

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE AGRONOMIA

"ESTUDIO DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA AGALLA DE CORONA EN
PLANTAS DE CRISANTEMO CON LA CEPA K-84 DE Agrobacterium
radiobacter var. radiobacter"

GERARDO GARZON BECERRA

Tesis de grado preparada como requisito
parcial para optar al título de

INGENIERO AGRONOMO

Presidente de Tesis

GERMAN ARBELAEZ TORRES I.A., M.S.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

1986

"Este trabajo hace parte de las investigaciones realizadas por la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sin embargo, las ideas emitidas por los autores son de exclusiva responsabilidad y no expresan necesariamente opiniones de la Universidad".

DEDICATORIA :

A mis Padres
y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

- Al Ingeniero Agrónomo Germán Arbelaez Torres,
Presidente de Tesis.

- Al Ingeniero Agrónomo Fernando Jaramillo, Gerente Técnico de Jardines los Andes por su asesoría, interés y apoyo en la realización de este trabajo.

- A Luz Marina Olarte, Laboratorio de Microbiología.
Facultad de Agronomía, Universidad Nacional.

- A Fanny Mena, Proyecto Parque Simón Bolívar, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional.

- A la Empresa Jardines de los Andes y su personal que colaboró con la consecución del material vegetal utilizado.

- Alfredo Acosta por su colaboración en el material fotográfico.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	
2.1 Generalidades	5
2.2 Clasificación	5
2.3 Morfología de la Bacteria	6
2.4 Hospedantes	7
2.5 Modo de acción de la Bacteria en la planta	10
2.6 Sintomatología	12
2.7 Supervivencia y Diseminación del Agente Patógeno	13
2.8 Métodos de Control	13
2.9 Control Biológico	15
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1 Obtención de la Bacteria Patógena	19
3.2 Métodos Bacteriológicos	19
3.2.1 Aislamiento de la Bacteria	19

	Página	
3.2.2	Caracterización e Identificación de la Bacteria	20
3.2.2.1	Pruebas de Patogenecidad	20
3.2.2.2.	Clasificación de la Bacteria	22
3.2.3	Obtención y Propagación de la Cepa K-84	22
3.3	Ensayos de invernadero	23
3.3.1	Métodos de Inoculación	25
3.3.1.1	Ensayos en cama de enraizamiento	25
3.3.1.2	Ensayo en Materas	28
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1	Métodos Bacteriológicos	32
4.1.1	Aislamiento de la Bacteria	32
4.1.2	Caracterización e Identificación de la Bacteria	32
4.1.2.1	Pruebas de Patogenicidad	32
4.1.2.2	Clasificación de la Bacteria	38
4.1.3	Reproducción de la Cepa K-84	42
4.2	Ensayo e invernadero	42
4.2.2	Ensayo en Bancos de Enraiza- miento	43
4.2.3	Ensayo en Materas	51

	Página
5. CONCLUSIONES	58
6. RESUMEN	61
7. BIBLIOGRAFIA	63
8. ANEXO. COMPOSICION DE ALGUNOS MEDIOS DE CULTIVO	67

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla No. 1	Pruebas para la Identificación del género <u>Agrobacterium</u>	31
Tabla No. 2	Pruebas de Diagnóstico de biotipos para los 3 aislamientos de <u>Agrobacterium radiobacter</u> var. <u>tumefaciens</u> y para la Cepa k-84	32
Tabla No. 3	Resultados de control de la cepa K-84 sobre 2 aislamientos de <u>Agrobacterium radiobacter</u> var. <u>tumefaciens</u> en 3 variedades de crisantemo. Ensayo en bancos de enraizamiento.	35
Tabla No. 4	Resultados del control de la cepa K-84 con 2 aislamientos de <u>Agrobacterium radiobacter</u> var. <u>tumefaciens</u> en 3 variedades de crisantemo. Ensayo en materos	42

I INTRODUCCION

En la última década la producción de flores para la exportación en Colombia ha tenido una actividad preponderante, no sólo para el sector agropecuario sino para la economía del país.

Es así como la producción de flores colombianas compite en calidad con las flores holandesas y francesas, para que se exporten a más de 30 países diferentes, y para que hoy sean el tercer renglón en exportaciones agropecuarias no tradicionales y el quinto en la generación de divisas dentro de las exportaciones menores.

Recientemente se han registrado numerosas enfermedades y plagas en este tipo de explotación agropecuaria, afectando la rentabilidad. Una de las enfermedades más importantes desde el punto de vista económico en cultivos de rosa y crisantemo, es la agalla de corona, causada por la bacteria Agrobacterium tumefaciens, la cual ha sido descrita y observada en todo el mundo desde el siglo pasado.

La enfermedad fué introducida al país hace varios años en

material propagativo infectado de rosa y crisantemo. En 1973, se registró la agalla de corona en algunos cultivos de crisantemo para exportación en el Departamento de Antioquia; en la Sabana de Bogotá durante el año de 1979 se presentaron grandes pérdidas económicas en cultivos de rosa, apareciendo posteriormente la enfermedad en plantas de crisantemo.

Benincore, Ovalle y Arbeláez (17), en estudios realizados sobre la patogenicidad de Agrobacterium tumefaciens en algunas especies de plantas de flores de exportación, encontraron que aislamientos de la bacteria patógena proveniente de agallas de rosa, causaron agallas en plantas de rosa, clavel, estatices, tomate, remolacha y eucalipto; sin embargo encontraron pocas agallas en plantas de crisantemo, indicando que los aislamientos tienen cierta especificidad para ciertos hospedantes.

La División de Sanidad Vegetal del I.C.A. del Aeropuerto El Dorado, en 1980 empezó a retener y ordenar la destrucción de cargamentos de material de propagación de rosa afectados por la enfermedad, para evitar la entrada al país de nuevas cepas patógenas que no se encuentran en nues-

tro medio y que podrían atacar un mayor número de especies vegetales. Durante el primer semestre de 1982, se retuvieron 3 importaciones de plantas por un valor de 144.953 dólares. En el transcurso de los años 1983, 1984 y 1985 no se registró ninguna retención por parte del I.C.A., debido a que no se presentaron síntomas visibles de agallas; es por esto que se requiere de un método rápido y eficaz para determinar la presencia de la bacteria patógena en el material vegetal que entra al país.

Con el tiempo se ha incrementado la enfermedad en cultivos de flores de exportación, debido a diferentes factores: insuficiencia de las medidas sanitarias, modificación de ciertas técnicas culturales, multiplicación de variedades particularmente susceptibles a la enfermedad e introducción de nuevas cepas patogénicas de la bacteria, todo esto unido a la ausencia de productos químicos para controlar la enfermedad.

Desde hace algunos años se ha demostrado la protección de plantas jóvenes en varios países con la cepa K-84 de Agrobacterium radiobacter var. radiobacter como antagonista de algunas cepas de A. radiobacter var. tumefaciens.

En varios trabajos se ha confirmado que la acción de la cepa antagonista se debía a la producción de una bacteriocina denominada Agrocina y que podría ser utilizada con éxito como un medio de lucha biológica contra la agalla de corona. Miller y Miller (13) en 1974 obtuvieron buenos resultados en el control de la enfermedad mediante el tratamiento del suelo con la cepa K-84, al igual que Kerr (10) en plantas y esquejes de crisantemo. Por el contrario, en Australia la presencia de una cepa resistente de A. radiobacter var. tumefaciens a la cepa K-84 no dió resultados positivos.

