

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL  
DEL TALLO HUECO EN TOMATE EN URUGUAY

por

Santiago CORES RODRÍGUEZ

Ariel SCARZELLA TESTA

TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el  
título de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2016

Tesis aprobada por:

Director: -----

Ing. Agr. Dra. Elisa Silvera

-----

Ing. Agr. Msc. Pablo González

-----

Ing. Agr. Msc. Diego Maeso

Fecha: 22 de julio de 2016

Autores: -----

Santiago Cores

-----

Ariel Scarzella

## AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias por el apoyo incondicional y constante que nos brindaron para lograr este objetivo.

A los Ing. Agr. Elisa Silvera y Pablo González por su constante apoyo en la elaboración del presente trabajo.

Al Ing. Agr. Diego Maeso por sus aportes y colaboración en el trabajo.

A todos los productores que nos permitieron ingresar a sus predios y obtener muestras para poder realizar el presente trabajo.

A los integrantes del laboratorio de Fitopatología, por su colaboración en la etapa de laboratorio.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	2
2.1. <u>CULTIVO DE TOMATE</u> .....	2
2.2. <u>ENFERMEDADES BACTERIANAS DEL TOMATE</u> .....	3
2.2.1. <u>Tallo hueco</u> .....	3
2.2.1.1. <u>Sintomatología</u> .....	3
2.2.1.2. <u>Organismo causal</u> .....	4
2.2.1.3. <u>Caracterización fenotípica</u> .....	4
2.2.1.4. <u>Ciclo y desarrollo de la enfermedad</u> .....	6
2.2.2. <u>Otras enfermedades bacterianas</u> .....	7
2.2.2.1. <u>Cancro bacteriano</u> .....	8
2.2.2.2. <u>Marchitez bacteriana</u> .....	8
2.2.2.3. <u>Pie negro</u> .....	9
2.2.3. <u>Diagnóstico de las diferentes <i>Pseudomonas</i> spp. causantes de tallo hueco</u> .....	9
2.2.3.1. <u>Prueba de hipersensibilidad en tabaco</u> .....	9
2.2.3.2. <u>Prueba de patogenicidad</u> .....	10
2.2.3.3. <u>Prueba de KOH</u> .....	10
2.2.3.4. <u>Pruebas fisiológicas</u> .....	11
2.2.3.5. <u>Pruebas bioquímicas</u> .....	12
2.2.3.6. <u>Análisis molecular</u> .....	14
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	16
3.1. <u>MUESTREO Y AISLAMIENTO DE <i>Pseudomonas</i> spp.</u> .....	16
3.2. <u>PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD</u> .....	17
3.3. <u>PRUEBA DE PATOGENICIDAD</u> .....	17
3.4. <u>TEST DE KOH</u> .....	18
3.5. <u>PRUEBAS FISIOLÓGICAS</u> .....	18
3.5.1. <u>Test de Hugh-Leifson (O/F)</u> .....	18
3.5.2. <u>Test de producción de fluorescencia</u> .....	18
3.5.3. <u>Test de Levan</u> .....	19
3.6. <u>CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA</u> .....	19
3.6.1. <u>Hidrólisis de gelatina</u> .....	19

3.6.2. <u>Test de catalasa</u> .....	19
3.6.3. <u>Test de oxidasa</u> .....	19
3.6.4. <u>Hidrólisis de almidón</u> .....	20
3.6.5. <u>Reducción de nitrato</u> .....	20
3.6.6. <u>Arginina dihidrolasa</u> .....	20
3.6.7. <u>Utilización de arabinosa</u> .....	21
3.6.8. <u>Utilización de cetoglucanato</u> .....	21
3.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	21
3.7.1. <u>Extracción de ADN</u> .....	21
3.7.2. <u>PCR</u> .....	22
4. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u> .....	23
4.1. COLECTA DE MUESTRAS.....	23
4.2. AISLADOS YMORFOLOGÍA DE COLONIA.....	24
4.3. PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD.....	26
4.4. PRUEBA DE PATOGENICIDAD.....	26
4.5. DIFERENCIACIÓN DE GÉNEROS DE BACTERIAS.....	27
4.6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	27
4.7. ANÁLISIS MOLECULAR.....	28
5. <u>CONCLUSIONES</u> .....	31
6. <u>RESUMEN</u> .....	32
7. <u>SUMMARY</u> .....	33
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	34
9. <u>ANEXOS</u> .....	40

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Características bioquímicas y fisiológicas de <i>Pseudomonas corrugata</i> , <i>P. mediterranea</i> , <i>P. cichorii</i> y <i>P. viridiflava</i> .....	6
2. Cultivos bacterianos aislados de plantas de tomate con síntomas de tallo hueco.....	25
3. Características de los aislados que permiten clasificarlos como <i>Pseudomonas</i> .....	27
4. Perfil bioquímico de los aislados de <i>Pseudomonas</i> no fluorescentes.....	28
5. Presencia o ausencia del producto de la PCR de los aislados con los primers PC5 y PC1 ( <i>P. corrugata</i> y <i>P. mediterranea</i> ).....	29
Figura No.	
1. Plantas de tomate variedad Elpida, en estado de maduración del primer racimo, en la cual se observa la necrosis en el tallo.....	24
2. Colonias aisladas cultivadas en medio NAD, con 48 horas de crecimiento, en estufa a 27°C.....	25
3. Síntomas de tallo hueco en plantas de tomate var. Leonora.....	26

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) en Uruguay es el segundo rubro en importancia para la horticultura nacional luego de la papa debido a su contribución al valor bruto de producción, el mismo ocupa una superficie de 395 hectáreas y una producción de 33091 ton. de acuerdo con la información extraída del último censo (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2014).

Se distinguen dos zonas de producción; la zona norte, en los alrededores de las ciudades de Salto y Bella Unión, principalmente con cultivos protegidos de primor y la zona sur que comprende a los departamentos de Canelones, San José y Montevideo rural caracterizándose por cultivos de estación a campo y cultivos protegidos (CAMM, 2014).

Dentro de los principales problemas que afectan al cultivo, las bacteriosis son responsables de grandes pérdidas en la producción (Lopes y Ávila, 2005). Entre éstas, el tallo hueco o necrosis de médula se encuentra ampliamente distribuidas en las diferentes regiones del mundo. La enfermedad se asocia a *Pseudomonas corrugata* (Scartlet et al., 1978), *P. fluorescens*, *P. viridiflava* (Alippi et al. 2003, Sahin et al. 2005) *P. cichorii* (Sahin et al. 2005, Trantas et al. 2014) y *P. mediterranea*, esta última especie variante de estirpes de *P. corrugata*, (Catara et al. 2002, Sahin et al. 2005, Xu et al. 2013). El síntoma consiste en necrosis y ahuecamiento de médula, que puede ser acompañado con el oscurecimiento del tallo, desarrollo de raíces adventicias y, en ataques severos, puede ocasionar marchitamiento y muerte de plantas (Gabor y Wiebe, 1997).

En Uruguay no existen antecedentes sobre la etiología del tallo hueco, así el presente trabajo tiene como objetivo identificar y caracterizar las *Pseudomonas* spp. aisladas de plantas de tomate con síntomas de tallo hueco o necrosis de médula.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. CULTIVO DE TOMATE

El tomate (*Solanum lycopersicum L.*), es una planta herbácea perteneciente a la familia de las solanáceas, potencialmente perenne pero muy sensible a heladas, lo que determina su ciclo anual (Rodríguez et al., 1997).

Según Hortoinfo (2015) para el año 2013, la producción mundial de tomate para consumo en fresco se estimó en 163.963.077 toneladas (datos elaborados a partir de valores de FAO). Como principal país productor del mundo se encuentra China, el cual produce 50.664.225 toneladas, correspondiente al 31% de la producción mundial.

El consumo de tomate de tipo redondo en Uruguay está entre 8,3 kg y 8,4 kg por persona al año y el de tomate perita es de 0,8 kg por persona al año (CAMM, 2014).

La mayor producción se destina para el consumo en fresco como tomate de mesa correspondiendo al 91% de la cosecha y el restante 9% como tomate de industria, con una producción total estimada en 33139 toneladas y un área de 395 hectáreas (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2014).

El cultivo de tomate es uno de los rubros con mayor importancia en el Mercado Modelo (principal lugar de comercialización del país), luego de la papa y la banana, representando un 7% del total de hortalizas comercializadas y un 10,2% del valor monetario total para el 2013 (CAMM, 2014).

La producción se enmarca en dos zonas del país principalmente, la zona norte la cual incluye los departamentos de Salto y Artigas y la zona sur, principalmente Canelones, Montevideo y San José (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2014).

Ambas zonas presentan producción protegida, a partir de la cual se genera la mayoría de la producción del tomate de mesa (81% del total) (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2014).

La producción a campo se limita a la zona sur produciendo tomate para industria (9%) y tomate de mesa (10%) (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2014).

En la zona norte se encuentra la mayor superficie de cultivos protegidos, 138 hectáreas, para abastecer el mercado durante invierno-primavera; mientras que en la zona sur ésta es de 73 hectáreas, los cuales abastecen el mercado en la época de otoño-invierno. Así mismo el volumen de producción del tomate de mesa producido es de 63% en la zona norte y 25% en la zona sur (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2014).

