

## BACTERIOSIS Y NECROSIS APICAL DEL NOGAL: COMPLEJOS MICROBIANOS INVOLUCRADOS EN LA CAÍDA TEMPRANA DE FRUTOS EN EL VALLE MEDIO DEL RÍO NEGRO

WALNUT BLIGHT AND BROWN APICAL NECROSIS: MICROBIAL COMPLEXES INVOLVED IN WALNUT EARLY FRUIT DROP OF VALLE MEDIO DEL RÍO NEGRO

Carolina Virginia Temperini (Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente, de la Universidad Nacional de Río Negro), Alejandro Guillermo Pardo (Universidad Nacional de Quilmes) y Graciela Noemí Pose (Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente de la Universidad Nacional de Río Negro)

### Resumen

La bacteriosis del nogal causada por *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* es una patología responsable de grandes pérdidas económicas en la producción del nogal a nivel mundial.

Desde finales de la década de 1990, se ha observado una nueva enfermedad que afecta a los nogales, causando la caída prematura de los frutos e importantes disminuciones en el rendimiento de los cultivares en Europa. Los frutos presentan una necrosis apical que comienza en los extremos pedunculares y puede extenderse, en diferente grado, por toda la superficie. Estudios realizados revelan que la bacteria *Xanthomonas* junto al género fúngico *Fusarium* y ciertos taxones de *Alternaria* serían los agentes implicados en el desarrollo y evolución de la patología.

Durante la temporada 2013-2014 se registraron severos daños y caída temprana de frutos en la región productora de nueces del Valle Medio del río Negro, con porcentajes que superaban las pérdidas de rendimiento de las temporadas anteriores. Ante esta problemática, la Universidad Nacional de Río Negro realizó un estudio sobre frutos afectados y los resultados preliminares parecen revelar la presencia de casos de necrosis apical en la región, siendo este, a nuestro conocimiento, el primer reporte de la enfermedad en el país.

**Palabras clave:** Necrosis apical, Bacteriosis, *Alternaria*.

### Abstract

Walnut blight caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* is a pathology responsible for great economic losses in the production of walnut worldwide.

Since the late 1990s, it was observed a new disease that affects walnut trees causing premature fruit drop and significant reductions in yield of cultivars in Europe. Fruits show an apical necrosis that begins at the stigmatic ends and may extend, with different degree, through their surface. Studies reveal that the bacterium *Xanthomonas* together with the fungal genus of *Fusarium* and certain *Alternaria* taxa would be the agents involved in the development and evolution of the pathology.

During the 2013-2014 season, it was registered severe damage and early fruit drop in the walnut producing region of the Valle Medio del río Negro, with percentages exceeding yield losses in previous seasons. Faced to this problem, the University of Río Negro conducted a study on affected fruits, preliminary results seem to reveal the occurrence of apical necrosis in the region, and this, to our knowledge, is the first report of the disease in the country.

**Keywords:** Apical Necrosis, Walnut blight, *Alternaria*.

## Introducción

La bacteriosis del nogal (*Juglans regia* L.) causada por la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (sin. *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*) es una importante patología que puede destruir hasta el 50 % del rendimiento de una plantación de nogales, según fue reportado en Francia (Garcin y Duchesne, 2001). A nivel mundial, esta enfermedad se presenta prácticamente en todos los países donde se cultivan nogales. Esta patología, conocida también como “tizón”, “mal seco” o “peste negra” del nogal, fue citada en la Argentina por primera vez por Marchionatto en 1944 (Flores *et al.*, 2003). Cuando los frutos son infectados por este patógeno, durante el período de prefloración o floración, las lesiones se encuentran típicamente en el extremo apical y constan de áreas pequeñas, circulares o irregulares y húmedas que posteriormente se deprimen y se hunden hacia el tejido interno. Cuando la infección se produce luego de la floración, se aprecian pequeñas manchas circulares a los costados de la nuez, con márgenes bien definidos y de apariencia húmeda y deprimida como la primera lesión originada en el extremo de los frutos (Miller y Bollen, 1946).

