. [En línea] <<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=11&ino=11&io=30050>> [consulta: 10 de Abril de 2015]
- TAKIKAWA, Y.; SERIZAWA, S; ICHIKAWA, T; TSUYUMU, S y GOTO, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. Annals of the Phytopathological Society of Japan 55: 437-444.
- VANNESTE, J.L.; GIOVANARDI, D.; YU, J.; CORNISH, D.A.; KAY, C.; SPINELLI, F. 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit pollen samples. New Zealand Plant Protection 64, 246-251
- WILKIE, J.P.; DYE, D.W.; WATSON, D.R.W. 1973. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. New Zealand Journal of Agricultural Research, 16(3): 315-323.
- YOUNG, J M; CHEESMUR, G J; WELHAM, F V; HENSHALL, W R. 1988. Bacterial blight of kiwifruit. Annals of applied biology, 112(1), 91-105.