El tomate de mesa e industria a campo ocupan, 95 y 89 hectáreas respectivamente, siendo cultivos de estación los cuales abastecen el mercado durante los meses de verano-otoño (MGAP. DIEA y MGAP. DIGEGRA, 2014).

## 2.2. ENFERMEDADES BACTERIANAS DEL TOMATE

Las principales enfermedades bacterianas que infectan el cultivo de tomate pueden dividirse en aquellas que provocan desórdenes vasculares (tallo hueco, cancro bacteriano y marchitamiento bacteriano), podredumbres (pie negro), y lesiones foliares (mancha bacteriana y peca bacteriana) (Jones et al., 1991).

### 2.1.1. Tallo hueco

#### 2.2.1.1. Sintomatología

El primer síntoma que se observa es clorosis en las hojas más jóvenes, luego que los frutos del primer racimo están totalmente desarrollados aún antes de maduración (Scarlett et al., 1978).

En casos severos la infección puede derivar en la pérdida de turgencia de la parte superior de la planta llevando a un desvanecimiento de la misma, ocasionando una coloración marrón oscura sobre la zona de la lesión, la cual puede extenderse hasta unos 30 cm. Al cortar esta zona el centro se observa hueco con aspecto firme y seco. Generalmente la zona de avance presenta una decoloración de la médula bien definida. En ataques leves la zona solo se decolora y puede no ahuecarse y la planta seguir creciendo muy lentamente, o en ataques graves marchitarse y morir (Scarlett et al., 1978).

La necrosis y coloración marrón de la médula se ubica generalmente a lo largo del tallo, debajo de los puntos de crecimiento,

en los pedúnculos del fruto y en los raquis de las hojas (Scarlett et al., 1978).

En cultivos en estado de formación de fruto, el tallo puede presentar raíces adventicias incluso uno a dos metros por encima del suelo (Catara, 2007).

#### 2.2.1.2. Organismo causal

Los posibles organismos causales de la enfermedad están asociados a *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea*, *P. viridiflava*, *P. cichorii*.

Los primeros reportes para *P. corrugata* datan desde 1971 en Inglaterra, la cual consistía en una decoloración o necrosis de la médula de color marrón a lo largo de la misma y con su posterior colapso atribuyéndose pérdidas superiores a 50% de la producción (Scarlett et al., 1978).

*Pseudomonas corrugata* es considerada como un patógeno débil y oportunista, pero que sin embargo puede atacar a la totalidad de un cultivo, conduciendo a grandes pérdidas (CABI, 2006).

Malatathrakis y Goumas, citados por Alippi et al. (2003) reportan a *P. viridiflava* como causante de necrosis de médula y pudrición basal del tallo en tomate. Por su parte, Goumas et al., citados por Alippi et al. (2003) determinan que la misma genera pudrición de la fruta.

*Pseudomonas mediterranea* fue inicialmente aislada por Catara et al. (2002) a partir de plantas con síntomas de necrosis de médula, en los países de Francia, Italia y España.

En el caso de *Pseudomonas cichorii* su reporte data del 1974 en Nueva Zelanda (Wilkie y Dye, citados por Trantas et al., 2014).

#### 2.2.1.3. Caracterización fenotípica

Al igual que otras bacterias del género *Pseudomonas* las especies que causan tallo hueco poseen forma bacilar, son Gram-negativas, móviles y poseen flagelos polares; son estrictamente aeróbicas y quimio-organoheterótrofas (Scarlett et al., 1978).

Estudios realizados por Catara et al. (2000) sobre *P. corrugata*, muestran que la mayoría de los aislados en medio Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA), o Nutriente Agar Dextrosa (NAD), presentan colonias con superficie rugosa y margen rizado, de aspecto levantado, seco o mucoso; de coloración crema o amarilla. En estos medios los aislados producen un pigmento amarillo difusible.

Según Catara et al. (2002) *P. mediterranea* presenta similares características culturales que *P. corrugata*, en medio YPGA, las colonias presentan formas arrugadas o lisas, de coloración amarilla a amarronada.

Las colonias de *P. viridiflava* en medio NAD a las 48 horas de crecimiento, presentan aspecto achatado, con un diámetro de aproximadamente 1 mm, de coloración crema-amarillenta, y con exuberante producción de mucosidad (Pérez et al., 2004).

*P. corrugata* y *P. mediterranea* son similares en sus características generales, son Gram-negativas, no forman esporas, no son fluorescentes en medio King-B, reducen nitratos, son oxidasa positivas, no producen Levan, no presentan actividad pectinolítica y generan degradación de gelatina. La mayoría de las cepas son arginina dihidrolasa positivas después de 15 días de incubación y algunas de ellas presentan hipersensibilidad en tabaco. Pero ambas bacterias se diferencian fenotípicamente en que *P. mediterranea* tiene la capacidad de utilizar meso-tartrato, 2-cetoglucanato y de utilizar histamina como única fuente de carbono y nitrógeno, *P. corrugata* no presenta esta habilidad (Catara et al., 2002).

*P. viridiflava* puede diferenciarse bioquímicamente de las bacterias mencionadas anteriormente debido a que es fluorescente en medio King-B, no reduce nitrato, no acumula poli-beta-hidroxibutirato, reacción de oxidasa negativa y presenta actividad pectinolítica en papa (Alippi et al., 2003).

En lo que respecta a *P. cichorii*, la misma se puede diferenciar de *P. corrugata* debido a que es una bacteria fluorescente, arginina hidrolasa negativa, no reduce nitrato, no hidroliza la gelatina, no acumula poli-beta-hidroxibutirato y asimila el meso-tartrato (Trantas et al., 2014).

Cuadro No. 1. Características bioquímicas y fisiológicas de *Pseudomonas corrugata*, *P. mediterranea*, *P. cichorii* y *P. viridiflava*

Test	<i>P. c.</i> (1)	<i>P. m.</i> (2)	<i>P. ci.</i> (3)	<i>P. v.</i> (4)
Oxidasa	+	+	+	+
Catalasa (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	+	+	+	+
Hidrólisis-Gelatina	+	+	-	+
Fluorescencia	-	-	+	+
Levan	-	-	-	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	+
Nitrato reducción	+	+	-	-
Arginina dihidrolasa	+	+	-	-
Utilización D-Arabinosa	+	+	-	V
2-cetoglucanato	-	+	+	+
Poli-beta-hidroxi-butirato	+	+	-	-
Meso-tartrato	-	+	+	+

*P. c.*: *P. corrugata*, *P. m.*: *P. mediterranea*, *P. ci.*: *P. cichorii*, *P. v.*: *P. viridiflava*  
V: variable

#### 2.2.1.4. Ciclo y desarrollo de la enfermedad

El “tallo hueco” se encuentra ampliamente distribuido en las diferentes regiones del mundo; asociado a temperaturas nocturnas bajas, altos niveles de nitrógeno y alta humedad, favorecido por la condensación en la superficie de las hojas que se produce a menudo, o en invernaderos en las filas contra las paredes del mismo. La condensación del agua facilita el ingreso del patógeno a la planta debido al incremento de la humedad (Scarlett et al., 1978).

Los síntomas comienzan por la base del tallo, ascendiendo hasta las hojas y racimos; detectándose la bacteria en frutos y semillas de tomate. La necrosis también puede afectar la raíz principal y ocasionalmente a las raicillas (Catara, 2007).

La enfermedad no solamente afecta a los cultivos de tomate sino también a cultivos de pimiento López et al., crisantemos Fiori, granos de

arroz Van Outryve et al., y cabezas de brócoli Pagada et al., citados por Catara et al. (2002).

La bacteria puede sobrevivir en el suelo, así como en la rizosfera de diferentes especies de plantas Lukezic, Scortichini, Ryder y Borrett, Paulitz et al., Achouak et al., citados por Catara et al. (2002). Así como también es capaz de llegar a los frutos de tomate y sobrevivir en la semilla (Catara, 2007).

Estudios realizados por Scarlett et al. (1978), Bella et al., Nauman et al., Scortichini, citados por Catara (2007) observaron que *P. corrugata* es capaz de ingresar al hospedero a través de heridas en el tallo, cuello y raíz.

Bella et al., citados por Cirvilleri et al. (2008) demostraron que *P. corrugata* coloniza a las plantas de tomate de forma endófito, a partir del inóculo presente en el suelo; así como también a partir de semillas infectadas. Coco et al., citados por Catara (2007) observaron a través de un microscopio electrónico que las células de *P. corrugata* colonizan los tejidos del parénquima de las plantas de tomate, las cuales consistentemente incrustan exopolisacáridos en la superficie del tejido celular.

La diseminación de la bacteria de una planta a la otra, se puede dar a partir de heridas provocadas en diferentes prácticas culturales del cultivo, como desbrotes o deshojes (Quezado-Duval y Martins, 2007). El agua de riego puede favorecer el ingreso del patógeno (Scarlett et al., 1978).

## 2.2.2. Otras enfermedades bacterianas

Cancro bacteriano, marchitamiento bacteriano y pie negro son enfermedades que pueden confundirse con tallo hueco a nivel de campo (Quezado-Duval y Martins, 2007).

### 2.2.2.1. Cancro bacteriano

El síntoma principal es el marchitamiento de la planta comenzando con el desvanecimiento de las hojas inferiores, necrosis marginal y marchitamiento de folíolos (siendo a menudo unilateral) y el curvado hacia arriba del borde de las hojas. A menudo las hojas inferiores se

marchitan primero estando las superiores turgentes hasta la fase final de la enfermedad. La infección puede producirse por heridas desbrote u otras lesiones, moviéndose en este caso desde la parte alta a la parte baja de la planta o comenzar desde la parte baja directamente hasta matar la planta (Jones et al., 1991).

