

PATOGENECIDAD DE *Agrobacterium tumefaciens* EN ALGUNAS ESPECIES DE PLANTAS DE FLORES DE EXPORTACION*

Germán Ovalle
Germán Benincore y
Germán Arbeláez**

ABSTRACT

Pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* in some export flower plant species. G. Ovalle, G. Benincore y G. Arbeláez. 1983. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Three isolates of *Agrobacterium tumefaciens* from rose plants affected with crown gall in the Savanna of Bogotá have been characterized and identified by laboratory test and by inoculation in tomato plants, carrot and beet root disks. Pathogenicity was tested in the field on rose, carnation, statice, chrysanthemum and gypsophila plants which are important species in the country for the production of export flowers. Their pathogenicity was also tested on eucaliptus, beet, tomato and geranium plants, common hosts of the bacteria; these tests were carried out on 45 days old plants and propagation material. The isolates were highly pathogenic on rose and eucaliptus plants, moderately pathogenic on carnation and statice and presented very low pathogenicity on chrysanthemum. There was no infection on gypsophila. Tomato, beet and geranium plants presented high susceptibility to the bacteria and can be of great usefulness for the diagnosis of the disease.

INTRODUCCION

Entre los diferentes tipos de agallas que se presentan en los vegetales, uno de los más importantes desde el punto de vista económico es la "agalla de corona" causada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Esta enfermedad es bastante común en varios países de las regiones templadas y tropicales del mundo y es frecuente atacando una gran cantidad de plantas hospedantes. (5,11).

La enfermedad tuvo una gran importancia económica durante 1979 y 1980 en algunos cultivos de rosa y crisantemo destinados a la exportación en la Sabana de Bogotá. Varios cargamentos de material de propagación de rosa afectados, procedentes de Francia e Israel, han sido destruidos por el ICA en el Aeropuerto Eldorado. Además, varias empresas han eliminado cientos de plantas enfermas para evitar la diseminación de la enfermedad a plantas sanas (2).

* Contribución del Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional, Bogotá. Resumen de la Tesis de Grado presentada por los autores principales para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

** Respectivamente: Ingenieros Agrónomos y Profesor Asociado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

La bacteria presenta una alta patogenicidad sobre un gran número de hospedantes que comprenden muchas familias y centenares de especies (1,5). La enfermedad debe ser manejada cuidadosamente para evitar la infección de otros cultivos de plantas hospedantes potenciales de la bacteria.

El objetivo de esta investigación, fue el estudio de la patogenicidad de algunos aislamientos de **Agrobacterium tumefaciens** obtenidos de plantas de rosa cultivadas en la Sabana de Bogotá, sobre plantas de las principales especies de flores para la exportación: clavel, crisantemo, rosa, estaticite y gypsophila; se incluyeron también otras plantas como eucalipto, tomate, remolacha y geranio registradas en la literatura como altamente susceptibles a la enfermedad.

REVISION DE LITERATURA

Agrobacterium tumefaciens ataca plantas herbáceas y leñosas de más de 160 especies pertenecientes a 60 familias, tanto de especies cultivadas como espontáneas (5). Entre las especies de plantas que se cultivan en el país para exportación de flores, la rosa y el crisantemo son las más atacadas por la bacteria (5,8).

Esta enfermedad se conoce en Colombia desde hace varios años causando agallas en plantas de cacao, eucalipto, guamo, mora, manzano y peral (4).

La bacteria presenta muchas razas fisiológicas con grados de especificidad diferentes al ser inoculados sobre diversas especies de plantas. La mayoría de las razas fisiológicas tienen poca especificidad en cuanto hospedantes, aunque algunas pocas razas son muy específicas (1, 11). En estudios llevados a cabo para determinar la reacción de 237 variedades de crisantemo a este patógeno, se estableció que ninguna de las razas utilizadas infectó todas las variedades y algunas variedades no fueron atacadas por ninguna de las razas inoculadas. Esto muestra la gran variabilidad que existe entre las razas de la bacteria (7).

La importación de material de propagación infectado ha sido la forma principal de diseminación de la enfermedad en los cultivos de rosa y crisantemo en Colombia (2).

