UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

AJUSTE DE UN MÉTODO PARA OBTENER Y MANTENER EN CONDICIONES DE LABORATORIO PLANTAS ASINTOMÁTICAS DE LIMÓN RUGOSO (*Citrus jambhiri* Lush) INOCULADAS ARTIFICIALMENTE CON *Xanthomonas axonopodis* pv*. citri.*

por

Leticia María LARRECHART ZANETTI

TESIS presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Ingeniera Agrónoma.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2010

Tesis aprobada por:

Director: ----------
Ing. Agr. M.Sc. Elena Pérez Faggiani

Ing. Agr. María Emilia Cassanello

Ing. Agr. Luis Bisio

Fecha: 17/12/2010 ----------

Autor: ----------
Leticia María Larrechart Zanetti

AGRADECIMIENTOS

A mi querida familia Mamá, Papá a mis hermanos Julio, Ana y Juanjo.

A Rafa por su apoyo incondicional.

A mi directora Elena, por la confianza la paciencia y por la disposición constante. A la Ing. Agr. Mercedes Peyrou, al Ing. Agr. Luis Bisio por sus valiosos aportes y a la Ing. Agr. María Emilia Cassanello por dedicarle tanto tiempo a la corrección de este trabajo.

A todo el personal de INIA Salto Grande por la buena disposición para llevar adelante este trabajo.

A mi amiga Roxana que supo apoyarme cuando la carrera se hizo cuesta arriba y a mis amigas de Facultad de Agronomía que me apoyaron en todos los momentos.

A todos ellos muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN……..... II
AGRADECIMIENTOS…….... III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES……..… VI

1. INTRODUCCIÓN…….. 1

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA…….. 3
2.1. LA CITRICULTURA……... 3

2.1.1. La citricultura a nivel mundial……. 3
2.1.2. Producción mundial……... 4
2.1.3. Exportaciones mundiales……. 5
2.1.4. Importancia del rubro para Uruguay……... 6
2.1.5. Producción nacional…….. 6
2.1.6. Exportación nacional……. 8

2.2. CANCRO CÍTRICO ……... 10

2.2.1. Agente causal……. 12
2.2.2. Distribución geográfica……. 14

2.3. CICLO DE LA ENFERMEDAD……. 15
2.3.1. Diseminación ……. 16
2.3.2. Inoculación…….. 16
2.3.3. Penetración……. 16
2.3.4. Infección…….. 17
2.3.5. Colonización……... 17

2.4. FACTORES QUE AFECTAN EL PERÍODO DE INCUBACIÓN……. 18
2.4.1. Temperatura……..…… 18
2.4.2. Humedad……..... 19
2.4.3. Concentración de bacteria en el inóculo……... 20
2.4.4. Métodos de inoculación……..…. 20

3. MATERIALES Y MÉTODOS..... 22
3.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO..... 22
3.1.1. Manejo de las plantas utilizadas como hospederas..... 22
3.1.2. Producción de inóculo 23
3.1.3. Inoculación..... 24
3.1.4. Métodos de detección de bacterias viables en hojas asintomáticas..... 28
3.1.5. Presencia de síntomas..... 30
3.1.5.1. Crecimiento de colonias en medio nutritivo Wakimoto..... 30
3.1.5.2. Inoculación en plantas indicadoras..... 31
3.1.5.3. Forzamiento de síntomas en hojas desprendidas..... 32

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 35
4.1. PERÍODO DE INCUBACIÓN 35
4.1.1. Efecto de la temperatura 35
4.1.2. Efecto del método de inoculación 40
4.1.3. Efecto de la concentración de bacterias..... 41
4.2. PRESENCIA DE BACTERIAS VIABLES EN TEJIDO ASINTOMÁTICO..... 42

5. CONCLUSIONES..... 47

6. RESUMEN..... 49

7. SUMMARY..... 51

8. BIBLIOGRAFÍA 52

9. ANEXOS 58

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No. Página

1. Volúmenes anuales de fruta cítrica en miles de toneladas para los principales países productores del mundo ……... 4

2. Comparativo para dos años de exportaciones del Hemisferio Sur por especie, en miles de toneladas……. 5

3. Zonas de producción citrícola en Uruguay…… 7

4. Evolución de las exportación de cítricos en volumen (miles de tt)…… 9

5. Exportación de cítricos en volumen y valor año 2007……. 9

6. Exportación de cítricos por especie, según destino, en miles de toneladas (al 30/11/2007)…….. 10

7. Patogenicidad de las distintas razas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri,* según especie cítrica y distribución geográfica……. 13

8. Descripción de las combinaciones de factores (concentración de bacterias/ método de inoculación/ temperatura) y fecha de inoculación artificial de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en limón rugoso …… 25

9. Métodos de detección utilizados para confirmar la presencia de bacterias viables en tejidos asintomático en las diferentes fechas de evaluación ……... 29

10. Características morfológicas y mucosidad de las colonias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cepa 49b, en medio de cultivo Wakimoto, incubadas por 48 horas de edad…… 32

11. Tiempo que permanecieron las hojas desprendidas acondicionadas en agar – agua y cámara húmeda para la expresión de los síntomas en cada fecha de evaluación…….. 34

12. Formación de lesiones de cancro cítrico en plantas de limón rugoso inoculadas con diez concentraciones de inóculo, dos métodos de inoculación y dos temperaturas de incubación…… 36

13. Período de incubación (en días) en plantas de limón rugoso inoculadas con *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* con diez concentraciones de inóculo, dos métodos de inoculación, mantenidas a 28° C …….. 37

14. Período de incubación (en días) en plantas de limón rugoso inoculadas con *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* con diez concentraciones de inóculo, dos métodos de inoculación, mantenidas a 9° C…….. 39

15. Resultados de la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en hojas asintomáticas de plantas de limón rugosos inoculadas por infiltración, creciendo a 28° C…….. 43

16. Resultados de la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en hojas asintomáticas de plantas de limón rugosos inoculadas por infiltración, creciendo a 9° C…… 43

17. Resultados de la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en hojas asintomáticas de plantas de limón rugosos inoculadas por aspersión, creciendo a 9° C……. 44

Gráfico No.

1. Producción total de cítrus en una década para Uruguay……. 8

Ilustración No.

1. Halo aceitoso, observado sobre una hoja de limón rugoso al inicio de la infección provocada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*…….. 11

2. Costras características sobre un fruto de naranja Valencia causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ……. 11

3. Ciclo de la enfermedad Cancro cítrico provocada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (adaptado de Gottwald et al., 2002)…… 15

4. Detalle de la técnica de inoculación por infiltración……. 27

5. Identificación del área inoculada por el método de infiltración…….. 27

6. Aspecto del aspersor De Vilbiss……. 27

7. Delimitación del área inoculada por el método de aspersión……. 28

8. Hoja de acetato perforada utilizada para delimitar el área de inoculación por aspersión……. 28

9. Hojas asintomáticas desprendidas de limón rugoso acondicionadas para realizar el test de forzamiento de síntomas en cámara húmeda…… 33

1. INTRODUCCIÓN

A partir de la década del 70, del siglo pasado, el sector citrícola uruguayo tuvo un importante cambio al proponerse el desafío de producir fruta fresca para exportación.

En la actualidad, luego de 40 años de exportaciones sostenidas, el sector ha consolidado mercados exigentes como la Unión Europea con exportaciones promedio de 130 mil toneladas anuales de cítricos en los últimos 5 años (Bruno, 2007).

El cancro cítrico causado por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* es una enfermedad muy difundida en los cítricos (Agrios 1995, Durán- Vila, 2000). En los frutos produce lesiones que afectan solo la apariencia externa del mismo, considerándose un daño de tipo cosmético. En ataques severos puede provocar caída prematura de los frutos y defoliación con la consecuente pérdida de rendimiento (Kimati et al. 1995, Agrios 1995, Durán – Vila y Moreno 2000, Sozzi 2007)

Sin embargo el principal problema de esta enfermedad es el carácter cuarentenario del agente causal (Durán – Vila y Moreno 2000, Canteros 2001). Todos los países productores de cítricos en los que esta enfermedad no se encuentra presente mantienen un estricto cuidado con la prohibición en la importación de frutos y árboles de cítricos procedentes de países donde se ha detectado la enfermedad (Agrios, 1995).

A partir del años 1997 la Unión Europea modificó las normas fitosanitarias y aplicó mayores restricciones para importar frutas de países con presencia de cancrosis de los cítricos (Kornoski et al., 2006).

En Uruguay, los primeros focos de cancro cítrico fueron observados en la segunda mitad del siglo pasado y desde entonces para evitar el establecimiento y la diseminación de la bacteria, el control se basó en un conjunto de medidas establecidas en normas legales con énfasis en el principio de erradicación (Arocena, 1987).

Sin embargo, en los últimos años se constató un aumento de la enfermedad que llevó a modificar el marco regulatorio vigente, considerando otras medidas de control que contribuyeran a evitar el avance de la enfermedad. Es ejemplo de esto el uso de cobre con el propósito de proteger el tejido susceptible en brotes y frutos (Decreto del 17/08/2001 que modifica el articulo 11 del decreto No. 133/992[1])

La situación planteada, generó la necesidad de iniciar trabajos nacionales de investigación que expliquen el comportamiento de la enfermedad en nuestras condiciones de producción. El objetivo principal es contar con medidas de manejo que eviten la propagación y aumento de la intensidad de la enfermedad, a niveles que pongan en riesgo las exportaciones a los mercados conquistados.

Una medida que contribuye a evitar la diseminación de la enfermedad es utilizar material de propagación sano. Por esto en el año 2007 – 2008, se llevó a cabo un proyecto conjunto integrado por el equipo de investigadores del Dpto. de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y el área de fitopatología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) titulado; “Desarrollo de metodologías de detección de bajas concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* y su aplicación en material de propagación”. Para el desarrollo de algunas actividades planteadas en el proyecto, se entendió necesario ajustar una metodología para obtener plantas asintomáticas infectadas artificialmente.

El objetivo de este trabajo fue evaluar un método para obtener y mantener en forma asintomática, plantas de limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) inoculadas artificialmente con *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en condiciones controladas de laboratorio.

[1]URUGUAY. Presidencia de la República. Secretaría de Prensa y Difusión. 2001. Cancro Cítrico (sin publicar).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. LA CITRICULTURA

2.1.1. La citricultura a nivel mundial

Los cítricos son frutales de origen tropical cuya producción se ha extendido a las regiones sub – tropicales, siendo común su explotación comercial hasta los paralelos 40º Latitud Norte y 35º Latitud Sur (Arocena, 2005).

Según FAO, en el comercio internacional, los cítricos se encuentran primeros en términos de valor, existiendo básicamente dos mercados de productos citrícolas; el mercado de las frutas frescas y el mercado de los cítricos procesados (UNCTAD, 2009).

En climas tropicales, el grueso se concentra en Brasil, con producciones que superan las 18 millones de toneladas anuales (FAO, 2006). Un 67 % de ésta producción se destina a la industria de jugos (FAO, 2006). En tanto en climas sub- tropicales, se concentran los países productores de cítricos para el consumo en fresco. En general la producción se sitúa en la estación invernal; aunque mediante la selección varietal se han obtenido variedades de producciones más tempranas y más tardías, ampliando el ciclo de producción global (Arocena, 2005).

Las latitudes extremas son menos productivas, no obstante el frío provoca el desarrollo de colores de la gama del rojo en las naranjas y mandarinas que la diferencian notoriamente del verde original de los climas tropicales (Arocena, 2005) y las hace más atractivas para el mercado de la fruta fresca.

2.1.2. Producción mundial

La producción mundial de cítricos se duplicó en treinta años pasando de 47 mil toneladas a valores cercanos a 95 mil toneladas para la campaña 2004/05 (ver Cuadro No. 1).

Cuadro No. 1. Volúmenes anuales de fruta cítrica en miles de toneladas para los principales países productores del mundo

AÑOS	1970/ 79	1980/ 89	1990/ 99	2000	2001	2002	2003	2004	2005/ 06
MUNDO	**47133**	**57775**	**81121**	**89707**	**98358**	**94084**	**100852**	**94793**	**------**
A. del Norte y Central									
USA	12427	11168	13433	14846	14800	13731	14784	10499	10451
México	1901	2480	4421	6143	6357	6080	6583	6910	6030
A. del Sur.									
Brasil	7392	11671	16907	16885	20674	17735	21392	18903	18238
Argen - tina	1440	1468	2056	2808	2566	2465	2550	2670	2430
Uru- guay	77	151	271	343	236	244	242	242	326
Chile	108	141	208	233	270	285	305	312	---
Perú	294	296	544	652	724	762	761	754	---
Europa									
España	2681	3472	5031	5400	5751	5944	6232	6181	5378
África									
Sudá - frica	599	708	1047	1527	1816	1586	1560	1543	1743
Oceanía									
Austra- lia	426	538	642	564	766	557	597	716	---
Asia									
China	656	1709	7329	9200	12027	12466	13884	15228	14985

Fuente: adaptado de FAO (2006).

