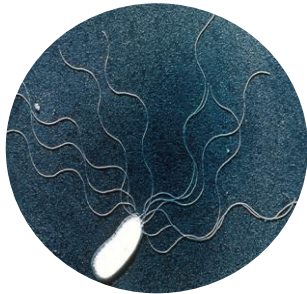


TOMA DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS



Las bacterias son microorganismos simples que consisten generalmente en células procarióticas individuales. Se conocen alrededor de 1600 especies de bacterias, y la gran mayoría son organismos estrictamente saprofitos, los cuales ayudan a descomponer las enormes cantidades de materia orgánica que se producen anualmente, tanto en forma de productos de desecho, así como del resultado de la muerte de las plantas y los animales. Se han reportado cerca de 80 especies de bacterias que atacan a las plantas a nivel mundial (Agrios, 2005), bacterias fitopatógenas que causan enfermedades serias, pero en menor número que los hongos o los virus, pero que también ocasionan pérdidas económicas (Kennedy y Alcorn 1980; Vidaver y Lambrecht, 2004).

La mayoría de las bacterias fitopatógenas se desarrollan principalmente como organismos parásitos en las plantas hospederas y parcialmente en el suelo como saprofitos.

Las bacterias como patógenos vegetales pueden causar enfermedades graves y económicamente dañinas, ocasionando desde manchas, mosaicos o pústulas en hojas y frutos, o podredumbres malolientes de tubérculos hasta la muerte de las plantas. Algunas causan una distorsión de las hojas y tallos relacionada con hormonas, llamada fasciación o agalla de corona, una proliferación de células vegetales produciendo un abultamiento en el cuello de las plantas y sus raíces (Figura 1).

Las bacterias pueden sobrevivir dentro y sobre las semillas, así como en otros órganos de las plantas o insectos que se encuentran en el suelo (Agrios 2005).

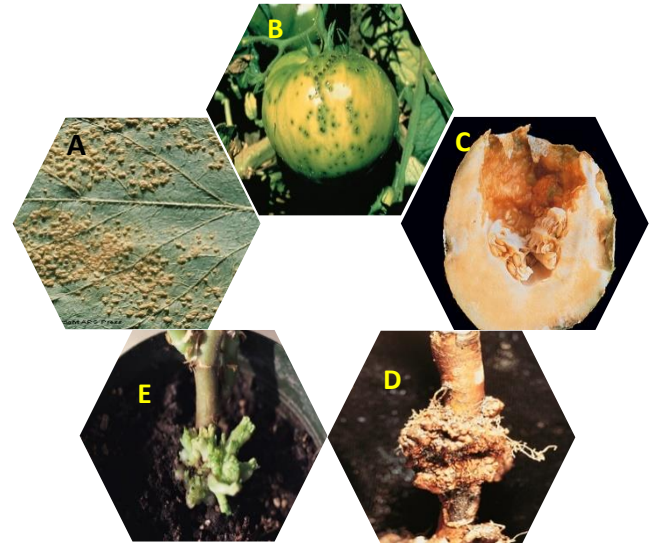


Figura 1. Síntomas de bacterias fitopatógenas: A) Pústulas en hojas; B) Manchas en frutos; C) Podredumbres malolientes en fruto; D) Agalla de corona y E) Proliferación de células vegetales (APSpres, 2019).

PROCESO DEL MUESTREO

¿Qué muestrear?

“Se debe muestrear en lo posible plantas completas, incluyendo el sistema radical, sin embargo, si el tamaño de la planta es muy grande, únicamente coleccionar las partes dañadas”

“No coleccionar o tomar como muestra una planta muerta o demasiado dañada”

El muestreo de tejido vegetal constituye un paso importante para el análisis fitopatológico. La toma de muestras puede variar según la rigurosidad del productor en mantener con sanidad su plantación.

Normalmente, la enfermedad inicia en focos de infección de la parcela o predio y dependiendo del clima, virulencia del patógeno y susceptibilidad del hospedero; se extiende a áreas mayores. La vigilancia y monitoreo deben ser constantes en la detección de posibles daños generados por enfermedades (INTA, 2017).



Figura 2. Plántulas de tomate con amarillamiento y manchas necróticas en las hojas. Muestra correcta para el análisis fitopatológico, ya que presenta todos los síntomas de la enfermedad (Cornell University, 2019).

Existen algunas enfermedades que producen síntomas secundarios en el follaje, es decir, los síntomas se manifiestan en la parte aérea, pero el organismo causal se localiza en otra parte de la planta como el cuello de las raíces (ejemplo: *Erwinia carotovora*). Por lo tanto, es necesario colectar todas las partes de la planta donde veamos el daño y algún síntoma de la enfermedad.