El objetivo de esta investigación fue determinar el resultado del tratamiento de la cepa K-84 sobre razas de la cepa patógena prevalentes en la Sabana de Bogotá y observar la reacción a dicho tratamiento en las variedades de crisantemo Circus, Surf y Yellow Garland bajo condiciones de invernadero, con el fin de precisar la eficacia del control biológico en nuestro medio.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES

Smith y Townsend demostraron que los tumores vegetales conocidos como la agalla de corona, eran cuasados por una bacteria descrita inicialmente bajo la denominación Bacterium tumefaciens y que en la actualidad se llama Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens. Dicha bacteria puede vivir en condiciones ambientales diversas, encontrándose diseminada por casi todos los suelos del mundo (7).

2.2 CLASIFICACION

El género Agrobacterium incluye algunas bacterias que habitan en el suelo y que se adaptan a la vida de la rizósfera (11).

Keane, Kerr y New, citados por Faivre (7) consideran que el género Agrobacterium incluye solamente una especie, la Agrobacterium radiobacter, la cual se divide en tres variedades:

- a. Agrobacterium radiobacter var. radiobacter que comprende las cepas no patogénicas, capaces de inhibir in vitro cepas patogénicas e impedir la formación de tumores en las plantas.
- b. Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens que comprende las cepas patogénicas; se diferencia de la variedad radiobacter por tener en su célula un gran plásmido y el plásmido Ti (Inductor de Tumor).
- c. Agrobacterium radiobacter var. rhizogènes: que comprende las cepas capaces de formar proliferación excesiva de raíces.

En las variedades mencionadas anteriormente, Kerr y Panagópulos, citados por Agrios (1) establecieron 3 biotipos, que se diferencian principalmente por sus características bioquímicas; estos biotipos a su vez están compuestos por un gran número de cepas heterogéneas, pudiéndose distinguir entre sí por sus características morfológicas, serológicas y bioquímicas. (7,17).

El patógeno es un bacilo de 1-3 por 0,4-0,8 micras y no posee cápsula; la bacteria es móvil y tiene de 1 a 4 flagelos de implantación polar, parapolar y lateral que le permite desplazarse fácilmente en un medio líquido.

Agrobacterium tumefaciens es un patógeno aeróbico cuya temperatura óptima para su desarrollo es de 25 a 28 grados centígrados (15).

Esta bacteria en el medio de cultivo Extracto de levadura-Dextrosa-Carbonato de Calcio (YDC), excreta un polisacárido muy higroscópico, que rodea el cuerpo bacteriano y desempeña una función de protección contra la desecación. En agar nutriente la bacteria desarrolla una colonia pequeña, blanca, traslúcida, circular, lisa, brillante y entera; es Gram negativa. (2,9)

La bacteria patógena sin duda es una de las especies fitopatógenas menos exigentes en requerimientos nutricionales, debido a que casi ninguna cepa tiene necesidades de sub-sistencia especiales, lo que hace difícil su control.

2.4 HOSPEDANTES

La enfermedad conocida como "Agalla de la corona" es muy

común afectando plantas leñosas y herbáceas pertenecientes a 160 especies de más de 60 familias, tanto en plantas silvestres como cultivadas (1).

Un trabajo recientemente realizado por Cleene y De Ley citados por Faivre (7) menciona 643 especies hospedantes pertenecientes a 93 familias botánicas; algunas de estas especies han respondido a inoculaciones en el Laboratorio formando agallas, aunque nunca se hayan observado en condiciones naturales (1,7,17).

Algunas rosáceas como el ciruelo, el duraznero, el cerezo, el almendro, el pero, el manzano y el frambueso, son más sensibles a la enfermedad (4).

En algunos árboles maderables tales como el cedro y el nogal se ha observado gran susceptibilidad a la agalla de la corona. En la Sabana de Bogotá existe la enfermedad en eucalipto y sauce; estas plantas especialmente sensibles desempeñan un papel importante como fuente de inóculo para otras plantas menos sensibles (15,18).

En Colombia, principalmente en el Departamento de Antioquia

y en la Sabana de Bogotá se ha observado problemas con la enfermedad en cultivos de rosa y de crisantemo para exportación (5,14).

Se han encontrado cientos de razas del patógeno con diversos grados de especificidad, en cuanto a hospedantes; plantas de tomate y de estramonio son muy sensibles a la mayoría de las cepas patógenas, permitiendo su uso como plantas indicadoras para probar la patogenicidad de la bacteria (3,17).

Trabajos desarrollados con aislamientos de la bacteria obtenidos de tumores de crisantemo, demostraron que ninguno de dichos aislamientos infestaron 237 variedades de crisantemo inoculadas, lo que indica la variabilidad de las razas de Agrobacterium tumefaciens (12). En otro experimento Miller (13), trabajó con aislamientos provenientes de la colección mundial de A. radiobacter var tumefaciens y con aislamientos provenientes de plantas de crisantemo, encontrando resultados diferentes; inoculaciones con aislamientos de la colección mundial presentaron mayor número de plantas infectadas, mientras que aislamientos provenientes de plantas de crisantemo ocasionaron tumores de diámetro pequeño a lo largo del ta-

llo cuando fueron inoculadas en el cuello de la planta; con esto se comprobó que algunos aislamientos de la bacteria pueden ser sistémicos en determinadas variedades de crisantemo (13).

Ovalle, Bénincore y Arbeláez (17) encontraron que aislamientos de A. radiobacter var. tumefaciens provenientes de plantas de rosa cultivadas en la Sabana de Bogotá, ocasionaron porcentajes de infección variables de acuerdo al hospedante inoculado; sin embargo los aislamientos procedentes de plantas de crisantemo, inoculados en 4 variedades de la misma especie, presentaron una alta infección, mientras que los aislamientos procedentes de rosa no infectaron ninguna planta de crisantemo, lo que demuestra que las cepas que afectan rosa y al crisantemo en el país parecen ser diferentes.

2.5 MODO DE ACCION DE LA BACTERIA EN LA PLANTA

A. radiobacter var tumefaciens parece ser incapaz de ejercer su acción patogénica a través de la pared de la célula vegetal y necesita de una herida para que las bacterias puedan penetrar en las plantas e inducir a la formación de tumores; las heridas pueden ser producidas por

insectos, durante la siembra, la poda, la cosecha, las heladas y la emergencia de nuevas raíces (7).

El proceso de transformación tumoral comprende fundamentalmente tres etapas:

- a. El acondicionamiento necesario para que pueda efectuarse la transformación tumoral, el cual se inicia por una herida y termina con la cicatrización de la misma.
- b. La inducción o transformación del tejido afectado; este período corresponde a la transformación de la célula normal a célula tumoral.
- c. La proliferación tumoral corresponde a la multiplicación de la célula tumoral de una manera indefinida y más o menos desordenada para dar origen a un tumor.

La agalla de corona es una enfermedad que rara vez ocasiona la muerte de la planta, pero puede ocasionar enanismo y disminución de crecimiento debido a su efecto en el sis-

tema radical; la presencia de agallas durante los primeros períodos de crecimiento de las plantas puede ocasionar su muerte.

Una vez formado el tumor, se puede presentar lesiones secundarias ocasionadas por hongos o bacterias; dichas lesiones pueden acelerar la destrucción de las plantas (11).

2.6 SINTOMATOLOGIA

A. radiobacter var. tumefaciens puede ocasionar la formación de agallas en raíces, coronas, tallos y hojas de una amplia gama de plantas susceptibles (18).

Los tumores pueden tener formas y tamaños variados, presentándose generalmente bajo la forma de protuberancia más o menos globales o redondeadas, de consistencia variable dependiendo del estado de desarrollo de la enfermedad y del tipo de planta. Inicialmente las agallas son blandas, de color blanco y escasamente visibles; en estado adulto se tornan duras y oscuras alacanzando gran tamaño (14). La superficie de la agalla puede ser lisa,

aunque pueden ocurrir rupturas durante su crecimiento.