Durante los últimos años se ha reportado una nueva enfermedad que afecta a los nogales causando caída prematura de los frutos e importantes mermas en el rendimiento de plantaciones en regiones mediterráneas tales como España, Francia, Turquía (Moragrega y Özaktan, 2010) e Italia (Belisario *et al.*, 2002). Los síntomas característicos de la enfermedad consisten en una necrosis apical que se origina en el extremo estigmático de los frutos. Una necrosis apical característica que causa severa caída de frutos fue definida por Belisario como necrosis apical marrón (NAM) y fue recientemente descrita en algunas regiones productoras de nogales de España e Italia. NAM fue reportada por primera vez y observada en Italia en 1998 (Belisario *et al.*, 2002).

Información recolectada luego de varios años de estudios sobre necrosis apical en plantaciones de nogal de España y Turquía llevaron a la descripción de los síntomas internos y externos de frutos afectados que permanecen unidos al árbol y de frutos caídos al suelo. Los síntomas externos comienzan a generarse luego del cuajado del fruto en el extremo apical de este y se vuelven más evidentes a medida que el fruto crece. Las lesiones suelen ser pequeñas y de color marrón oscuro o negras, no húmedas que progresan hasta adquirir un tamaño aproximado entre 2-15 mm con márgenes

relativamente regulares y generalmente circulares, adoptando la forma de un parche. A diferencia de los frutos que permanecen unidos al árbol, la necrosis externa en los frutos caídos puede alcanzar la zona ecuatorial y, a veces, suelen cubrirse de un micelio fúngico blanco superficial en sus extremos. Con respecto a los síntomas internos, la infección avanza a través de los tejidos y puede alcanzar la semilla, provocando una podredumbre marrón o negra (Moragrega y Özaktan, 2010). Esta descripción coincide con los síntomas hallados en frutos con NAM en cultivares de Italia descrita por Belisario. Si bien la necrosis en el extremo apical siempre se halla presente, no se observa una correlación definida entre la extensión de las lesiones externas con las internas (Belisario *et al.*, 2002).

Debido a la semejanza de los síntomas, la necrosis apical externa puede confundirse con la bacteriosis del nogal durante los primeros estadios del desarrollo de la nuez, y la diferenciación entre ambas enfermedades requiere una detallada observación de los síntomas que presenten los tejidos internos y externos de los frutos (Moragrega y Özaktan, 2010).

En relación con la resistencia varietal, y según observaciones realizadas en áreas afectadas, la mayoría de los cultivares de nueces comerciales como Chandler, Hartley, Serr, Lara y Vina son susceptibles a la necrosis apical y sus frutos suelen deteriorarse y caer en etapas tempranas, a diferencia de otras variedades como Franquette, que parecen sufrir un menor daño (Moragrega y Özaktan, 2010).

## Agentes causales de la necrosis apical

Estudios actuales indican que los agentes responsables de esta enfermedad podrían involucrar a una bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* como responsable de la infección inicial y también a un grupo variado de hongos entre los que se destaca *Fusarium* y un complejo de diferentes taxones de *Alternaria* (Moragrega *et al.*, 2011). Estos últimos pueden ser separados en tres grupos morfológicamente diferentes, cada uno tipificado por una especie de *Alternaria* representativa: el grupo A. *alternata*, el grupo A. *tenuissima* y el grupo A. *arborescens* (Hong *et al.*, 2006). La presencia de estos géneros y especie fúngicas estaría asociada a una colonización oportunista de lesiones apicales que fueron originadas por la bacteria.

## Condiciones predisponentes al desarrollo de la enfermedad

Ha sido señalado que problemas nutricionales y características del suelo (acidez, textura liviana, bajo contenido de manganeso y magnesio y deficiencia de fósforo y calcio) en adición a la infección microbiana podrían predisponer a los árboles a ser infectados e incrementar la severidad de la necrosis apical (Garcin y Duchesne, 2001). Esta patología también podría estar relacionada con factores climáticos como las lluvias o la temperatura. Aunque no están completamente definidas las condiciones ambientales que favorecen su desarrollo, se observó que porcentajes de humedad relativa superior al 70 % y temperaturas promedio mayores a 24 °C durante el período de crecimiento inicial de los frutos pueden disparar el desarrollo de la enfermedad (Moragrega y Özaktan, 2010).