2.1.3. Exportaciones mundiales

Según estadísticas de FAO, en la zafra 2005/06, se exportaron 11.5 millones de toneladas de cítricos frescos (Bruno, 2008).

Entre los exportadores del Hemisferio Norte se destaca en primer lugar España que representa el 28 % del total exportado mundialmente. En cuanto al Hemisferio Sur, se hará mayor énfasis por encontrarse Uruguay y sus competidores (ver Cuadro No. 2).

Cuadro No. 2. Comparativo para dos años de exportaciones del Hemisferio Sur por especie, en miles de toneladas

Países	Naranjas		Mandari-nas		Limones		Pomelos		**TOTAL**			
Años	07	08	07	08	07	08	07	08	07	08	07 %	08%
TOTAL	**1267**	**1212**	**298**	**301**	**438**	**505**	**243**	**217**	**2246**	**2239**	**100**	**100**
Sudáfrica	913	915	94	98	100	132	215	186	1323	1331	59	60
Argentina	145	103	83	80	284	318	26	30	537	531	24	24
Uruguay	85	69	46	38	14	14	1	1	146	122	6	5
Chile	11	37	23	21	38	40	1	1	72	99	3	4
Australia	105	78	16	18	1	1	0	0	122	97	5	4
Perú	8	11	37	47	1	0	0	0	46	58	2	3

Fuente: Bruno (2008).

En el año 2008 el 60% de las exportaciones del Hemisferio Sur provinieron de Sudáfrica, seguido por Argentina con un 24% y Uruguay un 5%.

Las exportaciones uruguayas de citrus para consumo en fresco hacia mercados anglosajones, presentan una amenaza dada por la producción creciente de países competidores de la región, caso de Chile y Perú (Bruno, 2008)

2.1.4. Importancia del rubro para Uruguay

En la década del 90, Uruguay se posiciona como el cuarto mayor exportador de fruta cítrica en contraestación del Hemisferio Sur.

Datos recientes afirman que Uruguay ocupa una posición marginal en el mercado de fruta cítrica fresca con una participación que ha ido disminuyendo en los últimos tres años. No obstante lo anterior; en Uruguay la industria citrícola es importante en términos socio-económicos, por diversos factores como presencia de un sector empresarial maduro, la intensidad en el uso de mano de obra, el aporte de divisas, y el impacto en el desarrollo en los territorios donde esta radicada (Bruno, 2008).

2.1.5. Producción nacional

La citricultura en Uruguay se concentra en dos áreas. La zona Norte y la zona Sur. La primera, la integran los departamentos de Salto, Paysandú y Río Negro, y en menor medida Rivera y Tacuarembó. En tanto la segunda esta conformada por los departamentos de Montevideo, Canelones, San José, Colonia, Maldonado y Florida (Arocena, 2005).

La zona Norte es la más extensa y en ella se encuentra el 85% de la superficie citrícola, 13.675 hectáreas efectivas, en las que se concentran especialmente la producción de naranjas, mandarinas y pomelos.

En tanto la zona Sur concentra la producción de limón, que ocupa 1336 hectáreas efectivas; aproximadamente el 73% de la superficie de montes de limón existentes en el país (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2008, ver Cuadro No. 3).

Cuadro No. 3. Zonas de producción citrícola en Uruguay

Especie	Total	Zona Norte		Zona Sur	
	Há.	Há.	%	Há.	%
Total	**16.145**	13.678	85	2467	15
Naranja	**7.599**	7.109	94	490	6
Mandarina	**6.424**	5.848	91	577	9
Limón	**1.821**	485	27	1.336	73
Pomelo	**302**	237	78	65	22

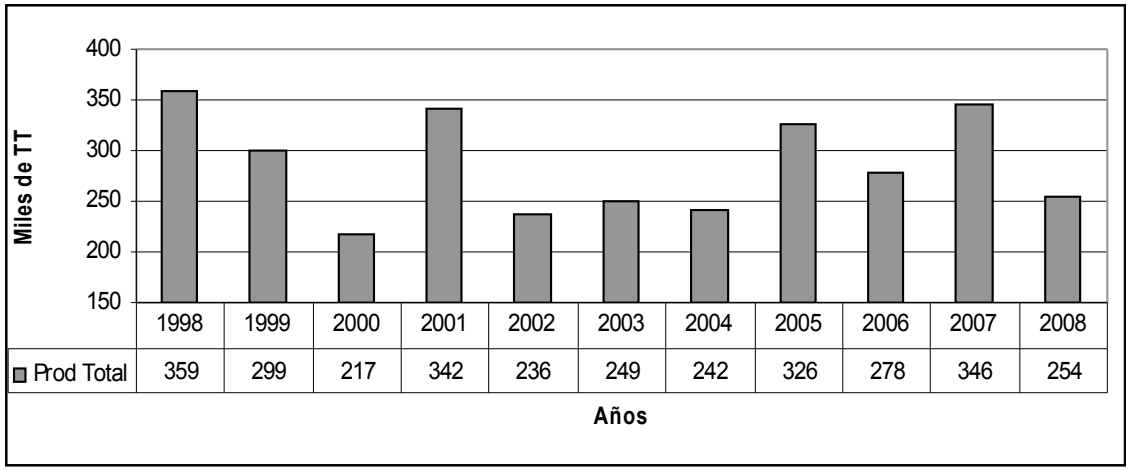
Fuente: URUGUAY. MGAP. DIEA (2008).

La producción de citrus para el año 2008 fue estimada en 254 mil toneladas, lo cual implica una caída del orden del 27% si se compara con la producción del año 2007 (346 mil toneladas), en el que se registrara la mayor cosecha de los últimos 10 años.

A pesar de la mencionada caída la cosecha 2008 se sitúa próxima al promedio de ese decenio, que se encuentra en el entorno de las 270 mil toneladas (ver Gráfico No. 1).

Debe señalarse que en el periodo 2007 – 2008 los montes de cítricos sufrieron daños a raíz de factores climáticos adversos; heladas, fuertes vientos, granizo. La incidencia de estos daños se profundizó por la persistente sequía que posteriormente afectó las plantaciones (URUGUAY. MGAP. DIEA ,2008).

Gráfico No. 1. Producción total de citrus en una década para Uruguay**.**



Fuente: URUGUAY. MGAP. DIEA (2008).

2.1.6. Exportación nacional

Como ya fue mencionado, el objetivo de la producción citrícola en nuestro país es obtener fruta de calidad para abastecer la demanda del hemisferio norte en contra estación.

En el año 2008 las exportaciones alcanzaron 122 mil toneladas, lo que equivale al 48% de la producción total (ver Cuadro No. 4). El volumen exportado se ubica un 18% por debajo de las exportaciones de la zafra pasada (Bruno, 2007).

Cuadro No. 4 . Evolución de las exportaciones de cítricos en volumen (miles de tt)

	Años						
Especie	**2002**	**2003**	**2004**	**2005**	**2006**	**2007**	**2008**
Total	**86.8**	**118**	**129.3**	**158.5**	**137.1**	**147.2**	**122**
Naranjas	49.2	69.0	77.4	96.4	78.9	85.8	69.0
Mandarinas	26.9	36.1	37.2	44.5	40.9	46.4	38
Limón	9.3	11.3	13.3	16.2	15.0	13.8	14
Pomelo	1.4	1.5	1.4	1.4	2.3	1.2	1

Fuente: Bruno (2007).

El valor en término de ganancias generado por las exportaciones de fruta fresca es de 74.2 millones de dólares, con un precio FOB promedio de US$ 504 por tonelada (Bruno, 2007, ver Cuadro No. 5).

Cuadro No. 5. Exportación de cítricos en volumen y valor año 2007

	Miles de tt.	**Millones US$**	%
Total	**147.2**	**74.2**	**100**
Naranja	85.8	37.2	50
Mandarina	46.4	30.7	41
Limón	13.8	5.9	8
Pomelo	1.2	0.4	1

Fuente: Bruno (2007).

En cuanto a los destinos de las exportaciones de fruta fresca, se presenta un cuadro con los principales destinos.

Cuadro No. 6. Exportaciones de cítricos por especie, según destino, en miles de toneladas (al 30/11/2007)

	Naranjas	**Mandarinas**	**Limones**	**Pomelos**	**Total**
Unión Europea	75.289	35.233	9.765	822	121.109
Resto de Europa	6.779	3.556	849	136	11.320
América	2.449	4.075	1.195	239	7.958
Asia	1.186	3.286	3.620	-	8.092

Fuente: Bruno (2007).

2. 2 CANCRO CITRICO

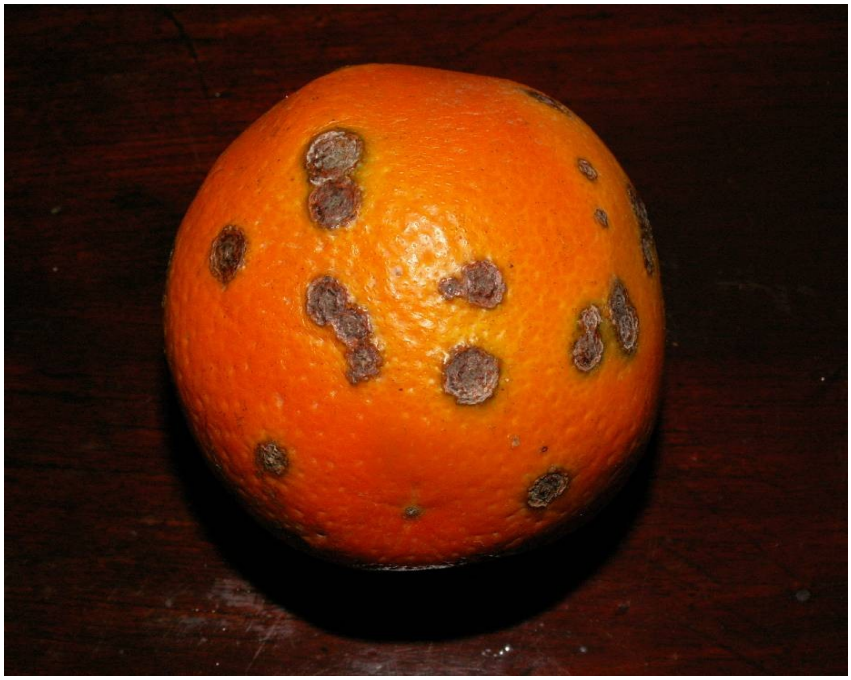
El cancro cítrico es una enfermedad que afecta a todos los cítricos de interés comercial. Es causada por una bacteria denominada *Xanthomonas axonopodis* pv*. citri* anteriormente *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. (Hasse 1915, Agrios 2005).

Esta grave enfermedad puede atacar hojas, ramas y frutos. Forma pústulas de aspecto corchoso, elevadas y ásperas al tacto de color crema al inicio del ataque y luego se van oscureciendo virando a un color caramelo característico. En infecciones recientes puede observarse una zona húmeda, muy similar a una mancha de aceite alrededor de la futura pústula (ver Ilustración No. 1). Éstas deprecian el valor comercial de la fruta (ver Ilustración No. 2). En infecciones fuertes puede causar defoliación, marchitamiento hasta caída de frutos (Durán – Vila y Moreno 2000, Sozzi 2007).

Xanthomonas axonopodis pv*. citri* afecta a la familia de las Rutáceas. Las infecciones naturales tienen mayor importancia económica en las especies del género *Citrus*. La especie *Poncirus trifoliata*, portainjerto de mayor uso en el Uruguay, también puede sufrir infecciones naturales (Koizumi y Kuhara, 1982).

Ilustración No. 1. Halo aceitoso, observado sobre una hoja de limón rugoso al inicio de la infección provocado por *Xanthomonas axonopodis* pv*. citri.*

Ilustración No. 2. Costras características sobre un fruto de naranja Valencia causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv*. citri.*



La real importancia de esta enfermedad se basa en las condiciones cuarentenarias del agente causal para la exportación de fruta fresca hacia países libres de la enfermedad (Agrios 1995, Canteros 2001, Sozzi 2007).