Se pueden generar raíces adventicias en tallos y en partes aéreas nodales. En condiciones favorables pueden desarrollarse cancros. El tejido vascular tiende a ser amarillento con rayas marrones y se torna rojizo-amarronado (Jones et al., 1991).

El agente causal de esta enfermedad es *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, una bacteria Gram-positiva, aerobia que no forma esporas, la cual pertenece a la clase *Actinobacteria* (Jones et al., 1991).

#### 2.2.2.2. Marchitez bacteriana

Los síntomas de la marchitez bacteriana comienzan como una flacidez en una o más de las hojas más jóvenes, que bajo condiciones ambientales favorables, altas temperaturas (30-35°C) y alta humedad se marchitan rápidamente. La etapa avanzada de la enfermedad puede ocurrir a los 2-3 días la aparición de los síntomas. Las plantas afectadas pueden producir raíces adventicias lo cual es más pronunciado cuando la enfermedad se desarrolla lentamente en condiciones de baja temperatura, cepas poco virulentas y huéspedes resistentes. En esas condiciones las plantas también pueden presentar epinastia de hojas (Jones et al., 1991).

En las primeras etapas del desarrollo de la enfermedad el sistema vascular de las plantas aparece de color amarillo o marrón claro, y a medida que la enfermedad progresa se convierte en un marrón más oscuro. Cuando la planta se marchitó por completo la médula y la corteza también se vuelven marrones. La invasión masiva de la corteza puede resultar en la aparición de lesiones acuosas en la superficie externa del tallo (Jones et al., 1991).

El agente causal de la enfermedad es *Ralstonia solanacearum* (Gabor y Wiebe, 1997) anteriormente denominada *Pseudomonas solanacearum*, la cual pertenece a la clase *Proteobacteria*, tratándose de una bacteria aeróbica, Gram-negativa, catalasa y oxidasa positiva, y reductora de nitritos a nitratos (Jones et al., 1991).

### 2.2.2.3. Pie negro

Se observó por primera vez como un marchitamiento de las plantas en el momento de la primera cosecha del fruto o posterior. La médula generalmente se desintegra, provocando tallo hueco de la planta que se observa cortando el tallo transversalmente. El tallo aparece húmedo y viscoso en el área de la médula (Jones et al., 1991).

El agente causal es *Pectobacterium carotovorum* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) la cual pertenece a la clase Gamma *Proteobacteria*, tratándose de una bacteria anaeróbica facultativa, Gram-negativa y fosfatasa negativa (Jones et al., 1991).

### 2.2.3. Diagnóstico de las diferentes *Pseudomonas* spp. causantes de tallo hueco

#### 2.2.3.1. Prueba de hipersensibilidad en tabaco

Según Klement, Klement et al., citados por Klement (1990) solamente las bacterias fitopatógenas tienen la capacidad de inducir necrosis hipersensitiva en hojas de tabaco o en otras plantas no hospedadoras, no siendo el caso de las bacterias saprófitas. La prueba permite diferenciar las bacterias fitopatógenas de las saprófitas (Lelliot y Stead, 1991).

En el caso de las bacterias fitopatógenas las células de la zona infiltrada se sensibilizan y mueren por el contacto con el patógeno lo cual impide que la infección se extienda al resto de la hoja debido a que el mismo no puede crecer con la presencia de células muertas. En condiciones de alta humedad (85%) y temperatura (25°C), se espera una reacción positiva en 24 horas.

#### 2.2.3.2. Prueba de patogenicidad

Para verificar los postulados de Koch la patogenicidad debe ser comprobada en el hospedero susceptible, con el objetivo de reproducir los síntomas de la enfermedad (Duveiller et al., 1997).

Se inoculan plantas sanas con un cultivo puro del patógeno, esperándose la reproducción de los síntomas de la enfermedad, para luego re-aislar el patógeno en un cultivo puro (Duveiller et al., 1997).

Se debe tener consideración de ciertos aspectos, como la concentración bacteriana a inocular que no debe ser mayor a  $10^7$  células/ml debido a que siendo mayor a esta concentración puede provocar enfermedad en una planta no hospedera; la edad del cultivo bacteriano (24 horas), debido a que en un cultivo de más edad puede haber presencia de metabolitos secundarios los cuales ocasionen reacciones confusas en las plantas (Lelliot y Stead, 1991).

Otros aspectos a considerar son la temperatura (25-28°C), la humedad relativa (85%), y el fotoperiodo (16 horas), siendo las condiciones ambientales de incubación de esta enfermedad (Catara et al., 2000).

#### 2.2.3.3. Prueba de KOH

Esta prueba fue creada por Ryu en los años 1938, 1939, para la diferenciación de bacterias Gram-positivas de Gram-negativas sin el uso de coloración (Da Silva Romeiro, 2001). La misma consiste en disolver durante 20 segundos una colonia bacteriana sobre una gota de solución de KOH (3%) (Gregersen, 1978).

En el caso de las bacterias Gram-negativas siempre causan un incremento en la viscosidad, y se observa la presencia de filancia; en contraposición en el caso de las Gram-positivas se observa una consistencia acuosa y sin la presencia de filancia (Da Silva Romeiro, 2001).

El aumento de la viscosidad de las bacterias Gram-negativas se debe a la disolución de la pared celular y liberación de ADN bacteriano que no ocurre en las Gram-positivas (Da Silva Romeiro, 2001).

Los diferentes tipos de *Pseudomonas* spp. son KOH positivo (Gram-negativas).

#### 2.2.3.4. Pruebas fisiológicas

##### Prueba de producción de fluorescencia

King-B es un medio para la detección y diferenciación de bacterias, según la producción o no de fluorescencia.

Este medio, enriquecido con sulfato de magnesio, promueve la producción de pyoverdina, pigmento amarillo-verdoso que al ser oxidado pasa a amarillo. La pigmentación se difunde por todo el medio y la fluorescencia se puede apreciar mediante el uso de una lámpara UV (Himedia Laboratories, 2015a).

En este medio *P. corrugata* y *P. mediterranea* producen una pigmentación amarillo-verdosa difusible, la cual no es fluorescente bajo luz ultravioleta, por el contrario, *P. viridiflava* y *P. cichorii* sí producen pigmentación fluorescente bajo la luz ultravioleta (Mitrev et al., 2014).

##### Test Hugh-Leifson (O/F)

Esta prueba nos permite identificar la forma en que utilizan las bacterias al hidrato de carbono de forma oxidativa o fermentativa, para la obtención de nutrientes y energía (Lelliot y Stead, 1991).

La metabolización de hidratos de carbono por bacterias resulta en la formación de ácido (coloración amarilla en el tubo), donde algunas solamente lo pueden hacer en condiciones aerobias, mientras que otras lo pueden hacer tanto de forma aerobia como anaerobia. Estas últimas que tanto pueden desarrollarse en condiciones aerobias como anaerobias, se clasifican como anaerobias facultativas (Lelliot y Stead, 1991).

Según Lelliot y Stead (1991) la mayoría de los patógenos bacterianos de plantas presentan metabolismo oxidativo, a excepción de *Erwinia* la cual es del tipo fermentativo.

##### Test de Levan

Levan es un polímero sintetizado a partir de una fracción de fructosa de la molécula de sacarosa; es el responsable de la producción de colonias mucoides, en forma de cúpula, brillantes y suaves por

algunas especies *Pseudomonas* fluorescentes y *Erwinia*, en medios enriquecidos con sucrosa (Lelliot y Stead, 1991). *P. corrugata* y *P. mediterranea* no forman colonias con las características antes descritas (Mitrev et al., 2014).

#### 2.2.3.5. Pruebas bioquímicas

##### Hidrólisis de gelatina

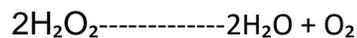
Determina la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteinasas), detectada por la licuefacción de gelatina (MacFaddin, 2003).

La gelatina es hidrolizada por la enzima gelatinasa extracelular en sus aminoácidos constitutivos con la consiguiente pérdida de su capacidad gelificante (MacFaddin, 2003).

*P. viridiflava*, *P. corrugata*, *P. mediterranea* y *P. cichorii*, son capaces de producir licuefacción (Mitrev et al., 2014).

##### Test de catalasa

La enzima catalasa es producida por microorganismos que viven en ambientes oxigenados para neutralizar formas tóxicas del oxígeno. La misma desdobra al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua (Acharya, 2013).



##### Producción de citocromo oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo oxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna

microaerófila, pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa (Bou et al., 2010). Este sistema está presente en *P. mediterranea*, *P. corrugata*, *P. viridiflava* y *P. cichorii* (Mitrev et al., 2014).

#### Test de hidrólisis de almidón

Las bacterias con actividad pectinolítica como *Erwinia* y algunas *Pseudomonas* producen en discos de papa una degradación de las paredes celulares en el punto de inoculación (Schaad et al., 2001). *P. cichorii*, *P. corrugata*, *P. mediterranea* no generan hidrólisis; por el contrario *P. viridiflava* hidroliza la papa.