2.7 SUPERVIVENCIA Y DISEMINACION DEL AGENTE PATOGENO

El patógeno puede encontrarse presente en el suelo o en las raíces de las malezas u otras plantas, o en residuos vegetales de un cultivo anterior (15). En suelos estériles puede vivir por lo menos 16 meses, mientras que en suelos fértiles su supervivencia disminuye al aumentar la competencia con otros microorganismos. Se han observado apariciones explosivas de la enfermedad en suelos no cultivados durante varios años (4).

Una de las principales formas de transmisión de la bacteria es por medio del agua, mediante el uso de material propagativo infectado y por herramientas infestadas (7).

2.8 METODOS DE CONTROL

Por carencia de un tratamiento verdaderamente eficaz para la erradicación de la agalla de corona una vez ésta se presenta en la planta, el mejor control de la enfer -

medad consiste en la aplicación de medidas preventivas, las cuales varían de acuerdo a la resistencia o susceptibilidad del hospedante (7).

La utilización de material de propagación sano constituye la medida preventiva más importante para el control de la enfermedad; además se recomienda reemplazar las variedades que presentan cierta susceptibilidad a la enfermedad por plantas de variedades resistentes o tolerantes (14). Los suelos o sustratos en donde han crecido plantas enfermas, deben ser tratados mediante el uso de vapor o de fumigantes; de igual manera, se debe hacer tratamientos de herramientas y bancos con germicidas tales como formol o hipoclorito de sodio para la eliminación de la bacteria (7).

Debido a que la bacteria requiere de heridas en la planta para la iniciación del proceso tumoral, es necesario manejar el material vegetal con extremo cuidado y procurar no ocasionar heridas en las diferentes labores de cultivo (14).

La eliminación periódica de las plantas con síntomas den-

tro de los cultivos es una medida de control aconsejable para disminuir el inóculo del patógeno (14).

2.9 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico parece muy promisorio como un medio de lucha contra la agalla de corona; desde 1972 muchos países del mundo han venido utilizando en forma comercial la cepa K-84 de Agrobacterium radiobacter var. radiobacter. En Colombia se están realizando ensayos en diferentes viveros de flores para comprobar su efectividad.

Kerr (10) aisló de un suelo australiano una cepa de Agrobacterium radiobacter var. radiobacter capaz de inhibir in vitro el crecimiento de algunas cepas patógenas de Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens; el tratamiento preventivo con la cepa K-84 impidió también la formación de agallas en plantas jóvenes de durazno y tomate.

A partir de este descubrimiento, la cepa K-84 de Agrobacterium radiobacter var. radiobacter se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de plantas, incluyendo algunas especies de Prunus, Rubus, Malus, Vitis, Libocedrus,

Chrysanthemum, Crategus, Carva, Rosa, Pyrus, Humulus (8); esta cepa antagonista se ha empleado también en el tratamiento de material de propagación como semillas, estacas y esquejes (7).

Kerr y Htay citados por Ellis et al (6), demostraron que la acción antagonista de la cepa K-84 era debida a la producción de una bacteriocina que actúa especialmente sobre las bacterias de la misma especie o especies semejantes; esta bacteriocina se ha llamado "Agrocin 84". Las cepas patógenas presentan una pieza extracromosómica circular denominada "plásmido Ti" (inductor de tumores) con la información necesaria para desencadenar el proceso tumoral; el efecto de este plásmido puede ser bloqueado en alguna forma por el "Agrocin 84" con sus correspondientes plásmidos, uno conjugativo que codifica la producción del "agrocin" y la resistencia a esta bacteriocina (16,19).

En algunos casos la cepa K-84 no ha sido efectiva en la prevención contra la agalla de corona porque, o las razas patógenas son insensibles al "Agrocin" o producen un inhibidor contra la cepa K-84 (6).

Para obtener un control eficiente con la cepa K-84 es necesario que la proporción entre la población de Agrobacterium radiobacter var. radiobacter y A. radiobacter var. tumefaciens sea 1:1 o mayor; la aplicación de la cepa antagonista se realiza por inmersión del material vegetativo en una suspensión bacteriana, la cual debe contener $10^8 - 10^9$ células bacterianas por mililitro. (10).

Existen algunos factores que influyen en la interacción "in situ" de patógenos insensibles a la cepa K-84, incluyendo la especie del hospedante tratado, el sitio de siembra y la microflora del suelo (8). Diversos medios de cultivo también pueden alterar las respuestas in vitro de patógenos al Agrocina producido por la cepa K-84 (19).

Debido a que el control con la cepa K-84 es preventivo y no curativo, sería inefectivo utilizarla en infecciones latentes, ni en material en donde ya se ha desencadenado proceso tumoral (7).

Faivre - Amiot y colaboradores (8) demostraron en Francia la eficacia del tratamiento al remojar esquejes de crisantemo en la suspensión bacteriana de la cepa K-84, justo

antes de la siembra en un sustrato contaminado con la cepa patógena.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 OBTENCION DE LA BACTERIA PATOGENA

La obtención de aislamientos de la bacteria patógena se realizó a partir de agallas presentes en la corona y en las raíces de las plantas de crisantemo de las variedades Surf, Dixe, Yellow Garland y Circus procedentes de diferentes viveros de la Sabana de Bogotá.

3.2 METODOS BACTERIOLOGICOS

3.2.1. Aislamiento de la Bacteria

Los aislamientos se hicieron a partir de tejidos de agallas jóvenes de un mes de crecimiento previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% y enjuagadas con agua destilada estéril.

Se usaron 2 métodos para el aislamiento de la bacteria:

- a. Se tomaron fragmentos del tumor de aproximadamente 0.5 cm^3 y se colocaron en un tubo de

ensayo con agua destilada estéril durante 24 horas; posteriormente se tomó una lupada de la suspensión y se distribuyó en forma de estrías sobre la superficie de los medios de cultivo.

- b. En un mortero esterilizado se preparó un macerado de porciones de agallas con agua destilada estéril, luego se filtró y la suspensión resultante se estrió sobre los medios de cultivo.

Para los aislamientos se utilizaron los medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Agar Nutriente (AN) y Extracto de Levadura-Dextrosa-Carbonato de calcio (YDC) con pH7.

Las cajas de Petri se incubaron a una temperatura de 29°C.

3.2.2. Caracterización e Identificación de la Bacteria

3.2.2.1 Pruebas de Patogenicidad

A cada uno de los cultivos bacteriales obtenidos se les com-

probó la patogenicidad mediante inoculación de la suspensión bacteriana sobre rodajas de zanahoria (Daucus carota) y de remolacha (Beta vulgaris) de 5 mm. de espesor, desinfectadas con etanol al 80% e hipoclorito de sodio al 5%; las rodajas se colocaron dentro de una caja de Petri estéril, con papel filtro estéril y se incubaron a 24°C durante 30 días.

Se utilizaron dos métodos de inoculación en los discos de remolacha y zanahoria: el primero consistió en tomar una lupada del cultivo puro creciendo en YDC y se extendió sobre la superficie del disco; posteriormente se agregaron 2 ml. de agua destilada estéril en la base de la caja de Petri con el fin de evitar la deshidratación de los discos. El segundo método se hizo a partir de una lupada de cultivo puro, la cual se diluyó en 2 ml. de agua destilada estéril en un tubo de ensayo y se extendió sobre el disco.

De las rodajas de zanahoria y de remolacha que presentaron agallas sobre la superficie, se aisló la bacteria para proceder a su identificación y caracterización.