Los servicios de cuarentena de los países importadores, toman muestras de la partida de fruta ingresada y la someten a inspección por la posible presencia de síntomas característicos o sospechosos de la o las enfermedades bajo fiscalización. Las muestras son enviadas a laboratorios de referencia para confirmar la presencia del patógeno vivo capaz de reproducir la enfermedad [2].

2.2.1. Agente causal

En cuanto a morfología son células bacilares, aerobias, Gram negativas, móviles con un solo flagelo polar. Forman colonias de coloración amarilla y consistencia mucosa, debido a la producción de polisacáridos extracelulares (Durán – Vila y Moreno, 2000).

A través de análisis serológicos se logró identificar y clasificar tipos de cancrosis, causados por diferentes razas de la bacteria que presentan distinta agresividad ante el huésped susceptible.

[2] Peyrou, M. 2008. Com. personal.

Cuadro No. 7. Patogenicidad de las distintas razas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, según especie cítrica y distribución geográfica

Clasificación Taxonómica	***X. axonopodis* pv. *citri***	***X. axonopodis* pv. *aurantifolii***	***X. axonopodis* pv. *aurantifolii***
Tipo de cancrosis	**A**	**B**	**C**
Distribución Geográfica	Asia, África, América, Oceanía.	Argentina, Uruguay.	Brasil.
Sensibilidad de las especies			
Naranja Dulce	+++	+	-
Mandarino	+	+	-
Limonero	+++	+++	-
Pomelo	+++	+	-
Lima Mexicana	+++	+++	+++

Referencias; +++ Muy sensible, + = Poco sensible, - = No sensible.

Fuente: adaptado de Pereira Leite por Durán – Vila y Moreno (2000)

La raza A, también denominada asiática, por hacer referencia a su lugar de origen, es la raza del patógeno más importante, por ser la más severa y atacar la mayoría de las especies cítricas (Durán – Vila y Moreno, 2000). Se ha diseminado en numerosos países del mundo (ver Cuadro No. 7).

En Uruguay fueron detectadas la raza A y B. Sin embargo en la actualidad solamente se ha podido aislar la raza A, esto posiblemente debido a la menor agresividad de la raza B (Durán – Vila y Moreno 2000, Sozzi 2007).

2.2.2. Distribución geográfica

La cancrosis se describió por primera vez en los Estados Unidos en 1913 y se creyó que se trataba de una enfermedad nueva. Luego se comprobó que era originaria del sudeste asiático, era endémica en India, China y Japón y posiblemente se introdujo en Estados Unidos con material vegetal importado de éste último país (Durán –Vila y Moreno, 2000).

A principios de éste siglo se introdujo también en Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda, países de los que fue erradicada (Agrios 1995, Durán –Vila y Moreno 2000).

Actualmente esta extendida en más de cuarenta países de Asia, África, Oceanía y América.

En Sudamérica se detectó en Brasil en el año 1957, desde donde se ha extendido hacia muchos otros países, hoy está presente en distintas zonas de Argentina y Uruguay (Agrios, 1995).

2. 3 CICLO DE LA ENFERMEDAD

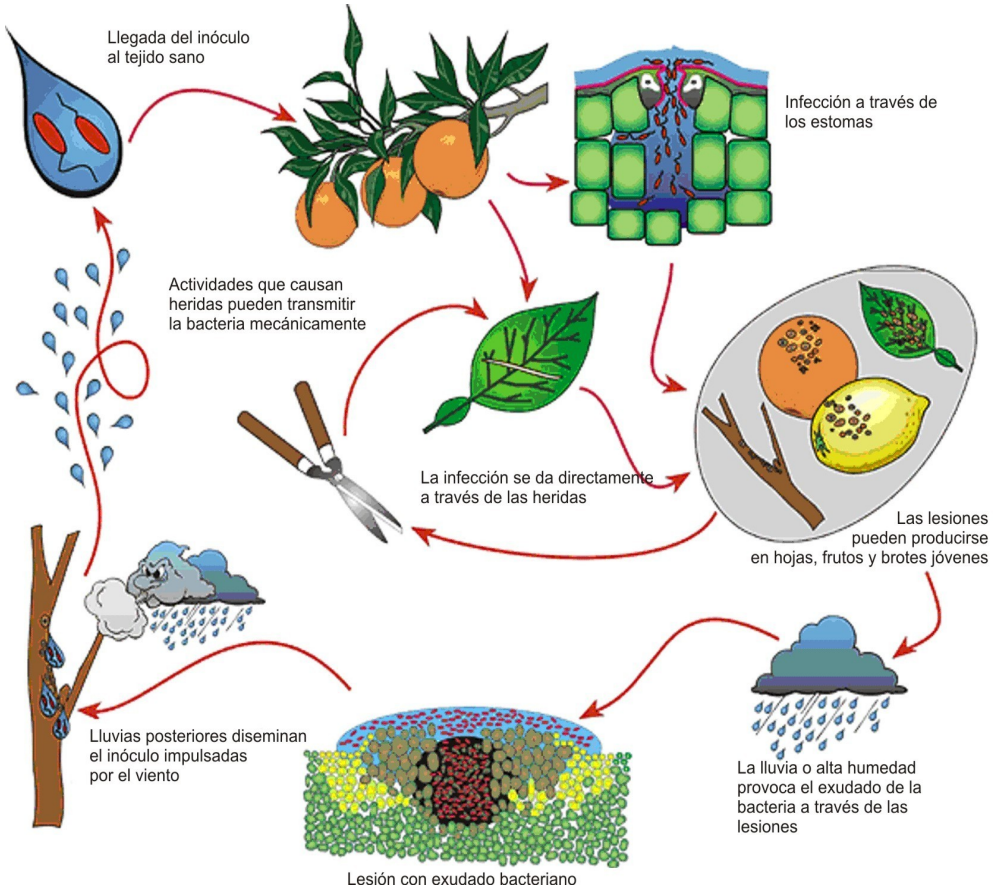


Ilustración No. 3. Ciclo de la enfermedad Cancro cítrico provocada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (adaptado de Gottwald et al., 2002).

Fuente: De Aurrecoechea et al. (2006)

Según Agrios (1995), Kimati et al. (1995) los principales eventos del ciclo de una enfermedad incluyen la diseminación, inoculación, penetración, infección, colonización, reproducción y sobrevivencia del patógeno.

Estás etapas en el caso de las bacterias tienen las siguientes características.

2.3.1. Diseminación

Esta fase del ciclo incluye los subprocesos de liberación, dispersión y deposición del patógeno.

2.3.2. Inoculación

Es proceso por el cual el patógeno entra en contacto con el hospedero.

2.3.3. Penetración

Este proceso involucra la entrada de las bacterias al hospedero y puede darse de dos formas; penetración por aberturas naturales de la planta o por heridas.

Penetración por aberturas naturales. Las plantas presentan muchas vías de entrada naturales para las bacterias; son ejemplo los estomas, lenticelas, nectarios, entre otras.

- Estomas; la densidad de estomas en una hoja varia entre 100 y 600 /mm^2, (también varia entre las especies vegetales), se estima que podrían representar un 1.5 % del área total de una hoja (Goto 1990, Transeau, citado por Kimati et al. 1995). Por esta razón representan una vía de entrada para las bacterias fitopatógenas. Para que esto ocurra es necesario que exista sobre la superficie foliar una película continua de agua (Durán - Vila y Moreno, 2000).

- Heridas; todas las partes de las plantas pueden verse perjudicadas por una variedad de causas, como insectos, el viento, las prácticas agrícolas como la poda, y los daños mecánicos debido a la maquinaria agrícola. Estas lesiones son generalmente

visibles y constituyen los principales portales de entrada para las bacterias (Goto, 1990).

2.3.4. Infección

Es el proceso mediante el cual los patógenos entran en contacto con las células o tejidos susceptibles de un hospedante (Agrios, 1995).

El proceso de infección finaliza cuando se estabilizan las relaciones parasitarias entre el patógeno y su hospedero que se podría materializar en el momento que el patógeno comienza a tomar nutrientes del hospedero (Kimati et al., 1995).

El simple ingreso del patógeno a la planta no garantiza que se esté desencadenando el proceso infectivo.

2.3.5. Colonización

No es tan simple definir la fase de colonización sin superponerla con la fase de infección. Por éste motivo aquí se presentan tres definiciones establecidas por diferentes autores citadas por Kimati et al. (1995).

- Se caracteriza el proceso de infección, "como el proceso que tiene inicio en la pre – penetración del inóculo y termina con una relación de estabilidad entre el patógeno y el hospedero" (Gaumann 1950, Hirst y Schein 1965, Butt y Royle 1980).

- Proponen "el establecimiento de las relaciones parasitarias como inicio del proceso. En éste caso la infección se prolonga hasta que aparecen los síntomas" (Roberts y Boothroyd 1972, González 1976).

- Los siguientes autores describen las fases de infección y colonización como una. Afirman que "la infección comienza con la entrada del patógeno al hospedero y se prolonga hasta que se visualizan los síntomas" (Strobel y Mathre 1970, Agrios 1988).

Científicamente no está determinado el momento exacto donde se daría la finalización del proceso de infección y comenzaría el de colonización (Kimati et al., 1995).

Dentro de las fases infección - colonización se determinan los periodos de incubación y latencia. Período de incubación se define como el intervalo de

tiempo comprendido entre la inoculación y la aparición de los síntomas de la enfermedad.

En tanto Latencia se define como el período que transcurre desde que ocurre la inoculación sobre la planta hospedera hasta que el inóculo vuelve a ser infectivo. Puede presentar diferencias dependiendo de cada especie hospedera, de la edad del órgano afectado, de la raza del patógeno, densidad del inóculo y de las condiciones ambientales externas como temperatura, humedad y forma de inoculación (Goto 1990, Kimati et al. 1995).

2. 4 FACTORES QUE AFECTAN EL PERIODO DE INCUBACIÓN

2.4.1. Temperatura

Este factor ambiental tiene un papel determinante en el período de incubación de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sobre plantas cítricas (Peltier 1920, Koizumi 1976a, Dalla Pria et al., 2006).

Los rangos de temperaturas para el desarrollo de la enfermedad se sitúan entre 13 y 35° C, con óptimos entre 25 y 30 ° C (Peltier 1920, Koizumi 1976a).

Peltier (1920) observó que colocando poblaciones de bacterias a 5° C en medio agarizado las mismas no presentaban crecimiento, pero si éstas mismas se exponían a 30 ° C retomaban la actividad. Esto indica que el organismo no está muerto cuando se lo somete a bajas temperaturas sino que aumenta su periodo de incubación.

Algo similar ocurre cuando se colocan las bacterias a temperaturas por encima de 33° C (Peltier, 1920). En trabajos realizados por Koizumi (1976a), se observó que temperaturas cercanas a 38 ° C constituyen el límite máximo para la expresión de la enfermedad, ya que en plantas huésped inoculadas con *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* y colocadas a 40 ° C las bacterias murieron sin provocar cambios en el tejido vegetal.

Temperaturas intermedias entre los rangos mencionados también prolongan o acortan el periodo de incubación, es así que al someter las poblaciones de bacterias a temperaturas entre 12 y 15° C el periodo de incubación se prolongó a 30 días; valores de temperaturas entorno a 20 ° C provocaron incubaciones de entre 28 y 19 días y a valores óptimos de temperatura entre 25 - 35° C el periodo disminuyó a 10 días, dentro de éste

rango se observó que la temperatura es inversamente proporcional al tiempo que demora la expresión de síntomas (Dalla Pria et al., 2006).

Analizando el factor temperatura y la incubación de bacterias fitopatógenas se conoce que éstas pueden sobrevivir en tejido vegetal por periodos de 1 a 6 meses cuando las condiciones de temperatura son adversas para la infección y pueden ser traslocadas en la planta sin producir lesiones típicas (Hayward, 1974).

2.4.2. Humedad

Este factor ambiental estaría ocupando un papel importante luego de la temperatura en el proceso infectivo ocasionado por *Xanthomonas axonopodis* pv*. citri*. Ambos factores se relacionan en forma positiva (Peltier 1920, Koizumi 1976a, Dalla Pria et al., 2006).