Las muestras de plantas se deben colectar una vez que haya síntomas característicos de la enfermedad y el muestreo debe ser dirigido a la zona afectada en la planta, siempre colectando tejido sano y tejido infectado (Figura 2).

¿Cuándo muestrear?

Las muestras de suelo pueden ser colectadas en cualquier época del año, aunque se debe evitar el muestreo en suelos excesivamente secos o mojados. Cuando se hace rotación de cultivos, el muestreo debe realizarse cuando aún está el cultivo anterior, para saber si se debe desinfectar antes de plantar el cultivo del año siguiente.

¿Cómo muestrear?

Plantas con síntomas. Cuando el cultivo presenta síntomas de daño del patógeno, se obtiene de campo muestras representativas del órgano afectado y en caso de las frutillas, la planta completa. Asimismo, se deben colectar muestras con diferentes grados de infección o de avance del síntoma.

Plantas o árboles con decaimiento general, detención de crecimiento, marchitez, defoliación y/o amarillamiento general.

- Muestrear en lo posible plantas enteras, incluyendo el sistema radical completo, sin destruir las raicillas.
- Si los árboles son muy grandes, enviar muestras de raíces con suelo adyacente o tejido del cuello de la planta y ramas con síntomas o presencia del agente causal.

Plantas aparentemente sanas (sin síntomas).
 Cuando el cultivo no presenta síntomas del ataque del patógeno, pero se identificó una anomalía en el desarrollo de la planta, la muestra requerida para el análisis fitopatológico consiste en brotes u hojas en crecimiento, incluyendo tanto ápices de crecimiento como hojas adultas y raíces (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tipo y cantidad de muestra requerida para análisis.

Tipo de muestra	Cantidad y/o características
Suelo	0.5 - 1 kg.
Agua	100 - 500 mL.
Semillas de hortalizas	10 g (aprox. 400 semillas).
Tubérculo, Bulbo o grano	0.5 - 1 kg.
Planta	2 - 3 plantas completas en trozos o en su caso, la parte de la planta con el síntoma específico que se quiere analizar.

Plantas o árboles con canchros, heridas y/o gomosis.

- Dirigir el muestreo a la parte del árbol con presencia de síntomas, incluyendo partes de la planta o árbol con diferente avance del daño.

Plántulas con síntomas de damping-off (césped).

- Seleccionar sectores con distintos grados de daño y muestrear las plantas enteras con el cepellón de sustrato correspondiente, cuidando que la humedad sea suficiente.



Figura 3. Síntomas causados por bacterias fitopatógenas en planta de tomate. A) Marchitamiento bacteriano en planta de tomate; B) Fruto de tomate con manchas; C) Hojas de tomate con manchas necróticas; y D) Floema y xilema afectados por bacterias fitopatógenas (Cornell, 2019).

Plantas o árboles con pudrición de la madera, tallo y/o raíces.

- En lo posible enviar la planta completa o la zona afectada, incluyendo partes con diferente avance del daño.
- En el caso de plantas ya secas, se pueden adjuntar éstas o sus partes afectadas para verificar estados avanzados del agente causal (cuerpos fructíferos, micelio, etc.).

Hojas, brotes, flores y otras partes vegetales con coloración anormal, deformación, brotación anormal, quemaduras o manchas, tizones o necrosis.

- Muestrear la rama o ramilla completa. En el caso de cultivos anuales enviar la planta completa incluyendo sistema radical.
- Hay que considerar que existen enfermedades cuyo síntoma secundario se manifiesta en las hojas, como las enfermedades de raíces.
- En caso de deformaciones, brotación anormal o vasculares, considerar dentro de la muestra los ápices de las ramillas o brotes nuevos cercanos al daño.

Plantas o árboles con agallas o tumores.

- En lo posible enviar la planta completa o el área comprometida, incluyendo tejido sano. No enviar solamente la agalla, ya que no es suficiente para realizar un buen análisis.

Frutos, vegetales carnosos, bulbos, tubérculos, etc., con manchas o pudriciones descartando los que están muy deteriorados o podridos.

- Seleccionar muestras que presenten todas las etapas de infección.

(Fuente: SAG-Chile, 2019 y Melanson, 2017).

¿Cómo envío la muestra?



Figura 4. Preparación de muestra de planta para su envío al laboratorio en papel periódico.

