

Rol epidemiológico de restos culturales y semillas en el desarrollo del cancro bacteriano del tomate en invernaderos del cinturón verde Buenos Aires – La Plata

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal*

Damián Vega

Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires - 2006

Cátedra de Fitopatología - Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Directora de tesis

Ana María Romero

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctor of Philosophy (North Carolina State University, Estados Unidos)

Consejera de estudios

Olga Susana Correa

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Magister Scientiae (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Ana María Romero

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctor of Philosophy (North Carolina State University, Estados Unidos)

JURADO

Pedro Alberto Balatti

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de La Plata)

Doctor of Philosophy (University of Missouri, Estados Unidos)

JURADO

José Luis Henríquez Saez

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Chile)

Doctor of Philosophy (Oregon State University, Estados Unidos)

Fecha de defensa de la tesis: 16 de marzo de 2015

*Dedico este trabajo a mis padres,
quienes siempre me han apoyado en mis estudios*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi directora, Ana María Romero, por su dedicación en mi proceso de aprendizaje, el compromiso con las discusiones y la tarea de investigación, así como la siempre buena predisposición para promover el trabajo y la reflexión en conjunto.

A mi consejera de estudios, Olga Correa, por sus sugerencias y las oportunas correcciones al trabajo.

Agradezco también especialmente a Eliana Wassermann, quien me ha brindado una colaboración imprescindible en ensayos que involucraron técnicas moleculares, y por su paciencia, comprensión y acompañamiento en el proceso de culminación de esta tesis.

También agradezco a Libio Simonetti, productor hortícola de Florencio Varela, por permitirme tomar las muestras de plantas de tomate para utilizar en nuestros ensayos.

A Patricia del Fueyo por su colaboración en la evaluación de la calidad fisiológica de las semillas.

Agradezco a la Universidad de Buenos Aires, institución que me ha brindado la posibilidad de acceder a una beca de investigación, sin la cual no hubiera sido posible este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a los docentes de la Escuela para Graduados “Alberto Soriano” con quienes he tomado cursos, porque sus clases han sido un complemento fundamental en mi formación.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Damián Vega

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Declaración	v
Índice general	vi
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
INTRODUCCIÓN	1
1. Importancia del cancro bacteriano del tomate	2
2. Sintomatología	4
3. Características de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .	5
4. Ciclo de vida del patógeno	8
5. Manejo de la enfermedad	13
6. Planteo del problema	15
7. Objetivo general y específicos	16
8. Hipótesis	17
CAPÍTULO I : SUPERVIVENCIA EN RESTOS CULTURALES	18
I.1 Introducción	19
I.2 Materiales y métodos	23
I.2.1 Determinación del tiempo de supervivencia	23
I.2.2 Efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia	26

I.2.3 Relación entre supervivencia y descomposición de los restos culturales	27
I.2.4 Corroboración de resultados del tiempo de supervivencia	28
I.3 Resultados	31
I.3.1 Supervivencia en invierno.....	31
I.3.2 Supervivencia en verano	31
I.3.3 Efecto de la estación del año y la ubicación del rastrojo en el suelo sobre el tiempo de supervivencia	33
I.3.4 Relación entre supervivencia del patógeno y la descomposición del rastrojo	35
I.3.5 Corroboración de los resultados del tiempo de supervivencia	38
I.4 Discusión	39
I.5 Conclusiones	50
CAPÍTULO II: LAS SEMILLAS COMO FUENTE DE INÓCULO PRIMARIO	51
II.1 Introducción	52
II.1.1 Detección en semillas	53
II.1.2 Tratamiento de semillas	58
II.1.3 Objetivos	60
II.2 Materiales y métodos	61
II.2.1 Comparación de métodos de análisis de semillas	61
II.2.2 Análisis de lotes de semillas comerciales	63
II.2.3 Tratamiento térmico	64
II.3 Resultados	65
II.3.1 Comparación de métodos de análisis de semillas	65
II.3.2 Análisis de lotes de semillas comerciales	67
II.3.3 Tratamiento térmico	68
II.4 Discusión	69
II.5 Conclusiones	73

CONSIDERACIONES FINALES	74
1. Validación de hipótesis	74
2. Aportes originales al conocimiento científico	75
3. Implicancias para futuras investigaciones	75
4. Aplicaciones prácticas de los resultados	78
BIBLIOGRAFÍA	80

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro I.1:** Supervivencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en invierno en diferentes tejidos (tallos, pecíolos, raíces) y condiciones (enterrado y sobre la superficie del suelo) en invernadero. Se indica la proporción de muestras positivas (Prop.) y la concentración bacteriana promedio de las muestras positivas (Conc.) expresado como Log_{10} UFC g^{-1} de peso seco, para cada rango de tiempo en el que se realizaron determinaciones. Para los datos de concentración se indica el error estándar en cursiva a la derecha..... 32
- Cuadro I.2:** Supervivencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en verano en tallos y pecíolos dejados sobre la superficie del suelo en invernadero. Se indica la proporción de muestras positivas (Prop.) y la concentración bacteriana promedio de las muestras positivas (Conc.) expresado como Log_{10} UFC g^{-1} , para cada rango de tiempo en el que se realizaron determinaciones. Para los datos de concentración se indica el error estándar en cursiva a la derecha..... 33
- Cuadro I.3:** Comparación entre los métodos *in vitro* e *in vivo* para diferentes tejidos. Se indica tiempo de descomposición del rastrojo utilizado (días), proporción de muestras positivas (Prop.), concentración bacteriana promedio (log_{10} UFC g^{-1}) de las muestras positivas (Conc.).. 38
- Cuadro I.4:** Comparación de la cantidad de saprófitos (UFC placa⁻¹) en placas con resultado positivo y negativo para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* del ensayo de invierno de 2011. Se indica promedio, mediana y número de placas analizadas (N)..... 39
- Cuadro I.5:** Condiciones ambientales y tiempos de supervivencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en diferentes localidades. Se indica para cada caso si se utilizaron cepas naturales o cepas resistentes a rifampicina (rif^R) o a sulfato de estreptomycin (estrep^R). Entre paréntesis: determinaciones que no se continuaron luego de la última determinación positiva. Los datos de temperatura son medias anuales, excepto los de verano de Argentina. Las precipitaciones son medias del total anual. 42
- Cuadro II.1:** Proporción de repeticiones positivas y concentración bacteriana promedio de las repeticiones positivas, expresada en UFC semilla⁻¹. En la columna de concentración se indica en cursiva a la derecha el error estándar, que fue siempre un orden de magnitud menor al promedio. s/d: sin dato..... 66

- Cuadro II.2:** Proporción de submuestras positivas (P) y concentración bacteriana promedio de las muestras positivas (C) expresada en UFC semilla⁻¹ de lotes de 10.000 semillas comerciales. Se indica la proporción de resultados positivos..... 67
- Cuadro II.3:** Efecto del tratamiento de calor sobre la proporción de muestras positivas y su concentración bacteriana promedio (UFC g⁻¹). Se indica la proporción de pseudo-réplicas y entre paréntesis las repeticiones verdaderas. En la columna de concentración se indica en cursiva a la derecha el error estándar, que tuvo el mismo orden de magnitud que la media..... 68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: A la izquierda: planta de tomate con síntomas de marchitamiento y cancro en el tallo principal. A la derecha: ampliación de la vista del cancro.....	3
Figura 2: Ampliación de tallo de tomate y pecíolo de una hoja. En la axila se observa una zooglea, exudado mucilaginoso signo de la enfermedad....	6
Figura 3: Esquema conceptual del ciclo de patogénesis de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en el sistema de producción de tomate. Se identifican con diferentes colores los subsistemas de producción de: semillas, plantines, tomates para consumo, y auto-producción de semillas. El grosor de las flechas indica una hipotética importancia relativa asignada. Con una estrella se indican los aspectos del agroecosistema en los que se trabajó en esta tesis. (1) Aplicación de fungicidas, insecticidas, reguladores del crecimiento, cobre. (2) Factores como temperatura, humedad, nutrición de las plantas, interacción con otros microorganismos pueden alterar el nivel de daño..	12
Figura I.1: Esquema representando dos ciclos de producción anuales de tomate bajo invernáculo y el tiempo de supervivencia del patógeno en tejidos dejados en invierno sobre la superficie del suelo o enterrados y para aquellos dejados en superficie en verano. Gráfico elaborado con los datos de los cuadros I.1 y I.2; se redondearon a meses los resultados del tiempo de supervivencia.	34
Figura I.2: Comparación de la supervivencia del patógeno y descomposición de tallos enterrados y en superficie (ambos en invierno). Las columnas indican el área bajo la curva de la población bacteriana (ABCPB). Los rombos negros indican el área bajo la curva de descomposición del rastrojo (ABCDR), las barras representan el error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para ambas variables.	34
Figura I.3: Comparación de la supervivencia del patógeno y descomposición de tallos y pecíolos dejados en superficie en verano (amarillo) y en invierno (verde). Las columnas indican el área bajo la curva de la población bacteriana (ABCPB). Los rombos negros indican el área bajo la curva de descomposición del rastrojo (ABCDR), las barras representan el error estándar. Letras diferentes minúsculas y mayúsculas representan diferencias significativas para ABCPB y ABCDR, respectivamente... ..	35

- Figura I.4:** Evolución de la materia seca relativa (g) de los tejidos de tomate en función del tiempo de descomposición para tejidos enterrados en invierno (verde) y dejados en superficie en invierno (azul) y en verano (naranja). Se indican los promedios de las repeticiones de cada fecha de determinación (rombos) y líneas suavizadas de promedios de cada tratamiento. 36
- Figura I.5:** Relación entre el área bajo la curva (ABC) de la población bacteriana y la de descomposición del rastrojo. A ambas variables se les aplicó una transformación logarítmica (Log_{10}). En verde datos de tallos enterrados, en azul tallos y pecíolos en superficie y en naranja datos de verano..... 37
- Figura I.6:** Tasa relativa de mortalidad bacteriana ($\% \text{ UFC g}^{-1} \text{ día}^{-1}$) en función de la tasa relativa de descomposición del rastrojo (g día^{-1}). En verde datos de tallos enterrados, en azul tallos y pecíolos en superficie y en naranja datos de verano. Se presentan la línea de tendencia, ecuación y coeficiente de regresión de todos los datos (línea llena y ecuación 1) y solo de los datos de tejidos enterrados (línea punteada y ecuación 2). 37
- Figura I.7:** Supervivencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tejidos dejados sobre la superficie del suelo (rombos) o enterrados (triángulos) en función de la temperatura media para diferentes sitios geográficos. Elaboración en base al Cuadro I.5. Rombo azul y naranja: datos propios de ensayos iniciados en invierno y verano, respectivamente. Triángulo verde: dato propio de tejidos enterrados en invierno. Se presentan las líneas de tendencia, ecuación y coeficiente de regresión para tejidos en superficie (línea llena) y enterrados (línea punteada). 44
- Figura II.1:** Análisis con PCR de la dilución más concentrada: 6 semillas inoculadas en 3.000. De izquierda a derecha: ADN-G (control positivo con ADN genómico de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*), PM: marcador de peso molecular 1 Kb plus; R1, R2 y R3: repeticiones 1, 2 y 3 de la dilución 6 en 3.000, control +: control positivo (semillas inoculadas). 66
- Figura II.2:** Evolución de la germinación de las semillas tratadas con: calor seco (rombos violetas), agua caliente a 52 °C y 20 minutos (cuadrados azules), agua caliente a 56 °C y 30 minutos (cuadrados verdes), control sin tratar (triángulos naranjas). Las barras representan el error estándar.. 69

ABREVIATURAS

ABCDR: Área bajo la curva de descomposición del rastrojo

ABCPB: Área bajo la curva de la población bacteriana

ANOVA: Análisis de varianza

BCT: Medio de cultivo semiselectivo desarrollado por Ftayeh *et al.* (2011).

EPPO: *European and Mediterranean Plant Protection Organization*

EPS: Exopolisacáridos

ISF: *International Seed Federation*

ISHI: *International Seed Health Initiative for Vegetables*

ISTA: *International Seed Testing Association*

MBCT: Medio de cultivo semiselectivo modificado en este trabajo, basado en el desarrollado por Ftayeh *et al.* (2011): BCT.

MCBA: Mercado Central de Buenos Aires

mSCM: Medio de cultivo semiselectivo desarrollado por Waters y Bolkan (1992)

MSCM: Medio de cultivo semiselectivo modificado en este trabajo, basado en el desarrollado por Waters y Bolkan (1992): mSCM.

NSHS: *National Seed Health System*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*)

PG: Poder germinativo

UFC: Unidades formadoras de colonias

YDC: *Yeast Dextrose Carbonate*. Medio de cultivo no selectivo.

RESUMEN

Título: Rol epidemiológico de restos culturales y semillas en el desarrollo del cancro bacteriano del tomate en invernáculos del cinturón verde Buenos Aires – La Plata

El cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) es la enfermedad bacteriana más importante de tomate en el mundo y en Argentina. El patógeno sobrevive durante períodos largos en restos de cultivo a campo, mientras que bajas proporciones de semillas infectadas/infestadas pueden ocasionar una epidemia. Se desconoce el tiempo de supervivencia de la bacteria en rastrojos en invernaderos, y si está o no presente en semillas comercializadas en el país. El objetivo de este trabajo fue determinar aspectos epidemiológicos clave de estas dos fuentes de inóculo primario en sistemas de producción de tomate bajo cubierta del cinturón verde Buenos Aires-La Plata. Restos vegetales infestados se enterraron o dejaron en superficie en un invernadero en verano o invierno de 2009, 2010 y 2011. Periódicamente se determinó el peso seco remanente y la concentración del patógeno en los restos. También se analizaron lotes de semillas comerciales utilizando un método de detección tradicional (siembra en medio de cultivo semi-selectivo) y otro molecular (amplificación de ADN por PCR), y se compararon tratamientos térmicos de desinfección de semillas. La supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* se correlacionó negativamente con la descomposición del rastrojo; fue menor en verano que en invierno y en tejidos enterrados (hasta 75 días) que en los dejados en superficie (hasta 260 días). La siembra en medio semi-selectivo permitió detectar un lote de semillas comerciales contaminado, mientras que la técnica molecular no resultó exitosa. Con la desinfección húmeda a 52-56 °C por 20-30 min no se detectó el patógeno ni se afectó la calidad fisiológica de las semillas. Se concluye que rastrojos y semillas constituyen potenciales fuentes de inóculo primario de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en nuestras condiciones. Como medidas de manejo de la enfermedad se recomiendan rotaciones estivales de al menos tres meses, enterrar los rastrojos y desinfectar las semillas preventivamente.

Palabras clave: *Clavibacter*, rastrojos, supervivencia, detección, desinfección de semillas, fuentes de inóculo primario

ABSTRACT

Title: Epidemiological role of host debris and seeds on the development of Bacterial Canker of tomato in greenhouses of the Buenos Aires – La Plata horticultural belt

Bacterial Canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) is the most important bacterial disease of tomato worldwide and in Argentina. The pathogen is able to survive long periods in host residues in field conditions, and small proportions of infected/infested seeds can cause an outbreak. It is unknown for how long bacteria survive in host debris in greenhouses, and whether it is present or not in commercial seeds in our country. The aim of this study was to determine key epidemiological aspects of these primary inoculum sources for the conditions of the Buenos Aires – La Plata horticultural belt, where greenhouse production systems prevail. Infested plant tissues were buried or left on the soil surface in a greenhouse, during the summer or winter of 2009, 2010 and 2011. Remnant dry weight and pathogen concentration were periodically determined on those tissues. Commercial seed lots were analyzed using a traditional (semiselective culture media) and a molecular detection method (DNA amplification by PCR), and heat disinfection treatments of the seeds were evaluated. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* survival was negatively correlated with plant debris decomposition, and it was shorter in summer than in winter, and in buried debris (up to 75 days) than in those left on the soil surface (up to 260 days). The traditional seed detection method allowed us to detect one contaminated commercial seed lot, whereas the molecular technique was not successful. After the hot water disinfection treatment (52-56 °C - 20-30 min) the pathogen was not detected, while the physiological quality of the seed remained unaltered. We conclude that seeds and host debris are potential primary inoculum sources in our conditions. Summer rotations of at least three months, burying plant debris and a preventive seed disinfection are recommended.

Key words: *Clavibacter*, residue, survival, detection, seed disinfection, primary inoculum sources

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* Linnaeus) pertenece a la vasta familia de las solanáceas, en la cual se encuentran otros importantes cultivos como la papa, el ají y la berenjena. A esta especie solo se la conoce cultivada, y si bien se desconoce su origen exacto, se postuló que es originaria de Sudamérica, donde se han encontrado especies de tomates silvestres (Spooner *et al.*, 2005). Por otro lado, datos arqueológicos sugieren que la domesticación ocurrió en el actual México y no en Sudamérica. Los mayas lo llamaron *xtomatl* o *tomatl*, dando origen a su nombre en castellano (Simpson y Conner-Ogorzaly, 2001).

Es la principal hortaliza de consumo fresco del mundo y de la Argentina. En 2011 la producción mundial excedió los 159 millones de toneladas y en la Argentina alcanzó las 698.700 t (<http://faostat.fao.org>). La provincia de Buenos Aires produce alrededor del 28 % de la producción nacional (INTA, 2008). En el Mercado Central de Buenos Aires (MCBA) se comercializan anualmente alrededor de 125.000 t de tomate (INTA y CMCBA, 2009). En 2008 la entrada principal de este cultivo en el MCBA fue de la provincia de Buenos Aires (36 %), seguida por Corrientes (22 %), Salta (19 %) y Jujuy (13 %) (INTA y CMCBA, 2009).

El tomate es el cultivo hortícola que ocupa la mayor superficie bajo invernadero en nuestro país (Fernández Lozano, 2012). Según el Censo Nacional de 2002, de las 2.961 ha bajo cubierta existentes, el 40 % correspondieron a tomate, las cuales se encuentran concentradas en las provincias de Corrientes (53,3 %) y Buenos Aires (34,4 %) (Corvo Dolcet, 2005). En el cinturón hortícola Buenos Aires-La Plata existen unas 1.000 ha de invernaderos y el tomate es el principal cultivo producido bajo cubierta (Fernández

Lozano, 2012). En esta zona, las explotaciones tienen típicamente entre 10 y 40 ha, y el 60 % de las mismas tienen alguna parte de la superficie cubierta, abarcando en promedio el 10 % de la superficie total (Fernández Lozano, 2012). En este sistema productivo, los agricultores no suelen hacer rotaciones y algunos realizan dos ciclos de tomate por año, el primero entre julio/agosto y diciembre y el segundo entre enero y junio. Unos pocos productores hacen un solo ciclo largo de tomate, entre septiembre y mayo. La mayoría compra los plantines listos para ser transplantados en bandejas producidas en viveros, generalmente bajo riego por aspersión.

1. Importancia del cancro bacteriano del tomate

El cancro bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*, es una grave enfermedad en todos los lugares del mundo donde se cultiva tomate, y recientemente se reportaron nuevas epifitias en varios países (Ftayeh *et al.*, 2011; de León *et al.*, 2011; Zaluga *et al.*, 2013). *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* es considerado el patógeno bacteriano más importante de este cultivo en el mundo (Hadas *et al.*, 2005; Jahr *et al.*, 1999), y es cuarentenario según la legislación de sanidad vegetal de la Unión Europea (Eichenlaub *et al.*, 2006) y de Israel, donde integra la lista de plagas cuarentenarias del *Plant Protection Inspection Service* (Hadas *et al.*, 2005). La enfermedad ha sido detectada prácticamente en todas partes del mundo donde se cultiva tomate (EPPO, 2005).

En la Argentina el cancro bacteriano fue citado en las provincias de Misiones, Corrientes, Santa Fe, Chaco, Formosa, Mendoza, San Juan, Río Negro, Salta, Jujuy, así como en el cinturón hortícola Buenos Aires – La Plata (Fernández Valiela, 1975; Dal Bó, *et al.*, 2012). En esta última zona, el tomate para consumo en fresco es severamente

afectado en sistemas de producción bajo cubierta (Romero *et al.*, 2003), siendo tal vez la enfermedad más importante en estos sistemas productivos. En relevamientos realizados en esta zona (más específicamente en el partido de Florencio Varela), en invernaderos donde la enfermedad estaba presente, la incidencia de plantas enfermas al finalizar el cultivo fue del 32 % al 92 %, según el híbrido de tomate y el invernadero evaluado (Romero, 2011, comunicación personal).

La importancia de la enfermedad se debe, por un lado, a los daños que ocasiona ya que en ataques graves llega a causar la muerte de la planta, y por otro lado, a su difícil manejo. El patógeno se disemina fácilmente durante las tareas de transplante y desbrote, posibilitando que una pequeña cantidad de semilla infectada sea capaz de producir un alto porcentaje de plantas enfermas en el cultivo (Fernández Valiela, 1975; Chang *et al.*, 1991). No existen en el mercado variedades resistentes a esta enfermedad, cuyo agente causal sobrevive varios meses en los rastrojos y semillas en condiciones naturales. Debido a la localización de la bacteria en los tejidos vasculares, los tratamientos químicos preventivos son ineficientes.



Figura 1: A la izquierda: planta de tomate con síntomas de marchitamiento y cancro en el tallo principal. A la derecha: ampliación de la vista del cancro.