Para que ocurra el proceso infectivo las bacterias fitopatógenas necesitan que se forme un continuo de agua en la superficie foliar para poder ingresar en forma pasiva por los estomas, al mismo tiempo debe darse una congestión de agua en los tejidos vegetales que permita la apertura de los estomas al momento de la llegada de las bacterias (Gottwald y Graham 1992, Durán - Vila y Moreno 2000).

Dalla Pria et al. (2006), en un trabajo de investigación observaron que plantas sometidas a condiciones de temperaturas iguales a 20 – 35 ° C y diferentes tiempos de humedad entre 4 a 24 horas presentaron 100 % de incidencia de la enfermedad. Cuando inocularon plantas que no estuvieron expuestas a condiciones de humedad y por ende no se dio el fenómeno de congestión de agua en los tejidos vegetales la incidencia de la enfermedad fue solo del 7 %, (4 tratamientos en 56 totales).

Esto estaría demostrando que la humedad incide en forma determinante en el proceso infectivo, facilitando que se den ambas condiciones mencionadas anteriormente congestión de agua en los tejidos vegetales para facilitar la apertura estomática y agua libre como medio de transporte de las bacterias para ingresar al hospedero.

Para obtener un alto % de incidencia de la enfermedad, el tiempo mínimo requerido para mantener las plantas bajo condiciones de humedad es de cuatro horas, si las condiciones de temperatura son óptimas (Dalla Pria et al., 2006).

2.4.3. Concentración de bacterias en el inóculo

Al momento de la infección la concentración de bacterias en el inóculo incide, en conjunto con los factores mencionados anteriormente, en el periodo de incubación de las bacterias. Cuando la infección ocurre por aperturas naturales sean estomas o lenticelas la concentración mínima de bacterias en la solución para que se desencadene el proceso infectivo se encuentra en valores iguales a 1×10^4 ,1×10^5 y 1×10^6 ufc/ml (Goto 1990, Vernière et al. 2003). Si en cambio, la infección ocurre a través de heridas la concentración minima debería ser igual a 1×10^2 y 1×10^3 ufc/ml (Vernière et al., 2003). Gottwald y Graham (1992) observaron que el proceso infeccioso podía desencadenarse con la presencia de solamente dos bacterias cuando se regulaban todo los demás factores como temperatura, congestión de agua en los tejidos, y una adecuada presión de impacto al momento de la inoculación en los tejidos del hospedero.

2.4.4. Métodos de inoculación

La forma de ingreso de las bacterias en el tejido vegetal, influye en forma relevante en el periodo de incubación. Como ya se mencionó anteriormente las bacterias fitopatógenas tienen dos formas de ingresar a la planta hospedera, por aberturas naturales (estomas, lenticelas, nectarios) o por heridas provocadas por espinas, efecto del viento y prácticas de campo entre otros (Goto, 1990).

Cuando las bacterias son depositadas en la superficie vegetal e ingresan por los estomas deben atravesar barreras estructurales propias del tejido epidérmico, lo cual implica un gasto energético para éstas, además de estar expuestas a condiciones adversas propias del ambiente que las rodea. Dicho ambiente cambia dentro y fuera del tejido vegetal y cuando las bacterias se encuentran en la cámara sub. estomática, su viabilidad dependerá de condiciones como, porcentaje de humedad del ambiente, influencia de rayos UV, microorganismos competidores o antagonistas (Goto, 1990).

Si las bacterias logran superar mencionados obstáculos e ingresan al tejido, el ambiente que las rodea será diferente ya que deberán enfrentarse a los mecanismos de defensa de la planta. Es por esto que el período de incubación será mayor o menor dependiendo de la cantidad de bacterias que puedan ingresar luego de sortear todas estás dificultades (Koizumi y Kuhara 1982, Goto 1990).

Cuando el ingreso se efectúa por heridas, las bacterias son depositadas directamente en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales. En éste caso el periodo de incubación podría ser menor ya que más bacterias tendrían la posibilidad de ingresar al tejido, sorteando las condiciones adversas para comenzar con el periodo infectivo (Goto, 1990).

Ahora en condiciones de laboratorio se intenta reproducir lo que ocurre en forma natural al momento de la inoculación, siendo necesario evaluar diferentes métodos. Para esto es importante conocer que las hojas presentan mayor susceptibilidad a la infección cuando alcanzan 2/3 de su longitud final. A medida que el tejido vegetal avanza en edad aumenta la resistencia a la infección dada por una mayor acumulación de ceras (Gottwald y Graham, 1992).

A continuación se detallan brevemente algunos métodos evaluados.

- Inoculación por infiltración: Método de Klement (1963), éste método consiste en inocular la solución de bacterias con el auxilio de una jeringa donde previamente se realiza una herida con una aguja para facilitar el ingreso del líquido.

- Inoculación por presión de goma: Se inocula la solución bacteriana colocando una hoja dada vuelta sobre una banda de goma, dejando caer una gota de mencionada solución y presionando suavemente por encima con una goma de diámetro igual a 1.5 cm hasta quedar embebida, luego el líquido sobrante se seca con algodón (Goto, citado por Koizumi, 1976a).

- Inoculación por presión: Gottwald y Graham (1992) diseñaron un aparato de inoculación estomática para producir congestión de agua en los tejidos de la hoja y permitir, sin provocar heridas, el ingreso de las bacterias. Consistía en una cámara de inoculación pequeña unida a una hoja intacta. El agua y el inóculo se vierten en una corriente de aire impulsada por una presión conocida y se centra el impacto en un área de diámetro igual a 1 mm de superficie foliar.

- Aspersión: En la inoculación por aspersión, se rocían órganos vegetales con una solución de bacterias, utilizando un aspersor de vidrio. Luego se cubren las plantas inoculadas con una bolsa de polietileno para favorecer la congestión de agua en los tejidos y permitir la apertura estomática. Este último paso también se realiza antes de asperjar las plantas con la solución bacteriana (Koizumi, 1976a).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO

El ensayo fue instalado entre el 31 de julio y 8 de agosto del 2007 en el laboratorio de Fitopatología de INIA Salto Grande. Las observaciones se realizaron durante 329 días, finalizando el 16 de julio del 2008.

3.1.1. Manejo de las plantas utilizadas como hospederas

Se utilizaron plantas de limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) de aproximadamente 14 meses de edad, obtenidas a partir de semillas certificadas en el laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental INIA Salto Grande.

En cuanto a la elección de la variedad para desarrollar el trabajo se resolvió hacerlo sobre plantas de limón rugoso, debido a que su follaje presenta mayor susceptibilidad a la enfermedad, (tejido sobre el cual se realizaron las inoculaciones), en relación a las ramitas (Koizumi y Kuhara 1982, Graham et al. 1992).

Las semillas se desinfectaron superficialmente con fungicida Chinosol (sulfato de hidroxiquinoleína) al 0.5% durante 3 minutos y se sembraron en almácigos con sustrato estéril (ver Anexo No. 9.1). Luego las plantas se trasplantaron a macetas de 1.5 litros colocándose 3 plantas por recipiente y se utilizó el mismo tipo de sustrato.

Quince días antes de comenzar el ensayo, todas las plantas se podaron para obtener una brotación uniforme y se mantuvieron en fitotrón a 28 º C y fotoperíodo de 12 hs.

La inoculación se realizó en hojas inmaduras, de aproximadamente 2/3 del tamaño final a completamente expandidas que es cuando presentan mayor susceptibilidad a la infección por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Gottwald y Graham, 1992).

.

3.1.2. Producción de inóculo

Como inóculo se utilizó el aislamiento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 49b identificado y caracterizado en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (cedido por la Ing. Agr. M.Sc. Mercedes Peyrou).

Esta cepa fue aislada de un fruto de limón proveniente de una quinta de Kiyú, Departamento de San José y caracterizada como *Xanthomonas axonopodis* pv*. citri.*

El cultivo se recibió en medio Wakimoto y fue repicado a medio Wakimoto, con el que se realizaron todo los aislamientos y repiques posteriores. (ver Anexo No. 9.2). Las placas de Petri se incubaron a 28º C y en oscuridad. Los repiques se realizaron semanalmente para tener cultivos jóvenes (36 – 72 horas) para realizar inoculaciones.

La patogenicidad fue evaluada por la cantidad de costras características de la enfermedad desarrolladas en plantines de pomelo Duncan *(Citrus paradisi)* inoculados (Gottwald y Graham, 1992).

A partir del crecimiento de una colonia fresca (48 hs de edad) en medio nutritivo líquido (ver Anexo No. 9.3) que permaneció en agitación a 250 rpm durante 24 horas.

La concentración de bacterias para la inoculación se ajustó aproximadamente a 10^8 ufc/ml mediante espectrofotómetro (abs_{550nm} = 0.100) utilizando como blanco medio nutritivo líquido. Para llegar a la concentración deseada de bacterias, se realizaron diluciones al décimo. La concentración alcanzada fue verificada por recuento de colonias en placas con medio de cultivo Wakimoto 48 a 72 horas después de colocadas en incubadora a 28º C y oscuridad absoluta.

3.1.3. Inoculación

Se utilizaron 81 plantas de limón rugoso (3 por ensayo) que fueron inoculadas con 10 concentraciones de *Xac*.

Las combinaciones de factores fueron, los dos métodos de inoculación (infiltración y aspersión), las 10 concentraciones de bacterias ($6.1X10^6$, $6.1X10^5$, $6.1X10^4$, $3.1X10^6$,$3.1X10^5$, $3.1X10^4$,$3.3X10^3$, $3.3X10^2$, $1.8X10^2$, $1.8X10^1$,) y las dos temperaturas a las que se mantuvieron las plantas, 9º C y 28º C (ver Cuadro No. 8).

Cada unidad de observación (maceta), estaba conformada por 3 plantas, fueron inoculadas con un mismo método de inoculación, se las expuso a una misma temperatura y se inocularon con la misma concentración de bacterias.Las temperaturas se determinaron por bibliografía, Dalla Pria et al. (2006) afirman que el rango óptimo para que se desencadene el proceso infectivo se encuentra entre 25 a 30° C por esto se opto por colocar las plantas a 28° C. Según Koizumi (1977a) la temperatura mínima para que se manifieste la enfermedad ronda los 12 – 15 ° C por lo que se decidió conocer si por debajo de esos valores ocurría la infección.

De acuerdo con Goto (1990) si la entrada de las bacterias al tejido vegetal es a través de aberturas naturales la cantidad necesaria para que ocurra infección es de $1x\ 10^4$, $1\ x\ 10^5$, $1\ x\ 10^6$ ufc/ ml, mientras que si el ingreso es a través de heridas las concentraciones mínimas son del orden de $1\ x\ 10^2$, $1\ x\ 10^3$ ufc/ml por lo que se seleccionaron esas concentraciones para realizar las inoculaciones por aspersión y por infiltración respectivamente.

Para la infiltración se utilizó el método de Klement (1963) con jeringas de plástico presionando sobre el envés de las hojas sin el auxilio de agujas para introducir el líquido (ver Ilustración No. 4). El área inoculada fue identificada marcando el borde de la misma con tinta indeleble (ver Ilustración No. 5).

La inoculación por aspersión fue realizada con un aspersor de vidrio De Vilbiss (ver Ilustración No. 6). Para identificar el área inoculada, se marcaron círculos de 8 mm de diámetro (ver Ilustración No.7) con el auxilio de hojas de acetatos perforadas que se apoyaron sobre la hoja en el momento de inoculación (ver Ilustración No. 8). Cada hoja apta para inocular fue numerada desde abajo hacia arriba de la planta buscando siempre las que presentaran las

condiciones de inoculación (2/3 a totalmente expandidas) y se respetó este orden en el momento de la inoculación. En ambos métodos, la inoculación se realizó en el envés de la hoja.

Se seleccionaron dos métodos de inoculación para comparar el período de incubación en días al introducir las bacterias directamente al mesófilo del tejido vegetal (infiltración), o permitir la entrada por los estomas asperjando el inóculo.