#### Reducción de nitrato

Algunas bacterias oxidativas incluyendo muchas *Pseudomonas* son capaces de crecer en anaerobiosis en medios enriquecidos con nitrato. La energía la obtienen de la reducción de nitrato a nitrito a partir de la enzima nitrato reductasa (Lelliot y Stead, 1991).

En caso de no producirse esta reacción, como confirmación que la bacteria en cuestión no reduce nitrato se agrega una cantidad pequeña de zinc al medio, el cual reducirá el nitrato presente a nitrito (Lelliot y Stead, 1991).

*P. mediterranea* como *P. corrugata* y *Pseudomonas* spp. reducen nitrato a nitrito, mientras que *P. viridiflava* (Mitrev et al., 2014) y *P. cichorii* no (Trantas et al., 2014).

#### Arginina dihidrolasa

Este test prueba la presencia de dos enzimas, las cuales les permiten a ciertas *Pseudomonas* crecer bajo condiciones anaerobias. Las bacterias obtienen la energía a partir de la degradación de arginina a ornitina (Schaad et al., 2001).

La primer enzima arginina deaminasa reduce la arginina a citrulina y  $\text{NH}_3$ , y la segunda citrulina ureasa convierte a la citrulina en ornitina más  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  (Schaad et al., 2001).

*P. mediterranea* y *P. corrugata* reducen la arginina, mientras que *P. viridiflava* y algunas cepas de otras *Pseudomonas* spp. no presentan esta habilidad (Mitrev et al., 2014).

#### Utilización de arabinosa

Las pruebas de utilización de fuentes carbonadas determinan la capacidad de utilizar un compuesto como la única fuente de carbono y energía disponible; lo cual puede demostrarse por la presencia o ausencia de crecimiento o por un cambio biológico provocado en el medio, por ejemplo el cambio de ácido a álcali (Lelliot y Stead, 1991).

El medio de cultivo base sintético Ayers et al. (1919) el cual no contiene nutrientes orgánicos, se utiliza para pruebas de hidratos de carbono (D-arabinosa), en bacterias patógenas de muchas plantas; especialmente para *Pseudomonas* tanto fluorescentes como no fluorescentes (Lelliot y Stead, 1991). Según Schaad et al. (2001) *P. corrugata* utiliza D-arabinosa, a diferencia de otras *Pseudomonas* fitopatógenas.

#### Utilización de cetoglucanato

Este test es utilizado para la detección de microorganismos oxidantes de glucanato, siendo ésta su única fuente de carbono, lo cual es típico de ciertas *Pseudomonas*. Dicho test nos permite diferenciar *P. corrugata* de *P. mediterranea*, ya que la última tiene la capacidad de utilizar 2-cetoglucanato (Catara et al., 2002).

La base de la prueba es el cambio de glucanato (compuesto no reductor), a 2-cetoglucanato (compuesto reductor) a partir de una sal de potasio. La capacidad reductora del 2-cetoglucanato se prueba utilizando el reactivo de Benedict's, el cual lleva a la formación de un precipitado de cobre reducido en el caso de que sea positiva la reacción (Himedia Laboratories, 2015b).

#### 2.2.3.6. Análisis molecular

Diferentes técnicas moleculares se utilizaron en la caracterización e identificación de bacterias fitopatógenas (Palacio-Bielsa et al., 2009). Entre ellas, el análisis de restricción del 16S rADN (Vanechoutte et al., 1993), el Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

(en inglés, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism -T-RFLP) (Liu et al., 1997) y la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, Polymerase Chain Reaction - PCR) con primers específicos (Schaad et al., 2001). Mediante reacciones de PCR múltiple se amplificaron dos fragmentos específicos de ADN de 600 pb o 1100 pb de *P. mediterranea* y *P. corrugata* respectivamente, utilizando dos pares de primers (PC1/PC5), diseñados dentro de dos regiones genómicas por la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (en inglés, Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD) (Catara et al. 2002, Quezadod- Duval y Martins 2007, Trantas et al. 2014).

Otros métodos incluyeron la secuenciación del 16S rADN (Yamamoto et al., 2000) y de los genes constitutivos subunidad  $\beta$  de la ADN girasa (*gyrB*) (Yamamoto et al., 1999), subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Mollet et al., 1997), y factor  $\sigma 70$  de la ARN polimerasa (*rpoD*) (Mulet et al., 2009). Sin embargo el análisis de las secuencias del 16S rADN es insuficiente para distinguir especies de bacterias relacionadas debido a la lenta tasa de sustitución de dicho gen (Yamamoto et al., 2000). Contrariamente los genes que codifican las proteínas *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* evolucionan más rápido que el rARN. Así, el análisis de filogenia de *Pseudomonas* basado en estos genes proporcionó mayor resolución a las secuencias del 16S rADN (Yamamoto et al. 2000, Sarris et al. 2012). El análisis genómico usando las huellas genéticas (“Finger Printing”) de secuencias repetitivas del genoma rep-PCR y el 16S rRNA-RFLP permitieron encontrar diversidad genética en *P. viridiflava* y *P. corrugata* (Alippi et al., 2003). Además el análisis de secuencias multilocus y rep-PCR determinó la alta diversidad genética intra e interespecífica de *P. corrugata* y *P. mediterranea* (Trantas et al., 2014).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado durante el 2015, en el laboratorio del Grupo Disciplinario de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Montevideo).

En primer lugar se realizó una colecta de tallos en las principales zonas de producción de tomate, zona sur (Canelones) y norte (Salto); visitando 25 y 40 productores, respectivamente.

Posteriormente se procedió al aislamiento e identificación tanto bioquímica como molecular de las diferentes *Pseudomonas* spp., incluyendo la prueba de hipersensibilidad en tabaco y la prueba de patogenicidad en plantas de tomate.

#### 3.1. MUESTREO Y AISLAMIENTO DE *Pseudomonas* spp.

Se colectaron tallos de tomate con síntomas del tallo hueco en establecimientos de Canelones (en el mes de marzo), y de Salto (en agosto).

Las secciones de tallos se lavaron con agua corriente para remover el suelo adherido, se desinfestaron con hipoclorito al 1% por 1,5 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada (ADE). Se dilaceraron fragmentos del tejido vascular, se colocaron en solución de suero fisiológico esterilizado al 0,85% y se maceraron en morteros previamente desinfectados. A partir del tejido macerado, con un anza flambeada se colectó una gota (20µL) y se realizaron estrías sucesivas en placas de Petri conteniendo agar dextrosa nutritivo (NAD) (anexo No. 1); para obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron a 27°C por 48-72 horas, en oscuridad.

A partir de las colonias aisladas con una superficie áspera, margen rizado de coloración amarilla o crema, que en determinados medios de cultivo produce una pigmentación amarilla difusible característico de *P. corrugata*, *P. mediterranea* y *Pseudomonas* spp., las mismas fueron repicadas a placas de Petri conteniendo NAD y se incubaron a 27°C por 48 horas para obtener el cultivo puro (Lelliot y Stead, 1991).

### 3.2. PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD

Los aislados obtenidos se inocularon en hojas de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). A partir de las colonias bacterianas con 24 horas de incubación, se prepararon suspensiones de células bacterianas a  $1 \times 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> en tubos con suero fisiológico esterilizado (0,85%). La suspensión de cada aislado se infiltró con aguja hipodérmica en diferentes hojas jóvenes expandidas de las plantas tabaco. Las plantas se colocaron en cámara de crecimiento a 25-28°C, con fotoperíodo de 12 horas. La presencia de necrosis en la zona de la hoja infiltrada se consideró como una respuesta de hipersensibilidad positiva (Lelliot y Stead, 1991).

### 3.3. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Los aislados se inocularon en plantas de tomate cv. Leonora para comprobar su patogenicidad en tomate.

Para esto se sembraron 100 semillas de tomate en almacigueras con sustrato estéril comercial (turba Brown 540w, marca Kekkila). Los plantines se trasplantaron individualmente a macetas de 300 cc a los 45 días de la siembra, con sustrato previamente esterilizado compuesto por una mezcla de turba y perlita, realizándose una fertilización base de 100 mg de fosfato de amonio por planta, cuando las plantas presentaron la primer hoja verdadera completamente expandida se comenzó a fertilizar semanalmente con 100 mg de nitrodoble (27% de nitrógeno). A la semana del trasplante cada planta se inoculó con una aguja hipodérmica en la axila de la primera hoja verdadera con 50 µl de una suspensión de células bacterianas de  $1 \times 10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup> provenientes de un cultivo de 24 horas de edad (Catara et al., 2000).

Se inocularon cinco plantas con cada aislado y tres con suero fisiológico al 0,85% esterilizado como control. Las plantas fueron llevadas a cámara de crecimiento con 16 horas de fotoperíodo y a una temperatura de 25-28°C (Catara et al., 2000). Las plantas recién inoculadas fueron cubiertas con bolsas de polietileno durante 48 horas.

Luego de transcurrido un mes se procedió a evaluar los síntomas y al reaislamiento de la bacteria con el mismo procedimiento realizado en el aislamiento inicial, para cumplir los postulados de Koch.

### 3.4. TEST DE KOH

Los aislados fitopatógenos provenientes de los aislamientos iniciales y del reaislamiento se evaluaron por el test de Gram indirecto (KOH). Sobre un portaobjeto se dispensó una gota de hidróxido de potasio 3% (p/v), seguidamente con un anza flambeada se colectó una masa de colonias de 48 horas de edad y se agitó circularmente sobre la gota, observándose la presencia de filancia en menos de 20 segundos (Suslow et al., 1982). Los aislados se conservaron en crio-tubos con una solución acuosa de glicerol (15%) en freezer a menos 20°C.

