
INFORME TECNICO

ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LA ETIOLOGÍA DE GOMOSIS Y NECROSIS OBSERVADA EN FRUTOS DE ALMENDRO

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, Dra. Graciela Pose

ASUNTO: Estudio microbiológico de la etiología de gomosis y necrosis observada en frutos de almendro.

FECHA: Villa Regina, Abril 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 una en casos de gomosis y otra, de manchas marrones en los laterales de los frutos de almendro jóvenes, observadas en plantaciones de Luis Beltrán, Valle Medio de Río Negro. En principio, respecto al primer caso, se sospechaba de casos de Antracnosis del almendro, producida por especies del género fúngico *Colletotrichum*.

INDICE

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

1- INTRODUCCIÓN

Durante el mes de octubre de 2017 se ha observado en frutos jóvenes de almendro pequeñas lesiones circulares, gomosas, y otras como manchas marrones laterales. A fin de determinar un posible origen microbiológico de la patología se realizaron los ensayos microbiológicos correspondientes.

Respecto al primer caso, el daño observado podría corresponderse a los síntomas iniciales de la Antracnosis del almendro, patología causada por varias especies fúngicas del género *Colletotrichum*, que se manifiesta como manchas pardas sobre el casco de los frutos en desarrollo y de las cuales emerge una sustancia gomosa.

Asimismo, síntomas coincidentes con los observados, descritos posteriormente, fueron reportados en California en 2013-2014 causados por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Bacterial Spot of Almond). Fue descrito que las lesiones empiezan en la cáscara como manchas acuosas pequeñas, produciéndose una sustancia gomosa color ámbar claro a oscuro. Las lesiones son marrones y aumentan lentamente en diámetro (2 a 4 mm, generalmente <5). El color de la sustancia gomosa es importante porque ayuda a distinguir la mancha bacteriana de otro tipo de daño (Doll D., 2015).

Muestras

Un total de 10 muestras fueron enviadas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Agencia de Extensión Rural, Valle Medio – Luis Beltrán, Río Negro en el mes de octubre de 2017.

Sintomatología

La mayoría de los casos analizados presentaron pequeñas manchas acuosas, circulares, con un diámetro menor de 5 mm, de color marrón oscuro, de las cuales emergía una sustancia gomosa color ámbar (Imagen 1).

Por otro lado, y en menor cantidad, almendras prematuras exhibieron oscurecimiento de la cáscara, lateral, de color marrón oscuro. La lesión se extendía y hundía en el tejido (Imagen 2).



Imagen 1: Frutos con síntomas de “gomosis”

Imagen 2: Frutos con necrosis lateral

2- OBJETIVO

Determinar si el origen de las patologías puede ser microbiológico. Respecto al primer caso se determinará si se trata de una enfermedad de origen fúngico, especialmente Antracnosis, causada por especies del género *Colletotrichum*. Además, teniendo en cuenta que en los últimos años se han detectado varios casos de Bacteriosis del Nogal (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) y Necrosis Apical del Nogal (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* junto a *Alternaria* spp.) en la región del Valle Medio de Río Negro, siendo Luis Beltrán una de las zonas afectadas, se evaluará la posibilidad que los síntomas observados fueran causados por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. La enfermedad se manifiesta sobre almendras en desarrollo con síntomas similares a los que se observaron en las muestras recibidas, y debido a la producción de goma, suele confundirse con otras patologías, tales como la Antracnosis.

3- PROCEDIMIENTO

Aislamiento de microorganismos

Manchas laterales. En el caso de las almendras que exhibieron lesiones laterales se analizaron 2 muestras. Los frutos se lavaron con agua de grifo, se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos en una solución de Hipoclorito de Sodio 1% durante 3 minutos y se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril. Las muestras se cortaron a la mitad y se extrajeron asépticamente trozos internos de la lesión que se inoculaban en placas conteniendo medio Agar Papa Dextrosa suplementado con Cloranfenicol (0.1 g/l) (PDA+C) para evaluar el desarrollo fúngico. Otros trozos obtenidos de la lesión se maceraron y se colocaron en tubos de ensayo conteniendo solución fisiológica estéril. Luego de homogeneizar (vortex), se sembró 0,1 ml de la suspensión en medio Luria Bertani (LB) para determinar el desarrollo bacteriano. Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días y a 27°C durante 4 días, respectivamente.