Cuadro No. 8. Descripción de las combinaciones de factores (concentración de bacterias/ método de inoculación/ temperatura) y fecha de inoculación artificial de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en limón rugoso

Fecha de inoculación	Combinación de factores	No. de hojas inoculadas por maceta	Concentración de bacterias en la suspensión (ufc/ml)	Método de inoculación	Temperatura de crecimiento de las plantas en (°C)
01/8/07	1	36	$6.1x10^6$	Aspersión	9
31/7/07	2	37	$3.1x10^6$	Infiltración	9
31/7/07	3	22	$6.1x10^6$	Aspersión	28
31/7/07	4	32	$3.1x10^6$	Infiltración	28
01/8/07	5	41	$6.1x10^5$	Aspersión	9
31/7/07	6	30	$3.1x10^5$	Infiltración	9
31/7/07	7	25	$6.1x10^5$	Aspersión	28
31/7/07	8	36	$3.1x10^5$	Infiltración	28
01/8/07	9	50	$6.1x10^4$	Aspersión	9
31/7/07	10	36	$3.1x10^4$	Infiltración	9
31/7/07	11	18	$6.1x10^4$	Aspersión	28
31/7/07	12	36	$3.1x10^4$	Infiltración	28
03/8/07	13	39	$3.3x10^3$	Aspersión	9
03/8/07	14	38	$3.3x10^3$	Infiltración	9
03/8/07	15	36	$3.3x10^3$	Aspersión	28
03/8/07	16	38	$3.3x10^3$	Infiltración	28
03/8/07	17	40	$3.3x10^2$	Aspersión	9
03/8/07	18	38	$3.3x10^2$	Infiltración	9
03/8/07	19	37	$3.3x10^2$	Aspersión	28

03/8/07	20	38	$3.3x10^2$	Infiltración	28
07/8/07	21	32	$1.8x10^2$	Aspersión	9
07/8/07	22	37	$1.8x10^2$	Infiltración	9
07/8/07	23	37	$1.8x10^2$	Infiltración	28
07/8/07	24	40	$1.8x10^1$	Aspersión	9
07/8/07	25	40	$1.8x10^1$	Infiltración	9
07/8/07	26	12	$1.8x10^1$	Aspersión	28
07/8/07	27	38	$1.8x10^1$	Infiltración	28

Durante todo el ensayo, las plantas se mantuvieron durante las 24 horas previas y posteriores a la inoculación en cámara húmeda a 24º - 28º C para favorecer la congestión de los tejidos vegetales y permitir la apertura estomática y de esta forma garantizar la entrada de las bacterias al tejido (ver Anexo No. 9.4)

Para los tratamientos realizados a 9º C se utilizó un fitotrón Sanyo Modelo MLR350 (ver Anexo No. 9.5). El control de la humedad se realizó colocando recipientes con agua dentro del fitotrón y se llevó registro de la misma utilizando un Sensor Modelo Espec, Thermo Recorder rs.11.

Para los tratamientos a 28 º C las plantas se mantuvieron en cuarto iluminado (solario) con temperatura y fotoperíodo controlado. Para mantener la temperatura en los meses invernales se utilizó un equipo de calefacción el cual se reguló a 28 °C.

El fotoperíodo fue de 12 hs de luz para ambos ambientes (fitotrón y solario), en el solario se utilizaron tubos con longitud de onda similar a la luz natural. Para regular este factor (horas de luz) se recurrió a tableros digitales programados.

Ilustración No. 4

Detalle de la técnica de inoculación por infiltración

Ilustración No. 5

Identificación del área inoculada por el método de infiltración

Ilustración No. 6. Aspecto del aspersor De Vilbiss

Ilustración No. 7

Delimitación del área inoculada por el método de aspersión

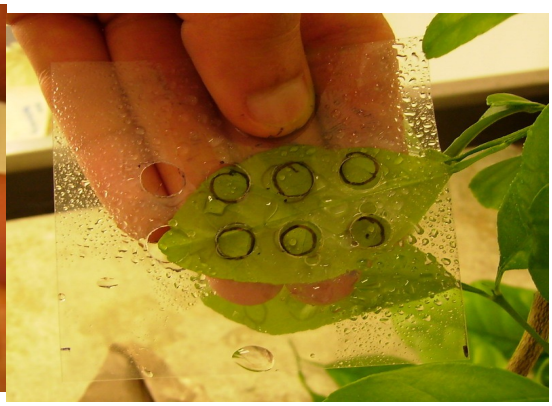


Ilustración No. 8

Hoja de acetato perforada utilizada para delimitar el área de inoculación por aspersión

3.1.4. Métodos de detección de bacterias viables en hojas asintomáticas

La presencia de bacterias viables en hojas asintomáticas se confirmó utilizando cuatro métodos de detección:

a) Presencia de síntomas típicos de la enfermedad en hojas inoculadas y mantenidas a 9 y 28 ° C, con ayuda de una lupa de mano 20 X (frecuencia semanal).

b) Aislamiento de lesiones a partir de las hojas asintomáticas inoculadas artificialmente y crecimiento en medio de cultivo Wakimoto (al inicio del trabajo la frecuencia fue todo los días por una semana, esto para estar seguros que la bacteria se había establecido en el tejido vegetal, luego se continua a los 55 días de comenzar con las inoculaciones, ver Cuadro No. 9).

c) Forzamiento de síntomas en hojas desprendidas (esta evaluación se comienza hacer a partir de los 35 días de comenzar las inoculaciones y la frecuencia era mensual)

d) Test de Patogenicidad en plantas de pomelo Duncan (*Citrus paradisi)* (frecuencia mensual a partir de 130 días de haber comenzado con las inoculaciones, ver Cuadro No. 9).

Cuadro No. 9. Métodos de detección utilizados para confirmar la presencia de bacterias viables en tejido asintomático en las diferentes fechas de evaluación.

Fechas de evaluación (días posteriores a inoculaciones 31 de julio[1])	Métodos			
	Presencia de síntomas	Presencia de colonias en medio de cultivo Wakimoto	Forzamiento de síntomas en hojas desprendidas	Test de patogenicidad
1 a 7	X	X	-	-
20	X	-	-	-
27	X	-	-	-
35	X	-	X	-
55	X	X	X	-
113	X	X	X	-
130	X	X	X	X
189	X	X	X	X
218	X	X	X	X
266	X	X	X	X
329	X	X	X	X

[1] Ensayos números: **2** ($3.1x10^6$, Infiltración, 9°C), **3**($6.1x10^6$, Aspersión, 28°C) **4** ($3.1x10^6$, Infiltración, 28°C) **6** ($3.1x10^5$, Infiltración, 9°C), **7** ($6.1x10^5$, Aspersión, 28°C), **8** ($3.1x10^5$, Infiltración, 28°C), **10** ($3.1x10^4$, Infiltración, 9°C), **11**($6.1x10^4$, Aspersión, 28°C) y **12** ($3.1x10^4$, Infiltración, 28°C).

X: indica que en esa fecha se realizó el método señalado.

– : indica que en esas fechas no se realizó el método señalado.

3.1.5. Presencia de síntomas

Para cumplir con los objetivos de la actividad, la observación de síntomas que evidencia el final del período de incubación, fue utilizada en todos los momentos de evaluación.

El total de hojas inoculadas fue observado en las fechas mencionadas en el Cuadro No. 9, con el auxilio de una lupa de mano 20X.

Cuando se observaron síntomas atípicos tales como ampollas acuosas o hiperplasia de tejido las plantas continuaron en observación hasta que los síntomas evolucionaron a las típicas erupciones blanquecinas, esponjosas, con halo aceitoso que con los días viraba a color caramelo, tomaban consistencia de corcho y forma de cráter (ver Ilustración No.1).

Si aún existían dudas sobre la causa de los mismos se realizaron macerados de esas muestras, en solución salina estéril (8.5 gr cloruro de sodio por litro de agua destilada) que fueron inoculadas nuevamente en plantas de pomelo Duncan (*Citrus paradisi)* para confirmar su identidad.

Cuando las plantas no presentaban síntomas, se realizaron las técnicas de detección de bacterias fitopatógenas que se detallan a continuación.

3.1.5.1. Crecimiento de colonias en medio nutritivo Wakimoto

En cada período de evaluación se retiró una hoja de cada una de las combinaciones que permanecían asintomáticas (ver Cuadros No. 15, 16 y 17) Con auxilio de un sacabocados se cortaron de 4 a 6 discos de 8 mm de diámetro interno (50.24 mm^2 por disco) del área inoculada. Inmediatamente los discos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se maceraron en 500 µl de solución salina estéril. De esta suspensión se sembraron 100 µl por duplicado rastrillando en superficie. La técnica del rastrillado consiste en dispersar el inóculo (en este caso los 100 µl) sobre la superficie del medio de cultivo en placa de Petri ayudados por una varilla de vidrio en forma de L.

Las placas se mantuvieron 48 a 72 hs en incubadora a 28 º C y oscuridad. Se evaluó la presencia de colonias con morfología similar a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Para ello previamente se observaron las caracteristicas morfológicas que presenta la bacteria en estudio en medio Wakimoto (ver Cuadro No. 10).

3.1.5.2. Inoculación en plantas indicadoras

Luego de cuatro meses de instalado el ensayo, se comenzó a evaluar una nueva alternativa para conocer la viabilidad de la bacteria en el tejido vegetal sin síntomas. Tomando el resto de líquido obtenido de los macerados utilizados para la siembra en medio de cultivo Wakimoto (aproximadamente 300 µl) se inoculó en plantas de pomelo Duncan por infiltración como se mencionó en el punto 3.1.3.

En los meses de invierno las plantas se colocaron en solario a 28 °C, para agilizar la aparición de síntomas. La humedad se mantuvo con un vaporizador doméstico y se regó diariamente el piso del solario.

En primavera – verano se colocaron en invernáculo con malla antiáfidos. La humedad se mantuvo con tarrinas de agua colocadas en el suelo del invernáculo y regando las plantas en la mañana y en la tarde. La temperatura se cuantificó con un termómetro de máxima y mínima.

La presencia de síntomas en cada una de las hojas inoculadas se observó semanalmente con lupa de mano 20X.

Cuadro No. 10. Características morfológicas y mucosidad de las colonias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cepa 49b, en medio de cultivo Wakimoto, de 48 hs de edad (ver Anexo No. 9.6).

Color	crema brillante
Diámetro (mm) [1]	3.78 ± 0.27
Borde	liso y entero
Elevación	convexa
Forma	circular
Consistencia*	muy mucosa

[1] : Promedio de 30 colonias.

*: Muy mucosa al tocarla y levantar el ansa.

3.1.5.3. Forzamiento de síntomas en hojas desprendidas

Se siguió la metodología sugerida por Koizumi (1971). El tiempo que permanecieron en estas condiciones fue variable (ver Cuadro No. 11).

Al mes de inocular las plantas, aquellas hojas inoculadas que permanecieron asintomáticas se extrajeron y se colocaron en potes de vidrio de 15 cm de diámetro y 5 cm de altura sin tapa, con agar- agua. Se hundieron los pecíolos en este medio y se cubrió cada recipiente con una bolsa de nylon invertida húmeda para lograr la expresión de los síntomas en condiciones de humedad. Luego se colocaron en incubadora a 28 ° C y obscuridad.

Con esta técnica la vida media de las hojas desprendidas fue muy corta (14 días) debido a que caían sobre el agar – agua y se pudrían antes de manifestar los síntomas de la enfermedad. Para mejorar esta situación y mantener las hojas erguidas, se colocaron escarbadientes de madera estériles, (esterilizados en autoclave a 121º C y 1,5 atmósferas de presión, durante 20 minutos y recubiertos con funguicida clorotalonil 1.2%, ver Ilustración No. 9).

Todas las hojas utilizadas en el test de forzamiento de síntomas en cámara húmeda se desinfectaron previamente asperjándolas con alcohol 70% por unos segundos y luego sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio (10% de producto comercial) durante 1 minuto. Por último se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Hasta el momento de su uso se mantuvieron sobre papel estéril en la cámara de flujo laminar.

A los 218 días posteriores al inicio del ensayo, se recurre a otro método para recuperar bacterias en el tejido asintomático. El cual consistió en macerar en 500 µl de solución salina estéril las hojas que al cabo de 22 a 28 días de estar en condiciones de agar - agua no presentaban síntoma. Con el líquido obtenido se inocularon plantas de pomelo Duncan, por el método de infiltración.