### 3.5. PRUEBAS FISIOLÓGICAS

Para realizar todos los test fisiológicos, los aislados previamente se incubaron en NAD, por 48 horas a 27°C.

#### 3.5.1. Test Hugh-Leifson (O/F)

En medio base (anexo No. 1), dispensado en tubos de ensayo de 8 ml mediante un anza se introdujo en el centro del tubo una colonia de los aislados en estudio. Los tubos se incubaron a 27°C por 24-48 horas y se evaluó el metabolismo oxidativo estricto o fermentativo facultativo. Si se produjo el cambio de color verde del medio base a amarillo en los primeros 15 mm y sin cambio de color a más de los 15 mm, se consideró como una bacteria con metabolismo oxidativo. Contrariamente cuando el cambio de color se dió en todo el volumen del medio se consideró como una bacteria fermentativa facultativa.

#### 3.5.2. Test de producción de fluorescencia

En placas de Petri con medio King B, (anexo No. 1), se colocaron en cuatro cuadrantes estrías de cada aislado. Las placas se incubaron por 24-48 horas a 27°C en oscuridad. Seguidamente se observaron sobre luz UV en un transluminador (marca Labnet DyNA lighth). Evaluándose presencia o ausencia de pigmentos fluorescentes (Lelliot y Stead, 1991).

### 3.5.3. Test de Levan

Se repicaron a placas de Petri con Nutriente Agar Sucrosa (NAS) (anexo No. 1) colonias de los aislados con 48 horas de incubación, y se incubaron a 27°C por 48 horas. La formación de colonias con borde convexo fue considerada como Levan positivo (Lelliot y Stead, 1991).

## 3.6. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Los aislados fitopatógenos y Gram-negativos según la prueba de KOH (hidróxido de potasio al 3%), se caracterizaron a través de test bioquímicos. Para la realización de las pruebas se utilizaron cultivos bacterianos incubados en placas de Petri con NAD por 48 horas.

### 3.6.1. Hidrólisis de gelatina

Se dispensaron 5 ml de medio de gelatina (anexo No. 1) en tubos de ensayo esterilizados, estos se colocaron por 30 minutos a 7°C, posteriormente se introdujo en el medio del tubo el anza contaminada con cada aislado o sin contaminar. Los tubos se evaluaron a los 30 minutos y se consideró como resultado positivo de la prueba cuando el medio se volvió líquido (Lelliot y Stead, 1991).

### 3.6.2. Test de catalasa

Se colectaron con un palito de madera muestras de los aislados y se colocaron sobre un portaobjetos dos gotas de una solución de peróxido de hidrógeno al 3%. La producción de burbujas de aire se evaluó como un resultado positivo y su ausencia como negativo (Lelliot y Stead, 1991).

### 3.6.3. Test de oxidasa

Se extrajeron con palitos de madera colonias de los distintos aislados cultivados en NAD por 48 horas, las cuales se colocaron sobre discos de papel de filtro con una gota de solución Tetrametil-p-fenilendiamina. La aparición de coloración púrpura dentro de 10

segundos se consideró como reacción positiva y sin color negativa (Lelliot y Stead, 1991).

#### 3.6.4. Hidrólisis de almidón

Se retiraron con sacabocados cilindros de 10 mm de diámetro por 50 mm de largo, de tubérculos de papa lavados previamente con agua y jabón neutro. La piel de cada cilindro se removió y sobre un extremo se realizó un corte aproximadamente a 45°. Inmediatamente cada sección se colocó en tubos de ensayo con agua destilada dejando cubierta la mitad del cilindro, los cuales se esterilizaron en autoclave a 115°C durante 10 minutos. Con anza flambeada se colocaron colonias de los aislados sobre la superficie en bisel del cilindro de papa y se incubaron durante 72 horas a 25°C. La presencia o ausencia de tejidos macerado puso en evidencia la actividad o no de enzimas pectinolíticas en los aislados (Lelliot y Stead, 1991).

#### 3.6.5. Reducción de nitrato

Para detectar la capacidad de los aislados de reducción de nitrato a nitrito se sembraron en tubos en medio líquido (anexo No. 1) previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos, se incubaron a 27°C por 72 horas. Posteriormente se agregaron 7 gotas (0,5ml) de una solución de (ácido sulfanílico, Bio Basic Inc. al 0,8%, y ácido acético, Bio Basic Inc. al 30%), se homogenizó por 5 segundos. Luego se agregaron 7 gotas (0,5 ml) de una segunda solución (alfa-naftilamina al 0,5% y ácido acético al 30%) y nuevamente se homogenizó. La presencia de color rojizo a los 10 minutos de la reacción fue considerada como positiva, (nitrato se reduce a nitrito). A los tubos que no cambiaron la coloración se les agregó zinc (una pizca) y al tornarse rojizos se confirmó la incapacidad de los aislados de reducir el nitrato (Schaad et al., 2001).

#### 3.6.6. Arginina dihidrolasa

Para realizar estas pruebas se colocaron las colonias mediante un anza flambeada en medio Thornley's (anexo No. 1), en tubos de ensayo. Los tubos se cubrieron con vaselina y se incubaron a 28°C

durante 96 horas. Un resultado se consideró positivo cuando el medio rosa claro pasa a rojo (Schaad et al., 2001).

### 3.6.7. Utilización de arabinosa

Para esta prueba se utilizó el medio de cultivo base sintético Ayers et al. (1919, anexo No. 1) y el indicador bromocresol purpura esterilizado, al cual se agregó 0,1% de solución de D-arabinosa previamente esterilizada por filtración (filtro de poro, Sartorius stedium, mini star, de 0,2  $\mu\text{m}$ ). Se dispensaron 5 ml del medio de cultivos en tubos de ensayos esterilizados, y mediante un anza se colocó la colonia bacteriana a analizar y se incubó a 27°C. La presencia de crecimiento bacteriano a los 3, 7 y 14 días respectivamente fue evaluada como respuesta positiva (Schaad et al., 2001).

### 3.6.8. Utilización de cetogluconato

Se emplearon tubos de 5 ml de medio gluconato (anexo No. 1), ajustado a pH 7 esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Se inculó el medio con las colonias bacterianas y se incubó durante 3 días en un agitador (marca Labnet orbit 1000) a 135 rpm, con una temperatura de 27°C.

Posteriormente se agregaron a cada tubo 5 ml del reactivo de Benedict's (anexo No. 1), se agitaron y se calentaron a baño maría durante 10 minutos. La formación de precipitado marrón o anaranjado se consideró como reacción positiva (Lelliot y Stead, 1991).

## 3.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

### 3.7.1. Extracción de ADN

Los aislados en estudio (los originales y los reaislados de la prueba de patogenicidad) fueron cultivados en nutriente medio liquido por 24 horas a 27 °C y en agitación a 135 rpm (marca Labnet orbit 1000). Para la extracción del ADN, el cultivo con las células de cada aislado se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C en

centrífuga refrigerada (marca HERMLE modelo Z300K), se descartó el sobrenadante y se enjuagó dos veces con agua Milli-Q esterilizado. Seguidamente las muestras se procesaron según la recomendación de Kit de extracción (marca Quiagen Sciences), consistente de dos componentes: Cell lysis solution y Protein precipitation. El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría (Nano Drop 2000 Thermo Scientific) y su concentración se ajustó a 100 ng.  $\mu\text{l}^{-1}$ .

### 3.7.2. PCR

Con los primers PC5/PC1 se amplificaron fragmentos específicos del ADN de los aislados en estudio. Para la reacción se usó una mezcla de 25  $\mu\text{l}$  con el ADN de los aislados (100 ng), buffer (1x), nucleótidos (20 mM);  $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM); primers (0,4 de cada uno); Taq polimerasa (1,25 U) (SBS Genetech Co., Ltd) en un termociclador PTC-100 Peltier thermal cycler.

Las condiciones de amplificación de los primers consistieron de una desnaturalización inicial 94°C por 5 minutos seguida de 34 ciclos a 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 1 segundo y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Cinco microlitros de la reacción se separaron por electroforesis en gel TBE agarosa 1,5% durante 25 minutos a 100 V, coloreado con GelRed (Biotium) y foto-documentado sobre luz ultravioleta para determinar según el tamaño de banda a cuál de las especies correspondió cada muestra. El tamaño de banda reportado para *P. corrugata* es 1100 pb y para *P. mediterranea* 600 pb (Catara et al., 2002).

La secuenciación de los productos de la PCR con el primer PC1 de los aislados 1c, 5s y 8s se realizó en el Instituto Pasteur de Montevideo y las secuencias resultantes fueron editadas manualmente, para luego ser comparadas con aquellas depositadas en el Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>, verificado 25-05-2015) mediante búsqueda Blast.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. COLECTA DE MUESTRAS

Se colectaron 70 muestras de tallos de plantas afectadas, 30 en el sur y 40 en el norte, en el mes de marzo y agosto de 2015. Las plantas al momento de la colecta estaban en maduración de primer racimo y presentaban los síntomas descritos por Scarlett et al. (1978), Quezado-Duval y Martins (2007). Éstos consistieron en clorosis de las hojas más jóvenes al momento previo a maduración del primer racimo, en casos severos ocasiona pérdida de turgencia en la parte superior, apreciándose una coloración marrón sobre la zona de avance y una necrosis en la zona inferior del tallo.