2. Sintomatología

La gran variedad de síntomas ocasionados por *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pueden diferenciarse en localizados o sistémicos (Gleason *et al.*, 1993). Cuando la enfermedad se desarrolla a partir del inóculo alojado en o sobre la semilla (infectada o infestada, respectivamente) o a través de heridas realizadas directamente en el tejido vascular, en general aparecen síntomas sistémicos, como es el marchitamiento (Figura 1).

El síntoma sistémico típico es una flaccidez de los folíolos que comienza de un solo lado de la hoja, o de las hojas de un solo lado de la planta, luego las hojas se marchitan permaneciendo adheridas a la planta. Cuando comienza el marchitamiento, las plantas pueden recuperarse durante la noche. La bacteria coloniza la planta avanzando por los vasos xilemáticos hacia la parte superior y también coloniza las raíces. Tanto en cortes transversales como longitudinales, los tejidos vasculares del tallo manifiestan un oscurecimiento o amarillamiento. Conforme el patógeno avanza sobre tejidos floemáticos y parenquimáticos aledaños al xilema, aparecen en los tallos o pecíolos manchas alargadas de coloración amarillo claro a marrón (Fernández Valiela, 1975). Estas manchas generalmente oscurecen y eventualmente se abren, resultando en canchales (Figura 1), síntoma que le da el nombre a la enfermedad. Con alta humedad relativa los canchales pueden exudar masas mucilaginosas de bacterias (zooglias) de color gris amarillento (Figura 2).

Cuando la infección ocurre a través de tricomas rotos, hidatodos u otras aberturas naturales, suelen ocurrir síntomas localizados, como manchas foliares o necrosis marginal en las hojas (Sharabani *et al.*, 2013). En algunas ocasiones, la penetración a través de estas aberturas naturales puede derivar también en síntomas sistémicos (Gleason *et al.*, 1993). En frutos, se pueden producir lesiones localizadas conocidas

como “ojo de pájaro”, que consisten en manchas redondeadas de color marrón claro rodeadas por un halo blanco. En plantas con síntomas sistémicos, la bacteria puede llegar a través del xilema hasta los frutos, los que pueden presentar una coloración amarillenta o marrón en los haces vasculares (Gleason *et al.*, 1993).

3. Características de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

El género *Clavibacter* está compuesto por una sola especie: *Clavibacter michiganensis*, bacteria Gram positiva de la Clase *Actinobacteria*, Familia *Microbacteriaceae*. Esta especie ha sido dividida en cinco subespecies fitopatógenas que afectan a distintos hospedantes. Además de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, se encuentra *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* que provoca la podredumbre en anillo de la papa, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* que ocasiona el marchitamiento y achaparramiento en alfalfa, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* que induce marchitamiento y quemado en maíz, y *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* causante de manchas foliares en trigo (Eichenlaub *et al.*, 2006). En un principio estas bacterias estaban agrupadas en el género *Corynebacterium* basándose en características morfológicas (no forman esporas y son bastones Gram positivos, más o menos irregulares). La nueva clasificación se basa principalmente en la presencia de menaquinona y la composición de la pared celular, así como en información de la secuencia de la fracción 16S del ADN ribosomal. El género se caracteriza por no producir flagelos, y por la presencia de menaquinona MK-9, poliaminas como espermina y espermidina, así como de D- y L-diaminobutirato en la pared celular (Eichenlaub *et al.*, 2006).

Clavibacter forma normalmente bastones pleomórficos, pero dependiendo del medio de cultivo pueden aparecer también células cocoidales o ramificadas. Si bien en general las células crecen aisladas o en pares, también se pueden observar eventualmente agregados

celulares, y es común la formación de arreglos en forma de V. El contenido de G+C en el ADN es de alrededor del 73 % (Eichenlaub *et al.*, 2006). *Clavibacter* es mesófilo con temperaturas óptimas de 25-28 °C, y tiene un crecimiento relativamente rápido, formando colonias visibles en placas de medio agarizado a los 3 - 4 días. La temperatura máxima de crecimiento es de 35 °C y el punto de muerte por temperatura es de 50 °C. El pH óptimo se ubica entre 7 y 8, pero puede crecer hasta valores de pH 5 (Eichenlaub *et al.*, 2006).



Figura 2: Ampliación de tallo de tomate y pecíolo de una hoja. En la axila se observa una zooglea, exudado mucilaginoso signo de la enfermedad.

C. michiganensis subsp. *michiganensis* se diferencia de las otras subespecies no solamente por su especificidad de atacar al tomate, sino también por otras características fisiológicas: produce pigmentos amarillos, tiene actividad proteolítica, utiliza acetato, tiene una producción variable de azúcares reductores y no produce levano (Eichenlaub *et al.*, 2006). La patogenicidad de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* puede ser determinada inoculando plantas de tomate o a través de la reacción de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa* L. (Diego de noche), que se manifiesta a las 48 h de la infiltración como una necrosis localizada del tejido infiltrado (Gleason *et al.*, 1993; Alarcón *et al.*, 1998).

El patógeno infecta el xilema de las plantas causando su marchitamiento y muerte (Jahr *et al.*, 1999) debido a un impedimento físico al transporte de agua que reduce la conductividad hidráulica del tallo (Romero *et al.*, 2014). Se sugirió que este impedimento estaría relacionado con la producción de exopolisacáridos (EPS), los cuales taponarían los vasos xilemáticos (Jahr *et al.*, 1999). Por otro lado, también fue sugerido que los EPS pueden funcionar como una fitotoxina (Jahr *et al.*, 1999). Sin embargo, otros estudios indican que éste no sería un factor de patogenicidad importante; mutantes obtenidos por mutagénesis química que producen menos de un 10 % de EPS que las cepas naturales de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, causaron marchitamiento y alcanzaron altas concentraciones en los tejidos (Bermppohl *et al.*, 1996). Asimismo, la bacteria produce numerosas enzimas extracelulares, entre las que se detectaron endocelulasas, poligalacturonasas, pectinmetilesterasas y xilanasas (Gartemann *et al.*, 2003). En base a estudios morfológicos se ha sugerido que las enzimas con capacidad de degradar componentes de la pared celular, y por lo tanto atacar vasos xilemáticos y células parenquimáticas adyacentes, juegan un rol importante en el desarrollo de la enfermedad (Gartemann *et al.*, 2003). Las cepas que no producen algunas celulasas no causan marchitamiento, aunque no se evita la colonización (Jahr *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha detectado que el patógeno es capaz de aumentar la relación tallo/raíz, promoviendo una mayor susceptibilidad al estrés hídrico (Romero *et al.*, 2014).

En estudios sobre los mecanismos moleculares de la patogenicidad, se determinó que numerosas cepas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* tienen dos plásmidos: pCM1 (27,5 kb) y pCM2 (72 kb) (Gartemann *et al.*, 2003). Cambiando la temperatura de crecimiento de 26 a 32 °C se obtuvo una cepa curada de ambos plásmidos y que producía cantidades normales de EPS. Dicha cepa fue capaz de colonizar el hospedante

en altas concentraciones sin producir enfermedad (Gartemann *et al.*, 2003). Por otro lado, otras dos cepas que llevaban solo uno de los plásmidos produjeron enfermedad pero se redujo su agresividad (hubo una menor severidad de la enfermedad), indicando que ambos plásmidos tienen genes involucrados en la patogenicidad (Gartemann *et al.*, 2003). Por lo tanto, los genes necesarios para la inducción de la enfermedad están ubicados en los plásmidos y la pérdida de los mismos convierte a esta bacteria en un endófito (Eichenlaub y Gartemann, 2011). Por otro lado, los genes responsables de una colonización exitosa del hospedante están ubicados en el cromosoma, en una isla de patogenicidad, e incluyen genes relacionados con la evasión o supresión de reacciones de defensa de la planta (Eichenlaub y Gartemann, 2011).

4. Ciclo de vida del patógeno

La bacteria puede sobrevivir en semillas infectadas o infestadas sin mostrar síntomas. Debido al prolongado período de incubación de la enfermedad, es posible que en sistemas de producción de semillas existan plantas enfermas asintomáticas, dando origen a lotes de semillas, inadvertidamente, infestadas/infectadas. En otros países se han identificado a las semillas y los plantines como la fuente de inóculo primario más importante en cultivos comerciales (de León *et al.*, 2006). Así se introduce el patógeno en establecimientos donde no existía previamente y, cuando son importados, son una potencial vía de entrada de nuevos genotipos bacterianos al país.

Los plantines suelen permanecer asintomáticos hasta luego del trasplante (Gitaitis *et al.*, 1991), facilitando la dispersión posterior del patógeno. Existen evidencias de que plantas certificadas como “libres de enfermedad” están muchas veces contaminadas (Ftayeh *et al.*, 2011). En algunos sistemas de producción de plantines se realizan

prácticas que favorecen la dispersión o la penetración del patógeno en el hospedante. En EE.UU. la producción de tomate para industria se iniciaba hasta hace unos años a partir de plantines procedentes de Georgia y Florida, donde las semillas de tomate se sembraban en el suelo y se los recortaba repetidamente con una segadora rotativa para aumentar la uniformidad y el vigor de los plantines. Chang *et al.* (1991) comprobaron que tanto el corte de plantines como el contacto de plantines enfermos con otros sanos durante el transplante dispersaba a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Con este sistema de producción de plantines, se determinó que una a cinco semillas infectadas/infestadas en 10.000 pueden causar una epidemia con una incidencia de plantas enfermas de entre 24 a 57 %, por ello actualmente ha quedado en desuso. Sin embargo, aún evitando los cortes, el ambiente cálido y húmedo de los invernaderos favorece la multiplicación bacteriana y el riego por aspersión facilita su dispersión (Hausbeck *et al.*, 2000), por lo que el patógeno también puede ser transportado epifíticamente con los plantines. Chang *et al.* (1991) demostraron que la manipulación durante el transplante facilita la dispersión de las poblaciones epífitas al poner en contacto plantines sanos y enfermos y genera heridas que son puerta de entrada del patógeno.

A pesar de la importancia que se le suele atribuir a las semillas y los plantines en el desarrollo de epifitias, la importancia relativa de estas fuentes de inóculo primario para el desarrollo de epidemias aún no se conoce completamente (Chang *et al.*, 1991). Esto es debido a que el patógeno puede sobrevivir también en los rastrojos, hospedantes alternativos, plantas de tomate voluntarias o incluso como epífita sobre otras plantas o superficies.

Se ha demostrado que en cultivos comerciales *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* puede sobrevivir y dispersarse como epífita, pero se desconoce la importancia

epidemiológica de esta forma de supervivencia (Chang *et al.*, 1991). En estudios realizados en EE.UU., se detectaron poblaciones del patógeno sobre la superficie de hojas de hospedantes alternativos y plantas no hospedantes, cuando éstas se encontraban cerca de plantas de tomate enfermas. Las poblaciones fueron más altas en tomate que en hospedantes alternativos o en no hospedantes, y a su vez fueron mayores en solanáceas que en no-solanáceas, pero no se detectaron síntomas sistémicos en tomate originados por estas poblaciones epífitas del patógeno (Chang *et al.*, 1992). Sin embargo, los mismos autores no descartan la posibilidad de que estas poblaciones ocasionen infecciones sistémicas, sobre todo en sistemas intensivos donde se producen heridas por tareas culturales. También se comprobó que puede sobrevivir como epífita hasta 100 días en estacas de bambú, desde donde se puede dispersar por riego o lluvia, y transmitirse al hospedante durante las tareas de tutorado, desbrote o cosecha (Miguel-Wruck *et al.*, 2006). Varias solanáceas, entre ellas *S. douglasii* Dunal y *Capsicum annuum* Linnaeus, también fueron informadas como hospedantes de esta bacteria. En Brasil se detectaron infecciones en *C. annuum* (Bogo y Takatsu, 1997), pero no existen registros de ataques a este cultivo en el cinturón verde de Buenos Aires-La Plata.

C. michiganensis subsp. *michiganensis* puede ser considerado como un organismo principalmente biotrófico y solo débilmente necrotrófico, pero no como bacteria habitante del suelo (Eichenlaub *et al.*, 2006). Puede sobrevivir durante períodos relativamente largos en restos de plantas enfermas, dependiendo de la zona geográfica y ubicación de los restos. En tomate de campo en zonas templadas, la bacteria pudo ser aislada hasta dos meses después de enterrados los rastrojos y entre tres a seis meses y medio en restos dejados en superficie. En regiones más frías, puede sobrevivir 10 meses en rastrojos enterrados y entre ocho a más de 24 meses en restos sobre la superficie del suelo (Fatmi y Schaad, 2002; Gleason *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992; Moffet y Wood,

1984). Pese a la información disponible en otros países sobre la supervivencia del patógeno en situaciones de campo, se desconoce su supervivencia en cultivos bajo cubierta. Asimismo, si bien para otras bacterias fitopatógenas se sugirió una relación entre la supervivencia en restos culturales y su descomposición (De Boer, 1982), esta relación no fue determinada para este actinomicete.

Aunque se han identificado las heridas, hidatodos u otras aberturas naturales como vías de penetración de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Sharabani *et al.*, 2013), aún se desconoce su importancia relativa en el desarrollo de las epidemias. Dentro de la planta la bacteria se desplaza y propaga principalmente a través de los vasos xilemáticos, para después salir de ellos y llegar al floema, médula y corteza donde origina cavidades que producen los canchros (Agrios, 2005). Las células bacterianas se pueden desplazar 30 cm desde el punto de inoculación y alcanzar la región apical en 15 días (Chalupowicz *et al.*, 2012).

El período de incubación es relativamente largo: puede ser de siete a 34 días, y la expresión de síntomas depende de la edad del hospedante, concentración del inóculo, condiciones ambientales, cultivar y nutrición de la planta (Chang y Pataky, 1992). El tiempo de incubación es más largo y la severidad es menor con temperaturas frescas, plantas más viejas, bajas concentraciones de inóculo y cultivares moderadamente resistentes (Chang y Pataky, 1992). En general, todas las condiciones óptimas para el cultivo de tomate lo son para el desarrollo de la enfermedad.

En la Figura 3 se presenta un esquema conceptual del ciclo de la patogénesis teniendo en cuenta los subsistemas de producción de tomate comercial: la producción de semillas, de plantines, de tomates para consumo y la auto-producción de semillas. Esta última categoría puede ser de importancia en sistemas productivos familiares, pero no es una práctica habitual de grandes productores.

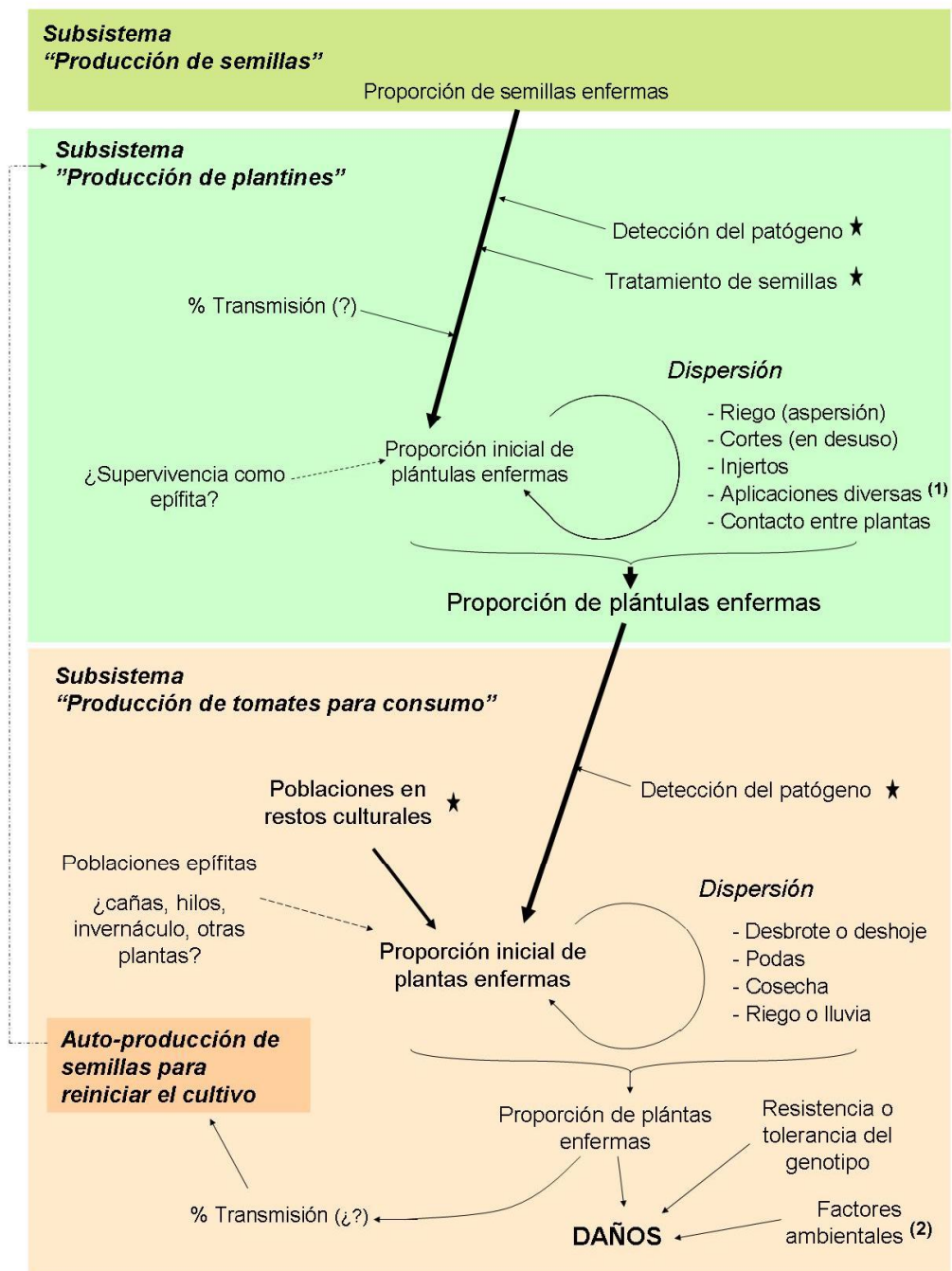


Figura 3: Esquema conceptual del ciclo de patogénesis de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el sistema de producción de tomate. Se identifican con diferentes colores los subsistemas de producción de: semillas, plantines, tomates para consumo, y auto-producción de semillas. El grosor de las flechas indica una hipotética importancia relativa asignada. Con una estrella se indican los aspectos del agroecosistema en los que se trabajó en esta tesis. (1) Aplicación de fungicidas, insecticidas, reguladores del crecimiento, cobre. (2) Factores como temperatura, humedad, nutrición de las plantas, interacción con otros microorganismos pueden alterar el nivel de daño.

5. Manejo de la enfermedad

El cancro bacteriano es una enfermedad de muy difícil manejo. El largo período de incubación posibilita que plantines o plantas adultas asintomáticas sean fuente de inóculo sin que esto sea identificado por el agricultor. Al tratarse de una enfermedad vascular una vez que el patógeno ocasiona los síntomas ya no hay forma de revertir el daño, por lo cual los tratamientos químicos no son efectivos. Si bien existen cultivares con mayor o menor susceptibilidad (Chang *et al.*, 1992; Van Steekelenburg, 1985) no hay actualmente genotipos comerciales resistentes a la enfermedad, a pesar de los múltiples intentos por desarrollarlos (Eichenlaub y Gartemann, 2011).

Entre las estrategias de control se mencionan la erradicación de malezas solanáceas, destrucción de plantas atacadas, riego por surcos o por goteo en lugar de aspersión, selección y trasplante de plantines provenientes de semilla sana y desarrollados en almácigos libres de la enfermedad y reemplazo del trasplante por la siembra directa (Agrios, 2005; Fernández Valiela, 1975). Sin embargo, es importante destacar que algunas de estas recomendaciones no siempre son aplicables en los sistemas de producción actuales. Para la producción de plantines se ha sugerido la aplicación de bactericidas a los efectos de reducir las poblaciones del patógeno (Werner *et al.*, 2002). En el subsistema de producción comercial se recomiendan el entierro de los rastrojos y/o la rotación con otro cultivo. La duración de una rotación deberá ser mayor al tiempo de supervivencia del patógeno en los restos culturales, el cual es muy variable según la zona geográfica (Fatmi y Schaad, 2002). Una vez que el patógeno infectó y colonizó el xilema de plantas de un lote es recomendable desinfectar herramientas y manos durante el desbrote y deshoje con algún producto efectivo, como ser alcohol 70 %, hipoclorito de sodio al 2 %, cloruro de benzalconio al 1 % o cloroxilenol al 5 % (Vega *et al.*, 2009).

El uso de semillas y plantines libres del patógeno es crucial. Existen diversas técnicas para erradicar el patógeno de las semillas: fermentación de las semillas con la pulpa del fruto, tratamiento por calor seco o húmedo, espolvoreo con fungicidas, uso de antibióticos (estreptomina), aplicación de capa protectora de cobre y desinfección con HCl, acetato cúprico acidificado o hipoclorito de sodio (Fernandez Valiela, 1975, Dhanvantari, 1989; Agrios, 2005; Lopes y Rossetto, 2004). Algunos de estos tratamientos han resultado efectivos en la erradicación, aunque en ocasiones se ha detectado que afectan la calidad fisiológica de la semilla. Los tratamientos térmicos son los más utilizados para erradicar bacterias fitopatógenas, pero su eficacia en la erradicación del patógeno y el efecto sobre la calidad de las semillas varía de acuerdo a la metodología utilizada. Las combinaciones de tiempo de exposición, temperatura y forma de aplicación (calor seco o húmedo) necesitan ser probados en condiciones más controladas y con métodos de detección del patógeno más eficientes (Silva *et al.*, 2002).