Ilustración No. 9. Hojas asintomáticas desprendidas de limón rugoso acondicionadas para realizar el test de forzamiento de síntomas en cámara húmeda

Hojas desprendidas de limón rugoso sobre agar – agua	Aspecto de la cámara húmeda	Hojas sostenidas con palillos de dientes, para evitar la descomposición del material vegetal

Cuadro No. 11. Tiempo que permanecieron las hojas desprendidas acondicionadas en agar - agua y cámara húmeda para la expresión de los síntomas en cada fecha de evaluación

Diferentes fechas en las que se realizó la evaluación por forzamiento de síntoma (cámara húmeda a 28°C)	Tiempo que permanecieron las hojas en observación hasta que presentaron síntomas de la enfermedad en cada fecha de evaluación (días).
4/9/07*	14
24/9/07	14
21/11/07	48
8/1/08	29
5/2/08	25
5/3/08	28
22/4/08	38
24/6/08	22

*: En cada una de las fechas indicadas se cortaron hojas que se encontraban asintomáticas a 9° C, se las colocó en agar – agua, cámara húmeda a 28 °C para forzar la expresión de síntomas. Para cada una de las fechas, en la columna de la derecha, se detalla la cantidad de días que estuvieron en estas condiciones hasta que presentaron o no síntomas de la enfermedad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PERÍODO DE INCUBACIÓN

El período de incubación definido como el tiempo que transcurre entre la inoculación y el desarrollo de los síntomas (Peltier 1920, Fukui et al. 1999) varió con la temperatura, el método de inoculación y la concentración de bacterias utilizadas en el inóculo.

4.1.1. Efecto de la Temperatura

Considerando este factor, la enfermedad se expresó en las plantas mantenidas tanto a 9 como a 28°C. Se formaron lesiones típicas; erupciones blanquecinas, esponjosas, con halo aceitoso que con los días viraba a color caramelo tomaban consistencia de corcho y forma de cráter (ver Ilustración No.1) en la mayoría de las combinaciones expuestas a 28º C e inoculadas por infiltración y aspersión, a excepción de aquellos asperjados con dosis de inóculo iguales o menores a 10^2 ufc/ml (ver Cuadro No. 12).

Por otro lado las plantas inoculadas y mantenidas a 9º C solamente expresaron los síntomas de la enfermedad cuando se infiltraron con concentraciones de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* iguales o mayores a 10^3 ufc/ml (ver Cuadro No. 12).

Cuadro No. 12. Formación de lesiones de cancro cítrico en plantas del limón rugoso inoculadas con diez concentraciones de inóculo, dos métodos de inoculación y dos temperaturas de incubación.

	Plantas creciendo a 9 º C			Plantas creciendo a 28 º C	
	Concentración de inóculo (ufc/ml)	Presencia de lesiones (1)		Concentración de inóculo (ufc/ml)	Presencia de lesiones (1)
Infiltración	$3.1X10^6$	+	Infiltración	$3.1X10^6$	+
	$3.1X10^5$	+		$3.1X10^5$	+
	$3.1X10^4$	+		$3.1X10^4$	+
	$3.3X10^3$	+		$3.3X10^3$	+
	$3.3X10^2$	-		$3.3X10^2$	+
	$1.8X10^2$	-		$1.8X10^2$	+
	$1.8X10^1$	-		$1.8X10^1$	+
Aspersión	$6.1X10^6$	-	Aspersión	$6.1X10^6$	+
	$6.1X10^5$	-		$6.1X10^5$	+
	$6.1X10^4$	-		$6.1X10^4$	+
	$3.3X10^3$	-		$3.3X10^3$	+
	$3.3X10^2$	-		$3.3X10^2$	-
	$1.8X10^2$	-			
	$1.8X10^1$	-		$1.8X10^1$	-

(1) +: presencia de lesiones en al menos una hoja inoculada.

- : ausencia de lesiones en todas las hojas inoculadas.

En la multiplicación de las bacterias fitopatógenas dentro del tejido vegetal, así como en el desarrollo de síntomas, la temperatura es uno de los factores ambientales relevantes (Goto, 1990). La implicancia de este factor en el patosistema citrus - *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* fue conocido tempranamente cuando Peltier (1920) demostró que la enfermedad podía desarrollarse o no de acuerdo a la temperatura, a las condiciones de crecimiento a las que se sometieran las plantas y a la especie hospedera.

En las condiciones de nuestro trabajo a 28 º C las plantas que expresaron la enfermedad lo hicieron en un período aproximado de 7 días a un mes dependiendo de la concentración del inóculo y del método de inoculación utilizado (ver Cuadro No. 13).

Se observó una tendencia coincidente con trabajos previos en los cuales las temperaturas óptimas para el desarrollo de la enfermedad oscilaron entre 20 y 30º C dependiendo del autor (Peltier 1920, Koizumi 1976a, Dalla Pria et al. 2006).

Cuadro No. 13. Período de incubación (en días) en plantas de limón rugoso inoculadas con *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* con diez concentraciones de inóculo, dos métodos de inoculación, mantenidas a 28 º C

INOCULACIÓN POR ASPERSIÓN			INOCULACIÓN POR INFILTRACIÓN		
Combinación de factores	Concent. de inóculo (ufc/ml)	Período de incub. (días)	Combinación de factores	Concent. de inóculo (ufc/ml)	Período de incub. (días)
3	$6.1X10^6$	>20 - <28	4	$3.1X10^6$	6
7	$6.1X10^5$	>20 - <28	8	$3.1X10^5$	8
11	$6.1X10^4$	>20 - <28	12	$3.1X10^4$	8
15	$3.3X10^3$	>30 - <44	16	$3.3X10^3$	>17-<28
19	$3.3X10^2$	Sin síntomas	20	$3.3X10^2$	>17 - <28
			23	$1.8X10^2$	>20 - <28
26	$1.8X10^1$	Sin síntomas	27	$1.8X10^1$	>27 - <37

Los síntomas se hicieron visibles aproximadamente 30 días después de la inoculación, en las plantas infiltradas con suspensiones de bacterias iguales o mayores a 10^5 ufc/ml.

En cuanto a las plantas mantenidas a bajas temperaturas en fitotrón se logró la expresión de síntomas en varias de las combinaciones ($3.1x10^6$, $3.1x10^5$, $3.1x10^4$, $3.3x10^3$ ufc/ml) mantenidos a 9° C, como se muestra en el Cuadro No. 14. Estos resultados no coinciden con trabajos anteriores donde se establece que los síntomas típicos de la enfermedad, solamente ocurrieron entre 15º C y 35 º C (Koizumi, 1977a).

Sin embargo, hasta este trabajo, los periodos máximos que se habían utilizado para observar la formación de síntomas luego de la inoculación, nunca superaron los 21 días y en casi todas las situaciones *in vitro* y de campo las temperaturas mínimas a las que se sometieron los tejidos inoculados fueron mayores a 12 º C (Koizumi 1976a, Vernière et al. 2003, Dalla Pria et al. 2006).

Peltier (1920) expuso plantas inmediatamente después de inoculadas por aspersión a temperaturas de 5º C, 10º C y 15º C y durante los 15 días posteriores no observó síntomas de la enfermedad. Aunque estas plantas no fueron aclimatadas durante el proceso de infección y posiblemente la bacteria no se haya establecido, de acuerdo con los resultados del presente trabajo, tampoco sería un tiempo adecuado para que la bacteria se desarrolle en el interior de la planta hasta la expresión de los síntomas de la enfermedad. Teniendo en cuenta que por encima de 6 º C la bacteria puede establecerse (Peltier, 1920) posiblemente a 9º C el proceso de multiplicación ocurre en forma muy lenta, provocando la prolongación del período de incubación.

Cuadro No. 14. Período de incubación (en días) en plantas de limón rugoso inoculadas con *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* con diez concentraciones de inóculo, dos métodos de inoculación, mantenidas a 9 º C

INOCULACIÓN POR INFILTRACIÓN		
Combinación de factores	Concent. de bacterias en el inóculo (ufc/ml)	Período de incubación en días y Presencia/ Ausencia de síntomas
2	$3.1X10^{6}$	>30 - <44
6	$3.1X10^{5}$	>30 - <44
10	$3.1X10^{4}$	>95 - <102
14	$3.3X10^{3}$	>181- <188
18	$3.3X10^{2}$	Sin síntomas
22	$1.8X10^{2}$	Sin síntomas
25	$1.8X10^{1}$	Sin síntomas

INOCULACIÓN POR ASPERSIÓN		
Combinación de factores	Concent. de bacterias en el inóculo (ufc/ml)	Presencia/ Ausencia de síntomas
1	$6.1X10^{6}$	Sin síntomas
5	$6.1X10^{5}$	Sin síntomas
9	$6.1X10^{4}$	Sin síntomas
13	$3.3X10^{3}$	Sin síntomas
17	$3.3X10^{2}$	Sin síntomas
21	$1.8X10^{2}$	Sin síntomas
24	$1.8X10^{1}$	Sin síntomas

Cuando las concentraciones de inóculo fueron $3.1X10^4$ y $3.3X10^3$ ufc/ml e inoculadas por infiltración aumentó el período de incubación a aproximadamente 90 y 180 días respectivamente (ver Cuadro No. 14).

4.1.2. Efecto del método de inoculación

Con respecto a los métodos de inoculación utilizados, ambos permitieron el desarrollo de la enfermedad (ver Cuadro No. 12). Sin embargo influyeron en el tiempo en que demoró en expresarse la misma. En las plantas testigo (28° C), inoculadas con iguales concentraciones de inóculo (medidas en unidades logarítmicas) y dónde solamente se modificó el método de inoculación, se observó que la velocidad de expresión de la enfermedad fue siempre mayor en las plantas inoculadas por infiltración en relación a las inoculadas por aspersión.

Estos resultados confirman que el método de inoculación incide en la manifestación de la enfermedad. Habitualmente se forman lesiones con mayor facilidad, cuando se utiliza un método de inoculación que provoca el contacto directo de la bacteria con el mesófilo (Vernière et al., 2003).

En todas las especies cítricas estudiadas, el periodo de incubación y la incidencia de la enfermedad han sido menores cuando las inoculaciones se han hecho con aguja en relación a las inoculaciones que pretenden que el ingreso de la bacteria sea a través de los estomas (Koizumi 1976a, Vernière et al. 2003).

Las causas que provocan esas diferencias en tiempo de expresión de la enfermedad, se han asociado a la cantidad de bacterias que inician el proceso de infección (Koizumi, 1981) o a la presencia de factores de defensa a nivel de los estomas (Underwood et al., 2008).

Por otro lado, aunque las plantas no estaban expuestas a radiaciones ultravioletas y se mantuvieron en cámara húmeda por más de 20 minutos (Peltier, 1920) existen otros factores adversos que pueden limitar la sobrevivencia de la bacteria sobre las hojas. Por ejemplo, el contacto con la comunidad de microorganismos epífitos que compiten o antagonizan a otros individuos (Beattie y Lindow, 1995).

Según Koizumi (1981) el proceso de infección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* está formado por dos fases que se diferencian entre otras cosas en la velocidad de multiplicación de la bacteria. En la primera fase el proceso de multiplicación es lento y en las plantas inoculadas pinchando con

aguja, la segunda fase coincide con el desarrollo de las lesiones. De acuerdo al mismo autor, en las plantas inoculadas por aspersión el proceso es 2 a 3 veces más largo porque en la primera fase las células del parénquima son afectadas por un número bajo de bacterias. Para las condiciones del trabajo, esta relación se confirmó para las plantas colocadas a 28° C inoculadas con concentraciones de inoculo mayores a 10^4 ufc/ml (ver Cuadro No.13).

Aunque el número y forma de los estomas no explican los diferentes grados de resistencia a cancro cítrico encontrados entre especies (Graham et al., 1992) la bacteria en el pasaje a través de los mismos tiene que enfrentar una primera línea de defensa que no ocurre cuando es colocada directamente en el mesófilo.

Hasta hace muy poco tiempo distintos autores consideraban a las aperturas naturales de las plantas como sitios pasivos de penetración de bacterias, sin embargo, actualmente existen evidencias de que tienen un rol activo, limitando la invasión de bacterias al interior de la planta como parte del sistema inmune innato de los vegetales (Underwood et al., 2008).

4.1.3. Efecto de la concentración de bacterias

En relación a la concentración de bacterias utilizadas en el inóculo, no se observó diferencia de este factor, en aquellos tratamientos inoculados por infiltración y mantenidos a 28 º C ya que todos fueron capaces de expresar síntomas aún aquellos en los que se utilizaron concentraciones muy bajas de *Xanthomonas axonopodis* pv*. citri.*

Tampoco se observó diferencias en las plantas inoculadas por aspersión y mantenidas a 9 º C ya que para ninguna de las concentraciones se observaron síntomas de la enfermedad (ver Cuadro No. 12).