La muestra una vez colectada no debe ser expuesta al sol y en el menor tiempo posible (minutos) colocarla en una condición fría (hielera con geles de frío). Si la muestra no va a ser enviada inmediatamente, se debe guardar a 4°C, máximo dos días y el transporte debe ser a baja temperatura o durante la noche.

Embalado de la muestra

Las muestras de planta para análisis fitopatológico que deben ir envueltas en papel absorbente sin humedecer y luego en bolsas dobles de polietileno pueden ser:

- a. Tozos de corteza de tronco o cuello.
- b. Trozos de ramas y tallos.
- c. Ramillas con hoja.



Figura 5. A) Raíz cubierta en bolsa de polietileno; B) Planta envuelta en papel periódico y empaquetada en bolsa de polietileno (Minnesota University, 2019).



Figura 6. Ejemplo de embalado de frutos y raíces para su envío al laboratorio (Iowa University, 2019).

Fuente: Melanson, 2017 y SAG-Chile, 2019.

Para envolver la planta o parte de ella, extienda una hoja de papel periódico coloque el tejido extendido y cubra con otra hoja de papel periódico (Figura 4), siempre procurando que el papel periódico que utiliza este seco.

Las muestras que deben ir envueltas en papel absorbente **humedecido** con el sistema radical y cuello separado del sistema aéreo mediante bolsa, y todo en conjunto debe ir en bolsa doble de polietileno son:

- a. Plantas herbáceas o leñosas enteras.
- b. Raíces y raicillas.
- c. Plántulas con suelo.
- d. Plantas suculentas.

En el caso de no tener papel suficiente, cubra solo la raíz con una bolsa y cubra el resto de la planta con papel periódico (Figura 5).

Las muestras que deben envolverse en papel absorbente seco, cuidando previamente de eliminar la humedad superficial de la muestra y luego colocar en envase de cartón o papel son:

- a. Tubérculos.
- b. Partes suculentas (frutos, bulbos, etc.).
- c. Partes vegetales con pudriciones acuosas.
- d. Brotes tiernos.

Para envolver la muestra, extienda una hoja de papel periódico coloque la parte suculenta y envuélvala (Figura 6), siempre procurando que el papel periódico que utiliza este seco.



Recomendaciones

1. Utilizar material de protección desechable.
2. Limpiar las herramientas de muestreo con soluciones desinfectantes como alcohol al 70%, Hipoclorito de sodio (cloro) al 3-5% o sales cuaternarias.
3. Evitar el uso de bolsas negras.
4. No exponer las muestras al sol y evitar el uso de hielo.

Referencias

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Quinta edición. Limusa editores. Gainesville, USA. 819 p.
- APS press. 2019. Introduction to the Major Pathogen Groups. Minnesota, USA.
Disponible en: <https://bit.ly/2FPiVcQ>
Fecha de consulta: 2019-03-11
- Cornell University. 2019. Bacterial speck of tomato. Vegetable Pathology – Long Island Horticultural Research & Extension center. New York, USA.
Disponible en: <https://bit.ly/2CjSx8T>
Fecha de consulta: 2019-03-13
- INTA. 2017. Guía para la toma de muestras vegetales en el diagnóstico de enfermedades fungo-bacterianas. Instituto Nacional de innovación y transparencia en tecnología agropecuaria (INTA-Costa Rica). Costa Rica. 6p.
- Iowa State University. 2019. Submitting Woody plants. Plant and Insect Diagnostic Clinic. Iowa, USA.
Disponible en: <https://bit.ly/2TU28O1>
Fecha de consulta: 2019-03-14
- Kennedy, B. W., and S. M. Alcorn, 1980. Estimates of U.S. crop losses to prokaryote plant pathogens. Plant Disease 64:674-676.
- Melanson, R. A. 2017. How to collect and package plant disease specimens for diagnosis. M1562 Mississippi State University Extension. Mississippi, USA. 2 p.
- Minnesota University. Plant Disease clinic. University of Minnesota, USA.
Disponible en: <https://bit.ly/2VWubJR>
Fecha de consulta: 2019-03-12
- SAG-Chile. 2019. Manual de procedimientos para la certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación: Capítulo 7: Condiciones de captación de muestras. Santiago de Chile. 8p
Disponible en: <https://bit.ly/2T4eqhY>
Fecha de consulta: 2019-03-08
- Vidaver, A. K., and P. A. Lambrecht. 2004. Las Bacterias como Patógenos Vegetales. *The Plant Health Instructor*. Minnesota, USA.
Disponible en: <https://bit.ly/2FPiVcQ>
Fecha de consulta: 0-03-2019.