



Revista

# AGROINNOVACIÓN

en el Trópico Húmedo

ISSN: 2215-5368

<http://revistas.tec.ac.cr/index.php/agroinn/index>

## Identificación del agente asociado a la pudrición bacteriana del corazón en plantas de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) MD2 cultivar

Identification of agent associated of bacterial heart rot of pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) MD2 cultivar

Alonso Jiménez Chinchilla<sup>1</sup>, Pablo Mena Barrantes<sup>2</sup>, Gustavo Jiménez Bogantes<sup>3</sup>,  
Xiomara Mata Granados<sup>✉4</sup>

### Palabras clave

*Erwinia carotovora* var. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Dickeya* sp. *Pectobacterium* sp.

### Key words

*Erwinia carotovora* var. *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Dickeya* sp. *Pectobacterium* sp.

### Resumen

El objetivo de este estudio fue identificar el agente causal asociado a la pudrición bacteriana del corazón en piña. Se colectaron muestras sintomáticas de plantas de piña en la Finca Agroindustrial Tres Amigos, ubicada en Piedra Alegre de Pital, San Carlos, Alajuela, Costa Rica, las mismas se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología y Biocontroladores de la Escuela de Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos, ITCR. Se aplicó el método clásico para la extracción de bacterias, utilizando como medio Agar Nutritivo, para la identificación de la bacteria se realizaron pruebas en medio YDC, producción de indolgina, de tinción diferencial, tinción simple, crecimiento a 37°C, motilidad, anaerobiosis, KOH al 3%, catalasa, oxidasa, hidrólisis de la gelatina, formación de esporas así como actividad pectolítica. Tanto los síntomas observados en el campo así como las características morfológicas y fisiológicas aplicadas concuerdan que el agente causal asociado a esta enfermedad es *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*); a nivel de campo esta enfermedad se encuentra localizada, aunque factores tales como métodos de diseminación, así como condiciones ambientales óptimas pueden promover una distribución mayor.

### Abstract

This study aims was to identify the causal agent associated of bacterial heart rot in pineapple. Symptomatic samples were collected from pineapple plants at Agroindustrial Tres Amigos Farm, located in Piedra Alegre from Pital, San Carlos, Alajuela, Costa Rica, these samples were moved to Phytopathology and Biocontrol Laboratory from Agronomy School, Campus Technological Local San Carlos, ITCR. It was applied the classic method for to bacteria extraction, using nutrient agar as media (AN), for the bacteria identification tests was using YDC media, indolgine production, differential staining, single staining, growth evaluation at 37°C, motility, anaerobiosis, KOH at 3%, catalasa, oxidasa, gelatin hydrolysis, spores production and pectolytic activity. The symptoms seen at the field as the morphological and physiological characteristics agree with that causal agent related to this disease is *Dickeya* sp. (syn *Erwinia chrysanthemi*); on field this disease is found in a located way, but some factors as dissemination methods, optimal environmental conditions can promote a higher distribution.

1 Estudiante Escuela de Agronomía, ITCR. Jimenezalonso95@gmail.com  
2 Estudiante Escuela de Agronomía, ITCR. pablomenab.18@gmail.com  
3 Estudiante Escuela de Agronomía, ITCR. tavojb17@gmail.com  
4 Docente e Investigadora. Escuela de Agronomía ITCR.  
✉xmata@tec.ac.cr

Recibido: 20 de noviembre del 2019  
Aceptado: 10 de marzo del 2020  
Publicado: 15 mayo del 2020  
DOI: 10.18860/rath.v2i2.5192

## Introducción

La piña (*Ananas comosus* var *comosus* L. Merril) ocupa el segundo lugar de importancia económica dentro de las frutas tropicales, el principal productor a nivel mundial es Costa Rica [1], con apenas 40.000 ha dedicadas a su producción, siendo el principal cultivar el Gold “Extra sweet” MD-2 [2], inicialmente conocido como “73114” [3]. Para el año 2019, la Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña (CANAPEP) reportó un valor de \$ 930.49 millones en exportaciones, lo que representó un crecimiento desacelerado con respecto al año anterior [2], factores tales como las condiciones atípicas en el comportamiento del clima durante el año 2016 y 2017, promovieron el retraso en el período de floración, así como diferentes problemas fitosanitarios, lo que impactó de manera directa la producción mundial de esta fruta [1].