3.2.2.2. Clasificación de la Bacteria

El género, la especie y el biotipo se determinaron mediante observaciones macroscópicas y microscópicas y la realización de pruebas fisiológicas y bioquímicas, siguiendo los procedimientos establecidos en el Manual de Bergey 8a. Edición (2) y la Guía de Laboratorio para identificación de bacterias fitopatógenas de Schaad (15).

Para la identificación de biotipos de Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens y la cepa K-84 se utilizaron las pruebas de diagnóstico propuestas por Kerr y Panagópu - los (15).

3.2.3 Obtención y Propagación de la Cepa K-84

La cepa K-84 de Agrobacterium radiobacter var. radiobacter fue enviada por el Dr. Larry W. Moore de Oregon State University, Corvallis, Oregon, U.S.A. Como medios de cultivo para la replicación de la bacteria se utilizaron Papa-Dextrosa-Agar, Caldo Nutritivo, Agar Nutritivo, Extracto de Levadura-Dextrosa-Agar-Carbonato de Calcio, D-1 Agar, Papa-Dextrosa-Agar + 5% de carbonato de calcio. Pa-

ra cada uno de los medios se efectuaron tres repeticiones en tubos de ensayo y 3 repeticiones en cajas de Petri.

3.3 ENSAYOS EN INVERNADERO

Se desarrollaron dos ensayos para observar el comportamiento de la cepa K-84 sobre los aislamientos patogénicos provenientes de plantas de crisantemo enfermas.

Los ensayos se desarrollaron en el Laboratorio y en los invernaderos con cubierta plástica de la Facultad de Agronomía, simulando las condiciones comerciales en las cuales se produce el crisantemo en la Sabana de Bogotá.

El primer ensayo se realizó en camas de enraizamiento utilizando esquejes de crisantemo de variedades susceptibles a la agalla de corona: Circus, Surf y Yellow Garland. En el segundo ensayo se buscó probar el control biológico de la cepa K-84 al ser aplicada en diferentes estados de crecimiento de las plantas de crisantemo bajo condiciones de invernadero; se utilizó como material vegetal esquejes enraizados de las variedades mencionadas anteriormente.

Para los tratamientos en camas de enraizamiento se utilizaron materas de 14 cms. de diámetro con una altura de 11 cms. y 1 Kgr. de capacidad; el fondo de la matera se selló con discos de plástico para evitar mezclas entre las cepas inoculadas; como sustrato se utilizaron escorias coquizadas tratadas con vapor de agua a 82°C durante 30 minutos. Una vez sembrados los esquejes se colocaron dentro de cámaras húmedas cubiertas con plástico lechoso y regularmente se prendía un vaporizador para ayudar a mantener la humedad relativa alta. Durante el período de enraizamiento de los esquejes de crisantemo se llevaron registros diarios de temperatura y humedad relativa mediante el uso de un hidrotermógrafo.

El segundo ensayo se realizó en materas de 1Kgr. de capacidad; como sustrato se utilizó suelo de textura franco-limosa, rico en materia orgánica y se mezcló con 1,6 Kgr. de roca dolomítica, 0.22 m³. de cascarilla de arroz y 1.0 Kgr. de superfosfato por m³ de suelo.

Se preparó para el riego de los 2 ensayos una solución nutriente en agua destilada a la cual se le agregó 0,3 gr. de nitrato de amonio, 1.0 gr. de nitrato de calcio, 0,5 gr.

de sulfato de magnesio, y 0.1 cc. de ácido fosfórico por litro de agua.

Para las camas de enraizamiento se aplicó un riego cada 24 horas con la solución nutriente; en el segundo ensayo se comenzó con 3 riegos diarios por matera y una vez establecidas las plantas se hicieron 2 riegos por día.

3.3.1 Métodos de Inoculación

El inóculo que se utilizó en los dos experimentos se obtuvo de un cultivo bacterial de 3 días de crecimiento, del cual se prepararon suspensiones homogéneas de la bacteria en caldo nutritivo (CN) hasta obtener concentraciones cercanas a 1.7×10^{10} células bacteriales por mililitro, las cuales se determinaron por medio de densidades ópticas.

3.3.1.1 Ensayo en Camas de Enraizamiento

Para simular las condiciones de las camas de enraizamiento se utilizó una caja de 3m x 1m x 0.6m. cubierta con plástico lechoso; se mantuvo una humedad relativa promedio de 80-85% con la utilización de gasa húmeda en el piso de

la caja y utilizando vaporizador 2 veces al día.

Se realizaron 7 tratamientos para observar la eficacia de la cepa K-84 sobre esquejes no enraizados de crisantemo. Los tratamientos que se utilizaron para las cepas patógenas A-1 y A-2 fueron:

T₀ : Testigo. Sin inoculación.

T₁ : Aplicación de A. radiobacter var. tumefaciens al sustrato.

T₂ : Aplicación simultánea de A. radiobacter var. tumefaciens al sustrato, y de la cepa K-84 a los esquejes sin enraizar.

T₃ : Inmersión de esquejes sin enraizar en una suspensión de la cepa K-84 y 8 días después de la siembra aplicación de una suspensión de la cepa patógena.

T₄ : Inmersión de esquejes sin enraizar en una suspensión de la cepa K-84 y 15 días después de la siem-

bra aplicación de una suspensión bacteriana de la cepa patógena.

T₅ : Inmersión de los esquejes sin enraizar en una suspensión de la cepa K-84.

T₆ : Aplicación de A. radiobacter var. tumefaciens al sustrato, más agua clorada a los esquejes sin enraizar.

En los tratamientos T₁, T₂, T₆ de cada aislamiento patógeno, se asperjaron 10 ml. de suspensión bacteriana sobre la escoria coquizada estéril para simular la presencia de dicha bacteria bajo condiciones naturales de una cama de enraizamiento. En el tratamiento 6 se preparó agua clorada mediante aplicación de Hipoclorito de Sodio del 15% hasta obtener una concentración de 200 ppm de cloro en donde se sumergieron los esquejes durante 30 segundos y posteriormente fueron sembrados; el riego para este tratamiento se efectuó con agua del grifo que contenía entre 5 a 7 ppm de cloro.

El testigo no recibió inoculación de ninguna de las cepas

patógenas ni de la cepa K-84.

En los tratamientos 3, 4 y 5 se aplicó la cepa K-84 a los esquejes de crisantemo y se sembraron en las materas con sustrato estéril; al cabo de 8 a 15 días, según el tratamiento, se halaron las plantas hacia arriba tratando de romper varias raíces para causar heridas, y 24 horas después se hicieron las inoculaciones con la cepa patógena por riego directo sobre el sustrato.

3.3.1.2 Ensayo en Materas

Bajo condiciones de invernadero los tratamientos en materas para las 2 cepas de A. radiobacter var. tumefaciens fueron iguales a los desarrollados en las camas de enraizamiento.

Se utilizaron esquejes de crisantemo enraizados de las variedades Circus, Surf, Yellow Garland; el sustrato fue suelo orgánico mezclado con cascarilla de arroz.

Cada tratamiento correspondió a una matera sembrada con 3 esquejes; se efectuaron 3 repeticiones para todos los

tratamientos.

Los tratamientos desarrollados fueron:

- T₀ : Testigo. Sin inoculación.
- T₁ : Aplicación de A. radiobacter var. tumefaciens al sustrato.
- T₂ : Aplicación simultánea de A. radiobacter var. tumefaciens al sustrato y de la cepa K-84 a los esquejes enraizados.
- T₃ : Inmersión de esquejes enraizados en una suspensión de la cepa K-84 y 8 días después de la siembra se aplicó una suspensión de la cepa patógena.
- T₄ : Inmersión de esquejes enraizados en una suspensión de la cepa K-84 y 15 días después de la siembra se aplicó una suspensión de la cepa patógena.