## El cultivo del nogal en el Valle Medio y situación actual en la región

En la región del Valle Medio del río Negro, en la Patagonia Norte, comenzó a desarrollarse una nogalicultura de características innovadoras, con variedades de carga lateral, uso de portainjertos, mayor densidad de plantación y sistemas de conducción modernos. Aproximadamente 400 ha son cultivadas por 50 productores en este valle, y la principal variedad es Chandler, le siguen en importancia Franquette, Cisco, Tulare, Ivarto y Mayette. Los portainjertos más utilizados son *J. regia* y *J. hindsii*. Los productores de la región integran una iniciativa organizacional de carácter público-privado, el *Cluster de Frutos Secos de Río Negro*, que reúne a agricultores, empresarios, técnicos y funcionarios tanto del Valle Medio como del Valle Inferior y del Alto Valle del río Negro, vinculados a la producción y comercialización de nueces, avellanas y almendras (Nievas *et al.*, 2014).

Durante la temporada 2013-2014 en varias plantaciones comerciales de nogal (*Juglans regia*) del Valle Medio del río Negro, se verificaron severos daños debido a una enfermedad que presentaban los nogales, que causaba la caída temprana de los frutos y la lesión progresiva de aquellos que quedaban adheridos a los árboles. Los nogalicultores han registrado mermas de hasta un 70 % en la producción local, lo cual significa una pérdida económica muy importante para este sector productivo (*Cluster de Frutos Secos de Río Negro*, comunicación personal). Los porcentajes de pérdidas obtenidos en temporadas previas a causa de la bacteriosis del nogal fueron inferiores a los obtenidos

durante la temporada 2013-2014, lo cual permite sospechar la presencia de una nueva enfermedad en la región.

## Objetivo

Si bien se tiene conocimiento de la existencia de esta misma sintomatología en nogales de otras regiones del país de acuerdo con información suministrada por personal del INTA (comunicación personal), luego de una exhaustiva búsqueda bibliográfica, no hemos encontrado reportes formales de esta en nuestro país. En adición y considerando la situación planteada en el Valle Medio del río Negro respecto de una enfermedad que causa importantes pérdidas al sector productor, como así también que se está extendiendo rápidamente en la región, el objetivo general del trabajo se centra en estudiar los microorganismos involucrados en la patología, identificándolos y determinando su concentración, a fin de establecer posteriormente estrategias de control, como también de detección temprana que permitan evitar las grandes pérdidas económicas al sector productivo y mantener la sanidad de los cultivos. Así, en esta primera etapa, se intenta identificar los diferentes microorganismos involucrados y, específicamente, los taxones de *Alternaria* presentes en frutos visiblemente afectados del Valle Medio del río Negro.

## Materiales y métodos

**Muestreo:** Se realizaron dos muestreos durante el mes de noviembre de 2013 en los que se recolectaron, al azar, frutos visiblemente afectados de árboles provenientes de plantaciones ubicadas en las localidades de Choele Choel y Luis Beltrán en el Valle Medio del río Negro. Las variedades analizadas fueron Chandler y Tulare. Basándose en los síntomas externos, un total de 50 frutos fueron clasificados como afectados por bacteriosis o afectados por necrosis apical. Luego, 30 de estos frutos fueron cortados en mitades para inspeccionar y registrar la presencia y extensión de las lesiones internas y para proceder con el análisis microbiológico.

**Aislamiento e identificación de microorganismos:** Se efectuó una desinfección superficial de los frutos sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % durante 2 minutos. Luego se enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente, se cortaron las nueces en mitades y se tomó el extremo estigmático y porciones de los diferentes tejidos internos

del fruto. Todos los trozos se sembraron en medio agar papa dextrosa suplementado con Cloranfenicol (0,1 g/L). Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días y luego se subcultivaron para obtener cultivos puros de los diferentes géneros fúngicos obtenidos, que se identificaron sobre la base de características morfológicas del cultivo y microscópicas según Pitt y Hocking (2009). En particular, 82 aislamientos fúngicos pertenecientes al género *Alternaria* obtenidos a partir de cultivos monospóricos se identificaron a nivel grupo especie siguiendo los criterios establecidos en estudios previos (Simmons y Roberts, 1993; Simmons, 2007).

En paralelo, con la otra mitad del fruto, se realizó el análisis bacteriológico en los medios Luria Bertani (LB) y levadura dextrosa calcio (YDC).