Estos síntomas a nivel de campo se pueden confundir con los de otras enfermedades vasculares, como cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*), marchitamiento bacteriano (*Ralstonia solanacearum*) y pie negro (*Pectobacterium carotovorum*) (Quezado-Duval y Martins, 2007).

Las características que nos permitieron diferenciarlo en la selección de las muestras fueron la presencia de una coloración amarilla generalizada del follaje; y la formación de cavidades en el tallo por destrucción de la médula. Esto último permite diferenciar del pie negro debido a que no es una pudrición blanda y por la formación de raíces adventicias; y la ocurrencia o no de oscurecimiento de la base del tallo y puntos de ramificación (Quezado-Duval y Martins, 2007). Al realizar un corte longitudinal se observó la médula desintegrada con aspecto firme, seco y con decoloración bien definida (Scarlett et al., 1978).



Figura No. 1. Plantas de tomate variedad Elpida, en estado de maduración del primer racimo, la flecha indica la zona en la cual se observa la necrosis en el tallo.

#### 4.2. AISLADOS Y MORFOLOGÍA DE COLONIA

Se obtuvieron 30 y 40 aislados, de Canelones y Salto respectivamente; pero 13 aislados (cuadro No. 2) presentaron en medio de cultivo NAD colonias de aspecto redondeado, chato, rugoso y margen rizado; con pigmentación amarilla difusible, que coinciden con las características descritas por Scarlett et al. (1978), Catara et al. (2002).

Cuadro No. 2. Cultivos bacterianos aislados de plantas de tomate con síntomas de tallo hueco

Aislamiento	Variedad	Departamento	Zona
1c	Elpida	Canelones	Armonía
2c	Elpida	Canelones	Paso la cadena
3c	Elpida	Canelones	Paso la cadena
4s	Elpida	Salto	Tropezón
5s	Elpida	Salto	Tropezón
6s	Dominique	Salto	Tropezón
7s	Dominique	Salto	Tropezón
8s	Elpida	Salto	Santana
9s	Elpida	Salto	Santana
10s	Elpida	Salto	Santana
11s	Elpida	Salto	Santana
12s	Elpida	Salto	Corralito
13s	Elpida	Salto	Corralito

Prefijo s: Salto  
c: Canelones

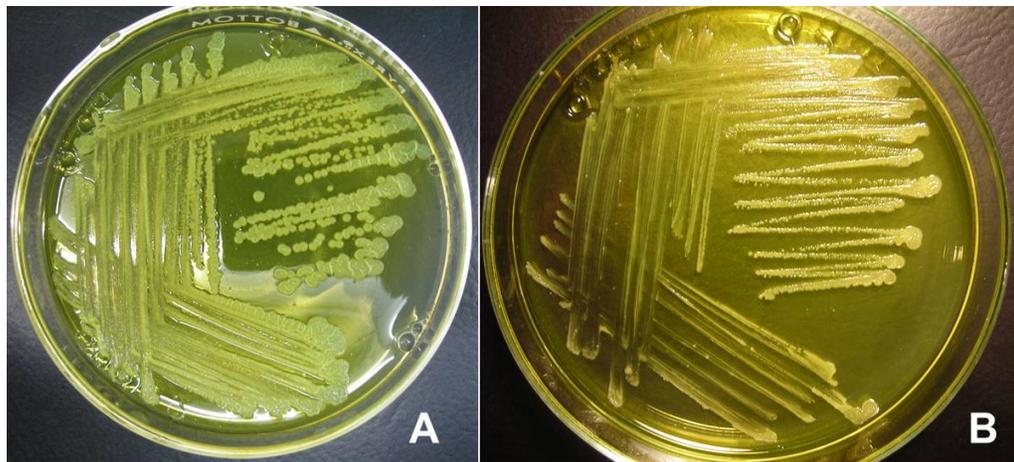


Figura No. 2. Colonias aisladas cultivadas en medio NAD, con 48 horas de crecimiento, en estufa a 27°C. A) *P. corrugata* (2c). B) *P. mediterranea* (1c).

### 4.3. PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD

Todos los aislados bacterianos en estudio provocaron una reacción de hipersensibilidad en tabaco a las 24 horas de la inoculación coincidiendo con los obtenidos por Mitrev et al. (2000). Sin embargo otros autores observaron reacciones variables con sus aislados, Alippi et al. (2003), Catara (2007), Xu et al. (2013).

### 4.4. PRUEBA DE PATOGENICIDAD

La patogenicidad de los diferentes aislados se probó mediante la inoculación del huésped susceptible (plantines de tomate), observándose una lesión necrótica y ahuecamiento de la médula en la zona infiltrada a las 4 semanas post inoculación (Catara et al., 2000), síntomas característicos de la enfermedad descritos por Scarlett et al. (1978).

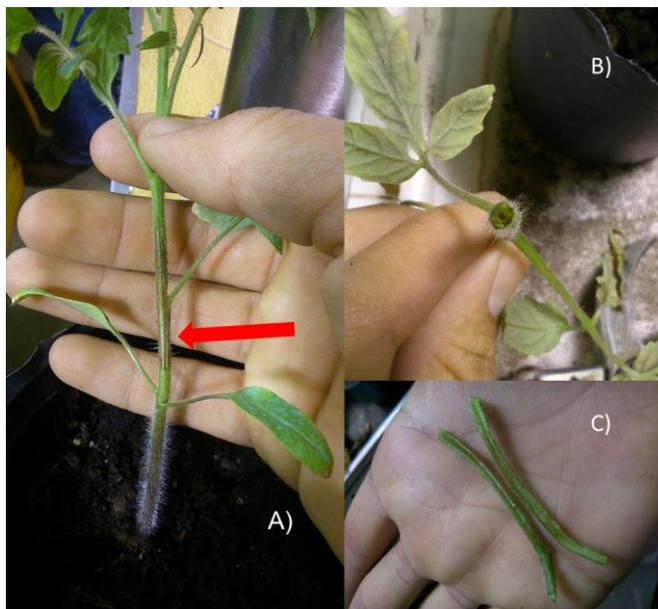


Figura No. 3. Síntomas de tallo hueco en plantas de tomate var. Leonora. A) la flecha indica lesión necrótica en el tallo del plantín inoculado en la primera hoja verdadera. B) corte transversal de la zona afectada donde se aprecia el ahuecamiento de tallo. C) corte longitudinal de la zona afectada donde se aprecia la falta de la médula del plantín

#### 4.5. DIFERENCIACIÓN DE GÉNEROS DE BACTERIAS

Todos los aislados de la colecta pertenecen al género *Pseudomonas*, siendo las mismas no fluorescentes, por lo tanto se descartó la presencia de *Pseudomonas* spp. fluorescentes que también causan tallo hueco (*P. viridiflava*, *P. cichorii*).

Cuadro No. 3. Características de los aislados que permiten clasificarlos como *Pseudomonas*

Test	<i>Pseudomonas</i>	Aislados												
		1c	2c	3c	4s	5s	6s	7s	8s	9s	10s	11s	12s	13s
KOH 3%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	oxidativo	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.	oxi.
Fluorescencia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S= Salto

C= Canelones

Todos los aislados en estudio presentaron filancia en el test de KOH, correspondiendo por lo tanto a bacterias Gram-negativas, como la mayoría de las bacterias fitopatógenas y presentaron metabolismo oxidativo, lo cual permite clasificarlos como pertenecientes al género *Pseudomonas*. Por lo tanto con estos resultados se descartan los géneros *Clavibacter* (KOH positivo), y *Erwinia* (*Pectobacterium*), la cual es anaerobia facultativa.

#### 4.6. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Los aislados de la colecta fueron positivo a los test de catalasa, hidrólisis de gelatina, nitrato reductasa, arginina dihidrolasa; y como resultado negativo los test de Levan e hidrólisis de almidón, lo que concuerda con los resultados para *P. corrugata* y *P. mediterranea* de Catara et al. (2000, cuadro No. 4).

Cuadro No. 4. Perfil bioquímico de los aislados de *Pseudomonas* no fluorescentes

Test	(1) Resultados esperados				Aislados												
	P. c	P. m	P. ci	P. v.	1c	2c	3c	4s	5s	6s	7s	8s	9s	10s	11s	12s	13s
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidro-Gelatina	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescencia	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Levan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de almidón	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato reducción	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilización D-Arabinosa	+	+	-	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-cetoglucanato	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1)= Resultados esperados para *P. corrugata*, *P. mediterranea*, *P. cichorri* y *P. viridiflava*

S= Salto

C= Canelones

Para diferenciar bioquímicamente *P. corrugata* de *P. mediterranea* se realizó el test de utilización de 2-cetoglucanato, siendo su reacción negativa, lo que podría sugerir que los aislados pertenecen a *P. corrugata* según Catara et al. (2000). Estudios posteriores realizados por Moura et al. (2008) demuestran que *P. corrugata* y *P. mediterranea* dan resultado variable para este test; dejando de ser así un factor discriminante entre ellas.

Esta variabilidad entre los aislados de una especie también se observó en la producción de arginina dihidrolasa (Sutra et al. 1997, Catara et al. 2000, 2002, Catara 2007), meso-tartrato e histamina (Moura et al., 2008) lo cual evidencia la limitación de los test bioquímicos en la identificación de las especies de *Pseudomonas*.