Dentro de éstos, la pudrición bacteriana del corazón es uno de los principales problemas fitosanitarios que enfrenta este cultivar en la Zona Huetar Norte de Costa Rica, al respecto Rohrbach y Johnson [4], indican que el cultivo es susceptible durante todo el ciclo de su desarrollo, infectando inclusive a la fruta, no obstante Lim [5] y Johnston [6] mencionan que plantas entre los 4 y 8 meses son más susceptibles a la infección causadas por esta bacteria, aspectos tales como la propagación clonal así como, la duración del ciclo de producción, propician infecciones latentes y contribuyen a un incremento de enfermedades como ésta [7], la cual puede tener un período de desarrollo de 1 a 2 semanas bajo condiciones ambientales óptimas [6].

Esta enfermedad constituye una amenaza latente en las diferentes zonas productoras de piña, la misma se ha reportado en países como Indonesia, donde se informa que afecta la fruta, causando pérdidas de hasta un 50% [8], en Hawaii inicialmente en el año 2003, reapareciendo infestaciones importantes en el año 2006 [9], en Malaysia [10], Brasil y Filipinas [4], entre otros países.

Se informa que su diseminación se asocia a la presencia de hormigas, escarabajos y ácaros, los cuales se convierten en vectores de la misma [5]. Para poder desarrollar estrategias de manejo, es trascendental conocer no solo la etiología, sino también la diversidad del agente, además comprender también la epidemiología, frecuencia,

incidencia y severidad, por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar el agente causal asociado a la pudrición del cogollo en piña.

## Materiales y métodos

### Recolección del material experimental

Las muestras sintomáticas de plantas de piña se colectaron en la Finca Agroindustrial Tres Amigos, ubicada en Piedra Alegre de Pital, San Carlos, Alajuela, Costa Rica (10°55'83,10" N – 84°31'71,80" O; 85 msnm). Se seleccionó de manera aleatoria bloques, en los mismos se tomaron muestras de plantas sintomáticas. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico y se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología y Biocontroladores de la Escuela de Agronomía, Campus Tecnológico Local San Carlos.

### Extracción e identificación de agentes causales:

De las plantas muestreadas, se obtuvo tejido sintomático de la base de las hojas así como del área del tallo donde se adhieren las mismas, los trozos de tejido se desinfectaron durante un minuto con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%, agua destilada y estéril, luego se colocaron en una cápsula de porcelana, se añadió agua estéril y se maceraron con un pistilo, con una pipeta estéril se obtuvo 1 ml de mezcla y se transfirió a un vial que contenía 9 ml de agua estéril, a partir de ésta se obtuvo una dilución hasta  $10^{-3}$ , esta última dilución se colocó en un agitador orbital (SI 600R Lab Companion) durante 30 minutos a 120 rpm, transcurrido ese período, se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l y se colocaron en placas de petri que contenían medio de Agar Nutritivo (AN, Oxoid), se establecieron ocho repeticiones e incubaron por un periodo de 72 horas, a  $28 \pm 2$  °C y oscuridad continua.

A partir de los aislamientos, se seleccionaron colonias y realizaron cultivos axénicos de medio AN, de igual forma se realizaron siembras estriadas en placas de petri que contenían medio Extracto de levadura- dextrosa- carbonato de calcio (YDC), éstas últimas se colocaron en una cámara de anaerobiosis y todas se incubaron bajo las condiciones descritas anteriormente. La caracterización morfológica y fisiológica se realizó aplicando los procedimientos descritos por De Boer y Kelman [11], por lo que se evaluó producción

de indolgina, de tinción diferencial y simple, crecimiento a 37°C, motilidad, anaerobiosis, KOH al 3%, catalasa, oxidasa, hidrólisis de la gelatina, formación de esporas.