Para corroborar la ausencia del patógeno en semillas y plantines es necesario un método de análisis confiable, reproducible y en la medida de lo posible, rápido y de bajo costo. La “International Seed Health Initiative for Vegetables” (ISHI) y la “European and Mediterranean Plant Protection Organization” (EPPO) proponen la siembra de extractos de semillas en medios semiselectivos y la posterior identificación de colonias sospechosas (EPPO, 2005; ISHI 2005). Sin embargo, la bacteria suele crecer lentamente en los medios de cultivo propuestos y puede ser inhibida por otros microorganismos, lo cual aumenta las probabilidades de resultados falsos negativos (Gleason *et al.*, 1993).

6. Planteo del problema

Las semillas y los rastrojos han sido identificadas como las principales fuentes de inóculo primario de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en otros países. En Argentina no disponemos de información sobre el tiempo de supervivencia del patógeno en rastrojos o sobre su presencia en semillas comerciales.

En otras regiones del mundo, en cultivos a campo, se han informado períodos de supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* relativamente largos en los restos del cultivo. Sin embargo, no existen datos sobre el tiempo de supervivencia en invernadero. Dado que ésta es la principal forma de producción en el cinturón hortícola Buenos Aires – La Plata, y que el tomate es el principal cultivo producido bajo cubierta, esta información resulta de particular importancia. Por otra parte, este dato también es necesario para realizar recomendaciones sobre la duración que deberían tener las rotaciones para reducir el inóculo presente. La gran variabilidad que se encuentra en bibliografía sobre el tiempo de supervivencia da cuenta de que no es posible extrapolar datos de diferentes regiones, ya que es importante considerar las condiciones ambientales, así como procesos ecológicos que podrían afectar la dinámica de las poblaciones del patógeno en los tejidos de su hospedante. Si bien para otras bacterias fitopatógenas se ha sugerido una relación entre la descomposición del rastrojo y la supervivencia del patógeno, no hay trabajos que relacionen estas variables para el caso de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

En nuestro país no contamos con información sobre la presencia del patógeno en las semillas comerciales utilizadas, que son en su gran mayoría importadas. La detección es necesaria a los efectos de alertar sobre la importancia de tomar medidas de manejo para reducir esta vía de dispersión. La utilización de métodos de detección sensibles es imprescindible para evitar epidemias, dado que debido a las altas tasas de dispersión

secundaria durante la producción de plantines, así como durante el trasplante o las tareas de deshoje y desbrote en el cultivo comercial, aún bajas proporciones de semillas enfermas pueden ocasionar una epidemia. Esto enfatiza la necesidad de probar técnicas de desinfección de semillas que, sin alterar su calidad fisiológica, permitan erradicar el patógeno.

7. Objetivo general y específicos

El objetivo general del trabajo fue determinar aspectos epidemiológicos clave sobre las fuentes de inóculo primario de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (semillas y rastrojos) en el cinturón hortícola Buenos Aires-La Plata, de forma de facilitar el desarrollo de herramientas de manejo sustentable de la enfermedad.

En el Capítulo I “Supervivencia en rastrojos” se desarrollan los siguientes objetivos: a) determinar el período de supervivencia del patógeno en tallos, pecíolos y raíces en sistemas de cultivo bajo cubierta del cinturón hortícola de Buenos Aires – La Plata, b) determinar el efecto de variables ambientales (época del año y ubicación de los rastrojos en el suelo) sobre el tiempo de supervivencia, y c) establecer si existe una relación entre la supervivencia en rastrojos de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y la descomposición de los mismos.

El Capítulo II se enfoca al estudio de las semillas como fuente de inóculo primario y tiene por objetivos: a) comparar dos métodos de detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas: uno molecular de amplificación de ADN por PCR y un método convencional de siembra de diluciones de un extracto de semillas en placas con medio semiselectivo; b) verificar la presencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas de tomate comercializadas en Argentina, y c) determinar la efectividad de

tres tratamientos térmicos de semillas para la erradicación del patógeno, evaluando su efecto sobre la calidad fisiológica de las semillas.

8. Hipótesis

Para los objetivos b) y c) del Capítulo I se parte de la siguiente hipótesis: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* tiene una baja habilidad competitiva saprofítica, por lo que a medida que los microorganismos saprófitos colonizan los tejidos del hospedante y éstos se descomponen, la población del patógeno se reducirá por competencia u otras interacciones (antibiosis o parasitismo). Aquellas condiciones que promuevan la actividad biológica de las comunidades microbianas descomponedoras (por ejemplo temperaturas más elevadas o contacto directo con los tejidos por el entierro de los rastrojos), y por lo tanto favorezcan mayores tasas de descomposición de rastrojos, redundarán en mayores tasas de mortalidad del patógeno y por tanto en un menor tiempo de supervivencia.

CAPÍTULO I

SUPERVIVENCIA EN RESTOS CULTURALES

CAPÍTULO I: SUPERVIVENCIA EN RESTOS CULTURALES

I.1 INTRODUCCIÓN

Los rastrojos son una importante fuente de inóculo primario para las enfermedades bacterianas. En este sentido, se ha demostrado que diferentes especies de los géneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium* (=Erwinia) y *Clavibacter* pueden sobrevivir por entre uno y más de 24 meses, según el caso, en tejidos muertos de su hospedante (Torres *et al.*, 2009; Tyson *et al.*, 2012; de Boer *et al.*, 1979; Fatmi y Schaad, 2002). En lotes donde el patógeno ha sido introducido anteriormente, ya sea por plantines o semillas, ésta se asume como la principal vía a través de la cual las bacterias pueden sobrevivir y volver a atacar a su hospedante en otro ciclo del cultivo.

En los sistemas productivos de tomate en invernadero del cinturón hortícola de Buenos Aires – La Plata predomina el monocultivo, y muchos productores realizan dos ciclos de cultivo por año en el mismo lote. Si bien es una práctica común retirar los restos culturales antes de una nueva plantación, quedan en el lote remanentes de pecíolos, hojas y tocones de tallos unidos a las raíces. El corto o nulo lapso de tiempo entre plantaciones sugiere que esos restos podrían ser una importante fuente de inóculo de fitopatógenos en estos sistemas. Se ha demostrado que una epidemia originada por rastrojos infestados puede reducir significativamente los rendimientos del cultivo siguiente (Gleason *et al.*, 1991). Sin embargo, se carece de evaluaciones sobre el período de supervivencia bajo nuestras condiciones de producción.

Algunos autores han sugerido que *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sería capaz de sobrevivir libre en el suelo, sin embargo, actualmente no parece haber evidencias suficientes para afirmarlo. Hasta la década de 1970 los métodos utilizados para

determinar la supervivencia de este patógeno se basaban en la identificación de síntomas en plantas de tomate sembradas o transplantadas en suelos supuestamente infestados. En algunos de estos estudios se propuso que el patógeno podría sobrevivir indefinidamente en el suelo (Fatmi y Schaad, 2002). Sin embargo, estos ensayos no permiten descartar otras posibles fuentes de inóculo, por lo que no serían evidencia contundente para demostrar la supervivencia del patógeno en suelo. Trabajos posteriores, utilizando la técnica de aislamiento por siembra de diluciones en medios de cultivo semiselectivos, determinaron que la bacteria podría sobrevivir en el suelo solo por períodos cortos. Trevors y Finnen (1990) recuperaron células viables del patógeno luego de 30 días en un suelo no estéril previamente inoculado con una suspensión bacteriana en condiciones de laboratorio, aunque la concentración bajó a menos del 10 % de la inicial. Otros investigadores, utilizando sustratos con baja actividad biológica como turba o perlita, precisaron que la bacteria inoculada sobrevivió al menos hasta los 35 a 40 días, mientras que en sustratos con agregado de compost no se pudo volver a aislar al patógeno luego de 12 a 15 días (Yogev *et al.*, 2009). De manera similar, Chang y Pataky (1992) no pudieron recuperar al patógeno a las seis semanas de haberlo inoculado en suelo sin esterilizar. Sin embargo, estos autores lograron detectarlo en suelo cercano a restos de tejidos infestados hasta los 210 días de enterradas las muestras. Este suelo estuvo siempre en contacto cercano con restos culturales infestados, y la concentración bacteriana fue siempre alrededor de uno a dos órdenes de magnitud menor que en los tejidos, por lo que los autores infieren que el patógeno podría difundir al suelo circundante desde los rastrojos. Por lo tanto, hasta el momento no se encontraron evidencias que demuestren que *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pueda sobrevivir libre en el suelo por largos períodos bajo condiciones naturales, sin estar ello asociado a la supervivencia en los tejidos del hospedante.

Por el contrario, la supervivencia en restos culturales puede ser prolongada. En diferentes estudios realizados en cultivos de tomate a campo se determinó un período de supervivencia en tallos y hojas que fue desde los dos meses hasta los dos años. Este período varió según el país y la ubicación de los tejidos (enterrados o dejados en superficie).

En relación al sitio geográfico, Fatmi y Schaad (2002) determinaron tiempos de supervivencia en tallos dejados en la superficie del suelo de cuatro a seis meses en dos sitios de Marruecos, mientras que en Ohio y California (EE.UU.) aislaron al patógeno hasta los diez meses, momento en que dieron por finalizado el experimento. En un experimento similar en Iowa (EE.UU.), Gleason *et al.* (1991) detectaron el patógeno a los dos años.

En diferentes localidades se determinaron tiempos de supervivencia y concentraciones menores en los rastrojos enterrados que en los dejados en superficie. En términos generales, en tejidos enterrados el patógeno sobrevivió un período 25 - 75 % menor que en los dejados en superficie (Fatmi y Schaad, 2002; Gleason *et al.*, 1991). Chang y Pataky (1992) determinaron una concentración del patógeno en restos culturales enterrados de aproximadamente un orden de magnitud menor a los dejados en superficie a los seis o siete meses, en dos años diferentes.

Las variaciones en el tiempo de supervivencia estarían asociadas a diferentes factores, entre ellos el clima, tipo de suelo y microflora edáfica (Basu, 1970; Moffet y Wood, 1984; Chang y Pataky, 1992). Para otras bacterias fitopatógenas se ha sugerido que la supervivencia estaría relacionada con la tasa de descomposición de los rastrojos infestados (De Boer, 1982). Los resultados de otros autores apoyarían la hipótesis de que la supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* también estaría relacionada a la descomposición de los tejidos del hospedante. En los estudios

mencionados anteriormente, siempre se detectó que la concentración bacteriana en tejidos disminuye con el tiempo: las concentraciones iniciales oscilaron entre los 10^9 y 10^{11} UFC g^{-1} y las últimas detecciones positivas correspondieron a concentraciones de $10^4 - 10^7$ UFC g^{-1} (Fatmi y Schaad, 2002; Chang y Pataky, 1992; Gleason *et al.*, 1991). Esta disminución de cinco a cuatro órdenes de magnitud con relación a la concentración bacteriana inicial fue más rápida, y por lo tanto el tiempo de supervivencia fue menor, en los rastrojos enterrados que en los dejados en superficie, aparentemente siguiendo el mismo patrón que la descomposición de los rastrojos. Los restos culturales enterrados están expuestos a condiciones ambientales de mayor humedad que los dejados en superficie y tienen una mayor superficie de contacto con los microorganismos del suelo, lo cual podría acelerar el proceso de descomposición (Chapin III *et al.*, 2002). Gleason *et al.* (1991) no lograron aislar al patógeno en hojas y tallos enterrados luego de 6 meses debido al alto grado de descomposición de los mismos. Condiciones ambientales con mayor temperatura y humedad determinarán una tasa de descomposición del rastrojo mayor (Chapin III *et al.*, 2002). La variabilidad en los períodos de supervivencia encontrados por otros autores bajo diferentes condiciones ambientales podrían deberse a las tasas de descomposición de los tejidos del hospedante. En sitios con mayores temperaturas, como Aït Melloul o Melk Zahr (Marruecos) o California (EE.UU), los períodos de supervivencia tienden a ser menores que en los sitios con temperaturas más bajas, como Ohio, Illinois o Iowa (EE.UU.).

En los estudios mencionados no se analizó la supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en las raíces, si bien también puede alojarse en estos órganos (Xu *et al.*, 2012). En nuestra zona de estudio, cuando no se realizan rotaciones, las raíces de los plantines trasplantados quedan cerca de las raíces remanentes del cultivo anterior, por lo

cual la tasa de transmisión del patógeno al nuevo cultivo podría ser alta si el patógeno fuera capaz de sobrevivir en estos tejidos.

Todos los estudios publicados sobre la supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en restos culturales en otros países fueron realizados en sistemas de cultivo a campo; no se encontraron referencias para cultivos bajo cubierta. En condiciones de invernadero, donde la temperatura y humedad tienden a ser mayores que al aire libre, sería esperable que tanto la descomposición de rastrojos como los tiempos de supervivencia del patógeno sean diferentes a los publicados hasta ahora. Por otro lado, considerando que en el cinturón verde Buenos Aires – La Plata se realizan dos cultivos por año, la época en que finalice el cultivo (invierno o verano) también puede incidir en estas variables.

Los objetivos de este capítulo fueron: a) determinar el período de supervivencia del patógeno en tallos, pecíolos y raíces en sistemas de cultivo bajo cubierta del cinturón hortícola de Buenos Aires – La Plata; b) determinar el efecto de las variables ambientales (época del año y ubicación del rastrojo en el suelo) sobre el tiempo de supervivencia; c) establecer si existe una relación entre la supervivencia en rastrojos de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y la descomposición de los mismos.

I.2 MATERIALES Y MÉTODOS

I.2.1 Determinación del tiempo de supervivencia

En invierno (julio) y verano (diciembre) de 2009, 2010 y 2011, cuando generalmente terminan los cultivos de tomate bajo cubierta en la zona hortícola de Buenos Aires-La Plata, se cosecharon plantas con síntomas de Cancro Bacteriano de un invernadero

comercial en Florencio Varela. Se cortaron trozos de tallo (de aproximadamente 10 cm de largo), hojas y raíces de las plantas enfermas, los que se colocaron en bolsas de nylon con una malla de 4 mm² para facilitar su recuperación posterior (Gleason *et al.*, 1991; Fatmi y Schaad, 2002). Previamente, se cortaron trozos de raíces adventicias y una sección de cada uno de los tallos y hojas para determinar su peso seco y concentración inicial de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (UFC g⁻¹). Esta determinación también tuvo por finalidad asegurar que las cepas naturales obtenidas de lotes enfermos crecían adecuadamente en el medio de cultivo utilizado.

Las bolsas con tallos y pecíolos se colocaron sobre la superficie del suelo, y otras con tallos y raíces se enterraron a 10 cm de profundidad en un invernadero de la Cátedra de Horticultura de FAUBA. Regularmente, cada 30-40 día, excepto las últimas determinaciones en el ensayo iniciado en invierno de 2011 (cada 70-80 días), se evaluó la concentración bacteriana hasta que no se pudo aislar más el patógeno. En cada fecha, los muestreos se completaron en dos a cinco días. Los recuentos se hicieron por dilución en placas a partir de macerados de tallos, pecíolos o raíces en agua destilada estéril. Para reducir el nivel de microorganismos saprófitos, las muestras se tomaron descartando los extremos de los trozos de tallos y pecíolos. Para relativizar el valor del recuento de colonias al peso seco, se tomó una muestra de cada tejido, se pesó en fresco y luego se secó en estufa a 70 °C hasta peso constante.

Cada muestra se maceró en mortero con agua estéril, de donde se realizaron diluciones, que fueron sembradas en el medio semiselectivo MSCM, que tiene como base el mSCM (Waters y Bolkan, 1992), en el cual se reemplazó la fuente carbonada manosa por sacarosa. El medio mSCM es utilizado en las determinaciones de rutina de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en muchos laboratorios (ISF, 2008), y tuvo su origen en el SCM, que contiene sacarosa (ISF, 2008). El medio MSCM contiene por

litro: 15 g agar, 1,5 g ácido bórico, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KH_2PO_4 , 2 g K_2HPO_4 , 0,1 g extracto de levadura, 10 g sacarosa, 100 mg ácido nicotínico (disuelto en 20 ml de agua destilada estéril), 30 mg ácido nalidixico (sal de sodio, disuelta en 1 ml 0,1 M NaOH) y 20 mg cicloheximida (disuelta en 1 ml de metanol absoluto). Los componentes estables al calor fueron disueltos en agua destilada estéril y autoclavados. Los componentes lábiles al calor fueron microfiltrados usando un filtro de 0,20 μm y agregados al medio autoclavado y enfriado a 50 °C, para luego volcarlo en las placas de Petri.

Las placas se incubaron en estufa a 28 °C y a los siete a diez días se realizó el recuento de las colonias identificadas morfológicamente como positivas. Para corroborar la identidad de las colonias, se eligieron algunas al azar y se repicaron en el medio no selectivo YDC modificado (Ritchie y Dittapongpitch, 1991; 10 g extracto de levadura, 5 g carbonato de calcio (CaCO_3), 15 g agar, 10 g D-glucosa por litro). A las 72 h se observó la forma, color, bordes y textura de las colonias y, se seleccionaron algunas al azar para realizar la reacción de Gram, observación microscópica de las células (forma y tamaño) y probar su patogenicidad inoculando plantas de tomate, o verificando la producción de una reacción de hipersensibilidad en *Mirabilis jalapa* L. (Gleason *et al.*, 1993). Esta reacción ocurre a las 48 h y se utiliza como prueba de patogenicidad estándar en numerosos laboratorios de análisis de semillas (Alarcón *et al.*, 1998). En algunos casos, se verificó la identificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés: PCR) utilizando dos *primers* que amplifican regiones del ADN del gen de patogenicidad *pat-1* ubicado en un plásmido: CMM-5 (secuencia: 5'-GCGAATAAGCCCATATCAA-3') y CMM-6 (secuencia: 5'-CGTCAGGAGGTCGCTAATA-3'). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 10 minutos, 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C

por un minuto, *annealing* de los *primers* a 55 °C por 1,5 minuto, y una extensión a 72 °C por 1 minuto; luego una extensión final a 72 °C por 10 minutos (Dreier *et al.*, 1995; EPPO, 2005).

I.2.2 Efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia

Debido a que no tenemos datos de supervivencia en restos enterrados en verano, no es posible hacer un análisis simultáneo del efecto de la ubicación del rastrojo en el suelo y la época del año. Por este motivo, para verificar el efecto de las condiciones ambientales sobre la supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* se realizaron dos análisis estadísticos a partir de los datos de supervivencia. Se determinó el efecto de la ubicación del rastrojo en el suelo comparando los resultados de los tallos enterrados *vs* los dejados en superficie, utilizando los datos de ensayos de invierno. Por otra parte, se comparó la supervivencia según la época del año (verano o invierno) para tallos y pecíolos en superficie. En ambos casos, la variable respuesta utilizada fue el área bajo la curva de la población bacteriana (ABCPB) (Yogev *et al.*, 2009), que se obtiene aplicando Log_{10} a los datos de concentración bacteriana (UFC g^{-1}) y luego calculando el área que surge de la curva de descenso de la concentración bacteriana en el tiempo. Esta variable resume la información de la evolución de la concentración bacteriana y el tiempo de supervivencia.

Para el primer análisis (ubicación del rastrojo en el suelo), dado que los datos correspondieron a los ensayos de invierno de tres años diferentes, previamente se corroboró la inexistencia de un efecto año o de un efecto de la interacción año-tratamiento. Una vez hecho esto, se tomaron las repeticiones de los tres años en forma conjunta, obteniéndose 17 repeticiones del tratamiento de tallos en superficie y 14 de

los tallos enterrados. Para el segundo análisis (época del año), dado que las repeticiones de los diferentes años son independientes, se las utilizó en forma conjunta para el análisis estadístico, por lo que se tuvieron 11 repeticiones para los tratamientos tallos en verano, tallos en invierno y pecíolos en verano, y 12 para pecíolos en invierno. Para realizar comparaciones múltiples se realizó un test de Fisher (protegido por ANOVA) siempre utilizando un valor de significancia $p = 0,05$.

Los supuestos del modelo fueron probados mediante el test de Shapiro Wilks para normalidad y el de Levene para homogeneidad de varianzas. En casos en que los datos no se distribuyeron normalmente, se utilizó el método no paramétrico de Kruskal Wallis.

I.2.3 Relación entre supervivencia y descomposición de los restos culturales

Para determinar si existe relación entre la supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en restos culturales y la descomposición, los datos se analizaron de tres maneras. A los efectos de poder realizar comparaciones, se relativizaron los valores de peso seco de los rastrojos tomados cada vez que se determinó la concentración del patógeno, llevando todos los valores iniciales a 100 (peso seco relativo).

En primer lugar, se comparó la descomposición de rastrojos según su ubicación en el suelo (enterrados o en superficie), y entre estaciones de cultivo (verano e invierno) utilizando el mismo diseño estadístico que para las comparaciones de supervivencia del patógeno (en las que se usó el ABCPB). Para esto se calculó una variable análoga a esta última: el área bajo la curva de descomposición del rastrojo (ABCDR) integrando el área bajo la curva de la evolución del peso seco relativo en el tiempo, para cada tratamiento y repetición. De esta forma, se obtuvieron dos variables (ABCPB y

ABCDR); ambas deberían tener un mismo patrón si existe una relación entre la supervivencia del patógeno y la descomposición de los rastrojos. En segundo lugar, con estas mismas variables se realizó un análisis de regresión, tomando el ABCDR como variable independiente. Finalmente, se calculó la tasa relativa de descomposición del rastrojo y la tasa relativa de mortalidad bacteriana, tomando a esta última como variable dependiente. Ambas tasas se calcularon de la misma forma: se promediaron los datos de las repeticiones de cada fecha de determinación, y se calculó la diferencia porcentual (por lo cual son tasas relativas) entre determinaciones sucesivas, dividido por el tiempo.

