

# Aspectos fitosanitarios del cultivo del azafrán del Jiloca: enfermedades de etiología bacteriana

Ana Palacio-Bielsa<sup>1</sup>, Miguel Cambra Álvarez<sup>2</sup>

1 Unidad de Sanidad Vegetal Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (C.I.T.A.), Av. Montañana, 930, 50059 Zaragoza (apalacio@aragon.es)

2 Centro de Protección Vegetal, Av. Montañana, 930, 50059 Zaragoza (mcambra@aragon.es)

## 1. Introducción: enfermedades de etiología bacteriana del cultivo del azafrán

La principal enfermedad de etiología bacteriana del cultivo del azafrán está causada por *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* Severini, 1913 (ex *Pseudomonas gladioli*). *B. gladioli* pv. *gladioli* es una bacteria patógena que también afecta a *Gladiolus* spp., *Freesia hybrida*, diversas especies del género *Crocus*, y otros miembros de la familia *Iridaceae*. Aunque *B. gladioli* pv. *gladioli* ha sido citada en América, Australia y algunos países de Europa (Hayward, 1983; Fiori *et al.*, 2005) no existen referencias de su presencia en España hasta el momento.

Los síntomas producidos por esta bacteria consisten en manchas y podredumbres en las hojas de la planta y en el cormo. Las hojas comienzan a secarse en las puntas y se observa clorosis a lo largo de uno o ambos márgenes de las mismas. Generalmente, las lesiones se centran en la zona basal e inicialmente son de pequeño tamaño, brillantes y de color marrón rojizo. Posteriormente, las manchas aumentan de tamaño, presentando los márgenes ligeramente elevados y hundidas en su centro, y adquieren un color marrón oscuro a negro. En estados avanzados de la enfermedad, las partes aéreas de la planta se pueden desprender del cormo con facilidad. En el cormo, las lesiones aparecen como zonas hundidas, con una coloración entre amarillenta y rojiza. Finalmente, el cormo queda flácido, liberando exudados inodoros al ser presionado. Las contaminaciones de *B. gladioli* pv. *gladioli* también pueden dificultar la propagación in vitro de explantes de cormos de azafrán.

Muestreos realizados en plantaciones de azafrán del Jiloca (años 2008, 2009 y 2010)

Con el objeto de determinar el estado fitosanitario en lo referente a las infecciones por bacterias fitopatógenas de las plantaciones de azafrán de la zona del Jiloca, se estudiaron parcelas situadas en las localidades de Blancas, Muniesa, Fuentes Claras, Peracense y Monreal del Campo, cultivadas tanto en secano como en regadío.

Las prospecciones en campo se llevaron a cabo en el mes de marzo mediante la observación visual de posibles síntomas en la parte aérea, el muestreo de plantas enteras (incluyendo los cormos) y la realización de los oportunos análisis en laboratorio.

Una selección de los cormos por su tamaño y ausencia de defectos antes de replantar permite una continua selección, incluso en ausencia de reproducción sexual, lo que puede conducir a la conservación de las mejores características morfológicas y productivas. Por ello, en los meses de junio, julio y septiembre, se estudiaron cormos que habían sido desechados para su resiembra por presentar alguna anomalía morfológica (destrío).

## 2. Materiales y métodos

Se realizaron observaciones del aspecto externo de la parte aérea y de los cormos. Las muestras que presentaban síntomas de flacidez o podredumbre, compatibles con una posible infección de origen bacteriano fueron analizadas mediante aislamiento en placas con medio de cultivo King B (King *et al.*, 1954). Los cultivos bacterianos obtenidos fueron purificados e identificados mediante técnicas bioquímicas y análisis moleculares, utilizando para ello la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación del ADN ribosómico 16S. Para los análisis de PCR se utilizaron iniciadores específicos de *B. gladioli* (GLA-f / GLA-r), que amplifican un fragmento de 300 pares de bases de la región intergénica 16S-23S rDNA (Furuya *et al.*, 2002). Para evaluar el poder patógeno de los aislados se realizaron ensayos de hipersensibilidad en tabaco y tomate. Para poder asociar los síntomas a la presencia de una bacteria fitopatógena, se deberán cumplir los postulados de Koch, mediante la inoculación de cormos y, en su caso, el reaislamiento de la bacteria a partir de los síntomas inducidos.

## 3. Resultados

En la parte aérea de las plantas no se observaron, en ningún caso, síntomas sospechosos de estar causados por una infección bacteriana. De

un total de 476 cormos estudiados, únicamente 48 de ellos (10%) presentaban síntomas de flacidez y podredumbre, compatibles con la posible presencia de bacterias fitopatógenas (Figura 1) (Tabla 1). Sin embargo, estos síntomas no coincidían plenamente con los descritos en la bibliografía para la bacteria fitopatógena *B. gladioli* pv. *gladioli* y la observación a la lupa binocular de los cormos permitió constatar la presencia de ácaros en la zona de avance de las lesiones.