Para realizar la prueba de actividad pectolítica, se utilizaron rodajas de papa desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante cinco minutos, luego se lavaron con suficiente agua destilada estéril y se colocaron en cámaras húmedas esterilizadas. El inóculo, se obtuvo a partir de las colonias desarrolladas en el medio AN, para esto se realizó una suspensión madre y a partir de ésta se obtuvo una dilución de  $10^{-3}$ , se colocó en un agitador orbital durante 30 minutos a 120 rpm, luego se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l y se procedió a inocular las rodajas de papa, se establecieron cuatro repeticiones y los respectivos testigos se inocularon con agua destilada estéril, la incubación se realizó por un periodo de 72 horas, a  $28 \pm 2$  °C y oscuridad continua, transcurrido este periodo se evaluó la maceración de tejidos, así como la presencia de olor.

## Resultados y Discusión

### Descripción de los síntomas observados

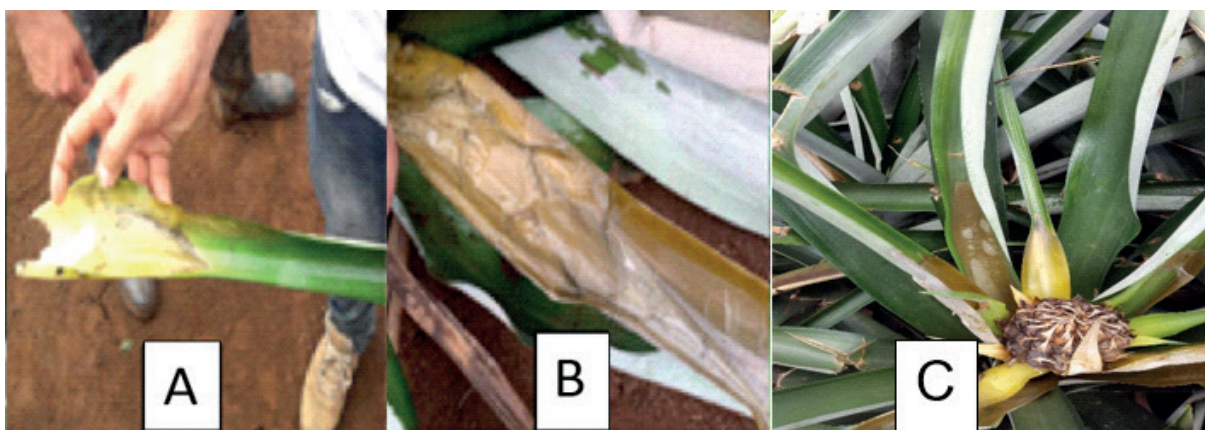
En el área muestreada se observó plantas con una pudrición en el cogollo, los síntomas iniciales se manifiestan en la base de las hojas nuevas (centrales), observando en esta área, lesiones de

un color café claro, tornándose cloróticas y que conforme las condiciones húmedas persisten el tejido foliar infectado se vuelve acuoso hasta darse la formación de una ampolla o bolsa de agua (Figura 1).

El tallo presenta una textura blanda, estos síntomas avanzan de manera descendente colonizando prácticamente todo el tejido del tallo, generando a la vez una putrefacción y por ende un mal olor. Bajo condiciones cálidas, las hojas infectadas se deshidratan, tornándose de un color café-rojizo, provocando la muerte abrupta de la planta.

En los aislamientos en medio AN, se obtuvo el desarrollo de colonias bacterianas de color blancuzco, opacas, de forma redonda, contorno de borde liso y elevación cóncava, éstas mismas características las presentaron las colonias axénicas, exhibiendo las características morfológicas y fisiológicas descritas en el Cuadro 1.

Los síntomas observados en campo son concordantes con los descritos por Rohrbach y Johnson [5], Marrero *et al.* [10], Muhamad *et al.* [12], Vine *et al.* [13], Kaneshiro *et al.* [14], quienes atribuyen esta patología a *Erwinia chrysanthemi*, de igual forma las características morfológicas y fisiológicas obtenidas en este estudio son consistentes con las descripciones de *Erwinia* spp. [11]. Éste género ha sido objeto de diferentes estudios a nivel molecular en los últimos años, por lo que su taxonomía ha sido cambiante, en éste se



**Figura 1.** Síntomas de la pudrición bacteriana del corazón en plantas de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill MD-2 cultivar. a) área basal de la hoja con estados iniciales de la infección. b) y c) lesiones acuosas (citolisis) en estado avanzado.