## Resultados

**Síntomas:** El 53 % de los frutos analizados presentó síntomas de bacteriosis. Nueces de la variedad Chandler exhiben un moteado externo de manchas color marrón oscuro - negro húmedas, que se hunden hacia el tejido y se extienden por la superficie del fruto, en algunos casos hasta su totalidad. Se observa una amplia variedad respecto a la severidad y a la extensión de los síntomas. En ciertas ocasiones se puede visualizar la presencia de filamentos blancos en el extremo estigmático correspondientes a desarrollo fúngico (Figura 1). Con respecto a los síntomas internos, en la mayoría de los frutos, el tejido se encuentra necrosado en los mismos sitios en los que se observó el moteado en el exterior. En algunos casos las lesiones pueden extenderse y afectar a tejidos más internos (Figura 2). En nueces de la variedad Tulare, el moteado externo es mayor casi convirtiéndose en una única mancha que, por lo general, es mucho más oscura y húmeda que en la variedad Chandler (Figura 3). Con respecto a las lesiones internas, estas parecen limitarse solo al tejido subyacente a la cáscara (Figura 4).

El 47 % restante de los frutos presentó síntomas de necrosis apical. Todos corresponden a la variedad Chandler. Externamente, se observa una única mancha amarillada, que puede variar en intensidad de color, que cubre solo el extremo estigmático del fruto. A veces, puede aparecer rodeada de una línea definida en el límite (Figura 5). Internamente, el tejido se encuentra ennegrecido solo en el extremo estigmático y de allí puede, en algunos casos, propagarse hasta llegar a la semilla (Figura 6).

Tanto en frutos con bacteriosis como en frutos con necrosis apical no existe una correlación entre la severidad de los



Figura 1: Síntomas externos de bacteriosis en variedad Chandler, 2013, Carolina Temperini.



Figura 2: Síntomas internos de bacteriosis en variedad Chandler, 2013, Carolina Temperini.



Figura 3: Síntomas externos de bacteriosis en variedad Tulare, 2013, Carolina Temperini.



Figura 4: Síntomas internos de bacteriosis en variedad Tulare, 2013, Carolina Temperini.



Figura 5: Síntomas externos de necrosis apical en variedad Chandler, 2013, Carolina Temperini.



Figura 6: Síntomas internos de necrosis apical en variedad Chandler, 2013, Carolina Temperini.

síntomas externos con los internos de un mismo fruto, tal como fuera reportado por Belisario *et al.* (2002).

**Aislamiento e identificación de microorganismos:** En la totalidad de los frutos analizados que presentaban síntomas de bacteriosis y síntomas de necrosis apical se observó desarrollo fúngico. Las colonias obtenidas corresponden a los géneros *Alternaria* (82,1 %), *Epicoccum* (13,9 %) y *Fusarium* (4 %) (Figura 7).

Respecto a *Alternaria*, particularmente, los aislamientos fueron clasificados en dos grupos especies morfológicamente diferentes: un 96,3 % corresponden al grupo *Alternaria tenuissima* (Figura 8) y un 3,7 % al grupo *Alternaria alternata*.

En el 95,4 % de los frutos analizados, la bacteria aislada resultó Gram negativa y vista al microscopio óptico presentó forma de bastón. Creció de color amarillo en los medios LB e YDC (Figura 9), presuntivamente tratándose de *Xanthomonas*, identidad que se confirmará por técnicas bioquímicas y moleculares.

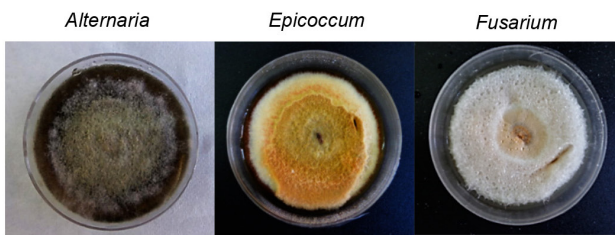


Figura 7: Características morfológicas de las colonias fúngicas halladas, 2013, Carolina Temperini.

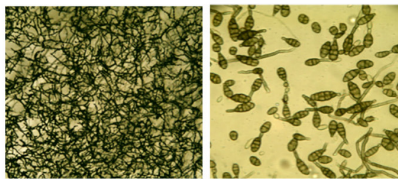


Figura 8: Patrón de esporulación y conidios de *Alternaria tenuissima*, 2013, Carolina Temperini.