Por otro lado, en los tratamientos inoculados por aspersión y expuestos a 28 º C y en los inoculados por infiltración y mantenidos a 9 º C, la enfermedad se manifestó en los tratamientos inoculados con densidad de inóculo iguales o superiores a $3.3x10^3$ ufc/ml y no en las menores (ver Cuadro No. 12).

De acuerdo con Zubrzycki y Zubrzycki (1984), a temperaturas conductivas para la enfermedad se recomienda utilizar una concentración de bacterias de 10^4 - 10^5 ufc/ml para la inoculación a través de estomas, mientras que a través de heridas es suficiente con una concentración de 10^2 ufc/ml.

Gottwald y Graham (1992), usando una forma de inoculación que les permitió provocar primero congestión de agua en los tejidos y luego la penetración de la bacteria a través de los estomas sin que se provocara heridas, demostraron que la concentración óptima para una infección natural en hojas expandidas de pomelo es de aproximadamente 10^4 ufc/ml, pero la infección puede resultar con sólo dos bacterias.

4.2 PRESENCIA DE BACTERIAS VIABLES EN TEJIDO ASINTOMÁTICO

Durante 329 días desde la inoculación de las primeras combinaciones de factores (No. 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11 y 12), una vez por semana las plantas fueron examinadas con el propósito de conocer si se habían desarrollados síntomas de la enfermedad en los sitios de inoculación. Cuando las combinaciones aún permanecían asintomáticas, se colectaron muestras de hojas inoculadas con la finalidad de conocer mediante la combinación de técnicas clásicas si todavía se encontraban bacterias viables (ver Cuadro No. 9).

Exceptuando el tratamiento inoculado por infiltración con 1.8×10^1 ufc/ml (ver Cuadro No. 15), siempre se detectó la presencia de bacterias en tejido asintomático por alguno de los métodos utilizados por lo menos en una de las fechas evaluadas (ver Cuadros No. 15, 16 y 17).

Cuadro No. 15. Resultados de la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en hojas asintomáticas de plantas de limón rugoso inoculadas por infiltración, creciendo a 28 ° C

Concentración de inóculo (ufc/ml)	Fecha (en días) posteriores al inicio de las primeras inoculaciones.																				
	55			113			130			189			218			288			329		
	Método de detección																				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
$3.3X10^2$	-	s	+	-	s	s	-	s	-	s	s	s	s	s	+	-	s	-	s	s	s
$1.8X10^1$	-	s	-	-	s	s	-	s	-	s	s	s	s	s	-	-	s	-	s	s	s

1: Formación de colonias en medio de cultivo Wakimoto.
2: Expresión de síntomas en plantas indicadoras de pomelo Duncan (*Citrus paradisi*).
3: Forzamiento de síntomas en hojas desprendidas.
+: Se confirma presencia de bacterias viables.
-: No se confirma la presencia de bacterias viables.
s: Sin determinar, por pérdida de la muestra.

Cuadro No. 16. Resultados de la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en hojas asintomáticas de plantas de limón rugoso inoculadas por infiltración, creciendo a 9 ° C

Concentración de inóculo (ufc/ml)	Fecha (en días) posteriores al inicio de las primeras inoculaciones.																				
	55			113			130			189			218			288			329		
	Método de detección																				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
$3.1X10^4$	+	s	+																		
$3.3X10^3$	+	s	+	+	s	+	+	+	+	+	+	+									
$3.3X10^2$	+	s	+	-	s	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	-	c
$1.8X10^2$	+	s	+	-	s	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
$1.8X10^1$	-	s	-	c	s	-	-	-	+	+	+	c	c	-	+	-	-	d	-	-	c

1: Formación de colonias en medio de cultivo Wakimoto.
2: Expresión de síntomas en plantas indicadoras de pomelo Duncan *(Citrus paradisi)*.
3: Forzamiento de síntomas en hojas desprendidas.
+: Se confirma presencia de bacterias viables
-: No se confirma la presencia de bacterias viables
s: Sin determinar, por pérdida de la muestra.
c: Muestra contaminada (no pudo ser procesada).
d: Síntoma dudoso (no se confirma *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*).

Cuadro No. 17. Resultados de la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en hojas asintomáticas de plantas de limón rugoso inoculadas por aspersión, creciendo a 9 ° C

Concentración de inóculo (ufc/ml))	Fecha (en días) posteriores al inicio de las primeras inoculaciones.																				
	55			113			130			189			218			288			329		
	Método de detección																				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
$6.1X10^6$	+	s	c	+	s	+	-	-	-	-	-	c	-	s	+	-	-	-	-	-	+
$6.1X10^5$	-	s	-	+	s	-	-	-	-	+	+	c	-	-	+	-	-	-	-	-	+
$6.1X10^4$	-	s	-	+	s	-	-	-	-	c	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	c
$3.3X10^3$	c	s	-	-	s	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	s	-	-	-	+
$3.3X10^2$	+	s	-	s	s	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
$1.8X10^2$	+	s	-	-	s	-	c	-	-	+	-	c	-	-	-	-	-	-	-	-	s
$1.8X10^1$	c	s	-	-	s	-	+	-	-	-	+	c	-	-	+	-	-	-	-	-	-

1: Formación de colonias en medio de cultivo Wakimoto.
2: Expresión de síntomas en plantas indicadoras.
3: Forzamiento de síntomas en hojas desprendidas.
+: Se confirma presencia de bacterias viables.
-: No se confirma la presencia de bacterias viables.
s: Sin determinar, por pérdida de la muestra.
c: Muestra contaminada (no pudo ser procesada).
d: Síntoma dudoso (no se confirma *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri)*.

Estos resultados indican que es posible mantener hojas infectadas con bacterias viables, asintomáticas por períodos prolongados si las plantas se mantienen a 9º C. Fue posible detectar bacterias viables a través del tiempo con el método de inoculación por infiltración hasta niveles de inóculo $1x10^2$ ufc/ml, pero la detección de *Xanthomonas axonopodis* pv*. citri* en las hojas inoculadas por aspersión fue errático (ver Cuadro No. 17).

Para la detección de *Xantomonas axonopodis* pv. citri, se utilizaron tres métodos clásicos que permiten simultáneamente detectar, identificar y conocer la viabilidad de la bacteria. La formación de colonias en medio Wakimoto tiene una sensibilidad de detección mínima de $1x10^3 – 1x10^5$ ufc/ml (Janse, 2006) y la sensibilidad de los otros dos métodos utilizados (que se basan en la expresión de la enfermedad) depende del número de bacterias mínimo necesario para que se desencadene la expresión de los síntomas junto con un ambiente óptimo.

Para las bacterias que producen infecciones en hojas, está ampliamente aceptado que hay una correlación importante entre la multiplicación en los espacios intercelulares y la producción de síntomas (Allington y Chamberlain 1949, Ercolani 1973). Para demostrar la importancia de la cantidad de bacterias necesarias para la producción de síntomas en algunos patosistemas se han elaborado curvas de respuesta a diferentes dosis (Ercolani, 1973).

La falta de estabilidad en la detección de la bacteria viable a través del tiempo, lleva a pensar que los resultados negativos pueden ser falsos por falta de sensibilidad en los medios de detección utilizados o que no se establecieron las infecciones en todas las hojas inoculadas por los motivos expuestos anteriormente (Koizumi 1981, Underwood et al. 2008).

En 50 de los ensayos realizados (contabilizando los ensayos para evaluar presencia o ausencia de bacterias), se analizó la misma muestra por dos técnicas de detección diferente: morfología de las colonias en medio de cultivo Wakimoto e inoculación en planta indicadora. En 37 de las 50 muestras el resultado fue coincidente (positivo o negativo para ambas muestras), en cambio en el resto de las muestras (13) se obtuvieron resultados positivos en una de las dos técnica usadas.

En el muestreo total, en 80 oportunidades se tomaron simultáneamente dos hojas de la misma planta. Una de ellas fue macerada y analizada por los test indicados en el párrafo anterior y en la otra la bacteria se detectó por forzamiento de síntomas. En el 49% de los análisis hubo

coincidencia entre las hojas desprendidas (resultados positivos o negativos en la expresión de síntomas de la enfermedad) y en el 51% la detección se pudo hacer solamente en una de las hojas.

La complementariedad de los métodos de detección ya había sido corroborada en trabajos recientes en los que se identificó *Xanthomonas axonopodis* pv*. citri.* como contaminante natural de la fruta cítrica[3].

[3] Pérez, E. 2008. Com. personal.

5. CONCLUSIONES

Fue posible mantener bacterias viables por un período de 329 días en plantas asintomáticas de limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) mantenidas a 9° C.

Este trabajo reporta por primera vez la expresión de síntomas de la enfermedad, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri.* en plantas de limón rugoso expuestas a diferentes concentraciones de bacterias ($6.1x10^6$, $3.1x10^6$, $6.1x10^5$, $3.1x10^5$, $6.1x10^4$, $3.1x10^4$, $3.3x10^3$, $3.3x10^2$, $1.8x10^2$, $1.8x10^1$ ufc/ml) temperaturas de 9° C, en condiciones de humedad (70 - 80%) y fotoperíodo de 12 hs de luz dentro de un fitotrón.

El período de incubación para detectar o confirmar el desarrollo de síntomas de la enfermedad, depende de la concentración de bacterias en el inóculo, del método de inoculación, de la temperatura y de la humedad a la que se mantienen las plantas inoculadas.

Inoculaciones con concentraciones de inóculo del orden de 10^6, 10^5 y 10^4 ufc /ml, mostraron menores periodos de incubación (entre 30 y 40 días para el método de aspersión y 6 días para el método de infiltración) que concentraciones de menor orden logarítmico 10^3, 10^2 y 10^1 ufc/ml. Esto fue observado para ambos métodos de inoculación.

El período de incubación fue menor cuando las bacterias fueron inoculadas por el método de infiltración (6 días) a diferencia del método de aspersión, donde la expresión de síntomas se evidenciaron luego de 20 a 30 días después que en las primeras se observaban síntomas típicos de la enfermedad esto cuando las plantas fueron expuestas a temperaturas iguales a 28° C, ya que a 9° C las plantas inoculadas por aspersión no mostraron síntomas típicos.

En cuanto al método de evaluación por forzamiento de síntomas en cámara húmeda fue necesario utilizar palillos de dientes de madera estériles para mantener erguidas las hojas y así conservarlas por más tiempo para que la enfermedad pudiera manifestarse antes que se deterioraran.

Para futuros trabajos, sería importante mantener constante el número de discos cortados de hojas inoculadas para macerar y sembrar en placa. De esta forma y en conjunto con el dato de volumen de inóculo que ingresa al vegetal en cada inoculación (7 µL/ cm^2) se podría conocer a partir de cuantas bacterias se habría desencadenado el proceso infectivo, teniendo en cuenta

que el área de cada disco fue de 50.24 cm^2. También se debería continuar este trabajo inoculando otras especies cítricas para conocer si es posible mantener viable la bacteria causante de la enfermedad a la temperatura utilizada (9° C).

En este ensayo se evaluaron métodos clásicos para la detección de bacterias fitopatógenas con el objetivo de conocer su período de incubación (observación de síntomas característicos de la enfermedad con lupa de mano 20 X, siembra en medio enriquecido, inoculación en planta indicadora y cámara húmeda en agar - agua de hojas desprendidas inoculadas), pero sería conveniente recurrir a métodos que complementen estos resultados y que presenten mayor sensibilidad en la detección, tal como la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), o inmunofluorescencia, para confirmar aquellos resultados negativos que pudieran ser falsos negativos.