**Figure 1.** Symptoms of bacterial heart rot of pineapple plants (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill MD-2 cultivar a) Initial infection stages on leaf's basal area. b) and c) watery lesions(citholysis) on advanced stage.

**Cuadro 1.** Pruebas fisiológicas aplicadas a las colonias de bacterias aisladas de tejidos sintomáticos de piña *Ananas comosus* vr. *comosus* L. Merrill MD-2 cultivar.

**Table 1.** Physiological tests applied on bacteria colonies isolated from symptomatic tissues on pineapple plants *Ananas comosus* vr. *comosus* L. Merrill MD-2 cultivar.

Prueba	Resultado
Color de la colonia en medio YDC	Blanco a beige
Producción de indolgina	Negativa
Tinción simple	Forma bacilar
Tinción gram	Negativa
Crecimiento a 37 C	Positiva
Motilidad	Positiva
Anaerobiosis	Positiva
KOH al 3%	Positiva
Catalasa	Positiva
Oxidasa	Negativa
Hidrólisis de la gelatina	Positiva
Formación de esporas	Negativa
Actividad pectolítica	Positiva

agrupan bacterias gramnegativo, con flagelación peritrica, no esporulentas y fermentadoras [15], inicialmente se subdividió en cuatro grupos; *amylovora* [16], *herbicola* [17], *Erwinias* atípicas [18] y *carotovora* [19], este último grupo fue subdividido en cinco especies y subespecies, dentro de estas *E. carotovora* var *carotovora* y *E. chrysanthemi* [20], mientras que Hauben *et al.* [21] propusieron que *E. chrysanthemi* se reagruparan en el género *Pectobacterium*; no obstante Samson *et al.* [22] demostraron que *E. chrysanthemi* está filogenéticamente alejada de dicho género y por ello lo reclasificó en un nuevo género *Dickeya*.

Al respecto Kaneshiro *et al.* [14] mencionan que características fenotípicas tales como la morfología de la colonia en medio YDC, la respuesta a pruebas como KOH, reacción positiva de la actividad pectolítica en medio CVP a las 48 h, fermentación de la glucosa, así como producción de indol e indigoidina, les permitieron en su estudio diferenciar *E. chrysanthemi* reclasificada como en actualidad como *Dickeya* de otros aislados obtenidos en muestras de piña, siendo algunos de estos resultados consistentes con los obtenidos en este estudio. No obstante, en las colonias

desarrolladas en medio YDC no se dio la secreción de pigmentos azulados (Cuadro 1), lo que podría sugerir que esta sea *E. carotovora* subsp. *Carotovora*. Estos mismos autores [14] informan que la producción de la indigoidina (pigmento azul), es útil para diferenciar *E. chrysanthemi* de *E. carotovora* subsp. *carotovora*, sin embargo, Dickey [23] y Starr *et al.* [24] indican que la producción de este compuesto puede ser variable, dependiendo de varios factores, por lo que no se puede usar como una característica confiable para distinguir las especies.

Kaneshiro *et al.* [14] informan que, aislados obtenidos de muestras de tejidos de piña provenientes de Costa Rica e identificados como *E. chrysanthemi*, en las pruebas de patogenicidad, mostraron síntomas similares a los descritos en este estudio, mientras que en plantas inoculadas con aislados identificados como *E. carotovora* subsp. *carotovora* los síntomas observados fueron lesiones necróticas, secas, así como muy poca invasión en los tejidos, estos mismos autores indican que *E. carotovora* subsp. *carotovora* solo causa pudrición localizada cuando las plantas presentan heridas inducidas o crecen bajo una



condición de estrés, mientras que *E. chrysanthemi* puede causar pudrición sistémica a partir del punto de infección, es decir que puede avanzar de las hojas hacia el corazón y de la base de las hojas hacia el ápice de las mismas, aunado a esto, en el material de siembra puede haber infecciones latentes que sólo se manifiestan al llegar al campo, lo que puede conducir a pérdidas importantes.