MATERIALES Y METODOS

Los aislamientos utilizados se obtuvieron de agallas presentes en la corona y en las raíces de plantas de rosa de la variedad Jelvanica sobre el patrón **Rosa manetti** procedentes de Francia y cultivadas en la Sabana de Bogotá. Los aislamientos se obtuvieron por maceración de los tejidos de la parte externa y media de las agallas en los medios de cultivo Agar Nutriente (AN) y Extracto de levadura, dextrosa y carbonato de calcio (YDC). La caracterización e identificación de los aislamientos se realizó en base a los criterios establecidos en la octava edición del Manual de Bergey y en la Guía de Laboratorio de Schaad (3, 9).

La patogenicidad de los aislamientos se comprobó en el laboratorio mediante la inoculación en plantas de tomate de 4 semanas de edad y sobre rodajas de zanahoria y remolacha.

Los ensayos de campo se realizaron en la empresa "Pompones Ltda." ubicada en el municipio de El Rosal (Cundinamarca) dentro de un invernadero de madera con cubierta plástica. El material vegetal se sembró en bolsas de polietileno de 30 x 30 x 30 cm., llenas de escorias coquizadas.

Para las pruebas de patogenicidad en el campo se usaron tres aislamientos previamente caracterizados. A partir de cultivos de 4 días de crecimiento en el medio de cultivo YDC incubados a 24°C, se prepararon suspensiones homogéneas de la bacteria en agua destilada estéril hasta obtener una concentración de 4.8×10^7 células por mililitro; la concentración de las suspensiones bacteriales usadas en los ensayos se determinó mediante densidad óptica.

La patogenicidad de los 3 aislamientos de la bacteria se probó en un primer ensayo sobre plantas de 45 días de edad de clavel, crisantemo, rosa, estatices, gipsophila, eucalipto, remolacha y tomate. La inoculación se hizo con una jeringa y se aplicaron 0.2 mililitros de la suspensión bacteriana sobre las heridas del tallo medio y de la corona de la planta realizadas 48 horas antes. Las plantas testigo se inocularon con agua destilada estéril.

En el segundo ensayo se probó la patogenicidad de los aislamientos sobre esquejes de clavel, gipsophila, crisantemo y geranio, estacas de rosa y semillas de tomate; la inoculación de la suspensión bacteriana se realizó sin efectuar ningún tipo de herida en el material de propagación; los esquejes, estacas y semillas se sumergieron en 100 ml. de la suspensión bacteriana durante 10 minutos y luego el material se colocó en bancos elevados y llenos de escorias coquizadas, provistos de riego de nebulización y se enraizó durante 20 días. El material se reinoculó nuevamente a las 24 y 72 horas, regando la suspensión bacteriana en los bancos de enraizamiento. El material se colocó luego en bolsas plásticas en las mismas condiciones del ensayo anterior.

Tabla 1. Patogenicidad de 3 aislamientos de *Agrobacterium tumefaciens* provenientes de rosa en 8 especies de plantas.

ESPECIE	VARIEDAD	PLANTAS INOCULADAS	PLANTAS INFECTADAS
ROSA	Bingo	20	19
TOMATE	Chonto	64	48
EUCALIPTO		16	11
ESTATICE	Heavenly Blue	32	15
CLAVEL	Improved White	18	5
	New Pink	18	7
	Scania	18	10
REMOLACHA		100	11
CRISANTEMO	Blue Marble	28	0
	Bronze Marble	28	0
	Deep Telstar	28	0
	Fire Brand	28	0
	Florida Marble	28	0
	Polaris	28	0
	White Marble	28	0
	Yellow Polaris	28	0
GIPSOPHILA	Perfecta	12	0

RESULTADOS Y DISCUSION

Los tres aislamientos de *Agrobacterium tumefaciens* inoculados sobre las plantas de 45 días resultaron patogénicos en seis de las ocho especies probadas (Tabla No. 1). Los porcentajes de infección variaron de acuerdo al hospedante y fueron: rosa 93%, tomate 75%, eucalipto 70%, estaticite 46%, clavel 41% y remolacha 11%. Las plantas de crisantemo y gipsophila no resultaron infectadas por ninguno de los aislamientos inoculados.

Los períodos de incubación de la enfermedad variaron notablemente para cada especie de planta y fueron: clavel 75 días, rosa 65 días, estaticite 50 días, eucalipto 44 días, remolacha 28 días y tomate 22 días. Las agallas aparecieron siempre sobre los sitios de inoculación en forma de pequeñas protuberancias redondeadas, pero presentaron diferencias notables sobre cada hospedante en tamaño, coloración, textura, superficie, consistencia, velocidad de crecimiento y duración sobre la planta.