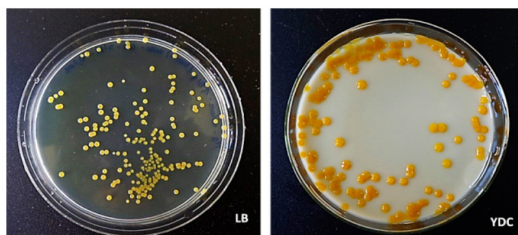


Figura 9: Colonias bacterianas obtenidas en los medios de cultivo LB e YDC, 2013, Carolina Temperini.

## Discusión

Este estudio provee información acerca de los diferentes microorganismos que parecen estar vinculados a enfermedades causantes de caída temprana en frutos de nogal del Valle Medio del río Negro. El hallazgo de diferentes géneros fúngicos en la totalidad de los frutos analizados pero no de bacterias, conduce a presuponer un rol importante de los hongos en estas patologías. Entre ellos, el género *Alternaria* se destaca por su concentración, y, dentro de este, los grupos especies encontrados fueron *A. tenuissima* y *A. alternata*, entre

los cuales el primero predomina. A su vez, los síntomas observados en los frutos analizados coinciden con aquellos descritos en la bibliografía para bacteriosis y necrosis apical. Todos estos datos contribuyen a suponer la existencia de ambas enfermedades en la región productora y a presumir un rol importante de *Alternaria tenuissima* en el desarrollo o intensificación de estas.

## Agradecimientos

A los integrantes y colaboradores del *Cluster de Frutos Secos de Río Negro*, a la becaria alumna Lucía Fabres Manosalva, a la Dra. Mirta Rossini (INTA EEA Alto Valle) y a la Universidad Nacional de Río Negro.

## Bibliografía

- Belisario A.; Maccaroni M.; Corazza L.; Balmas V. y A. Valier (2002), "Occurrence and etiology of brown apical necrosis on Persian (English) walnut fruit", *Plant Disease* Vol. 86, pp. 599-602.
- Flores P.; Seta S.; Gonzalez M.; Coniglio R.; Sferco S. y A. Trevizan (2003), "Manejo químico y varietal de nogales frente a bacteriosis del nogal", *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias* n.º 5, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe [en línea]. Disponible en: <www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev5/2.htm>.
- Garcin A. y D. Duchesne (2001), "Walnut blight and apical necrosis", *Acta Horticulturae* Vol. 544, pp. 379-387.
- Hong S.G.; Maccaroni M.; Figuli P.; Belisario A. y B. Pryor (2006), "Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe", *Mycological Research* Vol. 110, pp. 1290-1300.
- Miller P. W. y W.P. Bollen (1946), "Walnut bacteriosis and its control", *Technical Bulletin of Oregon Agricultural Experiment Station* Vol. 9, pp. 1-107.
- Moragrega C.; Matias J.; Aletà N.; Montesinos E. y M. Rovira (2011), "Apical necrosis and premature drop of Persian (English) walnut fruit caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis*", *Plant Disease* Vol. 95, pp. 1565-1570.

- Moragrega C. y H. Özaktan (2010), “Apical necrosis of Persian (English) walnut (*Juglans regia*): an update”, *Journal of Plant Pathology* Vol. 92, pp. 67-71.
- Nievas, W. E.; Rossini, M. y J. Toranzo (2014), “Bacteriosis del nogal en el Valle Medio del río Negro”, Ediciones INTA [en línea]. Disponible en: <<http://inta.gob.ar/documentos/bacteriosis-del-nogal-en-el-valle-medio-del-rio-negro>>.
- Pitt, J. y A. Hocking (2009), *Fungi and food spoilage*, Nueva York, Springer.
- Simmons, E. (2007), *Alternaria: An Identification Manual*, Holanda, Fungal Biodiversity Centre.
- Simmons, E. G. y R.G. Roberts (1993), “Morphology and toxigenicity of *Alternaria* associated with black spot disease of Japanese pear”, *Alternaria themes and variations* (73), XII, *Mycotaxon* Vol. 48, pp. 109-140.