Por su parte Muhamad *et al.* [12], en estudios realizados en campo encontraron que de las variedades evaluadas la MD2 era susceptible a *Dickeya* (syn. *E. chrysanthemi*), resultados similares fueron reportados por Ramachandran *et al.* [25]. *Dickeya* (syn. *E. chrysanthemi*) tiene la capacidad de producir enzimas pectolíticas las cuales degradan la pared de las células vegetales induciendo a síntomas tales como, marchitamientos vasculares, necrosis o podredumbres blandas [26], [22] y [27], siendo éstos últimos característicos en la pudrición del cogollo en plantas de piña.

## Conclusión

Los síntomas de la pudrición bacteriana del corazón en las plantas de piña muestreadas se asocian a *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*), la cual se presenta de manera localizada en la plantación.

## Agradecimientos

Agradecemos a los señores Álvaro Figueroa y Keylor Vargas, así como al personal de la Finca Agroindustrial Tres Amigos, por facilitarnos la finca para desarrollar este trabajo. A Ángel Corea Sánchez, asistente del Laboratorio de Fitopatología y Biocontroladores, por sus aportes y colaboración en la ejecución de este trabajo.

## Bibliografía

- [1] Altendorf, S. "Perspectivas mundiales de las principales frutas tropicales", 2015. [On line]. Disponible en: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Tropical\\_Fruits/Documents/Tropical\\_Fruits\\_Spanish2017.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Tropical_Fruits/Documents/Tropical_Fruits_Spanish2017.pdf) [Accesado: 26 Abr., 2020].
- [2] CANAPEP (Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña). "Exportaciones de Piña Fresca – Cifras en Millones de Dólares", 2019. [On line]. Disponible en: <https://canapep.com/estadisticas/> [Accesado: 26 Abr., 2020].
- [3] A. A. Thalip, P. S. Tong, N. G. Casey, "The MD2 Super sweer pineapple (*Ananas comosus*)". *Journal Agriculture Science*, vol. 1, num. 4, pp. 14-17, 2015.
- [4] G. K. Rohrbach, M.W. Johnson. "Pests, Diseases and Weeds", en *Pineapple: Botany, Production and Uses*, D.P. Bartholomew, R.E. Paull, K.G. Rohrbach. Honolulu: CAB International, pp. 203-251, 2003.
- [5] W. H. Lim. "Diseases and Disorders of Pineapples in Peninsular Malaysia", Malaysia Agricultural Research and Development Institute, 1985.
- [6] A. Johnston. "Bacterial heart rot of the pineapple". *Malayan Agricultural Journal*, vol. 40, pp. 2-8, 1957.
- [7] K.G. Rohrbach, D. Schmitt. "Diseases of Pineapple". En *Diseases of Tropical Fruit Crops*, R.C. Ploetz. Wallingford: CABI Publishing, 2003, pp. 443-464.
- [8] J. Prasetyo, T.N. Aeny. "Pineapple fruit collapse: Newly emerging disease of pineapple fruit in Lampung, Indonesia". *Journal HPT Tropika*, vol. 14, no. 1, pp. 96-99, 2014.
- [9] W.S. Kaneshiro, M. Burger, B.G. Vine, A.S. de Silva, A.M. Alvarez. "Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a Bacterial Heart Rot of Pineapple Outbreak in Hawaii. *Plant Disease*, vol. 92, no. 10, pp. 1444-1450, 2008.
- [10] G. Marrero, K.L. Schneider, D.M. Jenkins, A.M. Alvarez. "Phylogeny and classification of *Dickeya* based on multilocus sequence analysis". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 63, pp. 3524-3539, 2013.
- [11] S.H. De Boer, A. Kelman. "*Erwinia* soft rot group", en *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, N.W. Schaad, J. B. Jones, W. Chun. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2001, pp. 56-72.
- [12] A.A. Muhamad, R. Zainol, R. Abdullah, N.S. Jaffar, M.Z. Abdul, R. Laboh, N.A. Shafawi, N.B. Abdul. "Dissemination pattern of bacterial heart rot (BHR) disease and screening of the disease resistance among commercial pineapple varieties in Malaysia". *Malaysian Journal of Microbiology*, vol. 15, no. 4, pp. 246-250, 2019.
- [13] B. Vine, M. Burger, W. Kaneshiro, A. de Silva, A., A. Alvarez. "Molecular characterization of bacterial strains to investigate the origin of pineapple heart rot disease in Hawaii". *Phytopathology*, vol. 95, pp. S107, 2005.
- [14] W.S. Kaneshiro, M. Burger, B.G. Vine, A.S. de Silva, A.M. Alvarez. "Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a Bacterial Heart Rot of Pineapple Outbreak in Hawaii. *Plant Disease*, vol. 92, no. 10, pp. 1444-1450, 2008.
- [15] A. Winslow, J. Broadhurst, R.E. Buchanan, C. Krumwiede, L.A. Rogers, G.H. Smith. "The families and genera of the bacteria". *Journal of Bacteriology*, vol. 2, no. 5, pp. 505-566, 1917.

