# INFORME TECNICO

ESTUDIO
MICROBIOLÓGICO
DE LA ETIOLOGÍA
DE DIFERENTES
PATOLOGÍAS
OBSERVADAS EN
FRUTOS DE
NOGAL

Ing. Marangi, María Julia Dra. Pose, Graciela Noemí





**A:** AER INTA Valle Medio Villa Galense, Luis Beltrán, Río Negro Ing. Diana Fernández

**DE:** CIT Río Negro – UNRN Mitre 331, Villa Regina, Río Negro Ing. María Julia Marangi, Ing. Javier Alonso, Dra. Graciela Pose

**ASUNTO:** Estudio microbiológico de la etiología de diferentes patologías observadas en frutos de nogal.

FECHA: Villa Regina, Marzo de 2018

# **RESUMEN**

Se llevó a cabo un estudio microbiológico a fin de determinar la posible implicancia de microorganismos como causa de dos sintomatologías, consistentes en ampollas que emergían de la superficie de frutos de nogal jóvenes y cortezas arrugadas, observadas en chacras de Luis Beltrán, Valle Medio de Río Negro.

#### **INDICE**

- 1- Introducción
  - Muestras
  - Sintomatología
- 2- Objetivos
- 3- Procedimiento
- 4- Resultado
- 5- Conclusión
- 6- Recomendaciones

# Caso 1: Frutos con ampollas

#### **RESUMEN**

Se llevó a cabo un estudio microbiológico a fin de determinar la posible implicancia de microorganismos como causa de una nueva sintomatología, consistente en ampollas que emergían de la superficie de frutos de nogal jóvenes.

# 1- INTRODUCCIÓN

Durante el mes de diciembre de 2016 se han observado frutos de nogal que exhibían lesión en forma de ampolla, a veces rodeada por tejido necrosado, en chacras de Luis Beltrán, Río Negro. A fin de determinar un posible origen microbiológico de la patología se realizaron los estudios correspondientes.

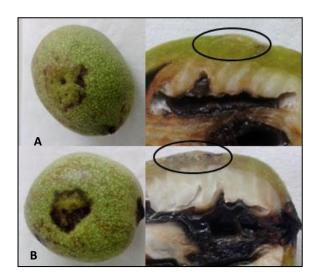
#### Muestras

Las muestras fueron recolectadas en diciembre de 2016 en una chacra orgánica y otras fueron recolectadas y enviadas por AER – INTA Valle Medio.

# Sintomatología

Nueces prematuras exhibían una lesión en forma de ampolla, a veces rodeada por tejido que había tomado coloración marrón. La mayoría de ellas presentaban signos necrosis en el extremo estigmático (Imagen).

Respecto a las necrosis apicales estas eran coincidentes con síntomas de Bacteriosis, causada por la bacteria *Xanthomonas arborícola* pv. *juglandis*, o Necrosis Apical Marrón (MAN), causada también por esta bacteria, junto con algunos taxones de *Alternaria*.



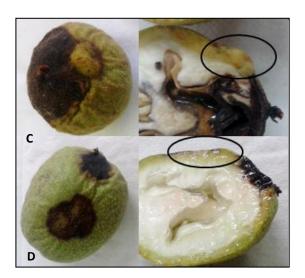


IMAGEN. A: Lesión ampolla sin necrosis en extremo estigmático. B, C y D: Ampollas y necrosis en extremo estigmático. En los círculos se observa el tejido interno de las ampollas.

# 2- OBJETIVO

Determinar si el origen de las lesiones en forma de ampollas puede ser microbiológico.

# 3- PROCEDIMIENTO

Se analizaron 4 muestras, dos de las recolectadas en la chacra orgánica y dos enviadas por INTA. De las analizadas enviadas por INTA, una no presentaba necrosis del extremo estigmático. En cada fruto se analizaron ambas lesiones por separado: tejido proveniente de ampollas y tejido proveniente de la lesión apical, para corroborar la presencia de los microorganismos causantes de Bacterisis o NAM.

Los frutos lesionados fueron lavados con agua potable, se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos en una solución de Hipoclorito de Sodio 0.5% durante 5 minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril.

Los frutos fueron cortados en dos mitades para poder extraer trozos de tejido interno de las lesiones, los cuales se trituraron y se colocaron en tubos de ensayos conteniendo 10 ml de solución fisiológica estéril. Los tubos se agitaron durante 3 minutos.

Una alícuota de la solución (0.1 ml) fue inoculada en placas de Petri conteniendo los medios Luria Bertani (LB), para determinar la presencia de bacterias, y otra alícuota en Agar Papa Dextrosa (PDA) suplementado con Cloranfenicol (0.1 g/l) para el determinar desarrollo fúngico. Las placas se incubaron a 27°C durante 4 días y a 25°C durante 7 días, respectivamente.