I.2.4 Corroboración de resultados del tiempo de supervivencia

A los efectos de verificar la eficiencia del método utilizado para detectar la presencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en los restos culturales y determinar posibles interferencias en la detección por presencia de microorganismos saprófitos, se hicieron tres experimentos.

En el primer experimento se comparó la técnica de detección *in vitro* con el medio MSCM con una técnica *in vivo*, utilizando pecíolos, raíces y tallos enterrados y tallos en superficie de los ensayos de 2011. Todas las muestras correspondieron a un período de descomposición de 155 días, excepto las de tallos enterrados que estuvieron expuestos 75 días. Cada tratamiento tuvo 6 repeticiones, excepto las raíces que contaron con tres repeticiones. Los tejidos vegetales se maceraron en agua destilada estéril y la misma suspensión se utilizó para evaluar los métodos *in vitro* e *in vivo*. Se contó con un control positivo que consistió en el agregado de una suspensión bacteriana del patógeno al macerado de tallos en superficie. Para esto se utilizó una cepa de probada virulencia (Cm9; Colección de la Cátedra de Fitopatología-FAUBA), la cual fue cultivada en YDC

a 28 °C. Luego de 48-72 h se transfirió a una suspensión en agua destilada estéril y se diluyó hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3 a 600 nm, lo que equivale aproximadamente a 10^8 UFC ml⁻¹. Se agregaron 100 µl de esta suspensión en 900 µl de una dilución de la suspensión de tallos para alcanzar una concentración por peso seco de tejido de aproximadamente 10^8 UFC g⁻¹. El método *in vitro* se realizó como se describió anteriormente: se determinó la presencia o ausencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y su concentración por dilución en placas con medio MSCM. Para la detección *in vivo* (Saettler *et al.*, 1989) se inocularon, con la suspensión de cada tratamiento, plantas de tomate del cultivar ACE 55 (Asgrow Seed Co.) de 45 días desde emergencia, a la edad fisiológica de 4-5 hojas verdaderas. La inoculación se realizó sumergiendo en la suspensión un bisturí previamente flameado y cortando la primera hoja verdadera. Posteriormente se dejó una gota de la suspensión sobre la herida. Se inocularon al menos dos plantas por repetición. Los síntomas se evaluaron al final del ensayo realizando un corte longitudinal de cada tallo y observando la manifestación de oscurecimiento de los haces vasculares. Se midió la longitud del tejido oscurecido, como medida de severidad. Se consideraron positivas para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* las muestras de rastrojos donde se observaron síntomas de la enfermedad en las plantas inoculadas. Se contó con dos controles: uno negativo (corte de la primera hoja sumergiendo el bisturí en agua) y uno positivo (con una suspensión de 10^8 UFC ml⁻¹ de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*).

Los otros dos experimentos tuvieron como finalidad detectar posibles interferencias por la presencia de microorganismos saprófitos en el método *in vitro*. Por un lado, se comparó la recuperación del patógeno creciendo solo, a partir de una suspensión en agua destilada estéril, con el crecimiento cuando se sembró suspendido en el macerado de rastrojos. Se utilizaron los tallos del ensayo de invierno de 2011 con cinco meses de

descomposición. Para realizar el análisis estadístico se calculó para cada una de las seis repeticiones la diferencia entre la concentración del patógeno creciendo junto a otros microorganismos y creciendo solo, expresado en UFC ml⁻¹. Se realizó una prueba T de Student para determinar su diferencia con respecto a cero. Por otro lado, en las determinaciones del ensayo de invierno de 2011 que tuvieron al menos una repetición positiva se contó el número total de microorganismos saprófitos que crecieron en las placas (UFC placa⁻¹) con el fin de determinar una posible relación negativa entre la presencia de dichos microorganismos y el éxito en la detección del patógeno. Se utilizaron datos de tejidos enterados (con 30 a 75 días de descomposición) y de tallos dejados en superficie (con 60 a 165 días de descomposición). Los datos se ordenaron en dos grupos en función de si se detectó o no el patógeno, y se realizó un análisis de varianza. Se utilizó el análisis de Kruskal Wallis dado que los datos no se distribuyeron normalmente.

Por último, simultáneamente con la utilización del medio MSCM, se sembró en un nuevo medio de cultivo semiselectivo desarrollado por Ftayeh *et al.* (2011) BCT, que permitiría una mayor eficiencia de recuperación del patógeno combinada con una mayor selectividad. Este medio se utilizó en las últimas determinaciones de los ensayos de 2011 y 2012. Dado que en nuestro país no se dispone de los fungicidas del medio original (epoxiconazole y fenpropimorf), se sustituyeron por cicloheximida. El medio BCT modificado (MBCT) contiene por litro: 15 g agar, 2,5 g manitol, 0,6 g ácido bórico, 0,1 g MgSO₄-7H₂O, 0,1 g KH₂PO₄, 1,0 g K₂HPO₄, 0,05 g NaCl, 2,0 g extracto de levadura, 0,015 g MnSO₄-H₂O, 0,015 g FeSO₄-7H₂O, 20 mg ácido nalidíxico (disuelto en 1 ml de NaOH 0,01 N), 100 mg trimetoprim, 20 mg sulfato de polimixina B (8,120 IU/mg), 20 mg cicloheximida (disuelta en 1 ml de metanol absoluto).

I.3 RESULTADOS

En todos los ensayos, la proporción de muestras positivas y la concentración de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* se redujeron con el tiempo. La persistencia en los rastrojos fue mayor en invierno que en verano y en los restos dejados en la superficie del suelo que en los enterrados. El patógeno fue capaz de sobrevivir en raíces.

I.3.1 Supervivencia en invierno

En los tres años del experimento se determinaron tiempos de supervivencia de 120 a 260 días en tejidos dejados en superficie, según el año (Cuadro I.1), mientras que en tallos enterrados este período fue un 70 – 75 % menor, fluctuando entre 30 y 75 días. En raíces en descomposición se detectó el patógeno en dos de los tres años, a los 45 y 75 días en 2010 y 2011, respectivamente. Llamativamente, en ninguno de estos años se detectó el patógeno en el recuento inicial en raíces (Cuadro I.1).

I.3.2 Supervivencia en verano

En los ensayos de verano las concentraciones iniciales del patógeno fueron siempre más altas que en invierno (Cuadro I.2). En el ensayo 2009-2010 se aisló el patógeno a los 30 días en uno de seis tallos y en tres de seis pecíolos. A los 75 días ya no se pudo aislar el patógeno en ninguna muestra de pecíolos o tallos. En las raíces, en la medición inicial, se aisló la bacteria en cuatro de las siete raíces analizadas, procedentes de plantas con comprobada alta concentración bacteriana en tallos y pecíolos; pero a los 75 días no se logró aislar el patógeno en ninguna de las siete muestras. En 2010-2011 no se recuperó el patógeno de tallos a los 75 días, partiendo de concentraciones iniciales de 10^{10} UFC g^{-1} (datos no aparecen en Cuadro I.2). En 2011-2012 la supervivencia en tallos en

superficie fue de al menos 75 días, mientras que en pecíolos no pudo aislarse a los 30 días (Cuadro I.2).

Cuadro I.1: Supervivencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en invierno en diferentes tejidos (tallos, pecíolos, raíces) y condiciones (enterrado o sobre la superficie del suelo) en invernadero. Se indica la proporción de muestras positivas (Prop.) y la concentración bacteriana promedio de las muestras positivas (Conc.) expresado como Log_{10} UFC g^{-1} de peso seco, para cada rango de tiempo en el que se realizaron determinaciones. Para los datos de concentración se indica el error estándar en cursiva a la derecha.

	Tallos enterrados		Tallos en superficie		Pecíolos		Raíces	
	Prop.	Conc.	Prop.	Conc.	Prop.	Conc.	Prop.	Conc.
<i>2009</i>								
Inicial	3/3	7,8 <i>0,56</i>	5/6	7,9 <i>0,32</i>	-	-	4/6	6,7 <i>0,45</i>
30 a 45	1/3	6,8	- ²	-	-	-	0/6	-
60 a 75	0/3	-	3/6	4,9 <i>1,42</i>	-	-	-	-
105 a 120	-	-	1/6	7,6	-	-	-	-
150 a 165	-	-	1/6	7,3	-	-	-	-
<i>2010</i>								
Inicial	5/5	10,4 <i>0,21</i>	5/5	10,4 <i>0,21</i>	6/6	9,5 <i>0,74</i>	0/7	-
30 a 45	1/5 ¹	7,1	-	-	-	-	1/7	6,7
60 a 75	-	-	-	-	-	-	0/2	-
105 a 120	0/5	-	1/5	5,0	0/6	-	-	-
150 a 165	-	-	0/5	-	0/6	-	-	-
<i>2011</i>								
Inicial	6/6	10,2 <i>0,11</i>	6/6	10,2 <i>0,11</i>	6/6	10,9 <i>0,71</i>	0/7	-
30 a 45	3/6	6,2 <i>0,19</i>	-	-	6/6	8,7 <i>0,15</i>	1/3	6,5
60 a 75	2/6	6,6 <i>0,21</i>	2/6	7,5 <i>0,46</i>	-	-	1/3	5,7
150 a 165	0/6	-	1/6	6,8	3/6	7,0 <i>0,33</i>	0/3	-
245 a 260	-	-	1/6	7,2	2/6 (3/3) ³	8,1 <i>1,05</i>	-	-
335 a 350	-	-	0/2 (0/1)	-	0/3 (0/3)	-	-	-

¹ Esta medición corresponde a los 30 días; a los 45 días las cinco muestras fueron negativas.

² -: Sin dato.

³ Valores entre paréntesis: determinaciones con el medio de cultivo MBCT.

Cuadro I.2: Supervivencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en verano en tallos y pecíolos dejados sobre la superficie del suelo en invernadero. Se indica la proporción de muestras positivas (Prop.) y la concentración bacteriana promedio de las muestras positivas (Conc.) expresado como Log_{10} UFC g^{-1} , para cada rango de tiempo en el que se realizaron determinaciones. Para los datos de concentración se indica el error estándar en cursiva a la derecha.

	Tallos		Pecíolos	
	Prop.	Conc.	Prop.	Conc.
2009-2010				
Inicial	6/6	10,7 <i>0,14</i>	6/6	10,6 <i>0,17</i>
30 a 45	1/6	7,6	3/6	8,2 <i>1,21</i>
60 a 75	0/6		0/6	
2011-2012				
Inicial	6/6	10,8 <i>0,15</i>	6/6	10,3 <i>0,21</i>
30 a 45	5/5 (4/5) ¹	7,7 <i>0,29</i>	0/5	
60 a 75	1/5 (0/5)	7,3	0/5 (0/3)	
150 a 165	0/5 (0/5)		- ²	

¹ Valores entre paréntesis: determinaciones con el medio de cultivo MBCT.

² -: Sin dato.

I.3.3 Efecto de la estación del año y la ubicación del rastrojo en el suelo sobre el tiempo de supervivencia

El período de supervivencia del patógeno fue menor en rastrojos provenientes de un ciclo de producción de invierno-primavera que en los provenientes de un ciclo estival, así como en los tejidos enterrados que en los dejados en superficie. En la Figura I.1 se presenta un esquema (elaborado a partir de los Cuadros I.1 y I.2) que indica las diferencias en los tiempos de supervivencia según el tratamiento.

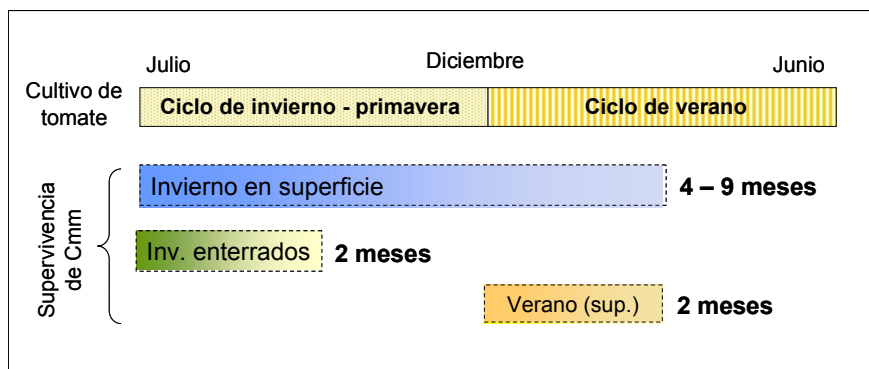


Figura I.1: Esquema representando dos ciclos de producción anuales de tomate bajo invernáculo y el tiempo de supervivencia del patógeno en tejidos dejados en invierno sobre la superficie del suelo o enterrados y para aquellos dejados en superficie en verano. Gráfico elaborado con los datos de los cuadros I.1 y I.2; se redondearon a meses los resultados del tiempo de supervivencia.

En concordancia con estos resultados, el ABCPB fue menor para los tallos enterrados que para los dejados en superficie, lo que evidencia una menor supervivencia del patógeno bajo esas condiciones (Kruskal Wallis; valor-p = 0,013) (Figura I.2).

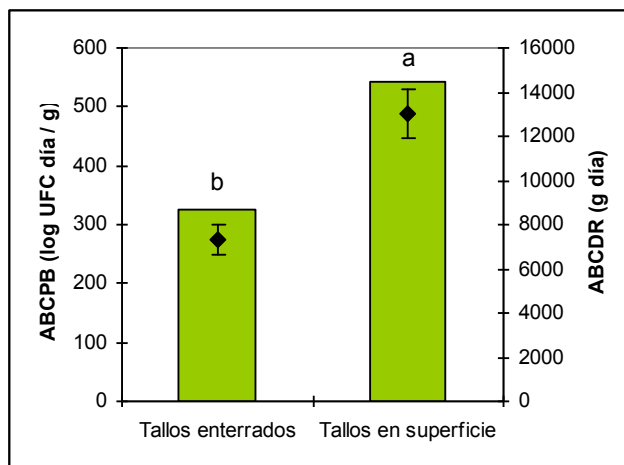


Figura I.2: Comparación de la supervivencia del patógeno y descomposición de tallos enterrados y en superficie (ambos en invierno). Las columnas indican el área bajo la curva de la población bacteriana (ABCPB). Los rombos negros indican el área bajo la curva de descomposición del rastrojo (ABCDR), las barras representan el error estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre tratamientos para ambas variables.

Se observó una interacción significativa entre la estación de cultivo (invierno y verano) y el tipo de rastrojo (peciolo o tallo) dejado en superficie para el ABCPB (valor $p = 0,031$). Los pecíolos en invierno presentaron un ABCPB significativamente mayor a la de tallos y pecíolos en verano y a la de tallos de invierno. A pesar de no ser significativa, se observa también para tallos una tendencia a una mayor ABCPB en invierno que en verano (Figura I.3).

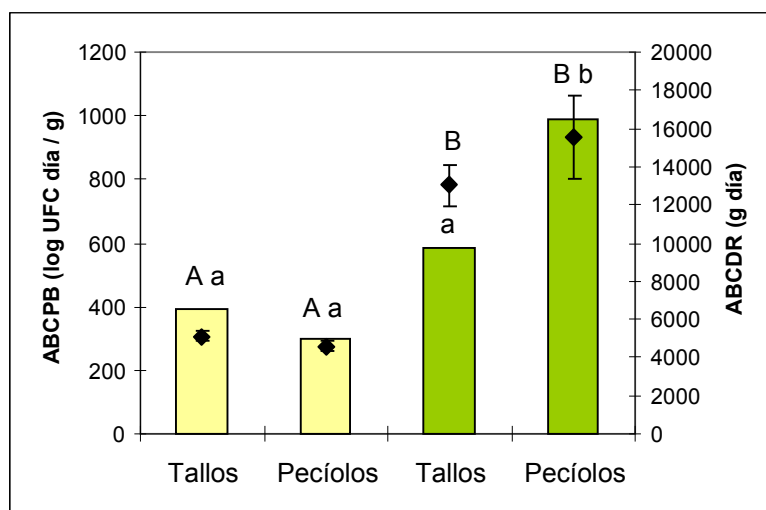


Figura I.3: Comparación de la supervivencia del patógeno y descomposición de tallos y pecíolos dejados en superficie en verano (amarillo) y en invierno (verde). Las columnas indican el área bajo la curva de la población bacteriana (ABCPB). Los rombos negros indican el área bajo la curva de descomposición del rastrojo (ABCDR), las barras representan el error estándar. Letras diferentes minúsculas y mayúsculas representan diferencias significativas para ABCPB y ABCDR, respectivamente.

I.3.4 Relación entre supervivencia del patógeno y la descomposición del rastrojo

El patrón de descomposición de los rastrojos fue diferente según la época del año y la ubicación de los tejidos en el suelo. Los rastrojos dejados en superficie tardaron más en descomponerse en los ensayos iniciados en invierno que en aquellos que se iniciaron en verano, si bien en estos últimos se encontró una mayor variabilidad. Por otro lado, en los ensayos de invierno, los tejidos enterrados se descompusieron más rápidamente que

los dejados en superficie (Figura I.4). Asimismo, los tallos en superficie tuvieron un ABCDR mayor que los enterrados (valor $p < 0,001$), lo que da cuenta de una descomposición más rápida de los segundos (Figura I.2). Por otro lado, al comparar pecíolos y tallos en invierno o verano, se determinó una mayor ABCDR en invierno que en verano (valor $p < 0,001$) y no hubo interacción ni diferencias significativas entre pecíolos y tallos (Figura I.3). El patrón de respuesta de esta variable de descomposición de los rastrojos fue similar a la del ABCPB.

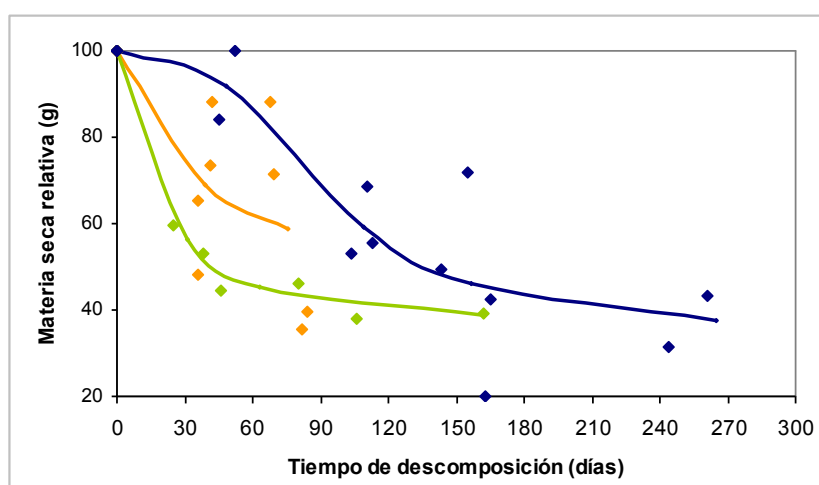


Figura I.4: Evolución de la materia seca relativa (g) de los tejidos de tomate en función del tiempo de descomposición para tejidos enterrados en invierno (verde) y dejados en superficie en invierno (azul) y en verano (naranja). Se indican los promedios de las repeticiones de cada fecha de determinación (rombos) y líneas suavizadas de promedios de cada tratamiento.

Se determinó una correlación positiva entre el Log_{10} ABCPB y el Log_{10} ABCDR (valor- $p < 0,001$; $R^2 = 0,42$) lo que da cuenta de que la supervivencia del patógeno fue mayor cuando el rastrojo tardó más en descomponerse (Figura I.5). Por otra parte, la tasa relativa de mortalidad bacteriana y la de descomposición del rastrojo también presentaron una correlación positiva, tanto cuando se analizaron todos los datos juntos

(valor-p = 0,0012) como cuando se analizaron solamente los datos de tejidos enterrados (valor-p = 0,0154) (Figura I.6).

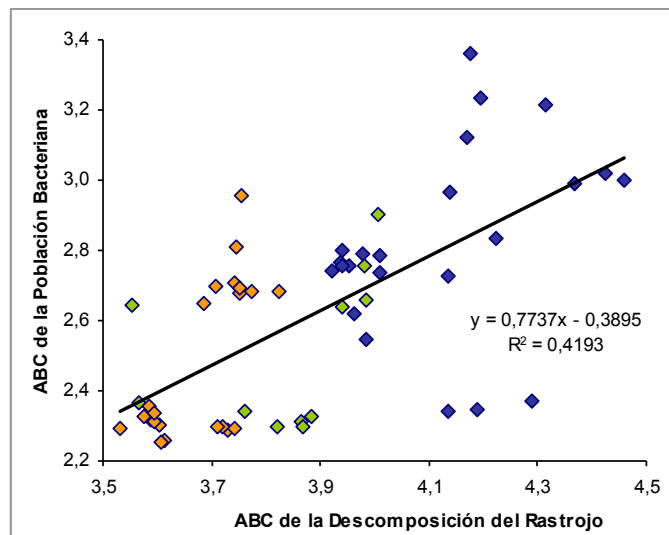


Figura I.5: Relación entre el área bajo la curva (ABC) de la población bacteriana y la de descomposición del rastrojo. A ambas variables se les aplicó una transformación logarítmica (Log_{10}). En verde datos de tallos enterrados, en azul tallos y pecíolos en superficie y en naranja datos de verano.