#### 4.7. ANÁLISIS MOLECULAR

De los productos de amplificación en PCR con los primers específicos (PC5/PC1) de los trece aislados iniciales, cuatro correspondieron a *P. corrugata* (2c, 3c, 9s y 11s) y nueve a *P. mediterranea* (1c, 4s, 5s, 6s, 7s, 8s, 10s, 12s y 13s) (cuadro No. 5). Estos resultados se repitieron con los trece aislados de los reisolamientos de la prueba de patogenicidad.

El análisis del Blast de la secuencia del producto de la PCR con los primers PC1 de los aislados 1c y 5s, mostró 99 y 100% de similitud respectivamente con la cepa de referencia de *P. mediterranea* (KC405207.1), y el 8s 99%, confirmando que los productos amplificados con los primers PC1 corresponden con *P. mediterranea*. Debido al tamaño de la banda de 1100 pb no se pudo realizar secuenciamiento de los productos de los primers PC5 (*P. corrugata*).

Cuadro No. 5. Presencia o ausencia del producto de la PCR de los aislados con los primers PC5 y PC1 (*P. corrugata* y *P. mediterranea*)

Aislamiento	PC5 ( <i>P. corrugata</i> )	PC1 ( <i>P. mediterranea</i> )
1c	-	+
2c	+	-
3c	+	-
4s	-	+
5s	-	+
6s	-	+
7s	-	+
8s	-	+
9s	+	-
10s	-	+
11s	+	-
12s	-	+
13s	-	+

PC1 + (banda 600 pb); PC5 + (banda 1100 pb), PC1/5 - (ausencia de banda)

La amplificación de un fragmento de 1100 pb en la reacción con los primers PC5, en las muestras 2c, 3c, 9s y 11s, se corresponde con el resultado negativo del test bioquímico de utilización de 2-cetoglucanato (Catara et al., 2000); indicando que corresponden a *P. corrugata*.

En el resto de las muestras el análisis molecular no se corresponde con el resultado de la utilización de 2-cetoglucanato (Catara et al., 2002). Sin embargo Moura et al. (2008) también encontraron variabilidad en aislados de *P. mediterranea* positivos en la utilización de 2-cetoglucanato, por lo que esta prueba no sería confiable para discriminar *P. corrugata* de *P. mediterranea*.

El uso de primers específicos fue eficiente en la identificación de los aislados coincidiendo el resultado en el aislamiento inicial y su reaislamiento. Sin embargo los test bioquímicos fueron insuficientes para la diferenciación de *P. corrugata* y *P. mediterranea* dada la variabilidad intraespecífica en la utilización de 2-cetoglucanato.

En futuras investigaciones sobre tallo hueco se deberá ampliar la colecta de muestras, evaluando la prevalencia de las diferentes *Pseudomonas* spp. que causan la enfermedad. Así también realizar estudios epidemiológicos e implementar medidas de manejo que reduzcan la incidencia de la enfermedad.

## 5. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de *P. corrugata* y *P. mediterranea* causando tallo hueco en tomate en el país.
- El uso exclusivo de los test bioquímicos fue insuficiente para diferenciar *P. corrugata* de *P. mediterranea*; mientras la PCR con primers específicos fue eficiente para diferenciar ambas especies en las muestras analizadas.

## 6. RESUMEN

El tallo hueco causado por *Pseudomonas* spp. puede llegar a ser destructivo para la producción de tomate en diferentes regiones del mundo. En Uruguay la enfermedad y su agente causal no ha sido reportado, por lo cual el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar *Pseudomonas* spp. causantes de tallo hueco. Se realizó una colecta de tallos de plantas con síntomas de la enfermedad en la zona sur (Canelones) y norte (Salto). Se realizaron aislamientos en Nutriente Agar Dextrosa (NAD). Los aislados presentaron reacciones positivas en pruebas de hipersensibilidad y patogenicidad y se les realizaron pruebas bioquímicas para diferenciar especies de *Pseudomonas*. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con primers específicos (PC1 y PC5). Se identificaron trece aislados, cuatro *P. corrugata* y nueve *P. mediterranea* de acuerdo a los productos amplificados con los primers PC5 y PC1, respectivamente. Los test bioquímicos no permitieron diferenciar los aislados de *P. mediterranea*. El presente estudio es el primer reporte de *P. corrugata* y *P. mediterranea* causando tallo hueco en Uruguay.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*; Bacterias; *Pseudomonas* spp.; *Pseudomonas corrugata*; *Pseudomonas mediterranea*.

## 7. SUMMARY

Tomato pith necrosis could be a destructive disease of tomato crops worldwide. In Uruguay there are no reports of the causal agent of the disease, so the aim of this work was to identify and characterize different *Pseudomonas* spp. that cause it. Tomato stems from plants with disease symptoms were collected in the South (Canelones) and North (Salto) regions of Uruguay. Isolation from these samples was made on Nutrient Agar Dextrose (NAD) medium. Hypersensitivity and pathogenicity test were conducted for every isolate: when both tests resulted positive additional biochemical tests were made in order to differentiate *Pseudomonas* spp. Moreover, polymerase chain reactions with specific primers (PC1 and PC5) was run. Thirteen isolates were identified: four as *P. corrugata* and nine as *P. mediterranea*, with primers PC5 and PC1 respectively. Biochemical tests do not allowed to differentiate among *P. mediterranea* isolates. The present study is the first report of *P. corrugata* and *P. mediterranea* causing tomato pith necrosis in Uruguay.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; Bacteria; *Pseudomonas* spp.; *Pseudomonas corrugata*; *Pseudomonas mediterranea*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alippi, A. M.; Dal Bo, E.; Ronco, L. B.; López, M. V.; López, A. C.; Aguilar, O. M. 2003. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathology*. 52: 287-302.
2. Acharya, T. 2013. Catalase test; principle, uses, procedure and results. (en línea). s.l., Microbeonline (Online Medical Microbiology guide for students and educators). s.p. Consultado may. 2016. Disponible en <http://microbeonline.com/bacteriology/biochemical-tests-in-microbiology/>
3. Ayers, S. H.; Rupp, P.; Johnson, W. T. 1919. A study of the alkali-forming bacteria in milk. USDA. Bulletin no. 782. 39 p.
4. Bou Arévalo, G. coord.; Fernández Olmos, A.; García de la Fuente, C.; Saéz Nieto, J. A.; Valdezate Ramos, S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. (en línea). In Cercenado, E.; Cantón, R. eds. *Procedimientos en microbiología clínica; recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2a. ed. Madrid, SEMIC. p. irr. (SEMIC Documentos científicos no. 37). Consultado mar. 2016. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomicrobiologia37.pdf>
5. CABI. 2006. *Crop protection compendium*. Wallingford, UK. s.p.
6. CAMM (Comisión Administrativa Mercado Modelo, UY). 2014. *Tendencias en la comercialización mayorista de tomate en el mercado modelo*. (en línea). Montevideo. 10 p. Consultado dic. 2015. Disponible en [http://mercadomodelo.net/c/document\\_library/get\\_file?uuid=87f3df3c-7e46-4e38a9760a40c6698273&groupId=10157](http://mercadomodelo.net/c/document_library/get_file?uuid=87f3df3c-7e46-4e38a9760a40c6698273&groupId=10157).
7. Catara, V.; Arnold, D.; Cirvilleri, G.; Vivian A. 2000. Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of the agent of tomato pith necrosis, *Pseudomonas corrugata*, by PCR amplification; evidence for two distinct genomic groups. *European Journal of Plant Pathology*. 106: 753–762.

8. \_\_\_\_\_.; Sutra, L.; Morineau, A.; Achouak, W.; Christen, R.; Gardan, L. 2002. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 1749–1758.
9. \_\_\_\_\_. 2007. *Pseudomonas corrugata*; plant pathogen and/or biological resource?. *Molecular Plant Pathology*. 8 (3): 233-244.
10. Cirvilleri, G.; Bella, P.; La Rosa, R.; Catara, V. 2008. Internalization and survival of *Pseudomonas corrugata* from flowers to fruits and seeds of tomato plants. In: Fatmi, M.; Collmer, A.; Lacobellis, N.; Mansfield, J.; Murillo, J.; Schaad, N.; Ullrich, M. eds. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens-identification epidemiology and genomics. Dordrecht, Netherlands, Springer. pp. 73-79.
11. Da Silva Romeiro, R. 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 279 p.
12. Duveiller, E.; Fucikovsky, L.; Rudolph, K. 1997. The bacterial diseases of wheat; concepts and methods of disease management. Mexico, D. F., CIMMYT. 50 p.
13. Gabor, B.; Wiebe, W. 1997. Tomato diseases; a practical guide for seedsmen, growers and agricultural advisors. Saticoy, CA, USA, Seminis Vegetable Seeds. 62 p.
14. Gómez, D.; Martínez, L. 1999. Detección de *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis* en lotes comerciales de semilla de tomate. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 73 p.
15. Gregersen, T. 1978. Rapid method for distinction gram-negative from gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 5: 123-127.
16. Himedia Laboratories, IN. 2015a. Gluconate test medium. (en línea). Mumbai. s.p. (Technical data M483). Consultado 01 abr. 2016. Disponible en <http://himedialabs.com/TD/M483.pdf>
17. \_\_\_\_\_. 2015b. King's medium B Base. (en línea). Mumbai. s.p. (Technical data M1544). Consultado 01 abr. 2016. Disponible en <http://himedialabs.com/TD/M1544.pdf>