Gomosis. Se utilizaron dos procedimientos diferentes de análisis para asegurar el aislamiento de los microorganismos. Se analizaron 5 muestras que la lesión presentaba sustancia gomosa.

En el primer caso, la mitad de las muestras se analizó utilizando el procedimiento descrito anteriormente, realizando el macerado de los tejidos en tubos Eppendorfs en lugar de utilizar tubos de ensayos debido al pequeño tamaño de la lesión, y por ende, poca cantidad de material para el análisis.

El segundo procedimiento consistió en desinfectar y enjuagar los frutos siguiendo el procedimiento descrito previamente. Luego, se colocaron las muestras individualmente en recipientes plásticos cerrados, conteniendo un trozo de algodón húmedo, con el fin de crear una cámara húmeda, para permitir el desarrollo microbiano en la lesión. Los recipientes así preparados se incubaron a 27°C durante 14 días. El micelio desarrollado en los frutos, luego de la incubación, se sembró en placas de PDA+C (McKay y col., 2009). Asimismo, sobre estas muestras, se desinfectó la superficie con alcohol 70%, se cortaron los frutos a la mitad y se extrajeron asépticamente trozos de tejido desde la lesión que se sembraron en PDA+C. Otros trozos de tejido se colocaron en tubos Eppendorfs conteniendo solución fisiológica estéril (determinación de hongos). Luego de homogeneizar, 0,1 ml de la suspensión fue inoculado en medio LB. También se

realizó siembra por estrías en dicho medio determinación de bacterias). Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días y a 27°C durante 4 días, respectivamente.

Determinación del género y especie de los microorganismos aislados.

En el caso de los aislamientos fúngicos, los géneros se determinaron a partir de las características macro y microscópicas de los aislamientos.

Respecto a bacterias, las colonias que mostraron características morfológicas correspondientes al género *Xanthomonas* sobre LB fueron inoculadas en el medio diferencial para este género, Xan-D. Las placas se incubaron a 27°C durante 7 días. El género y la especie de las colonias que resultaron positivas en dicho medio se confirmó mediante técnicas moleculares.

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de pellets obtenidos de suspensiones de bacterias con una DO (600nm)=0,2 (1 a 5 x 10⁸ CFU/ml aproximadamente). Las suspensiones fueron centrifugadas a 7500 RPM durante 10 minutos, descartándose los sobrenadantes. Los pellets se conservaron a -80°C hasta su uso.

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit "DNeasy blood and tissue mini kit" (Qiagen) con un protocolo de pre-tratamiento para bacterias Gram negativas siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN genómico extraído se cuantificó utilizando un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies). Se realizó la amplificación (PCR) y secuencia de los fragmentos amplificados con los primers especie específicos para *X. arboricola* XarbQF y XarbQR (gen *qumA* - quinato deshidrogenasa (Pothier et al., 2011)).

4- RESULTADOS

En los frutos con lesiones laterales se determinó la presencia de *Alternaria sp.* en las mismas. En una de las muestras se realizó la determinación de bacterias, observándose desarrollo bacteriano distinto de *Xanthomonas*.

En los frutos con gomosis, en las 5 muestras analizadas se determinó la presencia de bacterias y en 4, la de hongos. Respecto a bacterias, en 4 de los casos se determinó *Xanthomonas arboricola*, esto confirmado por el análisis molecular. Respecto a los hongos en los 4 casos se determinó especies del género *Alternaria* además de otra micoflora acompañante.

5- CONCLUSION

En los casos de lesiones marrones laterales, fue determinada la presencia de especies del género *Alternaria* en los dos casos estudiados, aunque para determinarse efectivamente si el agente es responsable de la patología deberían aplicarse los postulados de Koch.

En los casos de lesiones con secreciones gomosas, de acuerdo a los resultados obtenidos podría presumirse la presencia de "Mancha bacteriana de la almendra" (Bacterial Spot of Almond) en la región del Valle Medio de Río Negro. En las muestras analizadas no pudo ser determinada la presencia de *Colletotrichum spp.*, no pudiéndose determinar casos de Antracnosis.

6- RECOMENDACIONES

Se deberían confirmar ambos resultados aplicando los Postulados de Koch.

Se debería confirmar el patovar de la especie bacterias *X. arboricola* por pruebas moleculares.

En caso que se observe nuevamente la sintomatología se recomienda realizar estudios sistemáticos y con mayor número de muestras.