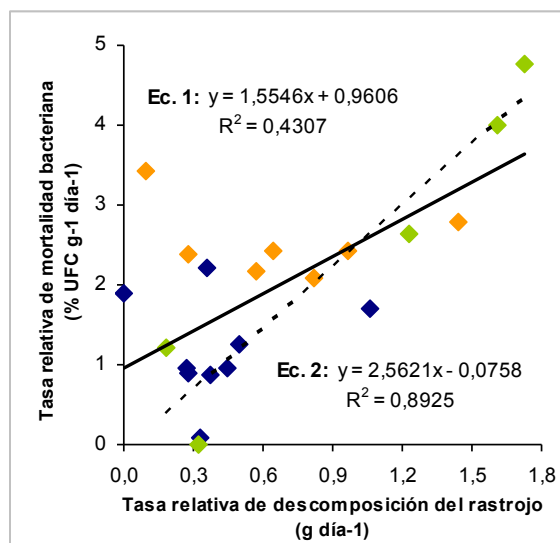


Figura I.6: Tasa relativa de mortalidad bacteriana ($\% \text{UFC g}^{-1} \text{día}^{-1}$) en función de la tasa relativa de descomposición del rastrojo (g día^{-1}). En verde datos de tallos enterrados, en azul tallos y pecíolos en superficie y en naranja datos de verano. Se presentan la línea de tendencia, ecuación y coeficiente de regresión de todos los datos (línea llena y ecuación 1) y solo de los datos de tejidos enterrados (línea punteada y ecuación 2).

I.3.5 Corroboración de los resultados del tiempo de supervivencia

Al comparar los métodos de detección *in vitro* e *in vivo* se observó que en la mayoría de los casos coincidieron, exceptuando tres de 27 determinaciones: dos de ellas fueron negativas con el método *in vivo* pero positivas con el método *in vitro* y con otra determinación ocurrió a la inversa (Cuadro I.3).

Cuadro I.3: Comparación entre los métodos *in vitro* e *in vivo* para diferentes tejidos. Se indica tiempo de descomposición del rastrojo evaluado (días), proporción de muestras positivas (Prop.), concentración bacteriana promedio (\log_{10} UFC g^{-1}) de las muestras positivas (Conc.).

	Tiempo	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
		Prop.	Conc.	Prop.	Severidad
Tallos enterrados	75	2/6	6,6	2/6*	- ¹
Raíces	155	0/3		0/3	
Pecíolos	155	3/6	7,0	3/6	56 %
Tallos en superficie	155	0/6		0/6	
Tallos c/Cmm ²	155	6/6	6,0	5/6	87 %
Total		11/27		10/27	

(*) Una de las dos muestras no fue coincidente entre métodos.

¹ -: Sin dato.

² Tallos a los que se les agregó una suspensión del patógeno.

Cuando se sembró el patógeno en placas de dilución suspendido en agua destilada estéril, el recuento fue de casi dos órdenes de magnitud mayor que cuando creció suspendido en el macerado de tallos, pasando de 10^7 UFC ml^{-1} a 10^5 UFC ml^{-1} (valor-p = 0,0001).

Al comparar la cantidad de saprófitos en las placas en las que se pudo o no aislar *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, no se encontraron diferencias (análisis de Kruskal Wallis, valor p = 0,0646), si bien se observó una tendencia a un promedio y una mediana de saprófitos mayor en las placas donde no se pudo aislar al patógeno (Cuadro I.4).

Cuadro I.4: Comparación de la cantidad de saprófitos (UFC placa⁻¹) en placas con resultado positivo y negativo para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* del ensayo de invierno de 2011. Se indica promedio, mediana y número de placas analizadas (N).

Resultado	N	Promedio	Mediana
Negativo	20	1840	1360
Positivo	10	842	862

El resultado obtenido con el medio MSCM fue corroborado cuando se utilizó simultáneamente el medio MBCT (Cuadro I.1). En este último medio las colonias de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* fueron más claramente distinguibles de las de los saprófitos debido a un mayor tamaño de la colonia, tal como informaron Ftayeh *et al.* (2011).

I.4 DISCUSIÓN

Los tiempos de supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* determinados en rastrojos de plantas de tomate cultivadas bajo cubierta del cinturón verde de Buenos Aires – La Plata resultaron similares a los menores registrados por otros autores en cultivos conducidos a campo en otras regiones del mundo. En nuestras condiciones, el patógeno fue aislado en los ensayos iniciados en invierno hasta los 120-260 días en tallos o pecíolos dejados sobre la superficie del suelo, dependiendo del año. Estos períodos son similares a los observados en dos localidades en Marruecos, donde la supervivencia fue de 132 y 194 días (Fatmi y Schaad, 2002). En diversas localidades de EE.UU. se determinaron tiempos de supervivencia mayores, de 7 a 24 meses (Chang y Pataky, 1992; Fatmi y Schaad, 2002; Gleason *et al.*, 1991); en esos casos se dieron por

finalizados los experimentos cuando aún se detectaba al patógeno en los rastrojos, por lo cual la supervivencia fue posiblemente mayor.

La ubicación de los rastrojos en el suelo tuvo efecto sobre la supervivencia del patógeno, lo cual se evidenció en un período más corto y un ABCPB significativamente menor en tallos enterrados que en los dejados en superficie. Según el año, la bacteria se aisló hasta los 45-75 días en restos enterrados, períodos similares a los encontrados en Marruecos (Fatmi y Schaad, 2002), donde los tiempos de supervivencia de tallos en superficie fueron dos a tres veces mayores. En regiones donde la bacteria sobrevivió en superficie más tiempo que en nuestras condiciones también hubo diferencias con respecto a tejidos enterrados. En el estado de Iowa (EE.UU.) se detectó *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Rif⁺) hasta los 180 días en hojas y tallos enterrados, mientras que en tejidos en superficie este período se extendió al menos hasta los 730 días (Gleason *et al.*, 1991). En California y Ohio, el patógeno se aisló en tejidos en superficie en la última determinación a los 314 días, pero en tallos enterrados solo hasta los 180-240 días en el primer sitio, y 240-314 días en el segundo (Fatmi y Schaad, 2002). En Illinois, la concentración bacteriana en tallos enterrados fue de alrededor de un orden de magnitud menor que en los de superficie, en todas las fechas de medición (Chang y Pataky, 1992).

La diversidad en condiciones ambientales presentes en otras regiones del mundo donde se realizaron determinaciones de supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en restos culturales (Cuadro I.5), podría explicar las diferencias entre los tiempos de supervivencia del patógeno en nuestras condiciones y los informados para Ohio, Illinois, Iowa o California. Las temperaturas son más altas en nuestra zona de estudio, lo cual podría reducir la supervivencia del patógeno. En el norte de la región central de EE.UU. (Iowa, Illinois y Ohio) los suelos permanecen congelados durante

algún período del año, y se ha demostrado que bajo esas condiciones la población del patógeno se reduce muy poco (Basu, 1970). En este sentido, también es importante considerar que nuestros ensayos fueron realizados en invernadero, donde la temperatura tiende a ser mayor que a campo. Esta hipótesis se refuerza cuando comparamos nuestros resultados con los de Marruecos, donde las condiciones ambientales son similares, no solo de temperatura sino también de humedad. En nuestros ensayos los rastrojos no fueron regados y estaban protegidos de la lluvia por el techo del invernadero, mientras que en los sitios de Marruecos las precipitaciones son marcadamente inferiores a las de las otras localidades. Estas condiciones de baja humedad podrían haber afectado la supervivencia del patógeno. Sin embargo, otros autores que evaluaron la supervivencia con contenidos hídricos variables en el suelo, no observaron diferencias significativas, o las mismas fueron de una importancia mucho menor que la temperatura (Basu, 1970; Moffett y Wood, 1984).

En los sistemas de producción bajo cubierta de nuestra zona de estudio, donde se realizan dos ciclos de cultivo por año, las condiciones ambientales a las que serán expuestos los rastrojos dependerán del momento en que finalice el cultivo. Los cultivos que se inician en julio/agosto finalizan en diciembre, por lo que los tejidos serán expuestos a temperaturas estivales, mientras que la campaña que inicia en diciembre/enero terminará en invierno. Esta situación particular marca una diferencia con respecto a los estudios encontrados en la literatura, los cuales siempre fueron realizados en sistemas productivos a campo, donde los cultivos finalizan su ciclo cuando ha pasado la estación cálida. Por esta razón, los datos de dichos estudios serían comparables con nuestros ensayos de invierno, pero no con los de verano.

Cuadro I.5: Condiciones ambientales y tiempos de supervivencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en diferentes localidades. Se indica para cada caso si se utilizaron cepas naturales o cepas resistentes a rifampicina (rif^R) o a sulfato de estreptomocina (estrep^R). Entre paréntesis: determinaciones que no se continuaron luego de la última determinación positiva. Los datos de temperatura son medias anuales, excepto los de verano de Argentina. Las precipitaciones son medias del total anual.

Lugar/país	Condiciones ambientales			Supervivencia (días)		Cepas	Referencias
	Precip. (mm)	T. min. (°C)	T. max. (°C)	Tallos en superficie	Tallos enterrados		
California (EE.UU.)	500	4 - 7	24 - 27	(314)	180-240	naturales	Fatmi y Schaad (2002)
Ohio, (EE.UU.)	900	4 - 7	15 - 18	(314)	240-(314)	naturales	Fatmi y Schaad (2002)
Illinois (EE.UU.)	900	5 - 7	16 - 18	(196-210)	(196-210)	rif ^R	Chang y Pataky (1992)
Iowa (EE.UU.)	900	0 - 4	10 - 15	(730)	180**	rif ^R	Gleason <i>et al.</i> (1991)
Queensland (Australia)	1200	14 - 17	24 - 27	-	90-210 †	estrep ^R	Moffett y Wood (1984)
Ait Melloul (Marruecos)	200	11 - 13	27 - 29	132-194	60	naturales	Fatmi y Schaad (2002)
Melk Zahr (Marruecos)	200	12 - 14	21 - 23	132-194	60*	naturales	Fatmi y Schaad (2002)
Bs.As. (Arg.) Invierno	1000	10 - 12	22 - 24	120-260	45-75	naturales	Este trabajo
Bs.As. (Arg.) Verano	1000	16 - 18	26 - 30	45-75	-	naturales	Este trabajo

† Datos de dos tipos de suelo diferentes.

Se indicó con asterisco (*) cuando no se pudo aislar luego de la última determinación porque se encontró inhibición al crecimiento del fitopatógeno en las placas, o doble asterisco (**) cuando esto se debió a una alta contaminación con otros microorganismos. Los datos climatológicos se obtuvieron de la institución oficial de cada país (Marruecos: *Maroc Météo*: www.marocmeteo.ma; Australia: *Bureau of Meteorology*: www.bom.gov.au; EE.UU.: National Atlas: www.nationalatlas.gov; Argentina: Servicio Meteorológico Nacional: www.smn.gov.ar). Cuando no se contó con información de la localidad donde se realizaron los estudios, se presentaron los datos de la ciudad más cercana.

De acuerdo a nuestros resultados, en invierno el tiempo de supervivencia y las poblaciones bacterianas tendieron a ser mayores que en verano. El ABCPB fue mayor en pecíolos de invierno que en los de verano; la misma tendencia se observó en los tallos. En verano, el período de supervivencia en tejidos en superficie fue menor al de los ensayos de invierno, y también al determinado por otros autores en otras regiones en

sistemas de cultivo a campo. Estas evidencias sugieren que la temperatura jugaría un rol importante en el tiempo de supervivencia de la bacteria.

A partir de los datos de diferentes sitios geográficos, sumados a los de verano e invierno de este trabajo, se determinó una correlación negativa entre el promedio de las temperaturas mínima y máxima de cada lugar y el tiempo promedio de supervivencia del patógeno en rastrojos, tanto para aquellos dejados sobre la superficie del suelo como para los enterrados (Figura I.7). El análisis de regresión resultó significativo para tejidos dejados en superficie (previa transformación de los datos de supervivencia aplicando \ln ; valor-p = 0,0031) y para los enterrados (valor-p = 0,0413). Esto sugiere que la temperatura media podría ser una buena variable predictora del tiempo de supervivencia del patógeno en rastrojos. El menor coeficiente de regresión de tallos enterrados (con respecto a los dejados en superficie) podría deberse a que el tipo de suelo o la actividad de microorganismos o de invertebrados tienen una mayor importancia en esas condiciones, aumentando la variabilidad de los resultados.

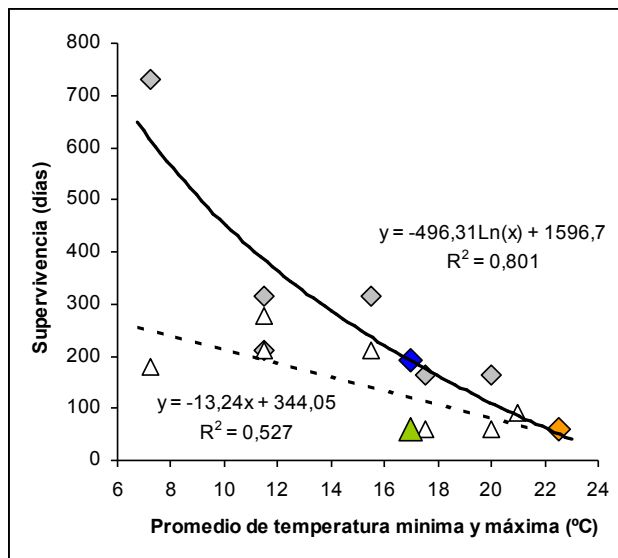


Figura I.7: Supervivencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tejidos dejados sobre la superficie del suelo (rombos) o enterrados (triángulos) en función de la temperatura media para diferentes sitios geográficos. Elaboración en base al Cuadro I.5. Rombos azul y naranja: datos propios de ensayos iniciados en invierno y verano, respectivamente. Triángulo verde: dato propio de tejidos enterrados en invierno. Se presentan las líneas de tendencia, ecuación y coeficiente de regresión para tejidos en superficie (línea llena) y enterrados (línea punteada).

Si bien la temperatura estaría relacionada con las diferencias observadas en la supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* entre épocas del año o entre localidades, esta variable también tiene un efecto sobre la descomposición de los restos del cultivo, así como sobre la actividad de los microorganismos e invertebrados del suelo. Para otras bacterias fitopatógenas se sugirió que la supervivencia estaría asociada con la tasa de descomposición del rastrojo (De Boer, 1982). En nuestros ensayos encontramos evidencias a favor de que estas variables también estarían relacionadas para el caso de la supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Se encontró una correlación significativa en el análisis de regresión lineal entre el ABCPB y el ABCDR: cuando los rastrojos tardaron más en descomponerse, mayor fue la supervivencia de las poblaciones bacterianas. En la Figura I.5 se observa además que los resultados de ensayos de verano se ubican en valores bajos de ambas variables,

mientras que para los valores de ensayos de invierno ocurre al contrario. Esto es coherente con los análisis de varianza realizados del ABCDR para diferentes tratamientos, en tanto que el patrón de respuesta de esta variable fue llamativamente similar al del ABCPB (Fig. I.2 y I.3). Por último, también se encontró una correlación positiva significativa entre las tasas relativas de mortalidad bacteriana y de descomposición del rastrojo. En este caso, cabe señalar que los valores de rastrojos enterrados son los que parecen responder más claramente a esta relación, mientras que los de los rastrojos dejados en superficie (en verano o invierno), no parecen depender de la tasa de descomposición del rastrojo (Fig. I.6). La tasa de mortalidad en verano parecería más bien constante e independiente de la tasa de descomposición, mientras que los rastrojos dejados en superficie en invierno tendieron a tener menores tasas de mortalidad que los de ensayos de verano, a pesar de ubicarse en el mismo rango de tasas de descomposición del rastrojo (Fig. I.6). Posiblemente esto se deba a que la mortalidad bacteriana en determinadas condiciones dependa más de otra variable ambiental, como la temperatura, que de la descomposición en sí misma. Esto mismo explicaría, al menos parcialmente, el bajo coeficiente de regresión (R^2) entre ABCPB y ABCDR, lo cual restringe el uso de esta última variable como única predictora de la supervivencia del patógeno.

Diferentes procesos podrían explicar que una mayor tasa de descomposición del rastrojo acelerara la mortalidad del fitopatógeno. La desintegración de tejidos reduce la disponibilidad de sustrato donde la bacteria es capaz de sobrevivir con mayor facilidad (tejidos de su hospedante). La comunidad microbiana que se desarrolla en tejidos en descomposición podría tener un efecto antagonista sobre el patógeno. Diferentes comunidades del suelo podrían modificar la relación entre la descomposición del rastrojo y la mortalidad bacteriana. Además de un efecto indirecto de la actividad

biológica sobre la tasa de descomposición de los restos culturales, también podría haber un efecto directo de supresividad por parte de los microorganismos del suelo, que podría ser diferente bajo diferentes condiciones ambientales e historia de uso del suelo. En ensayos en los que se comparó el efecto de la adición de compost al sustrato, Yogeve *et al.* (2009) detectaron que el área bajo la curva de progreso de la enfermedad fue significativamente reducida con respecto a otro sustrato con perlita o turba. La evaluación de la supervivencia del patógeno en el sustrato evidenció la misma tendencia, luego de 20 días no se pudo aislar el patógeno del sustrato con compost, mientras en los otros sustratos sobrevivió durante todo el período evaluado.

Con el tiempo, la proporción de muestras positivas disminuyó y el título bacteriano se redujo con respecto a la concentración inicial. Las últimas determinaciones positivas tuvieron valores similares a las de otros autores, que fluctuaron entre 10^4 y 10^7 UFC g^{-1} (Fatmi y Schaad, 2002, Chang y Pataky, 1992; Gleason *et al.*, 1991). La proporción de muestras positivas no fue informada en otros trabajos, por lo que se desconoce si la variabilidad de estos datos está asociada a diferencias en la concentración bacteriana en las muestras positivas o si la misma es un promedio que incluye muestras negativas y positivas. Por otro lado, también se ha detectado variabilidad en la supervivencia del patógeno entre años para un mismo tipo de tejido, como ocurrió por ejemplo con el tiempo de supervivencia en tallos dejados en superficie en invierno, que fue de 120 días en 2010 y de 260 días en 2011. Estas diferencias entre repeticiones o entre años para un mismo tejido podrían deberse a diferentes fuentes de variabilidad no controladas: a) las cepas naturales pueden presentar diversidad en su capacidad de sobrevivir en rastros, b) las comunidades microbianas evolucionan de forma diferente en las diferentes plantas, años o tejidos, ya sea por diferencias en las comunidades epífitas o de endófitos de las muestras o de diferencias en micrositios del suelo, c) diferencias ambientales

entre años en lo que respecta a temperatura o humedad, d) variabilidad en las cepas naturales en su capacidad de competir con la microflora que crece *in vitro* en el medio de cultivo utilizado, e) interacciones entre estos factores. En nuestro caso, esta variabilidad no estaría asociada a diferencias en la eficiencia de cultivo en el medio utilizado, dado que siempre se corroboró el crecimiento de la cepa de cada planta apenas fueron traídas las muestras del campo.

En los ensayos realizados en 2009 y 2010 se encontraron altas concentraciones de otros microorganismos en algunas muestras. Aún conociendo la forma, color y textura características de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en el medio utilizado, existe la posibilidad de tener falsos negativos, dado que la concentración del patógeno y la de saprófitos determina si se dan procesos de inhibición o si se reduce la probabilidad de encontrar el patógeno (Ftayeh *et al.*, 2011). Con el medio de cultivo BCT, Ftayeh *et al.* (2011) lograron aislar 8 UFC de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* entre 12.750 UFC de saprófitos o 58 UFC entre 18.000 saprófitos en placas sembradas desde macerados de plantas. En estas condiciones extremas, ninguno de los otros medios de cultivo utilizados en los métodos de detección de rutina (incluyendo el mSCM) permitió detectar el patógeno. En nuestros ensayos, utilizando el medio MSCM muchas veces se encontraban cepas de aspecto similar a las de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, por lo que siempre se hicieron al menos 30 repiques de cada repetición de las colonias sospechosas, a los efectos de reducir la probabilidad de falsos negativos. Posiblemente, haber tomado esas precauciones permitió que en nuestro caso los resultados obtenidos con el medio MSCM fueran similares a los del método *in vivo* y a los del medio MBCT. Sin embargo, aún pueden darse falsos negativos por efecto de inhibición del crecimiento. Cuando se compararon las concentraciones del fitopatógeno solo y con el agregado de la suspensión de rastros, se encontró una diferencia significativa de más

de un orden de magnitud. Si bien este efecto no fue lo suficientemente fuerte para inhibir totalmente el crecimiento del fitopatógeno, una reducción en las UFC por placa conlleva una subestimación de la concentración del patógeno en tejidos y un aumento en la probabilidad de falsos negativos, dado que la sensibilidad en la detección de los medios de cultivo semiselectivos depende de la cantidad de saprófitos y la concentración de la fitobacteria (Ftayeh *et al.*, 2011). La presencia de inhibición ya había sido detectada por Fatmi y Schaad (2002) en Marruecos, donde la bacteria no creció en placas sembradas con la suspensión de restos culturales mientras que en las placas control creció normalmente. Posteriormente, Ftayeh *et al.* (2011) encontraron cepas de saprófitos que *in vitro* resultaron antagonistas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. El efecto de inhibición depende de muchos factores no controlados: la concentración de saprófitos, la del patógeno, la identidad de los saprófitos (antagonistas o no), por lo que es difícil determinar si este efecto pudo haber sido significativo en todas las mediciones o su magnitud. Sin embargo, este efecto no parece haber sido lo suficientemente importante para alterar las determinaciones del tiempo de supervivencia. Casi todas las muestras en las que se compararon ambos métodos (*in vitro* e *in vivo*) arrojaron resultados similares y fueron coherentes entre sí, por lo cual no existen evidencias para afirmar que un método sea más sensible que el otro. Asimismo, al utilizar el medio MBCT, los resultados encontrados fueron similares y consistentes con los de los otros métodos. Las diferencias en los resultados obtenidos entre el medio MBCT y el MSCM podrían atribuirse a que no se utilizó el fungicida recomendado en la formulación original. Finalmente, en el ensayo de 2011 no se encontraron diferencias significativas en la concentración de saprófitos entre las muestras que arrojaron resultados positivos y negativos, lo cual es una forma indirecta (si bien no concluyente) de demostrar que en la detección del patógeno no interfiere la presencia y concentración

de microorganismos saprófitos, al menos en las concentraciones presentes en este trabajo.