- T₅ : Inmersión de los esquejes enraizados en una suspensión de la cepa K-84.
- T₆ : Aplicación de A. radiobacter var. tumefaciens al sustrato más agua clorada a los esquejes enraizados .

La aparición de daño en los esquejes a las dos semanas de iniciado el ensayo ocasionado por Rhizoctonia sp. y Botrytis cinerea, condujo a la aplicación de una aspersión al suelo de Ridomil (Metalaxil - Mancozeb) 0.16 gr. de producto comercial/Lt + Benlate (Benomil) 0.39 gr. de producto comercial/Lt. Se hicieron 3 aspersiones con Pirimor (Pirimicarb) para el control de afidos observados a partir de la cuarta semana.

En el ensayo con los esquejes enraizados y sembrados en materas se desarrolló inicialmente en el Laboratorio con una temperatura de 18-20 grados centígrados y 50-70% de H.R. ; se utilizaron lámparas fluorescentes para regular el fotoperíodo de las plantas de crisantemo, dejando durante 26 noches la luz continua. A los 54 días de la siembra el material vegetal se trasladó a los invernaderos con

cubierta plástica, con una temperatura promedio de 18 grados centígrados y una humedad relativa del 50%. En el estado de desarrollo del botón color de la planta (98 días después de la siembra), por cambio de plástico de los invernaderos que coincidió con una helada, se dió por terminado el ensayo debido a la quemazón y posterior degeneramiento de las plantas.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 METODOS BACTERIOLOGICOS

4.1.1 Aislamiento de la Bacteria

La maceración de agallas, su posterior filtrado y estriado en el medio de cultivo fue el método más confiable para lograr el aislamiento de la bacteria. Después de continuas replicaciones en los diferentes medios utilizados, se observó que el medio más adecuado para la obtención de cultivos puros fue el YDC, pH7; las colonias desarrolladas en dicho medio se caracterizaron por ser pequeñas, blancas, circulares, enteras, lisas, brillantes, alcanzándose a presentar colonias tipo estrella cuando crecía en el medio de cultivo por más de 72 horas.

Se desarrollaron en promedio de 8 a 10 repeticiones para obtener cultivo puro en YDC.

4.1.2 Caracterización e Identificación de la Bacteria

4.1.2.1 Pruebas de Patogenicidad.

El mejor método para la inoculación de las rodajas de za-

nahoria y de remolacha fue el de tomar una lupada de cultivo puro de 24 horas de crecimiento en YDC y su estriado posterior con un aza sobre la superficie de la rodaja; cuando se aplicó la mezcla del crecimiento bacterial y de agua destilada, se observó mucha contaminación.

Sobre las rodajas se presentaron diversos tipos de crecimiento bacterial; en ocasiones se observaron pudriciones causadas principalmente por Pseudomonas procedentes de aislamientos de la variedad Dixé; de igual manera se observó en algunos discos no inoculados, racimos cristalinos diminutos que al ser vistos al estereoscopio presentaron la formación característica de un crecimiento celular. (Fotografía No. 1). Es de anotar que la zanahoria se ha utilizado por varios investigadores para la reproducción in vitro de cultivo de tejidos por la tótipotencia de las células lo que indica que se debe diferenciar un crecimiento asexual en la rodaja y un teratoma ocasionado por la inoculación de una bacteria patógena; mientras que en el primer caso cada división celular es ordenada y asemeja ramilletes de diminutas protuberancias, la bacteria Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens causa en la superficie de la rodaja formas totalmente desordenadas y de

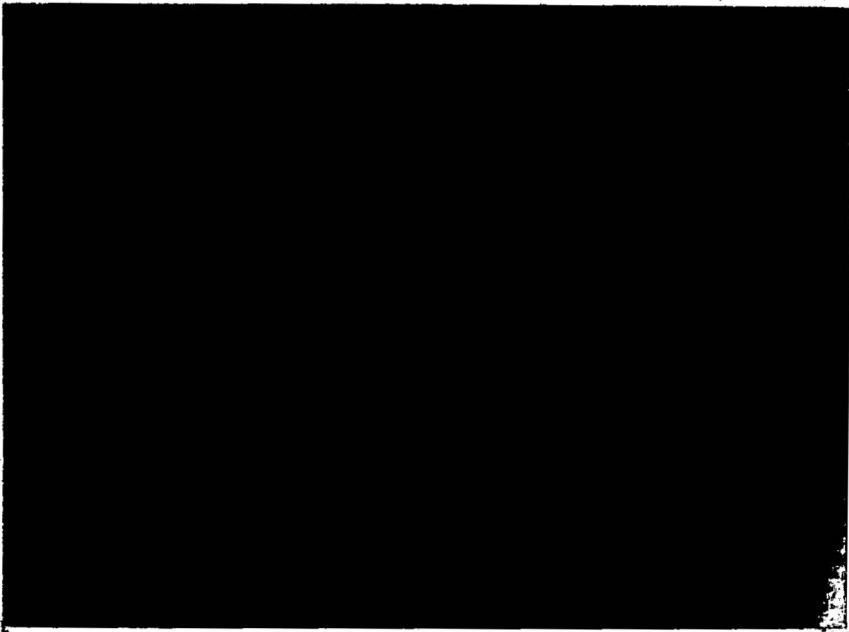
mayor tamaño que en el caso anterior. (Fotografía No.2).

Al igual que en el trabajo de Ovalle, Benincore y Arbeláez (17), se llegó a establecer que la rodaja de remolacha presentaba pequeños tumores brillantes, lisos, rojizos, en la superficie, alcanzando su máximo crecimiento a los 30 días de inoculado (Fotografía No. 3).

Para obtener datos consistentes se hicieron 3 repeticiones en cajas de Petri de cada uno de los aislamientos bacteriales obtenidos sobre las rodajas de zanahoria y de remolacha.



FOTOGRAFIA No. 1 Crecimiento celular en rodajas de zanahoria, el cual se origina a nivel de los vasos conductores de la rodaja a los 15 días de cortada la zanahoria.



FOTOGRAFIA No. 2 Crecimiento característico de los teratomas formados por la inoculación de aislamientos de A. radiobacter var. tumefaciens, 22 días de inoculación.



FOTOGRAFIA No. 3 Rodaja de remolacha inoculada con A. radiobacter var. tumefaciens; sobre la superficie de la rodaja se presentan pequeños tumores lisos y de coloración rojiza, 24 días de inoculación.

El aislamiento procedente de la variedad Circus presentó un 84% de patogenicidad en zanahoria, mientras que los aislamientos de las variedades Yellow Garland y Surf alcanzaron apenas un 50%. Para la remolacha los resultados de patogenicidad fueron: Circus 50%, Yellow Garland 20% y Surf 33%.

Al inocular rodajas de zanahoria y de remolacha con la cepa K-84 de Agrobacterium radiobacter var. radiobacter no se observaron los síntomas característicos de la formación de tumores desarrollados por los aislamientos patógenos.

Este método de inoculación en rodajas de zanahoria y de remolacha se constituye en un instrumento rápido y eficiente de diagnóstico para determinar la patogenicidad de un aislamiento bacterial desconocido.

4.1.2.2 Clasificación de la Bacteria

A cada uno de los aislamientos patógenos se les denominó así: A-1 Yellow Garland, A-2 Circus, A-3 Surf.

Los análisis realizados para establecer la identificación de los cultivos obtenidos a partir de agallas y compararlos con la cepa K-84 no patógena, se caracterizaron dentro del género Agrobacterium (Tabla No. 1).

En las pruebas de diagnóstico de biotipos se estableció que la cepa K-84 y el aislamiento A-1 pertenecían al biotipo 2, mientras que los aislamientos patógenos A-2 y A-3 fueron del biotipo 1 (Tabla No. 2).