- [16] D.W. Dye. "A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The, "amylovora" group". *New Zealand Journal of Science*, vol. 11, pp. 590-607, 1968.
- [17] D.W. Dye. "A taxonomic study of the genus *Erwinia*. III. The, "herbicola" group". *New Zealand Journal of Science*, vol. 12, pp. 223-236, 1969.
- [18] D.W. Dye. "A taxonomic study of the genus *Erwinia*. IV. The, "Atypical" erwinias". *New Zealand Journal of Science*, vol. 12, pp. 833-839, 1969.
- [19] D.W. Dye. "A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The, "carotovora" group". *New Zealand Journal of Science*, vol. 12, pp. 81-97, 1969.
- [20] R.A. Lelliot. "Genus XII *Erwinia*", en *Bergey's manual of determinative bacteriology*, R.E. Buchanan, N.E. Gibbons. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1974, pp. 332-339.
- [21] L. Hauben, E.R. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck, J. Swings. "Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae". *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 21, pp. 384-397, 1998.
- [22] R. Samson, J.B. Legendre, R. Christen, M. Fischer-Le Saux, W. Achouak, L. Gardan. "Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 55, pp. 1415-1427, 2005.
- [23] R.S. Dickey. "Erwinia chrysanthemi: A comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species". *Phytopathology*, vol. 69, no. 4, pp. 324-329, 1979.
- [24] M.P. Starr, G. Cosens, H. Knackmuss. "Formation of the Blue Pigment Indigoidine by Phytopathogenic *Erwinia*". *Applied Microbiology*, vol. 14, no. 6, pp. 870-872, 1966.
- [25] K. Ramachandran, U.A. Manaf, L. Zakaria. "Molecular characterization and pathogenicity of *Erwinia* spp. associated with pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] and papaya (*Carica papaya* L.)". *Journal of Plant Protection Research*, vol. 55, no. 4, pp. 396-404, 2015.
- [26] A. Palacio, P. Rodríguez, J.L. Palomo, M.A. Cambra. "Géneros *Dickeya* y *Pectobacterium*", en *Enfermedades de plantas causadas por bacterias*, M.M. López, J. Murillo, E. Montesinos, A. Palacio-Bielsa, A. España: Bubok Publishing, 2018, pp. 259-265.
- [27] V. Hélias, P. Hamon, E. Huchet, J.V. Wolf, D. Andrivon. "Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*". *Plant Pathology*, vol. 61, pp. 339-345, 2012.

De acuerdo con la norma IEEE, este documento debe citarse:

A. Jiménez Chinchilla, P. Mena Barrantes, G. Jiménez Bogantes, X. Mata Granados, "Identificación del agente asociado a la pudrición bacteriana del corazón en plantas de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* L. Merrill) MD2 cultivar)", *Revista AgroInnovación en el Trópico Húmedo*, vol. 2, no. 2, pp. 2-7, 2019. DOI: 10.18860/rath.v2i2.5192