En la bibliografía no se encontraron referencias sobre la supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en raíces. En invierno de 2010 y 2011, la bacteria sobrevivió en raíces enterradas hasta los 45 y 75 días respectivamente, tiempos similares a la de tallos enterrados. En nuestra zona de estudio, cuando se realizan los trasplantes, las raíces de los plantines pueden quedar cerca de las raíces remanentes del cultivo anterior, por lo que la tasa de transmisión del patógeno por este medio al nuevo cultivo podría ser alta. Es llamativo que en las mediciones iniciales de raíces no siempre se pudo aislar el patógeno (a pesar de que en todos los ensayos se partió de plantas con altas concentraciones bacterianas iniciales en tallos y pecíolos). Esto sugiere que en condiciones naturales el patógeno no llegaría a alojarse en todas las raíces adventicias, o que las concentraciones son más bajas que en otros tejidos, reduciéndose así las chances de ser detectado. Por otra parte, una mayor variabilidad en la distribución del patógeno en las raíces también podría explicar que algunas determinaciones fueran negativas inicialmente pero positivas en las subsiguientes. Por último, a diferencia de la parte aérea, en las raíces ya se parte de muestras que están en contacto con altas poblaciones de saprófitos, aumentando la probabilidad de falsos negativos. Esto mismo podría explicar por qué en los ensayos de invierno y verano de 2009, no se pudo volver a aislar el patógeno, a pesar de haber obtenido determinaciones iniciales positivas, en algunos casos con altas concentraciones.

I.5 CONCLUSIONES

Los rastrojos de plantas de tomate infestadas con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* constituyen un sustrato favorable para la supervivencia de este patógeno. En invernaderos de la zona de Bs. As. – La Plata su supervivencia en rastrojos fue mayor en invierno que en verano, y en rastrojos dejados en la superficie del suelo que en los enterrados. Se determinó que el período mínimo de supervivencia fue de 30 - 75 días tanto para los restos enterrados en invierno como para aquellos dejados en la superficie en verano. La supervivencia máxima fue de 260 días, lo que correspondió a los rastrojos dejados en la superficie del suelo en invierno. La bacteria puede sobrevivir también en las raíces de plantas enfermas, por un tiempo similar al de los tallos enterrados.

La persistencia de la bacteria está relacionada negativamente con la descomposición de los rastrojos; la tasa de mortalidad bacteriana se correlacionó positivamente con la tasa de descomposición de rastrojos.

A partir de los datos climáticos de distintas regiones del mundo donde se hicieron estudios de supervivencia de este patógeno, se determinó que el promedio de las temperaturas máximas y mínimas de un lugar es un buen predictor del tiempo de supervivencia del patógeno en los rastrojos.

CAPITULO II

LAS SEMILLAS COMO FUENTE DE INÓCULO PRIMARIO

CAPITULO II: LAS SEMILLAS COMO FUENTE DE INÓCULO PRIMARIO

II.1 INTRODUCCIÓN

Las semillas son una de las principales fuentes de inóculo primario de gran parte de fitopatógenos; muchos hongos, bacterias y virus pueden dispersarse y sobrevivir en las mismas (Neergaard, 1977). Para muchos de estos patógenos se han desarrollado métodos sensibles de detección y técnicas que permiten su erradicación. Sin embargo, para el caso de las bacterias fitopatógenas esta vía de transmisión continúa siendo importante, causando aún importantes pérdidas económicas, a pesar de que, en muchos países, la producción de semillas se ha llevado a zonas áridas o semiáridas, donde no son tan frecuentes las condiciones predisponentes para el desarrollo de las enfermedades. A través de las semillas pueden reaparecer enfermedades en zonas donde se habían erradicado, dispersar patógenos a través de fronteras e introducirlos en áreas donde no existían previamente (Gitaitis y Walcott, 2007). Las bacterias fitopatógenas transportadas por semillas son de particular preocupación, porque a diferencia de los hongos, existen limitadas opciones químicas para su control (Gitaitis y Walcott, 2007). Comenzar un cultivo con semillas sanas es una medida simple y lógica, pero muchas veces muy difícil de alcanzar. El desarrollo de técnicas de detección sensibles, así como los tratamientos de semillas para erradicar o reducir la población del patógeno son aspectos fundamentales para alcanzar este objetivo.

En el caso de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* las semillas son consideradas la principal fuente de inóculo primario, aun cuando esté presente en bajas proporciones (Gleason *et al.*, 1993). Tan solo el 0,01 a 0,05 % de semillas contaminadas han ocasionado epifitias en condiciones propicias (Chang *et al.*, 1991). Constituyen además una importante vía de dispersión del patógeno a largas distancias. Una vez que

las plantas están infectadas, no hay tratamientos de control satisfactorios, por lo que la utilización de semillas libres del patógeno es una medida clave en el manejo de la enfermedad (Fatmi *et al.*, 1991). Si bien se han hecho importantes avances en el desarrollo de métodos de detección replicables y sensibles en los últimos años, aún persisten limitaciones en los métodos disponibles o en los recomendados por organismos internacionales de sanidad de semillas, resultando en falsos negativos y en algunos casos, en falsos positivos. Algunas epifitias recientes ocurrieron en cultivos cuyas semillas fueron certificadas como libres del patógeno (Ftayeh *et al.*, 2011). Por otro lado, las técnicas de desinfección de semillas de tomate han sido evaluadas en general con semillas inoculadas, por lo cual se desconoce el efecto sobre semillas naturalmente infectadas/infestadas. Además, para algunas técnicas de desinfección no se ha probado su efectividad en la erradicación de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

II.1.1 Detección en semillas

En nuestro país una alta proporción de las semillas utilizadas comercialmente son de origen extranjero, de las que se desconoce si están libres de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Por esta razón, las semillas no solo podrían ser la fuente de inóculo de las epidemias en nuestros cultivos comerciales, sino que también constituyen una posible vía de entrada al país de cepas con diferentes niveles de agresividad. Por lo tanto, es necesario determinar la presencia del patógeno en las semillas para alertar sobre los riesgos epidemiológicos en nuestros cultivos comerciales, y recomendar medidas sanitarias para reducir la entrada al país de nuevas cepas y la dispersión del patógeno.

Existen cuatro organizaciones principales que publican métodos estandarizados de sanidad de semillas para uso en el comercio internacional: el *International Seed Testing Association* (ISTA), *International Seed Health Initiative* (ISHI), el *National Seed Health System* (NSHS), y la *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (OEPP). Entre los métodos de detección de fitopatógenos se encuentran los moleculares de amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por la sigla en inglés), métodos serológicos y los de siembra de diluciones en placas con medios semiselectivos. Considerando en forma conjunta el ISTA, el ISHI y el NSHS, de 75 pruebas sugeridas por estos organismos para diferentes patógenos (hongos, virus y bacterias), solo tres se basan en PCR, 13 en inmunología y los otros en técnicas convencionales como microscopía, incubación, plantas indicadoras o siembra de semillas y detección de síntomas en plántulas (Munkvold, 2009).

Una de las principales ventajas de la técnica por PCR es su rapidez para obtener el resultado y la posibilidad de analizar un gran número de muestras por reacción. Sin embargo, una serie de inconvenientes dificultan su adopción: la necesidad de equipos especiales y personal entrenado, la baja calidad del ADN extraído, la presencia de inhibidores de la reacción de PCR en extractos de semillas que pueden llevar a falsos negativos; el pequeño volumen que se puede utilizar partiendo de grandes volúmenes de las muestras de semillas o el set de *primers* utilizado (Munkvold, 2009; Gitaitis y Walcott, 2007; Hadas *et al.*, 2005). Para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* se han desarrollado recientemente métodos de detección basados en PCR, buscando resolver el problema de falsos negativos de los métodos convencionales cuando los niveles de la población del patógeno en o sobre la semilla son muy bajos (Hadas *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados no han sido tan alentadores. En un ensayo comparando técnicas de detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en extractos de semillas a los

cuales se agregaron concentraciones conocidas del patógeno, de León *et al.* (2008) pudieron aislar el patógeno hasta una concentración de 10^2 UFC ml⁻¹ en placas con medio mSCM, pero no lograron detectarlo por PCR directa (sin previa extracción de ADN) en ninguna de las concentraciones testeadas. Algo similar encontraron al intentar aislar el patógeno en extractos de semillas naturalmente infectadas/infestadas: en mSCM aislaron el patógeno en concentraciones tan bajas como 10 UFC ml⁻¹, mientras que por PCR directa no lograron detectarlo.

Diferentes autores han demostrado que varios compuestos derivados de las plantas pueden inhibir la reacción de PCR. Es por ello que las muestras de semillas de tomate deberían ser tratadas para remover o reducir el efecto de esos inhibidores, ya sea a través de la dilución o el calentamiento de las muestras, uso de la técnica de separación inmunomagnética o técnicas de extracción y purificación de ADN (de León *et al.*, 2008). Sin embargo, diferentes métodos de extracción pueden variar en su capacidad para evitar este problema, y por lo tanto alterar la sensibilidad de la detección por PCR. A partir de un extracto de semillas al cual se agregó diferentes concentraciones del patógeno de León *et al.* (2008) lograron detectar el patógeno presente en una concentración de 10^3 UFC ml⁻¹ mediante una extracción de ADN usando el *kit* “Easy-DNA” (Invitrogen), de 10^5 UFC ml⁻¹ con el método de isopropanol, y no lo detectaron cuando la amplificación se realizó sin extracción del ADN. Por otro lado, en suspensiones del patógeno en una solución *buffer*, pudieron detectar el patógeno presente en una concentración de 10^3 UFC ml⁻¹ con los tres tratamientos. No se ha encontrado en bibliografía referencias a la extracción de ADN de semillas de tomate usando *kits* de extracción para muestras de suelo, los cuales podrían eliminar inhibidores y por lo tanto aumentar la sensibilidad del método por PCR.

A pesar de que la técnica por PCR es sensible y teóricamente podría detectar la presencia de una única célula bacteriana, el tamaño de la muestra y el volumen de semillas (por ejemplo 30.000 semillas / litro de *buffer*) utilizados, sumado al pequeño volumen que se usa en la reacción de PCR hace que este método no necesariamente sea más sensible que las otras técnicas (Gitaitis y Walcott, 2007). Por otra parte, se desconoce si los tamaños muestrales utilizados y los umbrales establecidos para otros test de semillas son apropiados para aquellos basados en PCR (Munkvold, 2009), y por último, con las técnicas moleculares también existe la posibilidad de falsos positivos debido a la detección de ADN remanente de propágulos no viables del patógeno (Munkvold, 2009).

Otro problema asociado a la detección por PCR es la selección de los *primers*, ya que existen cepas que pueden ser detectadas por un set de *primers* y no con otro. De 17 cepas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* evaluadas por Hadas *et al.* (2005) que tenían comprobada patogenicidad, tres no amplificaron con los *primers* CM₃ + CM₄ y una tampoco con los *primers* CMM-5+CMM-6. Como se pueden tener falsos positivos o falsos negativos con estos dos sets de *primers*, es necesario usar más de uno (Hadas *et al.*, 2005).

La detección y aislamiento del patógeno por medio de dilución y siembra en placas es complicada cuando la bacteria se encuentra en bajas concentraciones y/o hay alta carga de microorganismos saprófitos asociados a las semillas (de León *et al.*, 2006). Se ha informado que utilizando el medio semiselectivo mSCM se puede detectar una semilla infectada en 10.000. Sin embargo, en diversos laboratorios y en los análisis en la industria de semillas no han observado esta sensibilidad (Hadas *et al.*, 2005). La mayor debilidad de los protocolos propuestos por la EPPO y la ISHI radica en la utilización de medios semiselectivos que fallan en la detección del patógeno en bajas concentraciones

(Ftayeh *et al.*, 2011). Existen varias explicaciones para las diferencias en la sensibilidad del método de detección en placas: a) la utilización de diferentes métodos de extracción, b) la variabilidad en la concentración del patógeno, que generalmente fluctúa entre 10^2 a 10^3 UFC semilla⁻¹ (Hadas *et al.*, 1995; Fatmi *et al.*, 1991), o en la concentración de saprófitos en diferentes lotes de semillas, c) diferencias en la capacidad de crecimiento en diversos medios de cultivo [utilizando cepas de diferentes orígenes, Hadas *et al.* (2005) encontraron que la cepa 4592 no creció en mSCM ni en CNS, pero sí en D₂ANX, mientras que la 4011 no creció en D₂ANX pero sí en mSCM y en CNS]; d) algunos lotes de semillas pueden contener excesiva materia orgánica que aporta nutrientes o factores de crecimiento para el crecimiento de microorganismos que normalmente no crecerían en dicho medio de cultivo (Gitaitis y Walcott, 2007); e) la selectividad de un medio de cultivo no necesariamente es igual para floras de diferentes hábitats (Gitaitis y Walcott, 2007); y f) la condición y la edad de las semillas (Gitaitis y Walcott, 2007). Ftayeh *et al.* (2011) desarrollaron un nuevo medio de cultivo semiselectivo (BCT) que resultó altamente sensible para la detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en condiciones de alta carga de saprófitos: dicho medio permitió recuperar *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, mientras que los otros ocho medios semiselectivos evaluados dieron falsos negativos. Este medio de cultivo parece promisorio para mejorar la sensibilidad del método de siembra de diluciones en placas. Por último, se debe tener en cuenta que el proceso a través del cual las bacterias son extraídas de las semillas puede ser tan importante como la eficiencia de plaqueo o la selectividad del medio de cultivo (Gitaitis y Walcott, 2007). En experimentos realizados por Hadas *et al.* (2005) la molienda de las semillas mejoró la detección del patógeno, mientras que el agregado de un paso por *stomacher* no aumentó la sensibilidad de la detección.

II.1.2 Tratamiento de semillas

De comprobarse la presencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, o de sospecharse que las semillas se encuentran contaminadas, existen diversos tratamientos de desinfección que podrían ser utilizados. Numerosos tratamientos han sido probados en tomate, entre los que se encuentran: a) la desinfección con productos químicos, utilizados a diferentes concentraciones y tiempos de exposición: HCl, acetato cúprico acidificado, hipoclorito de sodio, alcohol, antibióticos; b) fermentación de la pulpa y semillas; y c) tratamientos por calor húmedo o seco (Fatmi *et al.*, 1991; Dhanvantari, 1989). En general, muchos de estos tratamientos han sido probados en experimentos con semillas inoculadas artificialmente, que no representan a las semillas infectadas naturalmente, por lo cual no son recomendables para evaluar estos tratamientos (Fatmi *et al.*, 1991). Cuando se inocula artificialmente es posible que el patógeno se aloje en lugares diferentes a los de una inoculación natural, por lo cual el efecto del tratamiento y/o la posterior recuperación del patógeno podrían ser diferentes. La mayoría de los tratamientos químicos y el de fermentación de la pulpa no fueron totalmente efectivos en la erradicación del patógeno y en algunos casos se encontraron efectos adversos sobre la calidad fisiológica de las semillas (Fatmi *et al.*, 1991; Dhanvantari, 1989). En un material de divulgación del INTA publicado en 2012 se recomienda la utilización de ácido clorhídrico (HCl) 0,6 M por cinco horas para la erradicación del patógeno, pero este tratamiento podría afectar la calidad de semillas. Fatmi *et al.* (1991) determinaron que este procedimiento conlleva a una fuerte reducción de la germinación (alcanzando un poder germinativo de 5 %). Estos resultados enfatizan la necesidad de corroborar que el tratamiento de desinfección de las semillas no altere su calidad fisiológica. Por otra parte, los tratamientos físicos podrían ser una alternativa interesante.

Las técnicas de desinfección de semillas por calor demostraron resultados alentadores y están entre las más citadas para la erradicación de bacterias fitopatógenas (Silva *et al.*, 2002). Sin embargo, la eficiencia del tratamiento en el control del patógeno y la calidad de las semillas varía de acuerdo a la metodología utilizada. Estos tratamientos pueden causar daños fisiológicos, retardando o reduciendo la germinación, y su eficiencia depende en gran parte del tipo de patógeno, su localización y la especie vegetal (Silva *et al.*, 2002). La termoterapia puede ser aplicada por calor húmedo (vapor o agua) o seco. Este último tiene menor capacidad de intercambio de calor que el húmedo, por lo que requiere períodos de exposición mayores. Por otro lado, sería más simple, accesible y, en general, no afectaría fuertemente la germinación, dado que no hay ruptura del tegumento (Silva *et al.*, 2002). Sin embargo, con el tratamiento por calor seco se encontraron resultados divergentes en lo relativo al efecto sobre la calidad de las semillas. Lopes y Rossetto (2004) detectaron que semillas con 96 horas de exposición a 70 °C redujeron su poder germinativo (PG) de 75 % a menos de 60 % en tres variedades diferentes de tomate, pero 48 h de exposición sólo afectaron la germinación en el primer conteo de plántulas emergidas, pero no luego. Silva *et al.* (2002) no detectaron un efecto negativo sobre el poder germinativo con una exposición de 96 horas, pero sí se redujo la germinación en el primer conteo. Estos resultados se contradicen con los de Muniz (2001, citado en Lopes y Rossetto, 2004): la exposición al calor a 70 °C por 15 días no afectó la germinación ni la calidad fisiológica. Estos resultados contradictorios podrían estar relacionados con el contenido hídrico de las semillas: para da Cruz Machado (2000) los efectos de la termoterapia son más perjudiciales a mayor contenido de agua de las mismas: las semillas más secas serían más tolerantes a este tratamiento.

En lo que respecta a la eficiencia de erradicación, el uso de termoterapia por calor seco en general reduce la infección de bacterias fitopatógenas, aunque, presenta resultados

variados (Silva *et al.*, 2002). El tratamiento por calor seco a 70 °C durante 96 h en estufa con circulación forzada de aire erradicó *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en un 100 % y 99,96 % en dos ensayos diferentes (Silva *et al.*, 2002), y con una exposición al calor a 70 °C por 15 días controló hongos como *Alternaria*, *Fusarium* y *Cladosporium* (Muniz, 2001, citado en Lopes y Rossetto, 2004). Se desconoce el efecto de este tratamiento sobre *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

En un ensayo con tratamiento con agua caliente, Fatmi *et al.* (1991) encontraron que el tratamiento de semillas de tomate a 56 °C por 30 minutos y a 52 °C por 20 minutos resultaron efectivos en la erradicación de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pero los efectos sobre la germinación fueron contradictorios: con el método *blotter test* determinaron una diferencia significativa con el tratamiento a 52 °C por 20 minutos (el PG fue menor que el control), mientras que con el método de siembra en suelo, ambos tratamientos con agua caliente tuvieron un PG significativamente mayor que el control. Las diferencias encontradas en los tratamientos térmicos indican la necesidad de que estas técnicas sean evaluadas en condiciones más controladas y con métodos más eficientes de detección (Silva *et al.*, 2002).

II.1.3 Objetivos

Los objetivos de este capítulo fueron: a) comparar dos métodos de detección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas: uno molecular de amplificación de ADN por PCR, utilizando un *kit* de extracción de ADN para suelos, y un método convencional de siembra de diluciones de un extracto de semillas en placas con medio semiselectivo; b) verificar la presencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en

semillas de tomate comercializadas en Argentina, y c) determinar la efectividad de tres tratamientos térmicos de semillas para la erradicación del patógeno y su efecto sobre la calidad fisiológica de las semillas.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1 Comparación de métodos de análisis de semillas

Se comparó el método de siembra de diluciones de un extracto de semillas en placas con el medio semiselectivo MSCM, basado en el mSCM recomendado por organismos internacionales (EPPO, 2005; ISHI, 2005; ISF, 2008) y la técnica de amplificación de ADN por PCR.