Tabla No. 1 Pruebas para la identificación del género Agrobacterium

Prueba	Aislamientos			
	A-1	A-2	A-3	K-84
Crecimiento en medios de cultivo comunes (YDC, PDA, AN)	+	+	+	-
Tinción de Gram	-	-	-	-
Requerimientos de oxígeno	AEROBICOS			
Pigmento amarillo no difusible producido en YDC	-	-	-	-
Fluorescencia en el medio B de King	-	-	-	-
Crecimiento en D-1 Agar	+	+	+	-
Producción de enzimas:				
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	-	+	+	-
Hidrólisis de gelatina	-	-	+	-
Producción de ácido a partir de:				
Glucosa	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	-	+
Crecimiento 24-26°C	+	+	+	+

A-1 corresponde al aislamiento obtenido de la variedad Yellow Garland, A-2 de la variedad Circus y A-3 de la variedad Surf.

Tabla No. 2 Pruebas de Diagnóstico de Biotipos para los 3 aislamientos de Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens* y para la Cepa K-84.

Prueba	<u>Aislamientos</u>			
	<u>Biotipo 1</u>		<u>Biotipo 2</u>	
	A-2	A-3	A-1	K-84
Producción de 3-ketolactosa	+	+	-	-
Tolerancia al Cloruro de sodio	3%	3%	1%	1%
Crecimiento a 35°C	+	+	-	-
Leche tornasol	ALCALINA		ACIDA	
Reacción oxidasa	+	+	-	-
Utilización citrato	-	-	+	+
Producción de ácido a partir de Eritritol	-	-	+	+
Patogenicidad				
Agallas en discos de zanahoria	+	+	+	-
Agallas en discos de remolacha	+	+	+	-

La identificación del biotipo de cada aislamiento obtenido es importante para la posible utilización de la cepa K-84, debido a que se ha encontrado un control más eficiente de la enfermedad ocasionada por aislamientos pertenecientes al biotipo 2 (16).

4.1.3 Reproducción de la Cepa K-84

El medio de cultivo donde crecieron bien las bacterias no patógenas fué el PDA más 5% de CaCO_3 ; las colonias bacteriales a las 48 horas se caracterizaron por ser blancas, circulares, enteras, lisas y abundantes sobre la superficie del medio.

En YDC el crecimiento bacterial fue muy pobre, mientras que en D-1 Agar, CN, AN y PDA fue nulo.

4.2 ENSAYO DE INVERNADERO

Los 2 aislamientos de A. radiobacter var. tumefaciens inoculados en plantas de las 3 variedades de crisantemo presentaron un alto porcentaje de infección principalmente en las variedades Circus (66%) y Yellow Garland

(58%); la variedad Surf fue la menos afectada con un 27% de infección.

La observación y cuantificación de las agallas se efectuó a los 112 días después de la inoculación. Los tumores encontrados se desarrollaron en la raíz y en la corona de las plantas inoculadas, caracterizándose por presentar agrupaciones irregulares de formas redondeadas, alcanzando diámetros no mayores de 15 m.m.; la superficie de las agallas fue rugosa, con coloración pardo oscura y de consistencia dura, similar a las agallas encontradas en plantas de crisantemo afectadas por la enfermedad en cultivos comerciales de exportación (Fotografía N° 4).

En bancos de enraizamiento, se observaron a los 50 días de iniciado el ensayo agallas redondas y rojizas en la corona de las plantas inoculadas (Fotografía N° 5).

4.2.2 ENSAYO EN BANCOS DE ENRAIZAMIENTO

En este ensayo se presentó una mayor incidencia de la enfermedad en las variedades Circus y Yellow Garland; en



FOTOGRAFIA No. 4

Planta de crisantemo afectada por la agalla de corona. La superficie de la agalla es rugosa y de coloración pardo oscura alcanzando diámetros de 3 ctms.



FOTOGRAFIA No. 5

Formación inicial de agallas en la corona de plantas de crisantemo al ser inoculada con la bacteria patógena de A. radiobacter var. tumefaciens a esquejes sin enraizar en bancos de enraizamiento; 50 días de inoculación.

la variedad Surf la infección fue baja (Tabla N° 3). Este comportamiento se debe a la procedencia de los aislamientos inoculados, es decir, que el aislamiento A-1 procedente de la variedad Yellow Garland ocasionó un mayor número de agallas en la variedad Yellow Garland, mientras que el aislamiento procedente de la variedad Circus lo hizo en plantas de la variedad Circus. Tanto el aislamiento A-1 como el aislamiento A-2 causaron tumores en la variedad Surf (Tabla N° 3).

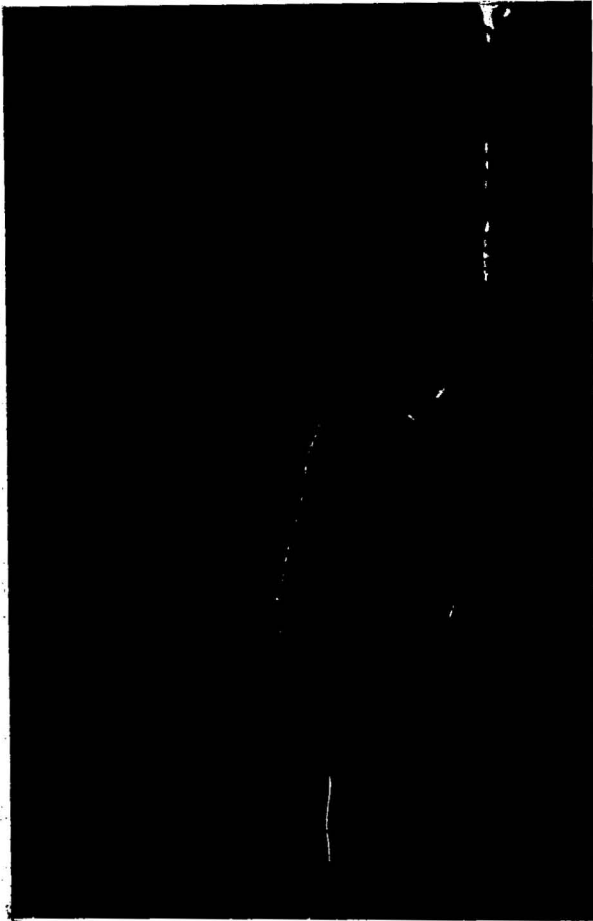
La mayor cantidad de agallas se observó en la corona de las plantas (67%), lo cual permite establecer que la herida en la base de los esquejes sin enraizar fue el punto de entrada de bacteria patógena (Tabla N°3, Fotografías 6 y 7).

Tabla N°3. Resultados de control de la cepa K-84 sobre 2 aislamientos de Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens en 3 variedades de crisantemo. Ensayo en bancos de enraizamiento.