18. Hortoinfo, ES. 2015. El mundo produce 2.636 millones de kilos más de tomate (en línea). Barcelona, ES. s.p. Consultado mar. 2016. Disponible en <http://hortoinfo.es/index.php/noticia/4682-prod-mund-tomate-120215>
19. INIA. GRAS (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Grupo Agroclima y Sistemas de Información, UY). 2015. Normales climatológicas; temperatura máxima, temperatura mínima, humedad relativa. (en línea). Rincón del Colorado, Canelones, INIA Las Brujas. Estación Experimental "Wilson Ferreira Aldunate". s.p. Consultado abr. 2016. Disponible en <http://inia.uy/investigación-e-innovación/unidades/GRAS>
20. Jones, J. B.; Jones, J. P.; Stall, R. E.; Zitter, T. A. 1991. Compendium of tomato diseases. St. Paul, MN, APS. 73 p.
21. Klement, Z. 1990. Tobacco (HR) test for the quick demonstration of pathogenicity. In: Klement, Z.; Rudolph, K.; Sands, D. C. eds. Methods in phytobacteriology. Budapest, Akademia Klado. pp. 101-102.
22. Lelliot, R.; Stead, D. 1991. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plant. London, Blackwell. 224 p.
23. Liu, W. T.; Marsh, T. L.; Cheng, H.; Forney, L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 63 (11): 4516–4522.
24. Lopes, C. A.; Ávila, A. C. 2005. Doenças do tomateiro. Brasília, EMBRAPA Hortaliças. 151 p.
25. MacFaddin, J. F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. 850 p.
26. MGAP. DIEA; MGAP. DIGEGRA (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias; Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección General de la Granja, UY). 2014. Encuestas hortícolas 2013 zonas Sur y litoral Norte. Montevideo. 23 p.
27. Mitrev, S.; Karov, I.; Kovacevik, B.; Kostadinovska, E. 2014. *Pseudomonas* population causing tomato pith necrosis in the

- republic of Macedonia. *Journal of Plant Pathology*. 96 (3): 589-592.
28. Mollet, C.; Drancourt, M.; Raoult, D. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology*. 26 (5): 1005–1011.
  29. Moura, M. L.; Rocha, M.; Fischer-Le Saux, M.; Lima, A.; Duclos, J. 2008. Genetic diversity of non-fluorescent *Pseudomonads* associated with tomato pith necrosis in Portugal. *Acta Horticulturae*. no. 789: 285-292.
  30. Mulet, M.; Bennasar, A.; Lalucat, J.; Garcia-Valdes, E. 2009. An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes*. 23 (3-4):140–147.
  31. Palacio-Bielsa, A.; Cambra, M. A.; Lopez, M. M. 2009. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria; updated review of protocols (1989–2007). *Journal of Plant Pathology*. 91 (2): 249–297.
  32. Pérez Faggiani, E.; Silvera Pérez, E.; Gepp Ward, V. 2004. *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson; agente causal de manchas necróticas en hojas de cebolla y ajo (*Allium spp.*) en Uruguay. *Agrociencia* (Montevideo). 8 (1): 33-38.
  33. Quezado-Duval, A. M.; Martins, O. M. 2007. Necrose da medulla; uma ameaça para o tomate estaqueado no Brasil. EMBRAPA. Circular Técnica no. 50. 11 p.
  34. Rodríguez, Rodríguez, R.; Tabares, Rodríguez, J. M.; Medina San Juan, J. A. 1997. El cultivo moderno del tomate. Madrid, ES, Mundi-Prensa. 255 p.
  35. Ryu, E. 1938. On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. *Japanese Society of Veterinary Science*. 17: 31-32.
  36. Sahin, F.; Aysan, Y.; Saygili, H. 2005. First observation of pith necrosis on tomato caused by some *Pseudomonas* species in Turkey. *Acta Horticulturae*. no. 695: 93-95.
  37. Sarris, P. F.; Trantas, E. A.; Mpalantinaki, E.; Ververidis, F.; Goumas, D. E. 2012. *Pseudomonas viridiflava*, a multi host

plant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. PLoS ONE. 7 (4): e36090.

38. Scarlett, C. M.; Fletcher J. T.; Roberts, P.; Lelliot R. A. 1978. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. Annals of Applied Biology. 88: 105-114.
39. Schaad, N. W.; Jones, J. B.; Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3<sup>rd</sup>. ed. St Paul, MN, APS. 373 p.
40. Suslow, T. V.; Schroth, M. N.; Isaka, M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology. 72: 917-918.
41. Sutra, L.; Siverio, F.; Lopez, M. M.; Hunault, G.; Bollet, C.; Gardan, L. 1997. Taxonomy of *Pseudomonas* strains isolated from tomato pith necrosis; emended description of *Pseudomonas corrugata* and proposal of three unnamed fluorescent *Pseudomonas* genomospecies. International Journal of Systematic Bacteriology. 47: 1020–1033.
42. Trantas, E.; Sarris, P.; Pentari, M.; Mpalantinaki, E.; Ververidis, F.; Goumas, D. 2014. Diversity among *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* isolated from tomato and pepper showing symptoms of pith necrosis in Greece. Plant Pathology. 64 (2): 307-318.
43. Vaneechoutte, M.; De Beenhouwer, H.; Claeys, G.; Verschraegen, G.; De Rouck, A.; Paepe, N.; Elaichouni, A.; Portaels, F. 1993. Identification of Mycobacterium species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis. Journal of Clinical Microbiology. 31(8): 2061–2065.
44. Wilkie, J. P.; Dye, D. W.; Watson, D. R. W. 1973. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. New Zealand Journal of Agricultural Research. 16: 315-323.
45. Xu, X.; Baysal, Gurel, F.; Miller, S. A. 2013. First report of tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas mediterranea* in the United States and *P. corrugata* in Ohio. Plant Disease. 97: 988.

46. Yamamoto, S.; Bouvet, P. J. M.; Harayama, S. 1999. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences; comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49 (1): 87–95.
47. \_\_\_\_\_.; Kasai, H.; Arnold, D. L.; Jackson, R. W.; Vivian, A.; Harayama, S. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*. 146 (10): 2385–2394.

## 10. ANEXOS

### Anexo No. 1. Medios de cultivo

#### Medio de cultivo: Nutriente Agar Dextrosa (NAD)

##### Ingredientes:

Nutriente Agar..... 28 gr (Oxoid)  
Dextrosa.....5 gr (Difco)  
Agua destilada estéril.....1 lt

#### Medio de cultivo: Hugh-Leifson (O/F)

##### Ingredientes:

Medio basal O/F ..... 9,4 gr (Difco)  
Dextrosa.....10 gr (Difco)  
Agua destilada estéril.....1 lt

#### Medio de cultivo: King's B

##### Ingredientes:

Proteosa peptona.....20 gr (Difco)  
Glicerol.....10 gr (desconocido)  
 $K_2HPO_4$ .....1,5 gr (J.T. Baker)  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....1,5 gr (J.T. Baker)  
Agar.....15 gr (Oxoid)  
Agua destilada estéril.....1 lt

#### Medio de cultivo: Nutriente Agar Sucrosa (NAS)

##### Ingredientes:

Sucrosa.....5 % (Prosales)  
Nutriente Agar.....28 gr (Oxoid)  
Agua destilada estéril.....1 lt

Medio de cultivo: gelatina

Ingredientes:

Yeast extract..... 3 gr (Sigma)  
Peptona..... 5 gr (Difco)  
Gelatina comercial.....120 gr (Hornex)  
Agua destilada estéril.....1 lt

Medio de cultivo: reducción de nitrato

Ingredientes:

KNO<sub>3</sub>..... 1 gr (desconocido)  
Peptona..... 5 gr (Difco)  
Extracto de levadura.....3 gr (Oxoid)  
Agar.....3 gr (Oxoid)  
Agua destilada estéril.....1 lt

Medio de cultivo: Arginina dihidrolasa

Ingredientes:

Peptona.....1 gr (Difco)  
NaCl.....5 gr (J.T. Baker)  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0,3 gr (J.T. Baker)  
Agar.....3 gr (Oxoid)  
Rojo fenol.....1 mg (desconocido)  
Arginina HCl..... 10 gr (Difco)  
Agua destilada estéril.....1 lt

Medio de cultivo: Ayers et al.

Ingredientes:

Fosfato de amonio.....1 gr (Sigma)  
Cloruro de potasio.....0,2 gr (J.T. Baker)  
Sulfato de magnesio heptahidratado.....0,2 gr (Fisher)  
Agar.....12 gr (Oxiod)  
Agua destilada estéril.....1 lt

Medio de cultivo: glucanato

Ingredientes:

Tryptona.....1,5 gr (desconocido)  
Extracto de levadura.....1,0 gr (Oxoid)  
 $K_2HPO_4$ .....1,0 gr (J.T. Baker)  
Glucanato de sodio.....40 gr (desconocido)  
Agua destilada estéril.....1 lt

Reactivo de Benedict's

Ingredientes:

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ .....1,73 gr (desconocido)  
Citrato de sodio.....17,3 gr (Sigma)  
 $Na_2CO_3$ .....10 gr (J.T. Baker)  
Agua destilada estéril.....1 lt