Se observaron los resultados y en el caso del desarrollo de bacterias, estas fueron repicadas al medio Xan-D, un medio de cultivo diferencial para determinar si estas pertenecen al género *Xanthomonas*.

En el caso de desarrollo fúngico, la determinación de los géneros fúngicos se llevó a cabo según Pitt y Hocking (2009) y Samson y col. (2004), a partir de observaciones macro y microscópicas.

# 4- RESULTADOS

En cuanto a las lesiones en forma de ampolla no fue determinada la presencia de microorganismos en tejidos internos en tres de las muestras analizadas. Se determinó la bacteria *Xanthomonas* en una muestra (chacra orgánica) desde una lesión que se encontraba muy próxima al extremo estigmático con necrosis apical.

De los 3 frutos con necrosis en el extremo estigmático, en uno fue determinada la presencia de *Xanthomonas* en la lesión, en otro la bacteria y *Alternaria* y en el otro, solo *Alternaria*.

#### 5- CONCLUSION

No es posible asignar un origen microbiológico a las lesiones en forma de ampollas observadas basado en la ausencia del desarrollo de microorganismos en los tejidos de las lesiones analizadas. Respecto a la determinación *de Xanthomonas* en una de las lesiones de un fruto afectado, la presencia de la misma puede ser atribuida al avance de la bacteria a partir de una lesión de necrosis apical, muy próxima a esta (Imagen C).

Los microorganismos causantes de Bacteriosis y NAM fueron determinados en los extremos estigmáticos necrosados.

### 6- RECOMENDACIONES

En caso que se observe nuevamente la sintomatología se recomienda realizar estudios sistemáticos y más profundos, no solo microbiológicos, sino implicando también otro tipo de factores (fisicoquímicos del suelo, estado nutricional de las plantas, etc.).

# Caso 2: Frutos con corteza arrugada

#### **RESUMEN**

Se llevó a cabo un estudio microbiológico a fin de determinar la posible implicancia de microorganismos como causa de una sintomatología consistente en corteza arrugada en frutos de nogal jóvenes.

# 1- INTRODUCCIÓN

Durante el mes de diciembre de 2016 se han observado frutos de nogal que exhibían surcos profundos en su corteza dándoles una apariencia arrugada. A fin de determinar un posible origen microbiológico de la patología se realizaron los ensayos microbiológicos correspondientes.

# Muestras

Las muestras fueron recolectadas en baberos en plantaciones de Luis Beltrán en diciembre de 2016 y enviadas por AER – INTA Valle Medio.

# Sintomatología

Frutos prematuros presentaron surcos profundos en su corteza dándoles una apariencia arrugada. La mayoría de ellos estaban completamente marrones y otros también presentaban necrosis en el extremo estigmático (Imagen).



IMAGEN. A, C, D: Frutos con corteza arrugada y distintos grados de oscurecimiento del tejido. En el caso A se observa necrosis del extremo estigmático. B: Corte transversal del fruto A.

# 2- OBJETIVO

Determinar si el origen de la patología puede ser microbiológico.

# 3- PROCEDIMIENTO

Se analizó la superficie y el interior de la corteza de 8 frutos que presentaban aspecto arrugado. En primer lugar se lavaron bajo agua de grifo cepillando la superficie para asegurar la limpieza en el interior de los surcos. Se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos en una solución de

Hipoclorito de Sodio 0.5% durante 5 minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Luego se cortaron asépticamente en dos mitades para poder extraer por un lado, parte de la corteza externa, y por otro lado, trozos internos de la misma. El material extraído se trituró y se colocó en tubos de ensayos conteniendo 10 ml de solución fisiológica estéril. Los tubos se agitaron durante 3 minutos y se sembró 0.1 ml de la solución en placas conteniendo los medios Luria Bertani (LB), para evaluar el crecimiento bacteriano y en Agar Papa Dextrosa (PDA) suplementado con Cloranfenicol (0.1 g/l) para el desarrollo fúngico. Las placas se incubaron a 27°C durante 4 días y a 25°C durante 7 días, respectivamente. Se observaron los resultados y en el caso de las colonias bacterianas se realizaron estrías en medio Xan-D, un medio diferencial para determinar si se trata del género *Xanthomonas*.

# 4- RESULTADOS

Sólo en una de las muestras con avanzado daño en la corteza se determinó desarrollo bacteriano, pero en ningún caso se trató del género *Xanthomonas*.

# 5- CONCLUSION

El hecho de no haberse observado desarrollo bacteriano o fúngico en los medios utilizados permite sospechar acerca de un problema físico o nutricional, aunque no se descarta la posibilidad de que se trate de algún microorganismo que no tiene la capacidad de crecer en los medios de cultivos utilizados.

#### 6- RECOMENDACIONES

En caso que se observe nuevamente la sintomatología se recomienda realizar estudios sistemáticos y más profundos, no solo microbiológicos, sino implicando también otro tipo de factores (fisicoquímicos del suelo, estado nutricional de las plantas, etc.).