Variedad	Tratamiento	A-1 (Biotipo 2)			A-2 (Biotipo 1)		
		Plantas con agallas	# Agallas		Plantas con agallas	# Agallas	
			Raíz	Corona		Raíz	Corona
CIRCUS	T ₀	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₁	6/9	4/9	2/9	7/9	3/9	4/9
	T ₂	2/9	1/9	1/9	2/9	0/9	2/9
	T ₃	2/9	0/9	2/9	4/9	0/9	4/9
	T ₄	1/9	1/9	0/9	6/9	1/9	5/9
	T ₅	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₆	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
SURF	T ₀	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₁	4/9	2/9	2/9	3/9	2/9	1/9
	T ₂	0/9	0/9	0/9	1/9	1/9	0/9
	T ₃	1/9	0/9	1/9	2/9	1/9	1/9
	T ₄	2/9	1/9	1/9	0/9	0/9	0/9
	T ₅	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₆	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	1/9
	T ₀	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₁	8/9	0/9	8/9	4/9	2/9	2/9
	T ₂	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₃	1/9	0/9	1/9	1/9	0/9	1/9
	T ₄	2/9	0/9	2/9	3/9	1/9	2/9
	T ₅	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₆	1/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9
TOTAL		30/189	10/189	20/189	34/189	11/189	23/189



FOTOGRAFIA No. 6 . Agalla en la corona de 2 ctms. de diámetro en una planta de crisantemo de la variedad Circus de 90 días de inoculada con la cepa patógena en bancos de enraizamiento.-



FOTOGRAFIA No. 7 : Agalla de 3 ctms. de diámetro en la corona de una planta de crisantemo tratada con la cepa K-84 e inoculada 15 días después con el aislamiento patógeno de A. radiobacter var. tumefaciens; 110 días después de la inoculación en bancos de enraizamiento.

Aplicaciones preventivas del aislamiento K-84 en el momento de la siembra (Tratamiento T_2), redujeron la incidencia de la enfermedad en las variedades Circus y Surf; en la variedad Yellow Garland se observó un control total de la enfermedad (Tabla N° 3).

La cepa K-84 de A. radiobacter var. radiobacter perdió efectividad con el tiempo en el sustrato. En los tratamientos T_3 y T_4 se observó una disminución en el grado de control a medida que aumentó el tiempo entre la inmersión de los esquejes en la solución con la cepa K-84 y la inoculación de la bacteria patógena por ser fácilmente lixiviada por el agua de riego, contrario a lo encontrado por Moore y Waren (16) en plantas de crisantemo, quienes sostienen que la bacteria ejerce control mediante la formación de un halo protector alrededor de los tejidos de las plantas, reproduciéndose y manteniéndose constantemente.

Las plantas de los tratamientos testigo (T_0) e inoculadas con la cepa K-84 (Tratamiento T_5) no desarrollaron agallas en ninguna de las variedades, y tampoco se observaron diferencias en su desarrollo con las plantas

infectadas (Tabla N° 3).

El mejor tratamiento en bancos de enraizamiento para todas las variedades se obtuvo mediante la inmersión de los esquejes en una solución que contenía 200 ppm. de cloro (Tratamiento T₆) (Tabla N°3). El riego se efectuó durante todo el ensayo con la solución nutriente disuelta en agua con 6 ppm. de cloro.

Mientras que la cepa K-84 actúa con mayor eficiencia sobre el biotipo 2 que sobre el biotipo 1, el cloro ejerció su acción preventiva independiente del biotipo de la bacteria patógena.

El aislamiento A-1 procedente de la variedad Yellow Garland ocasionó mayor infección que el aislamiento A-2 obtenido de la variedad Circus. Ninguno presentó especificidad al hospedante inoculado (Tabla N° 3).

4.2.3 Ensayo en Materas

Al igual que en el ensayo de enraizamiento se observó un alto grado de infección en las variedades Circus y Yellow Garland, siendo menor en la variedad Surf (Tabla N°4); por

Tabla N°4 Resultados del control de la cepa K-84 con 2 aislamientos de Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens en 3 variedades de crisantemo. Ensayo en materos

Variedad	Tratamiento	A-1 (Biotipo 2)			A-2 (Biotipo 1)		
		Plantas con agallas	# Agallas		Plantas con agallas	# Agallas	
			Raíz	Corona		Raíz	Corona
CIRCUS	T ₀	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₁	4/9	4/9	0/9	7/9	6/9	1/9
	T ₂	2/9	2/9	0/9	5/9	5/9	0/9
	T ₃	2/9	1/9	1/9	4/9	4/9	0/9
	T ₄	0/9	0/9	0/9	3/9	3/9	0/9
	T ₅	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₆	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
SURF	T ₀	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₁	3/9	2/9	1/9	0/9	0/9	0/9
	T ₂	0/9	0/9	0/9	2/9	2/9	0/9
	T ₃	1/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₄	1/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₅	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₆	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
TOTAL	T ₀	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₁	6/9	6/9	0/9	3/9	3/9	0/9
	T ₂	0/9	0/9	0/9	1/9	1/9	0/9
	T ₃	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	1/9
	T ₄	1/9	1/9	0/9	2/9	2/9	0/9
	T ₅	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
	T ₆	1/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9
TOTAL		21/189	19/189	2/189	28/189	26/189	2/189

lo tanto a nivel comercial, es necesario llevar registros al detectar problemas con la agalla de la corona en bancos de enraizamiento y en camas de producción para efectuar la rotación en el próximo ciclo con variedades resistentes que toleren la enfermedad y de esta forma evitar la siembra de variedades susceptibles en sitios contaminados.

Del número total de agallas presentes en las plantas, el 93% se localizó en la raíz y el 7% en la corona (Tabla N° 4, Fotografías N°8 y N°9); este resultado confirma que una siembra inadecuada con maltrato de raíces ocasiona heridas favorables para la penetración de la bacteria en los tejidos de la planta, y la posterior formación de tumores.

A nivel comercial al observar teratomas se puede tener un indicio de la ubicación del inóculo del patógeno; si la enfermedad se presenta en la corona, el inóculo puede presentarse en bancos de enraizamiento, y si está en las raíces se podría localizar en las camas de producción.

La acción preventiva de la cepa K-84 se incrementó a



BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

FOTOGRAFIA No. 8 Agalla radical de 1.5 ctms. de diámetro en una planta de crisantemo de la variedad Yellow Garland inoculada con un aislamiento patógeno de A. radiobacter var. tumefaciens en materas; 110 días de inoculada.



FOTOGRAFIA No. 9 Agalla radical de 1 cm. de diámetro en una planta de crisantemo; del 100% de agallas presentes en el ensayo en mataras el 93% se presentó en la raíz de las plantas.

medida que la planta avanzó en edad (Tratamientos T_2 , T_3 , T_4) contrario a lo encontrado en bancos de enraizamiento. En este caso el sustrato creó condiciones favorables a nivel de la rizósfera para el mantenimiento y reproducción de la bacteria antagonista con el fin de competir con los aislamientos patógenos aplicados posteriormente (Tabla N° 4).

En general la aplicación de cloro a los esquejes enraizados (Tratamiento T_6) fue el mejor tratamiento observado, ya que se redujo la enfermedad en un 95% en comparación al testigo inoculado con la cepa patógena (Tratamiento T_0). Por lo tanto cloro se constituye en un elemento importante para ser utilizado en la prevención de la agalla de corona en los bancos de enraizamiento y en las camas de producción.

El aislamiento patógeno A-1 procedente de la variedad Yellow Garland fue el más agresivo y a su vez el más controlado por la cepa K-84 por pertenecer ambos al biotipo 2.

El sitio donde se adquiere la infección determinará la

incidencia de la enfermedad en las plantas. Los resultados demostraron que la infección en los bancos de enraizamiento ocasionó un mayor número de plantas enfermas que cuando el inóculo se hallaba presente en las camas de producción (Tablas N° 3 y N° 4).

5. CONCLUSIONES

1. El método de inoculación en rodajas de zanahoria y de remolacha con un aislamiento patógeno de Agrobacterium radiobacter var. tumefaciens causante de tumores, se constituye en un instrumento rápido y eficiente de diagnóstico para determinar la patogenecidad de un aislamiento bacterial desconocido.
2. Los aislamientos de A. radiobacter var. tumefaciens pertenecientes a los biotipos 1 y 2 presentaron un alto porcentaje de infección en las variedades Circus y Yellow Garland mientras que la variedad Surf fue la menos afectada por dichos aislamientos.
3. El mayor número de agallas en los bancos de enraizamiento se presentó en la corona de las plantas inoculadas, mientras que en el ensayo en materas se observaron más agallas en las raíces de las plantas.
4. El control de la enfermedad con la aplicación pre -

ventiva de la cepa K-84 en el ensayo en materas fue más efectivo que la aplicación efectuada en bancos de enraizamiento.