En el ensayo sobre material de propagación comercial, la bacteria infectó 4 de las 6 especies de plantas probadas (Tabla No. 2). La infección en esquejes fue de 7% para clavel, 0.5% para crisantemo, 66% para geranio y plántulas de tomate; las estacas de rosa y los esquejes de gipsophila no presentaron infección. Las plantas testigo no desarrollaron ningún tipo de agalla y presentaron diferencias apreciables en su desarrollo en comparación con las plantas infectadas.

Tabla 2. Patogenicidad de 3 aislamientos de *Agrobacterium tumefaciens* provenientes de rosa en material de propagación de 6 especies de plantas.

ESPECIE	VARIEDAD	PLANTAS INOCULADAS	PLANTAS INFECTADAS
GERANIO		24	16
TOMATE	Chonto	42	28
CLAVEL	Improved White	24	4
	New Pink	24	4
	Scania	24	2
CRISANTEMO	Amber	48	6
	Deep Telstar	48	0
	Florida Marble	48	2
	Jade	48	2
	Jambori	48	0
	Jazmin	48	0
	Joiban	48	2
	Pink Marble	48	0
	Polaris	48	0
	White Marble	48	0
	Yellow Marble	48	0
	Super White	48	0
Super Yellow	48	0	
GIPSOPHILA	Perfecta	24	0
ROSA	Manetti	50	0
	Indica	50	0

Las diferencias observadas en el número de plantas infectadas al comparar los dos ensayos de patogenicidad parece deberse más a los métodos de inoculación utilizados, que a la edad de la planta; la inoculación de plantas mediante la inyección asegura la penetración de una gran cantidad de bacterias en los tejidos de la planta, mientras que con el método de inmersión del material de propagación en la suspensión bacteriana parece lograrse la penetración de una cantidad mucho menor de bacterias.

Las plantas de rosa de la variedad Bingo injertadas sobre el patrón **R. Indica** presentaron el mayor porcentaje de infección durante los ensayos. El clavel y el estaticé presentaron un número alto de plantas infectadas; debido a que no se han registrado ataques de esta bacteria sobre estas dos especies de plantas en cultivos comerciales en el país, se evidencia el grave peligro de infección que puede presentarse si no se toman las medidas necesarias para evitar el establecimiento del patógeno.

El eucalipto que es un hospedante común de la bacteria registrado hace varios años (4) presentó un alto índice de infección y puede constituirse en una fuente de inóculo permanente para los cultivos de flores.

Los porcentajes de infección de 75 y 66 respectivamente que presentaron las plantas de tomate en los dos ensayos, pusieron en evidencia la utilidad de esta especie para probar la patogenicidad de los aislamientos de **Agrobacterium tumefaciens**, debido a la rápida formación y al tamaño de las agallas.

En las plantas de remolacha se formaron agallas de rápido crecimiento y gran tamaño; debido a esto se ensayaron las rodajas de remolacha como método para facilitar el aislamiento y el diagnóstico de la bacteria; este método resultó muy efectivo para establecer la patogenicidad de los aislamientos por la formación de un gran número de agallas pequeñas, de coloración rojiza, las cuales llegaron a cubrir toda la rodaja.

Debido a la muy baja infección obtenida en plantas de crisantemo inoculadas (entre 0 y 13% según la variedad) con los aislamientos obtenidos de rosa, se realizó un ensayo adicional mediante la inoculación de un aislamiento obtenido de agallas de crisantemo; en este caso para las cuatro variedades inoculadas se obtuvieron valores de infección que variaron entre 41 y 66% (Tabla No. 3).

Tabla 3. Patogenicidad de un aislamiento de **Agrobacterium tumefaciens** proveniente de de crisantemo, en cuatro variedades de crisantemo.

VARIEDAD	PLANTAS INOCULADAS	PLANTAS INFECTADAS	INFECCION (%)
Florida Marble	24	16	66
Blue Marble	24	12	50
White Marble	24	10	41
Bronze Marble	24	16	66

Los resultados obtenidos en este trabajo, los ataques severos observados en cultivos de la Sabana de Bogotá y del Departamento de Antioquia, y el registro en la literatura en donde se

reconoce al crisantemo como una especie muy susceptible a diversas razas de la bacteria, permiten establecer que los aislamientos que están afectando las plantas de rosa y de crisantemo en la Sabana de Bogotá pertenecen posiblemente a diferentes razas fisiológicas de **A. tumefaciens**.

Sería conveniente obtener un mayor número de aislamientos de plantas de rosa y crisantemo afectadas, e inocularlos en las dos especies de plantas.