Se utilizó un lote de semillas de la variedad ACE55 (Asgrow), consideradas libres de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en base a un análisis preliminar utilizando el método de siembra de diluciones en placas, a las cuales se les agregó diferentes proporciones de semillas inoculadas artificialmente. La inoculación se realizó sumergiendo las semillas en una suspensión bacteriana con concentración de 10^8 UFC ml^{-1} (OD_{600} : 0,3) con la cepa Cm9 de la Colección de Bacterias Fitopatógenas (Cátedra de Fitopatología, FAUBA). Las semillas sumergidas en la suspensión bacteriana fueron sometidas a cinco pulsos de un minuto de vacío, el cual siempre fue interrumpido abruptamente para favorecer la entrada de la bacteria en las cavidades de las semillas (Bashan y Assouline, 1983). Las semillas fueron posteriormente secadas sobre papel de filtro estéril en cámara de flujo laminar. Para corroborar que la inoculación llegó a todas las semillas, se estrió en los medios YDC y MSCM la suspensión obtenida de cada una de siete semillas inoculadas.

Se evaluaron seis diluciones que se obtuvieron agregando diferentes proporciones de semillas inoculadas a las semillas sanas: 1 en 10.000; 3 en 7.500; 4 en 5.000, y 6 en 3.000, un control negativo (0 en 2.000) y un control positivo (10 semillas inoculadas). Se utilizaron tres repeticiones, excepto para el control positivo (dos repeticiones) y en la dilución más alta (1 en 10.000), que contó con seis repeticiones.

Las muestras de semillas fueron trituradas en un molinillo, dado que este método fue más sensible para la detección que los que utilizan solamente el remojo de las semillas (Hadas *et al.*, 2005). Entre el molido de cada muestra se desinfectó el molinillo con alcohol 70 %.

A las muestras de semillas molidas se les agregó solución de buffer fosfato estéril, se mezcló y se dejó reposar unos segundos para que los materiales más gruesos decantaran. Se sembró la suspensión original, una dilución 1:10, y otra parte se concentró centrifugando 1 ml de la suspensión original a 13.000 rpm por 10 minutos, y descartando 900 µl del sobrenadante. Cada dilución se sembró en placas del medio MSCM (dos placas por dilución). Entre las colonias identificadas positivamente se seleccionaron algunas al azar, se repicaron a medio no selectivo YDC, se corroboró la morfología de las colonias, se realizó reacción de Gram, y se observaron en microscopio óptico.

El análisis por PCR se realizó sobre el control positivo (semillas inoculadas), el control negativo (semillas sanas) y la muestra que tenía la mayor proporción de semillas inoculadas (6 en 3.000). El ADN se extrajo con el *kit* de extracción Power Soil[®] (MOBIO). Se usaron 0,2 g de cada muestra de semillas trituradas. Para la amplificación del ADN por PCR se utilizó el set de *primers* CMM-5 (5'-GCGAATAAGCCCATATCAA-3') y CMM-6 (5'-CGTCAGGAGGTCGCTAATA-3') específico para este patógeno por ser derivado del gen de patogenicidad *pat-1* (Dreier *et*

al., 1995). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 10 minutos, 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por un minuto, *annealing* a 55 °C por 1,5 minuto, y una extensión de 72 °C por 1 minuto; luego una extensión final de 72 °C por 10 minutos (Dreier *et al.*, 1995). Previamente se corroboró que el ADN de la cepa utilizada para la inoculación (Cm9) amplificara con este set de *primers*. Como un control, a los efectos de descartar un posible efecto de la presencia de inhibidores de la reacción de PCR, se agregó ADN genómico de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* a tubos con muestras del ADN extraído. Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % en *buffer* TBE, se tiñeron con “SYBR® Safe DNA” y se iluminaron con luz ultravioleta para obtener una fotografía digital.

II.2.2 Análisis de lotes de semillas comerciales

Se realizaron análisis de semillas comerciales importadas de tres lotes de híbridos (nombrados aquí “A”, “B” y “C”) y una variedad “D”, sospechados de estar naturalmente infectadas por haber dado origen a cultivos donde se observó la enfermedad. En todos los casos se utilizaron muestras de 10.000 semillas, las cuales se subdividieron en 4 submuestras de 2.500. Se analizaron por amplificación de ADN por PCR y con el método de placas de dilución usando el medio semiselectivo MSCM, como se describió en la sección anterior; además se hicieron siembras en el medio semiselectivo MBCT.

Otro lote de un híbrido “E” se analizó a partir de 150 plántulas. Cuando alcanzaron el estadio de dos hojas verdaderas, las plántulas se analizaron por el método de placas de dilución utilizando el medio no selectivo YDC. Previo al procesamiento de las

muestras, las plántulas fueron rociadas con alcohol al 70 % para reducir la carga de microorganismos epífitos. Se realizaron dos técnicas de detección: a) macerado de trozos de los tallitos en grupos de 15 plántulas y posterior siembra por estriado en superficie; y b) impresión de tallos individuales (en inglés: *stem printing technique*) (Gitaitis *et al.*, 1991). Esta última técnica consiste en cortar el tallo de la plántula, sostenerlo entre los dedos y apretarlo cuidadosamente sobre el medio de cultivo hasta que sale una gota que se deposita sobre el medio de cultivo (Gitaitis *et al.*, 1991). Dado que se utilizó un medio de cultivo no selectivo se evitó que el tallo tocara el medio para reducir la probabilidad de contaminaciones.

Para todos los métodos de aislamiento, de las colonias identificadas como positivas, se estudiaron sus características morfológicas, reacción de Gram y forma de la bacteria. Se realizaron inoculaciones en plantas de tomate para corroborar la patogenicidad.

II.2.3 Tratamiento térmico

A partir de un cultivo comercial de tomates del híbrido “Elpida” (Enza Zaden) producidos en una finca de Florencio Varela, provincia de Buenos Aires, se extrajeron semillas de plantas con corroborada presencia del patógeno. Se compararon tres técnicas de desinfección por calor y un control: (1) tratamiento por calor seco a 70 °C durante 96 h en estufa con circulación forzada de aire (Silva *et al.*, 2002), (2) tratamiento por inmersión en agua caliente a 52 °C por 20 minutos (Fatmi *et al.*, 1991), (3) tratamiento por inmersión en agua caliente a 56 °C por 30 minutos (Fatmi *et al.*, 1991), y (4) control sin tratamiento térmico. Después del tratamiento con agua caliente las semillas fueron puestas a secar en una cámara de flujo laminar.

Para la evaluación de la calidad fisiológica, se utilizaron 300 semillas para cada tratamiento, distribuidas en tres repeticiones de 100 semillas. Se realizó un *Blotter test* (según reglas de ISTA, 2003) y se contaron las semillas germinadas a los 3; 7; 10; 14 y 17 días desde la incubación en estufa a 24 °C.

Para la detección del patógeno se utilizaron 360 semillas por cada tratamiento, distribuidas en tres repeticiones de 120 semillas (con dos submuestras de 60 semillas). La concentración bacteriana se determinó en placas con el medio MSCM, como se describió anteriormente. De las colonias identificadas como positivas, se estudiaron sus características morfológicas, reacción de Gram y forma de la bacteria. Se realizaron inoculaciones en plantas de tomate para corroborar la patogenicidad.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Comparación de métodos de análisis de semillas

Utilizando el método de siembra de diluciones en placas con medio semiselectivo se logró aislar el patógeno hasta la mayor dilución: una semilla inoculada en 10.000 (Cuadro II.1). Solo en dos de las seis repeticiones de esta dilución no se logró aislar el patógeno debido a la contaminación con hongos que no permitieron aislar colonias para corroborar su identificación. Sin embargo, aún en estas placas aparecieron colonias características de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* por debajo del micelio. Con la técnica de PCR, no fue posible detectar el patógeno en la menor dilución (6 en 3.000) (Cuadro II.1 y Fig. II.1). Esto no estuvo asociado a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR dado que se obtuvo una banda amplificada del tamaño esperado para la muestra de semillas inoculadas (Fig. II.1). La ausencia de un efecto de inhibidores fue

corroborada cuando a las mismas muestras se les agregó ADN genómico del patógeno, obteniéndose una amplificación positiva en todos los casos.

Cuadro II.1: Proporción de repeticiones positivas y concentración bacteriana promedio de las repeticiones positivas, expresada en UFC semilla⁻¹. En la columna de concentración se indica en cursiva a la derecha el error estándar, que fue siempre un orden de magnitud menor al promedio. s/d: sin dato.

	Medio MSCM		PCR
	Proporción	Concentración	Proporción
Semilla no inoculada	0/3	-	0/3
1 en 10.000	4/6*	1,71 x 10 ¹ 5,4	s/d
3 en 7.500	3/3	4,77 x 10 ¹ 4,2	s/d
4 en 5.000	3/3	4,80 x 10 ¹ 4,4	s/d
6 en 3.000	3/3	1,33 x 10 ² 1,1	0/3
Semilla inoculada	2/2	2,99 x 10 ⁴ 2,9	1/1

* En las dos muestras negativas aparecieron colonias características pero no se pudo aislar el patógeno por presencia de saprófitos fúngicos.

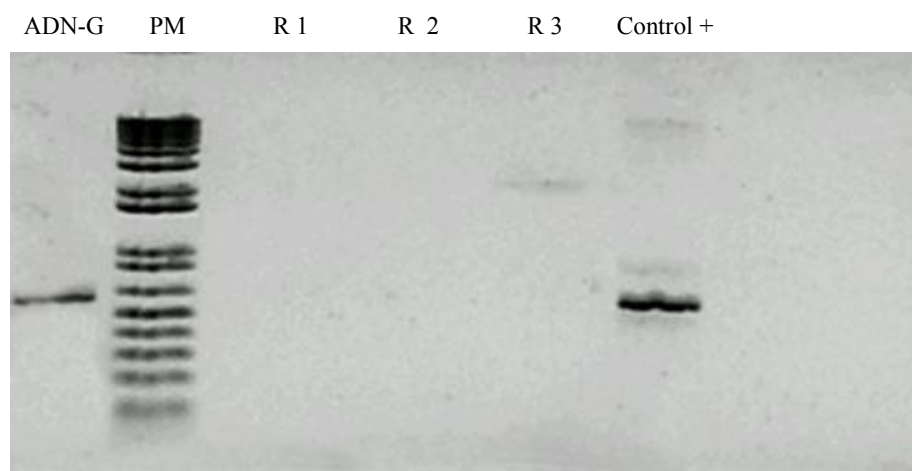


Figura II.1: Análisis con PCR de la dilución más concentrada: 6 semillas inoculadas en 3.000. De izquierda a derecha: ADN-G (control positivo con ADN genómico de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*), PM: marcador de peso molecular 1 Kb plus; R1, R2 y R3: repeticiones 1, 2 y 3 de la dilución 6 en 3.000, control +: control positivo (semillas inoculadas).

II.3.2 Análisis de lotes de semillas comerciales

C. michiganensis subsp. *michiganensis* fue detectada en uno de los cuatro lotes de semillas comerciales analizados. El lote de semillas del híbrido “C” resultó positivo en una de las cuatro submuestras de 2.500 semillas, tanto con el medio semiselectivo MSCM como con el nuevo medio MBCT, con una baja concentración en ambos medios, pero de un orden de magnitud superior en este último (Cuadro II.2). Con la técnica de PCR no se obtuvo ningún resultado positivo.

La bacteria también fue detectada en el lote de semillas del híbrido “E” analizado a partir de 150 plántulas asintomáticas. Con la técnica de impresión de tallos individuales se detectó el patógeno en una de 150 plántulas. Cuando se cortaron trozos de talluelos y se analizaron grupos de 15 plántulas, no se encontró ninguna muestra positiva de las diez analizadas.

Cuadro II.2: Proporción de submuestras positivas (P) y concentración bacteriana promedio de las muestras positivas (C) expresada en UFC semilla⁻¹ de lotes de 10.000 semillas comerciales.

Muestra	Medio MSCM		Medio MBCT		PCR
	P	C	P	C	P
“A”	0/4	-	0/4	-	0/4
“B”	0/4	-	0/4	-	0/4
“C”	1/4	0,3 x 10 ⁰	1/4	8,0 x 10 ⁰ *	0/4
“D”	0/4	-	0/4	-	s/d

* Se detectó sólo en la placa con la suspensión concentrada por centrifugación.

II.3.3 Tratamiento térmico

En ninguno de los dos tratamientos con agua caliente se detectó la presencia del patógeno, lo que sí ocurrió en dos de las seis submuestras de las semillas expuestas a calor seco, si bien con concentraciones cuatro órdenes de magnitud inferiores al control (Cuadro II.3). En todas las submuestras del control se aisló la bacteria.

Cuadro II.3: Efecto del tratamiento térmico sobre la proporción de muestras positivas y su concentración bacteriana promedio (UFC g⁻¹). Se indica la proporción de submuestras y entre paréntesis las repeticiones verdaderas. En la columna de concentración se indica en cursiva a la derecha el error estándar, que tuvo el mismo orden de magnitud que la media.

	Proporción	Concentración
Control	6/6	1,55 x 10 ⁶ <i>1,5</i>
Calor seco	2/6 (2/3)	4,19 x 10 ² <i>1,4</i>
Agua 52 °C 20 min	0/6	-
Agua 56 °C 30 min	0/6	-

Los tratamientos con agua caliente no afectaron la germinación en ninguna de las fechas evaluadas. Las semillas tratadas presentaron un poder germinativo promedio entre el 97,3 y 98,3 %, y el control entre 98 y 99 %. El tratamiento por calor seco llegó a niveles de plántulas emergidas similares al testigo a los 10 días, pero a los 7 días fue menor y tuvo una mayor variabilidad (Fig. II.2).

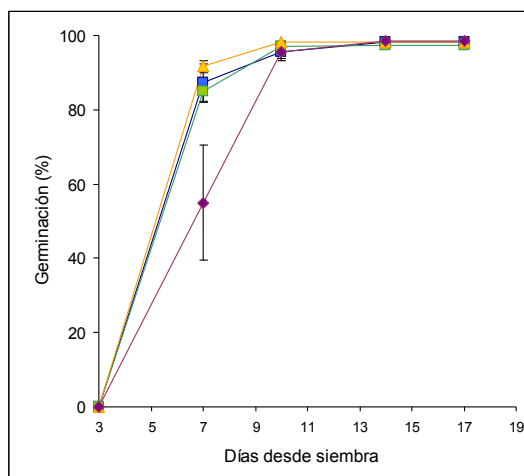


Figura II.2: Evolución de la germinación de las semillas tratadas con: calor seco (rombos violetas), agua caliente a 52 °C y 20 minutos (cuadrados azules), agua caliente a 56 °C y 30 minutos (cuadrados verdes), control sin tratar (triángulos naranjas). Las barras representan el error estándar.

II.4 DISCUSIÓN

Con el método de detección tradicional, que implica el cultivo del patógeno usando el medio de cultivo semiselectivo MSCM, se detectó el patógeno en todas las diluciones evaluadas, lo cual es coherente con los resultados informados por otros autores, considerando que las semillas tuvieron una concentración relativamente alta del patógeno (10^4 UFC semilla⁻¹). Para la dilución 1 en 10.000 se pudo aislar el patógeno solo en cuatro de las seis repeticiones; en las otras dos repeticiones, si bien se observaron colonias características de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, se desarrollaron hongos saprófitos que impidieron el aislamiento. En experimentos con concentraciones ligeramente menores, 0,5 - 0,8 10^4 UFC semilla⁻¹, Hadas *et al.* (2005) también detectaron una semilla enferma en 10.000.

Con la técnica de detección por PCR utilizando el *kit* de extracción de ADN Power Soil[®] no fue posible detectar el patógeno en muestras que contenían 6 semillas inoculadas en 3.000 (equivalente a 20 en 10.000), aún con las concentraciones

relativamente altas del patógeno en las semillas inoculadas. Este resultado negativo también se produjo con las muestras de semillas comerciales, en las que una de las muestras resultó positiva con el método de cultivo en ambos medios semiselectivos utilizados (MSCM y MBCT), pero fue negativa con la técnica por PCR. En este caso, sin embargo, la concentración bacteriana fue muy baja. El éxito en la detección del patógeno por PCR en el control positivo, el que consistió solo de semillas inoculadas, y de las muestras en las que se agregó ADN genómico de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, son evidencia de que no existió un efecto de inhibición de la reacción. Los resultados negativos podrían deberse a una baja eficiencia de extracción de ADN con el *kit* comercial utilizado, obteniéndose por lo tanto una menor cantidad de material para amplificar. Si este fuera el caso, aún estando el patógeno presente en la muestra de semillas, podría no haber suficiente ADN para generar una banda visible en el gel. Por otra parte, uno de los problemas de las técnicas de detección por PCR es que solo es posible procesar una pequeña proporción de la muestra de semillas a analizar, lo que reduce la sensibilidad del método. Esto ocurre con el *kit* de extracción de ADN evaluado para el cual solo es posible utilizar una pequeña fracción de la muestra de semillas (0,2 g). A pesar de que las semillas son trituradas y mezcladas en un molinillo, la utilización de una pequeña fracción del material de la muestra puede haber reducido la probabilidad de encontrar al patógeno. Esto determina que este método no sea más sensible que otras técnicas (Gitaitis y Walcott, 2007).

A partir del análisis de muestras de semillas comerciales se pudo demostrar que las semillas importadas son una potencial fuente de inóculo en nuestro país, dado que se detectó el patógeno en dos de los lotes analizados. El método destructivo utilizado en este estudio dificulta la posibilidad de analizar un gran número de muestras, debido al

alto costo de la semilla, pero al mismo tiempo aumenta la probabilidad de detectar el patógeno (Hadas *et al.*, 2005).

La detección temprana de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en plántulas con el método de impresión de tallo es dependiente de la concentración del inóculo (Gitaitis *et al.*, 1991). En este caso, el patógeno se pudo detectar con esta técnica, pero no se detectó cuando se procesaron 15 tallos juntos. Posiblemente el patógeno se alojaba en la parte superior de la plántula y aún no había alcanzado la parte inferior, de donde se tomó el trozo de tallo para triturar el tejido. Otra explicación es que el inóculo se haya diluido al procesar los 15 tallos juntos, reduciendo la sensibilidad de este método.

Si bien el análisis de cuatro muestras de semillas comerciales y un lote de 150 plántulas no es representativo de la diversidad de semillas utilizadas en el país, estos resultados indican que sería recomendable analizar un mayor número de lotes de semillas para evaluar la importancia de este problema y eventualmente implementar técnicas de desinfección de semillas en forma preventiva. Para este fin, resultan interesantes los resultados obtenidos con los tratamientos de desinfección por inmersión en agua caliente. Con esta técnica no se detectó el patógeno y no hubo efecto sobre la dinámica de germinación de las semillas. Esto coincide con lo observado por Fatmi *et al.* (1991), que si bien también utilizaron semillas naturalmente infectadas/infestadas partieron de una concentración en semillas dos órdenes de magnitud menor a nuestro ensayo (10^4 y 10^6 UFC g^{-1} respectivamente). Con el tratamiento con calor seco, si bien la concentración se redujo entre dos y cuatro órdenes de magnitud con respecto al control, el patógeno se detectó en dos de tres repeticiones y la calidad de las semillas fue afectada negativamente. Lopes y Rossetto (2004) y Silva *et al.* (2002) también detectaron una caída de la calidad fisiológica de la semilla en el primer conteo de plántulas emergidas con exposiciones a calor seco de 48 y 96 h, respectivamente. Este

tratamiento puede aumentar el grado de susceptibilidad al daño provocado por una rápida imbibición, al tener las semillas un menor contenido hídrico (Lopes y Rossetto, 2004). Esto no ocurre con el tratamiento húmedo lo cual explicaría porqué no se afectó la germinación en este último caso. Por el contrario, Muniz (2001, citado en Lopes y Rossetto, 2004) aplicó una desinfección por calor seco de 15 días, sin observar efectos negativos sobre la calidad fisiológica de las semillas de tomate.

En un ensayo en el que se evaluaron otros métodos de desinfección de semillas, Dhanvantari y Brown (1993) no pudieron aislar el patógeno cuando trataron las semillas con hipoclorito de sodio 0,6 % (w/v) a 50 °C por 15 minutos, pero no trituraron las semillas para una mejor detección del patógeno, tal como recomiendan Hadas *et al.* (2005). Cuando evaluaron la aparición de síntomas en plantas de este tratamiento en condiciones de campo, encontraron un 4,6 % de incidencia, mientras que en el control no tratado la incidencia fue de 24,5 %. Fatmi *et al.* (1991) al evaluar la técnica de inmersión en agua caliente tuvieron los mismos resultados que en nuestro ensayo (no detectaron el patógeno), pero no informaron el umbral de detección, el cual en nuestro caso fue de 279 UFC g⁻¹ de semilla. En un estudio realizado por Hadas *et al.* (2005) inoculando muestras de 2000 semillas con concentraciones crecientes del patógeno (10² a 10⁵ UFC ml⁻¹), encontraron una correlación entre la concentración en semilla y la incidencia de síntomas de la enfermedad en plántulas a los 60 días. Además, con una concentración por debajo de 58 UFC g⁻¹ ya no se producía la enfermedad (al menos durante el período evaluado). El umbral de detección de nuestro ensayo es más de cuatro veces superior a esa concentración que, según este trabajo, sería capaz de producir enfermedad. Esto significa que existiría un rango de concentraciones (entre 58 y 279 UFC g⁻¹) capaces de producir enfermedad, pero que no serían detectadas por estar por debajo del umbral de detección de nuestro ensayo. Este inconveniente se podría

solucionar agregando un paso de centrifugación para concentrar la suspensión obtenida de la trituración de semillas antes de la siembra en las placas. Otra opción es realizar una trituración de grupos de semillas más pequeños. Por último, teniendo en cuenta los resultados de Dhanvantari y Brown (1993), sería conveniente corroborar estos resultados con una evaluación de síntomas en plántulas. Un aspecto interesante de este último método de detección, es que incluye también la tasa de transmisión del patógeno en o sobre la semilla a la planta.