5. En los bancos de enraizamiento la cepa K-84 perdió efectividad a medida que transcurría el tiempo por ser fácilmente lixiviada por el agua de riego.
6. La inmersión de los esquejes enraizados al momento de la siembra en una suspensión bacteriana con la cepa K-84 ocasionó el mejor control de las cepas patógenas y su acción aumentó con el tiempo.
7. El sitio en donde las plantas adquirieron la infección determinó la incidencia de la enfermedad. Se encontró que la infección en bancos de enraizamiento ocasionó un mayor número de plantas enfermas, en comparación cuando el inóculo se encontró en el sustrato de las materas.
8. El aislamiento patógeno proveniente de la variedad Yellow Garland fue el aislamiento más agresivo y a su vez el más afectado por la cepa K-84; por pertenecer al biotipo 2.

9. De los medios de cultivo utilizados para la multiplicación de la cepa K-84, el PDA más 5% de Carbonato de Calcio fue el mejor para el crecimiento de la bacteria.
10. La inmersión de los esquejes en una solución con 200 ppm. de cloro antes de la siembra, el uso continuo y moderado de Cloro en el agua de riego, se constituyó en el mejor tratamiento para prevenir la agalla de la corona en el ensayo de bancos de enraizamiento y en el ensayo en materas.
11. La dificultad en simular condiciones ambientales favorables para el crecimiento de las plantas a nivel de laboratorio, crea la necesidad de iniciar nuevas investigaciones que permitan la utilización de verdaderos bancos de enraizamiento y camas de producción con debidas normas profilácticas que eviten la diseminación del inóculo en un cultivo comercial.

6. RESUMEN

A partir de plantas de crisantemo de las variedades Surf, Yellow Garland y Circus afectadas por la agalla de corona en la Sabana de Bogotá, se obtuvieron 3 aislamientos bacteriales de A. radiobacter var. tumefaciens, los cuales se caracterizaron e identificaron mediante observaciones macroscópicas y microscópicas y la realización de pruebas fisiológicas y bioquímicas en el laboratorio; para probar la patogenicidad de dichos aislamientos se inocularon en plantas de tomate, en discos de zanahoria y de remolacha.

Se realizaron 2 ensayos para determinar el efecto de la cepa K-84 de A. radiobacter var. radiobacter sobre la enfermedad ocasionada por 2 aislamientos patógenos de A. radiobacter var. tumefaciens en plantas de crisantemo de las variedades Circus, Yellow Garland y Surf. El primer ensayo se desarrolló en bancos de enraizamiento con esquejes sin enraizar y el segundo ensayo se hizo con esquejes enraizados y colocados en materas.

Los 3 aislamientos patógenos presentaron un alto porcentaje de infección en las variedades Circus y Yellow Garland, mientras que la variedad Surf fué la menos afectada.

La cepa K-84 fué más efectiva en el ensayo de materas que en el ensayo en bancos de enraizamiento por la fácil lixiviación de la bacteria con el agua de riego. Se encontró un mejor control de la cepa K-84 para los aislamientos patógenos pertenecientes al biotipo 2.

La inmersión en presiembra de los esquejes en una solución de cloro y el uso continuo de este elemento en el agua de riego fue el mejor tratamiento para el control de la agalla de corona en bancos de enraizamiento y en materas.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G.n. 1980, Plant Pathology, Academic Press. New York. 342 pp.
2. Allen, O.N. and J.J. Holding. 1974. Agrobacterium p. 264-267. In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th edition. The Williams and Wilkins Baltimore Co.
3. Anderson, A.R. and L.W. Moore. 1979. Host especificity in the genus Agrobacterium. Phytopathology 69: 320=323.
4. Anónimo. 1979. Tumores de Agrobacterium tumefaciens o Crown gall. Mimeografiado Asocolflores.
5. Castaño, J.J. 1975. Trayectoria de la Fitopatología en Colombia. (1571-1974). 1ª edición. Editorial Letras. Medellín.
6. Ellis, J.G., A. Kerr, M. van Montagu and. J. Schell. 1979. Agrobacterium: genetic studies on agrocin 84 production and the biological control on crown gall. Physiological Plant Pathology 15: 311-319.

7. Faivre, Amiot, A. 1979. Conferencia sobre los tumores de Agrobacterium y el problema de la agalla de corona. Mimeografiado Asocolflores. Bogotá.
8. Faivre, Amiot, A. J. Roux et M.L. Faivre. 1982. Lutte biologique contre Agrobacterium tumefaciens (Schmit et Townsend) Conn Agent de la galle du collet du chrysantheme a l'side de la souche K-84 D' Agrobacterium radiobacter (Beijerinck et van Delden) Conn. Acta Horticultura 125: 233-237.
9. Hugh, R. and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bacteriol 66: 24-26.
10. Kerr, A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. Plant Disease 64: 25-30.
11. Lippinott, J.A. and B.B. Lippincott. 1975. The genus Agrobacterium and plant tumorigenesis. Annual Review of Microbiology 29: 377-405.

12. Miller, H.N. 1975. Leaf, stem, crown and root galls induced in chrysanthemum by Agrobacterium tumefaciens. *Phytopathology* 6: 805-811.
13. 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.
14. Moore, L.W. 1979. La agalla de corona y su relación con la producción de rosas en Colombia. Mimeografiado Asocolflores. Bogotá.
15. Moore, L.W., Anderson and C. Kado. 1980. Agrobacterium p. 17-25. In N.W. Schaad. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota.
16. Moore, L.W., and G. Waren. 1979. Agrobacterium radiobacter strain 84 and biological control of crown gall. *Phytopathology* 17: 163-179.
17. Ovalle, G., G. Benincòre and G. Arbeláez. 1984. Patogenicidad de Agrobacterium tumefaciens en algunas

especies de plantas de flores de exportación. *Agro-
nomía Colombiana* 2: 89-95.

18. Sarasola, A. y M. Rocca de Sarasola. 1975. *Fitopatología. Curso moderno, Tomos III y IV. Primera edición. Editorial Hemisferio Sur.*
19. Spiers, A. G., 1980. Biological control of Agrobacterium species in vitro. *Journal of Agricultural Research* 23: 133-137.
20. Tovar, G. 1978. *Microbiología Agrícola. Guías para la práctica del curso de Microbiología Agrícola Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agro-
nomía. Bogotá.*

ANEXO

Composición de algunos medios de Cultivo

- Extracto de levadura-Dextrosa- Carbonato de Calcio (YDC)

Extracto de levadura	10 gr/lt
Dextrosa (Glucosa)	20 gr/lt
CaCO ₃	20 gr/lt
Agar	15 gr/lt

- Medio B de King

Pectona (Difco)	20 gr/lt
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	2.5 gr/lt
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	6 gr/lt
Agar	15 gr/lt
Glicerol	15 ml/lt

- Papa- Dextrosa- Agar + Carbonato de Calcio (5%) PDA.

Papa	200 gr/lt
Agar	18 gr/lt
Glucosa	15 gr/lt
CaCO ₃	50 gr/lt

- D-1 Agar

Mannitol	15 gr.
NaNO ₃	5 gr.
LiCl	6 gr.
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	0.002 gr.
K ₂ HPO ₄	2 gr.
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	0.2 gr.
Azul de Bromotinol	0.1 gr.
Agar	15 gr.