CONCLUSIONES

1. Los aislamientos obtenidos de plantas de rosa fueron altamente patogénicos en plantas de rosa, fueron medianamente patogénicos en plantas de clavel y estatices y presentaron muy baja patogenicidad en plantas de crisantemo. Dichos aislamientos no fueron patogénicos en plantas de gipsophila.
2. El aislamiento obtenido de plantas de crisantemo infectadas fue altamente patogénico en variedades de crisantemo inoculadas.
3. El clavel y el estatices son hospedantes de **Agrobacterium tumefaciens** y pueden llegar a ser afectados en cultivos comerciales.
4. Las plantas de tomate, remolacha y geranio, y los discos de zanahoria y remolacha presentaron una alta susceptibilidad a la inoculación con diferentes aislamientos de **Agrobacterium tumefaciens**, y constituyen por lo tanto, una buena herramienta para el diagnóstico de la bacteria.
5. Los resultados obtenidos permiten establecer que los aislamientos de la bacteria que están afectando los cultivos de rosa y crisantemo en el país son diferentes y existe la posibilidad de que se trate de razas de la bacteria.
6. El comportamiento diferente del patógeno frente a los distintos hospedantes hace recomendable emprender investigaciones en donde se incluyan aislamientos de diferente origen, un mayor número de variedades por especie vegetal y otros hospedantes que permitan determinar la existencia de posibles razas fisiológicas de la bacteria en el país.

RESUMEN

Tres aislamientos de **Agrobacterium tumefaciens** provenientes de plantas de rosa afectadas por la agalla de la corona en la Sabana de Bogotá, se caracterizaron e identificaron mediante pruebas de laboratorio y por inoculación en plantas de tomate y rodajas de zanahoria y remolacha. En el campo se probó la patogenicidad de los tres aislamientos sobre plantas de rosa, clavel, estatices, crisantemo y gipsophila, especies importantes en el país para la producción de flores de exportación; también se probó su patogenicidad sobre plantas de eucalipto, remolacha, tomate y geranio, hospedantes comunes de la bacteria. Estas pruebas se realizaron sobre plantas de 45 días de edad y en material de propagación vegetativa. Los aislamientos fueron altamente patogénicos en plantas de rosa y de eucalipto, fueron medianamente patogénicos en plantas de clavel y estatices y presentaron muy baja patogenicidad en plantas de crisantemo. Las plantas de gipsophila no presentaron infección. Las plantas de tomate, remolacha y geranio presentaron una alta susceptibilidad a la bacteria y pueden ser de una gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al I. A. Pedro Uribe y al Señor Francis Novitski de la empresa "Pompones Ltda." por su interés y aporte económico para la realización de la investigación.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, A. R. and L. W. MOORE. 1979. Host specificity in the genus **Agrobacterium**. *Phytopathology* 69:320-323.
2. ARBELAEZ, G. 1980. Problemas fitopatológicos en cultivos de flores de exportación. IV Congreso ASCOLFI, Medellín, julio 2-5, 1980.
3. BUCHANAN, R. E. and N. E. GIBBON 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th edition. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
4. CASTAÑO, J. J. 1975. Trayectoria de la fitopatología en Colombia (1571-1974). Editorial Letras. Medellín.
5. FAIVRE, A. A. 1979. Conferencia sobre los tumores de **Agrobacterium** y el problema de la agalla de la corona. Bogotá. (en mimeógrafo).
6. MILLER, H. N. 1975. Leaf, stem, crown and root galls induced in chrysanthemum by **Agrobacterium tumefaciens**. *Phytopathology* 65:805-811.
7. MILLER, H. N., J. W. MILLER and G. L. CRANE. 1975. Relative susceptibility of chrysanthemum cultivars to **Agrobacterium tumefaciens**. *Plant Disease Reporter* 59:576-581.
8. MOORE, L. W. 1979. La agalla de corona y su relación con la producción de rosas en Colombia. ASOCOLFLORES. Bogotá. (en mimeógrafo).
9. MOORE, L. W., A. ANDERSON and C. I. KADO. 1980. **Agrobacterium**. p. 17-25. In: N.W. Schaad (ed.) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
10. NEW, P. B. and K. S. MILNE. 1975. Biology and control of crown gall on potted Chrysanthemums. *N. Z. Journal of Experimental Agriculture* 4:109-115.
11. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 1970. Index of plant diseases in United States. *Agricultural Handbook No. 165*. U.S.D.A. Agricultural Research Service. Washington, D. C.