II.5 CONCLUSIONES

Se verificó la presencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas comerciales importadas utilizadas en el país. Para ello, la técnica de siembra en placas con los medios de cultivo semiselectivos MSCM o MBCT resultó adecuada. Esta técnica permitió incluso detectar niveles bajos del patógeno (en un lote de semilla comercial). Por el contrario, la técnica de detección por PCR utilizando el *kit* de extracción de ADN de suelos no resultó exitosa.

La desinfección de semillas por calor húmedo (52 °C 20 min o 56 °C 30 min) resultó adecuada para reducir la concentración del patógeno a niveles no detectables sin afectar la calidad fisiológica de las semillas, a diferencia del tratamiento por calor seco a 70 °C por 96 h.

CONSIDERACIONES FINALES

Dado el estrecho margen de acción que tiene el agricultor una vez que aparecen los síntomas del Cancro Bacteriano, la prevención es fundamental. La identificación de las fuentes de inóculo primario realizada en este estudio es por lo tanto un aspecto clave para el manejo de la enfermedad. Ha sido demostrado que los rastrojos y las semillas comerciales importadas constituyen potenciales fuentes de inóculo primario de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en los sistemas bajo invernadero del cinturón verde Buenos Aires – La Plata.

1. Validación de hipótesis

Para los objetivos del Capítulo I: b) “determinar el efecto de la época del año y la ubicación de los rastrojos en el suelo sobre el tiempo de supervivencia del patógeno”, y c) “establecer si existe una relación entre la supervivencia en rastrojos de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y la descomposición de los mismos”, se partió de la siguiente hipótesis: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* tiene una baja habilidad competitiva saprofítica, por lo que a medida que los microorganismos saprófitos colonizan los tejidos del hospedante y éstos se descomponen, la población del patógeno se reducirá por competencia u otras interacciones (antibiosis o parasitismo). Aquellas condiciones que promuevan la actividad biológica de las comunidades microbianas descomponedoras (por ejemplo temperaturas más elevadas o contacto directo con los tejidos por el entierro de los rastrojos), y por lo tanto favorezcan mayores tasas de descomposición de rastrojos, redundarán en mayores tasas de mortalidad del patógeno y por tanto en un menor tiempo de supervivencia.

A partir de los ensayos y análisis realizados se encontraron evidencias a favor de esta hipótesis. En este sentido, es interesante remarcar que si bien las variables temperatura y tasa de descomposición del rastrojo están relacionadas entre sí (la primera determina en parte la segunda), también se ha detectado que no alcanza solo la variable “tasa de descomposición de los tejidos” para explicar la tasa de mortalidad del patógeno, en tanto que para el mismo rango de tasas de descomposición hubo diferentes tasas de mortalidad en ensayos iniciados en invierno y en verano (Fig. I.6).

2. Aportes originales al conocimiento científico

Este trabajo es el primero en demostrar que existe una relación entre el tiempo de supervivencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* y la descomposición de los rastrojos de tomate y la época del año en que se descomponen. Si bien para otras bacterias fitopatógenas se había sugerido una relación entre supervivencia y descomposición de rastrojos, no encontramos trabajos que vinculen estas variables para el caso de este patógeno en particular.

La gran variabilidad encontrada en bibliografía en diferentes sitios geográficos sobre el tiempo de supervivencia en tejidos del hospedante de este patógeno pudo ser explicada con las temperaturas medias climáticas del sitio donde se realizaron los ensayos, lo cual da cuenta de la importancia de tener en cuenta los procesos ecológicos que podrían explicar estos resultados.

3. Implicancias para futuras investigaciones

Los resultados obtenidos para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en lo que respecta a la relación entre su supervivencia en rastrojos y el proceso de descomposición o las

temperaturas a las que están expuestos los mismos, permite plantear la hipótesis que otras bacterias fitopatógenas que sobreviven en tejidos del hospedante (pero no libres en el suelo) podrían tener respuestas similares a estas variables, en tanto que el mismo proceso ecológico estaría determinando los tiempos de supervivencia.

Otros autores demostraron que una epidemia originada por rastrojos infestados puede reducir significativamente los rendimientos del siguiente cultivo (Gleason *et al.*, 1991). Sin embargo, no se dispone actualmente de información sobre la tasa de transmisión de los restos de tejidos al siguiente cultivo. Es posible que esta tasa sea alta, debido a que el patógeno puede sobrevivir en el suelo circundante a tejidos infestados (Chang y Pataky, 1992), y a que durante el trasplante se producen heridas en raíces que facilitan la penetración del patógeno. Disponer de información sobre esta variable permitiría establecer cuantitativamente la importancia epidemiológica de esta fuente de inóculo primaria.

El medio de cultivo utilizado para la detección del patógeno en rastrojos resultó eficiente, pero persiste la dificultad asociada a la pérdida de sensibilidad por un alto número de saprófitos en las muestras. En el nuevo medio semiselectivo desarrollado por Ftayeh *et al.* (2011), BCT (y el modificado en este trabajo, MBCT), las colonias de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* se identifican mucho más fácilmente y el crecimiento es más rápido que en el medio MSCM, por lo que resulta promisorio tanto para futuros ensayos no solo de supervivencia en tejidos en descomposición sino también de detección en semillas. Dado que el fungicida del medio original no está disponible en el país y que su reemplazo por cicloheximida no ha sido del todo satisfactorio, deberían evaluarse otras alternativas.

En dos de cinco muestras de semillas comerciales analizadas (cuatro lotes de semillas y un lote de plantines), se determinó la presencia de *C. michiganensis* subsp.

michiganensis. Sería conveniente, en futuros estudios, analizar un mayor número de lotes para determinar la proporción de semillas infestadas/infectadas, la concentración del patógeno y relacionarlos con el origen de las mismas.

La siembra de diluciones en placas con medios semiselectivos resultó exitosa en la detección del patógeno en semillas. Esta técnica permitió aislar el patógeno de una de las muestras de semillas comerciales. La sensibilidad fue alta, dado que se detectó una semilla inoculada en 10.000 “sanas”. Por otra parte, la evaluación de la técnica de amplificación por PCR no resultó exitosa en este estudio. Se deberían testear otras técnicas de extracción de ADN que permitan procesar una muestra de mayor tamaño.

En semillas naturalmente infectadas/infestadas, la técnica de desinfección por inmersión en agua caliente ha dado los mejores resultados en nuestro ensayo, partiendo de semillas que tuvieron una concentración dos órdenes de magnitud mayor que las utilizadas por Fatmi *et al.* (1991). Teniendo en cuenta que Hadas *et al.* (2005) determinaron que existe una concentración del patógeno en semilla por debajo de la cual no se producen síntomas, al analizar las semillas resulta importante conocer e informar el umbral de detección de la técnica utilizada, el cual debería ser menor que la concentración capaz de producir enfermedad. Se puede lograr reducir el umbral de detección agregando un paso de centrifugación previo a la siembra en placas o bien reduciendo la cantidad de semillas procesadas en cada repetición.

Además de las semillas y los rastrojos pueden existir otras fuentes de inóculo primario cuya importancia epidemiológica se desconoce. En este sentido, resulta interesante el trabajo de Miguel-Wruck *et al.* (2006), en el que se detectó el patógeno en las cañas usadas para el tutorado de las plantas. En los sistemas productivos bajo invernadero de nuestra zona de estudio, las plantas de tomate no se tutoran sino que se conducen con cintas de polietileno atadas a la estructura del invernadero, que en general no son

cambiadas entre cultivos. Habiéndose demostrado la supervivencia epífita de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en otras superficies u otras plantas no hospedantes (Chang y Pataky, 1992), deberían considerarse estas fuentes de inóculo alternativas. Por ello, deberían encararse nuevos estudios que evalúen la relevancia de estas posibles fuentes de inóculo alternativas en esta zona de producción.

4. Aplicaciones prácticas de los resultados

La relación establecida entre la temperatura, la supervivencia del patógeno en rastrojos, su ubicación en el suelo, y la descomposición de los restos culturales, así como el empleo de una técnica de desinfección de semillas eficaz e inocua, permiten sugerir recomendaciones de manejo concretas en respuesta a aspectos epidemiológicos clave de la enfermedad para las condiciones de este trabajo: realizar rotaciones de al menos tres meses en verano o nueve meses desde inicios del invierno. Esto podría complementarse con prácticas que aceleren la tasa de descomposición de los tejidos, como su incorporación al suelo, adición de materia orgánica o la solarización. Dado que los tiempos de supervivencia son menores en verano, estas prácticas podrían tener un mayor efecto sobre la mortalidad del patógeno durante este período. Finalmente, sería recomendable desinfectar las semillas preventivamente, por ejemplo por calor húmedo.

Dado que la determinación del tiempo de supervivencia supone un largo período de evaluación y mucho tiempo de trabajo y cierta experticia, resulta interesante disponer de criterios para hacer predicciones aproximadas para otras zonas, hasta tanto no se cuente con mediciones directas. Por un lado, se deberían tomar como referencia datos de áreas geográficas que tengan condiciones ambientales similares y descartar valores de zonas con climas muy diferentes. Si esto no fuera posible, se puede estimar el tiempo de

supervivencia a partir de la ecuación de la regresión de la Figura I.7., para la cual sólo es necesario contar con las temperaturas medias máximas y mínimas. Complementariamente, se podría determinar la dinámica de descomposición de rastros, y con esos datos estimar un tiempo de supervivencia teórico del patógeno a través de las ecuaciones de regresión de las figuras I.5 y I.6. Esto último podría ser de utilidad, pero sin dejar de considerar que los resultados de nuestros ensayos no necesariamente son extrapolables a otras regiones climáticas.

Con respecto a las semillas como fuente de inóculo, teniendo en cuenta su alto costo, las dificultades en la detección por métodos no destructivos y que se ha comprobado la presencia del patógeno en semillas comerciales en el país, sería recomendable utilizar en forma preventiva algún método de desinfección. Por último, considerando que se han identificado lotes de semillas importadas infestadas/infectadas en el principal cultivo hortícola fresco de la Argentina, sería conveniente que las instituciones públicas competentes evalúen la posibilidad de incorporar herramientas de control legales, como ser el requisito de realizar análisis de semilla o utilizar un tratamiento de desinfección efectivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. (2005) *Plant pathology*. El Sevier Academic Press. Burlington, MA, USA.
- Alarcon, C., Castro, J., Munoz, F., Arce-Johnson, P. y Delgado, J. (1998) Protein (s) from the gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* induces a hypersensitive response in plants. *Phytopathology*, **88**, 306-310.
- Bashan, Y. y Assouline, I. (1983) Complementary bacterial enrichment techniques for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in infested tomato and pepper seeds. *Phytoparasitica*, **11**, 187-193.
- Basu, P.K. (1970) Temperature an important factor determining survival of *Corynebacterium michiganense* in soil. *Phytopathology*, **60**, 825-827.
- Bermpohl, A., Dreier, J., Bahro, R. y Eichenlaub, R. (1996) Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiological Research*, **151**, 391-399.
- Bogo, A. y Takatsu, A. (1997) Virulencia de aislados de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em pimentao e tomate. *Fitopatologia Brasileira*, **22**, 535-538.
- Bureau of Meteorology (Australia) <http://www.bom.gov.au>
- Chalupowicz L., Zellermann E.-M., Fluegel M., Dror O., Eichenlaub R., Gartemann K.H., Savidor A., Sessa G., Iraki N., Barash I., Manulis-Sasson S. (2012) Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology*, **102**, 3-31.
- Chang R.J. y Pataky J.K. (1992) Local sources of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology*, **82**, 553-560.
- Chang R.J., Ries S. M. y Pataky J.K. (1992) Effects of temperature, plant age, inoculums concentration and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Disease*, **76**, 1150-1155.
- Chang, R.J., Ries, S.M. y Pataky, J.K. (1991) Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, **81**, 1276-1281.

- Chapin III, F.S., Matson, P.A., Mooney, H.A. (2002) Terrestrial decomposition. Pp. 151-175 en: Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. Editorial Springer-Verlag, Nueva York.
- Corvo Dolcet, S. (2005) Zonas de producción del cultivo del tomate en la Argentina. Informe SAGPyA.
- da Cruz Machado, J. (2000). Tratamento de sementes no controle de doenças. Ed. da UFLA.
- Dal Bó, E., Cardozo, N., Lopez Lambertini, P., Samaniego, C. y Colombo, M. (2012) Enfermedades de *Solanum lycopersicum* L. (tomate) en: Nome, S.F., Docampo, D.M., y Conci, L.R. (eds.) Atlas Fitopatológico Argentino. Vol. 4, Nº 4. Córdoba, Argentina. Recuperado de:
<http://rian.inta.gov.ar/atlas/Inicio.aspx#/ConsultaGeneral?Id=718>
- De Boer, S.H. (1982) Survival of phytopathogenic bacteria in soil. Capítulo 12. Pp. 285-302 en: Mount, M.S., Lacy, G.H. (eds.) Phytopathogenic Prokaryotes, Vol.1.
- De Boer, S.H., Allan, E. y Kelman, A. (1979) Survival of *Erwinia carotovora* in Wisconsin soils. *American Potato Journal*. **56**, 243-252.
- de León L., Siverio F., López M.M. y Rodríguez A. (2011) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease*, **95**, 1328-1338.
- de León, L., Rodríguez, A. Lopez, M.M. y Siverio, F. (2008) Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Journal of Applied Microbiology*, **104**, 776-786.
- de León, L., Siverio, F. y Rodríguez, A. (2006) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *Journal of Microbiological Methods*, **67**, 141-149.
- Dhanvantari, B.N. (1989) Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of bacterial tomato canker. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **11**, 400-408.
- Dhanvantari, B.N. y Brown, R.J. (1993). Improved seed treatments for control of bacterial canker of tomato. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **15**, 201-205.

- Dreier, J., BERPPOHL, A. y EICHENLAUB, R. (1995) Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, **85**, 462-468.
- EICHENLAUB, R. y GARTEMANN K.H. (2011) The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **49**, 445-464.
- EICHENLAUB, R., GARTEMANN, K.H. y BURGER, A. (2006) *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria. Pp. 385-421 en: Gnanamanickam, S.S. Plant-Associated Bacteria. Editorial Springer, Holanda.
- EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2005) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. EPPO Bulletin, **35**, 271-273.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de: <http://faostat.fao.org/>
- FATMI, M. y SCHAAD, N.W. (2002) Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology*, **51**, 149-154.
- FATMI, M.; SCHAAD, N. W.; BOLKAN, H.A. (1991) Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Disease*, **75**, 383-385.
- FERNÁNDEZ LOZANO, J. (2012) La producción de hortalizas en la Argentina. Secretaría de Comercio Interior – Corporación del Mercado Central de Buenos Aires.
- FERNANDEZ VALIELA, M. V. (1975) Capítulo I. Bacterias. Parte especial. I.1. Género *Corynebacterium*. Pp. 293-302 en: Introducción a la Fitopatología. 3^{ra} ed. Colección científica del INTA - 7. Volúmen III.
- FTAYEH, R.M., VON TIEDEMANN, A., y RUDOLPH, K.W.E. (2011) A new selective medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seed. *Phytopathology*, **101**, 1355- 1364.
- GARTEMANN, K.H., KIRCHNER, O., ENGEMANN, J., GRÄFEN, I., EICHENLAUB, R. y BURGER, A. (2003) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, **106**, 179-191.

- Gitaitis, R., & Walcott, R. (2007) The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, **45**, 371-397.
- Gitaitis, R.D., Beaver, R.W. y Voloudakis, A.E. (1991) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, **75**, 834-838.
- Gleason, M.L., Braun, E. J., Carlton W.M. y Peterson R.H. (1991) Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, **81**, 1519-1523.
- Gleason, M.L., Gitaitis, R. D., y Ricker, M.D. (1993) Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, **77**, 1069-1076.
- Hadas, R., Kritzman, G., Klietman, F., Gefen, T. y Manulis, S. (2005) Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology*, **54**, 643-649.
- Hausbeck, M., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R. y Fulbright D.W. (2000) Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, **90**, 38-44.
- INTA (2012) Desinfección de semilla de tomate. Cancro Bacteriano. Programa Nacional Hortalizas, Flores y Aromáticas. (material de divulgación)
- INTA (2008) Cadena Hortícola. Plan Tecnológico Regional 2006-2008. Informe Diagnóstico de Situación. Recuperado de: http://www.funcex.org.br/material/REDEMERCOSUL_BIBLIOGRAFIA/biblioteca/ESTUDOS_ARGENTINA/ARG_170.pdf
- INTA y CMCBA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y Corporación del Mercado Central de Buenos Aires. (2009) Boletín electrónico de tomate N° 18. Recuperado de: <http://www.mercadocentral.gob.ar/boletin/pdf/Tomate18.pdf>
- ISF. International Seed Federation. (2008) Methods for the Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* on Tomato seed. Versión 3. Recuperado de: <http://www.worldseed.org>

- ISHI. International Seed Health Initiative. (2005) Manual of seed health testing methods. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. Recuperado de: <http://www.worldseed.org>
- ISTA. International Seed Testing Association. (2003) Handbook on Seedling Evaluation. 3^{ra} Edición.
- Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer J. y Eichenlaub R. (1999) Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology* **1**, 113-118.
- Lopes, F.S. y Rossetto, C.A.V. (2004) Qualidade de sementes de tomate influenciada pelos tratamentos térmico e osmótico. *Horticultura Brasileira*, **22**, 642-646.
- Maroc Météo (Marruecos) <http://www.marocmeteo.ma>
- Miguel Wruck, D.S., Oliveira, J.R., Romeiro, R. da S. y Dhingra, O.D. (2006) Control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in bamboo stakes used for tomato production. *Summa Phytopathologica*, **32**, 373-375.
- Moffet, M.L. y Wood, B.A. (1984) Survival of *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense* within host debris in soil. *Australian Plant Pathology*, **13**, 1-3.
- Munkvold, G.P. (2009) Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology*, **47**, 285-311.
- National Atlas (EE.UU.) <http://www.nationalatlas.gov>
- Neergaard, P. (1977). Seed pathology. Volume 1. Macmillan Press Ltd.
- Ritchie D.F., Dittapongpitch V. (1991) Copper- and streptomycin-resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease*, **75**, 733-736.
- Romero, A.M., Vega, D. y Correa, O.S. (2014) *Azospirillum* mitigates biotic water stress in tomato by increasing stem hydraulic conductivity and xylem vessel area. *Applied Soil Ecology*. (aceptado, en revisión)
- Romero, A.M.; Correa, O.; Moccia, S. y Rivas, J. (2003) Effect of *Azospirillum*-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 832-838.
- Saettler, A.W.; Schaad, N.W. y Roth, D.A. (1989). Detection of bacteria in seed and other planting material.

Servicio Meteorológico Nacional (Argentina) <http://www.smn.gov.ar>

- Sharabani, G., Manulis-Sasson, S., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Chalupowicz, L., & Shtienberg, D. (2013) The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathology*, **62**, 578–586.
- Silva, A.M.S., Carmo, M.G.F., Olivares, F.L. y Pereira, A.J. (2002) Termoterapia via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. *Fitopatologia Brasileira*, **27**: 586-593.
- Simpson, B.B., y Conner-Ogorzaly, M. (2001) *Economic botany*. New York: McGraw-Hill.
- Spooner, D.M., Peralta, I.E., & Knapp, S. (2005) Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [Solanum L. section Lycopersicon (Mill.) Wettst.]. *Taxon*, 43-61.
- Torres, J. P., Maringoni, A. C. y Silva Jr, T. A. F. (2009) Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in common bean leaflets on soil. *Journal of Plant Pathology*, **91**, 195-198.
- Trevors, J.T. y Finnen, R.L. (1990) Introduction and recovery of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from agricultural soil. *Plant and Soil*, **126**, 141–143.
- Tyson, J. L., Rees-George, J., Curtis, C. L., Manning, M. A. y Fullerton, R. A. (2012) Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on the orchard floor over winter. *New Zealand Plant Protection*, **65**, 25-28.
- Van Steekelenburg, N.A.M. (1985) Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato genotypes. *Euphytica*, **34**, 245-250.
- Vega, D., Romero, A.M., Zapata, R.L. y Arienza, P. (2009) Desinfección de herramientas como práctica de manejo del cancro bacteriano del tomate. En: XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Las Termas de Río Hondo, Santiago del Estero.
- Waters, C.M. y Bolkan, H.A. (1992) An improved selective medium and method of extraction for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Phytopathology*, **82**, 1072. (Resumen)

- Werner, N. A., Fulbright, D. W., Podolsky, R., Bell, J. y Hausbeck, M. K. (2002) Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Disease*, **86**, 535-542.
- Xu, X., Rajashekara, G., Paul, P.A. y Miller, S.A. (2012) Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. *Phytopathology*, **102**, 177-184.
- Yogev, A., Raviv, M., Kritzman, G., Hadar, Y., Cohen, R., Kirshner, B., & Katan, J. (2009) Suppression of bacterial canker of tomato by composts. *Crop Protection*, **28**, 97-103.
- Zaluga, J., Van Vaerenbergh, J., Stragier, P., Maes, M., & De Vos, P. (2013) Genetic diversity of non-pathogenic *Clavibacter* strains isolated from tomato seeds. *Systematic and Applied Microbiology*, **36**, 426–435.