En los cormos analizados en las campañas de 2008 y 2009, únicamente se logró el aislamiento de bacterias saprofitas, correspondientes a infecciones secundarias oportunistas, asociadas a los ataques primarios de ácaros o nematodos.

En la campaña del año 2010, se obtuvieron cultivos bacterianos cuyas colonias presentaban una morfología similar a la del patógeno *B. gladioli* pv. *gladioli*, por lo que se procedió a su caracterización. Los resultados de la caracterización bioquímica coincidieron con los descritos para *Pseudomonas* sp., pero no aquellos descritos para *B. gladioli* pv. *gladioli*. Los análisis de PCR dieron resultados negativos. La secuenciación parcial del ADN 16S mostró homología de secuencia con *Pseudomonas cedrina* (Behrendt *et al.*, 2009). Contrariamente a lo esperado para la mayoría de las bacterias fitopatógenas, las pruebas de hipersensibilidad, tanto en tomate como en tabaco, fueron negativas (Klement *et al.*, 1964; Klement, 1982). Todavía no se dispone de los resultados de las inoculaciones en cormos.

#### 4. Conclusiones

Los muestreos realizados en plantaciones de azafrán de diversas localidades de la zona del Jiloca no permitieron detectar la presencia de la bacteria fitopatógena *B. gladioli* pv. *gladioli* en los cormos analizados. Se ha observado la existencia de otras bacterias saprofitas que son consideradas como infecciones secundarias asociadas a ataques primarios de ácaros u otros organismos. En cualquier caso, el porcentaje de cormos afectados es bajo.

Aunque también se han identificado otras bacterias del género *Pseudomonas*, su patogenicidad en azafrán todavía no ha podido ser determinada. Sin embargo, los resultados negativos obtenidos en la reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco y tomate no serían, en principio, compatibles con el carácter fitopatógeno de estas bacterias. Por tanto, los

datos disponibles hasta el momento permitirían concluir la ausencia de bacterias fitopatógenas en las plantaciones de azafrán de la zona del Jiloca.

## 5. Referencias bibliográficas

Behrendt U., Schumann P., Meyer J.M., Ulrich A. (2009). *Pseudomonas cedrina* subsp. *fulgida* subsp. nov., a fluorescent bacterium isolated from the phyllosphere of grasses; emended description of *Pseudomonas cedrina* and description of *Pseudomonas cedrina* subsp. *cedrina* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 1331-1335.

Fiori M. Virdis S., Schiaffino A., (2005). A bacterial disease of saffron caused by *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas* spp. XII Congresso Nazionale S.I.Pa.V.Scilla (RC).

Furuya N., Ura H., Ilyama K., Matsumoto M., Takeshita M., Takahashi Y. (2002). Specific oligonucleotide primers based on sequences of the 16S-23S rDNA spacer region for the detection of *Burkholderia gladioli* by PCR. Journal of General Plant Pathology 68: 220-224.

Hayward A.C. (1983). *Pseudomonas*: The Non-Fluorescent *Pseudomonas*. En: Plant Bacterial Diseases. Academic Press, Australia. pp. 107-135.

King E.O., Ward M.K., Raney D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory Clinical Medicine 44: 301-307.

Klement K. (1982). Hypersensitivity. En: Phytopathogenic Prokaryotes, ed. M.S. Mount, G.H. Lacy. Vol. 2. Academic Press, New York. Pp. 149-177.

Kement K., Farkas G.L., Lovrekovich L. (1964). Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 54: 474-477.

Tabla 1. Análisis de bacterias fitopatógenas realizados en cormos de azafrán del Jiloca

Fecha	Localidad	Nº muestras estudiadas	Nº muestras con síntomas	Nº muestras positivas <sup>a</sup>
Junio y julio 2008	Blancas	127	46	0 (flora saprofita)
	Fuentes Claras			
	Muniesa			
Septiembre 2009	Blancas	284	0	0 (flora saprofita)
	Blancas			
Marzo 2010	Fuentes Claras	65	2	0* (flora saprofita)
	Monreal del Campo			
	Peracense			
<b>TOTAL</b>		<b>476</b>	<b>48</b>	<b>0</b>

<sup>a</sup>Aislamiento en medio KB e identificación de bacterias fitopatógenas.

\* Identificada como *Pseudomonas* sp.



Figura 1. Síntomas en cormos de azafrán.