6. RESUMEN

A partir de la década del 70, del siglo pasado, el sector citrícola uruguayo tuvo un importante cambio al proponerse el desafío de producir fruta fresca para exportación. En la actualidad, luego de 40 años de exportaciones sostenidas, el sector ha consolidado mercados exigentes como la Unión Europea con exportaciones promedio de 130 mil toneladas anuales de cítricos en los últimos 5 años. El cancro cítrico causado por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* es una enfermedad muy difundida en los cítricos. En los frutos produce lesiones que afectan solo la apariencia externa del mismo, considerándose un daño de tipo cosmético. Sin embargo el principal problema de esta enfermedad es el carácter cuarentenario del agente causal. Todos los países productores de cítricos en los que esta enfermedad no ha aparecido, mantienen un estricto cuidado en la importación de frutos y árboles de cítricos procedentes de países donde se ha detectado la enfermedad. La situación planteada, generó la necesidad de iniciar trabajos nacionales de investigación que expliquen el comportamiento de la enfermedad en nuestras condiciones de producción. El objetivo de este trabajo fue evaluar un método para obtener y mantener en forma asintomática, plantas de Limón Rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) inoculadas artificialmente con *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en condiciones de laboratorio. Para lograr este objetivo se realizó un ensayo utilizando diez concentraciones de bacterias dos métodos de inoculación (infiltración y aspersión) y dos temperaturas de incubación (9 y 28° C). Las plantas de limón rugoso fueron mantenidas por 329 días en fitotrón a una temperatura de 9° C, en cada fecha de evaluación (8 fechas) se cortaron 2 hojas inoculadas y se les practicaron cuatro técnicas de detección de bacterias fitopatógenas, (observación de síntomas típicos con lupa de mano 20 X, macerado del material y posterior inoculación en medio de cultivo Wakimoto, inoculación en planta indicadora, cámara húmeda en agar – agua de hojas inoculadas desprendidas) para evaluar la viabilidad de las bacterias en el tejido vegetal, el mismo trato recibieron las plantas colocadas en solario a 28° C. Se constató que es posible mantener bacterias viables, causantes del cancro cítrico a temperaturas de 9° C. El período de incubación fue menor cuando la temperatura fue de 28° C para ambos métodos de inoculación y para todas las concentraciones evaluadas a excepción de 1.8×10^1, 1.8×10^2 ufc /ml inoculadas por aspersión, donde no se observaron síntomas típicos de la enfermedad.

Palabras clave: *Xanthomonas axonopodis pv. citri*; Limón rugoso; Período de Incubación; Concentración de bacterias; Infiltración; Aspersión; Temperatura.

7. SUMMARY

Since the 70s of last century, the Uruguayan citrus industries had proposed an important change and generated a big challenge. It was about to produce fresh fruit for export. Today, after 40 years of sustained exports, the industry has consolidated demanding markets likes the European Union with average exports of 130 thousand tons of citrus in the last five years. Citrus canker caused by *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* is a widespread disease of citrus. In fruit produced injuries that affect only the outer appearance thereof, it is considered a type of cosmetic damage. But the main problem of this disease quarantine was the character of the agent. All country that produces citrus where the disease has not appeared, such Spain, maintains a strict care in the fruit imports and citrus trees that come from countries where the disease has been detected. The situation created, generated the necessity to initiate a national research to explain the behavior of the disease in our production conditions. The aim of this study was to evaluate with a laboratory conditions a method to obtain and maintain an asymptomatic plants Rough Lemon (*Citrus jambhiri* Lush) artificially inoculated with *Xanthomonas axonopodis* pv *citri.* To achieve this objective an experiment was conducted using six concentrations of bacteria (10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1ufc/ml), two inoculation methods (infiltration and spray) and two temperatures (9 and 28° C). Rough lemon plants were kept for 350 days in a phytotron at 9 °C (nine Celsius grade). In each evaluations dates two inoculated leaves were cut and were evaluated with four techniques (observation of typical symptoms with 20X hand lens, softened material and subsequent inoculation of culture medium Wakimoto, inoculation with a “indicator plant”, agar moist chamber - water) to assess the bacteria viability in a plant tissue. It was found that it is possible to maintain a bacteria causing citrus canker in temperatures under 12 ° C. The incubation period was shorter when the temperature was 28 ° C for both inoculation method and for all concentrations tested except for 10^1, 10^2 cfu / ml, where there were no typical symptoms of the disease.

Keywords: *Xanthomonas axonopodis pv citri*; Rough lemon; Incubation period;

Concentration of bacteria; Infiltration; Spray; Temperature.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGRIOS, G. N. 1995. Fitopatología. 2ª ed. México, Limusa. 838 p.

2. AGRIOS, G. N. 2005. Plant Pathology. 5ª ed. USA, Elsevier. 922 p.

3. ALLINGTON, W.E.; CHAMBERLAIN, D.W. 1949. Trends in the population of pathogenic bacteria within leaf tissues of susceptible and immune plant species. Phytopathology. 39: 656-660.

4. AROCENA, G. 1987. Control del cancro cítrico en el Uruguay; informe. In: Simposio Internacional sobre Cancro Cítrico (1987, San Pablo, Brasil). Trabajos presentados. Montevideo, MGAP. pp. 1-18

5. _____. 2005. Estudio de viabilidad para la promoción citrícola en el Departamento de Cerro Largo (en línea). Montevideo, PRODENOR. 93 p. Consultado 7 jun. 2009. Disponible en http://www.prodenor.com/html/docs_originales/informes/informe_gonzalo_arocena.pdf

6. BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. Phytopathology. 33: 145-172.

7. _____. LINDOW, S. E. 1999. Bacterial colonization of leaves; a spectrum of strategies. Phytopathology. 89: 353-359.

8. BENTANCUR, M. 2008. Comercio internacional de cítricos; nuevas exigencias y tendencias. In: Jornada Citrícola Nacional (30°., 2008, Concordia, Entre Ríos). Memorias. Concordia, INTA. pp. 2-10.

9. BERTONI, G.; MILLS, D. 1987. A simple method to monitor growth of bacterial populations in leaf tissue. Phytopathology. 77: 832-835.

10. BRUNO, Y. 1998. Citrus y derivados. (en línea). Anuario OPYPA 1998: s. p. Consultado jun. 2009 Disponible en http://www.mgap.gub.uy/opypa/publicaciones/litpa/Citrus_y_derivados/CitrusyDerivados.htm

11. _____. 2007. Cítricos; situación y perspectivas. Informe de Coyuntura. (en línea). Anuario OPYPA 2007: s.p. Consultado 12 oct. 2009. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario07/docs/14_Citricos_situacion_perspect.pdf

12. _____. 2008. Cítricos; situación y perspectivas. Informe de Coyuntura. (en línea). Anuario OPYPA 2008: 81 - 85. Consultado 12 oct. 2009. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario08/material/pdf/14.pdf

13. _____. 2009. Cítricos; situación y perspectivas. Informe de Coyuntura. (en línea). Anuario OPYPA 2009: s.p. Consultado 12 oct. 2009. Disponible en http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario2009/material/pdf/16.pdf

14. CANTEROS, B. I. 2001. Cancrosis de los cítricos. (en línea). Revista IDIA XXI. 1 (1): 23 - 27. Consultado 1 ago. 2009. Disponible en http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/fruta/pdf/completa.pdf

15. DALLA PRIA, M.; CHRISTIANO, R. C. S.; FURTADO, E. L.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A. 2006. Effect of temperature and leaf wetness duration on infection of sweet oranges by Asiatic citrus canker. Plant Pathology. 55: 657-663.

16. DE AURRECOECHEA, I.; MONTELONGO, M.J.; RAUDUVINICHE, L. 2006. Efectividad de distintos desinfectantes en la sobrevivencia de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sobre frutos de limón inoculados artificialmente. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 102 p.

17. DURAN - VILA, N.; MORENO, P. 2000. Enfermedades de los cítricos. Madrid, Mundi- Prensa. 165 p.

18. ERCOLANI, G.L. 1973. Two hypotheses on the aetiology of response of plants to phytopathogenic bacteria. Journal of General Microbiology. 74: 83-95.

19. FUKUI, R.; FUKUI, H.; ALVAREZ, A. M. 1999. Effect of temperature on the incubation period and leaf colonization in bacterial blight of *Anthurium*. Phytopathology. 89: 1007-1014.

20. FAO. 2003. Examen de los problemas fitosanitarios actuales relacionados con los cítricos y de las políticas aplicadas para afrontarlos; informe. In: Comité de problemas de productos básicos (2003, La Habana, Cuba). Trabajos presentados (en línea). Roma, FAO. s.p. Consultado 28 ago. 2009. Disponible en ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/006/y9061s.pdf

21. _____. 2006. Frutos cítricos frescos y elaborados; estadísticas anuales. (en línea). Roma. 47 p. Consultado 28 ago. 2009. Disponible en http://www.fao.org/es/esc/common/ecg/243/es/bull2006.pdf

22. GOTO, M. 1990. Fundamentals of bacterial plant pathology. Shizuoka, Japan, Academic Press. 339 p.

23. GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. 1992. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. Phytopathology. 82 (9): 930-935.

24. _____.; _____.; SCHUBERT, T. S. 2002. Citrus canker; the pathogen and its impact. (en línea). Florida, USDA. 37 p. Consultado ago. 2009. Disponible en http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker/

25. GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. 1992. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in *citrus* cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. Phytopathology. 82: 1319-1325.

26. HAYWARD, A. C. 1974. Latent infections by bacteria. Annual Review of Phytopathology. 12: 87-97.

27. JANSE, J.D. 2006. Phytobacteriology; principles and practice. Wageningen, The Netherlands, CABI Publishing. 368p.

28. KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIN, L. 1995. Princípios gerais de controle. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorin, L. eds. Manual de fitopatologia. 3ª ed. Sao Paulo, CERES. v.1, pp. 268 – 330.

29. KLEMENT, Z. 1963. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. Nature 199: 299-300.

30. KOIZUMI, M. 1971. A quantitative determination method for *Xanthomonas citri* by inoculation into detached citrus leaves. Horticultural Research Station. 11: 167- 182.

31. _____. 1976a. Incubation period of citrus canker in relation to temperature. Bulletin Fruit Tree Station. B (3): 33 – 46.

32. _____. 1976b. Multiplication of the bacteria and histological changes of the bacteria and histological changes following needle – prick inoculation. Phytopathology . 42: 407 – 416.

33._____. 1976c. Multiplication of the bacteria and histological changes of the host plant following rubber – block press or infiltration inoculation. Phytopathological Society of Japan. 42: 517 - 525.

34._____. 1977a. Relation of temperature to the development of citrus canker lesions in the spring. Proceedings of International Society of Citriculture. 3: 924- 928.

35. _____. 1977b. Behaviour of *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson and histological changes of diseased tissues in the process of lesion extension. Phytopathological Society of Japan. 43: 129 – 136.

36. _____. 1979. Ultraestructural changes in susceptible and resistant plants of citrus following artificial inoculation with *Xanthomonas citri* (Hasse) Dawson. Phytopathological Society of Japan. 45 (5): 635-644.

37. _____. 1981. Resistance of citrus plants to bacterial canker disease: a review. In: Proceedings of the International Society of Citriculture. Japan. 1: 402 - 405.

38._____. KUHARA, S. 1982. Evaluation of citrus plants for resistance to bacterial canker disease in relation to lesion extension. Bull. Fruit Tree Res. Stn. Jpn. D 4: 73 – 92.

39._____. KIMIJIMA, E.; TSUKAMOTO, T.; TOGAWA, M.; MASUI, S. 1996. Dispersion of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. Proceedings of International Society of Citriculture. 1: 340- 344.

40. KORNOSKI, M.V.; AGOSTINI, J.P.; ACUÑA, L.E. 2006. Detección de bacterias causantes de cancrosis desde frutas asintomáticas a campo y en galpón de empaque. Citrus Misiones. 32: 19 – 35.

41. PELTIER, G.L.; 1920. Influence of temperature and humidity on the growth of *Pseudomonas citri* and its host plants and on infection and development of the disease. Journal of Agricultural Research. 20 (6): 447-506.

42. PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY. SECRETARÍA DE PRENSA Y DIFUSIÓN. 2001. Cancro Cítrico. Decreto del 17/08/2001 que modifica el artículo 11 del decreto Nº 133/992. Montevideo. s.p. Consultado 9 de Jun. 2010. Disponible en http://www.presidencia.gub.uy/noticias/archivo/2001/agosto/2001081701.htm

43. SCATTOLINI, A.; CASSANELLO, M.E.; PÉREZ, E.; BENTANCUR, O. 2007. Evolución del cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv *citri)* en limón con y sin aplicaciones estivales de cobre en las brotaciones previas a la floración. Agrociencia. 11 (2): 24 – 30.

44. SCHUBERT, T. S.; RIZVI, S. A. ; SUN, X. ; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. ; DIXON, W. N. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida – Again. The American Phytopathological Society. 85 (4): 340 – 356.

45. SOZZI, G. O. 2007. Árboles frutales. Buenos Aires, Argentina, Facultad de Agronomía. 848 p.

46. SPREEN, T. H. 2001. Proyecciones de la producción y consumo mundial de cítricos a 2010; informe. (en línea). In: Simposio sobre Cítricos (2001, Beijing, China). Trabajos presentados. Roma. s.p. Consultado 24 jul. 2009. Disponible en ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/x6732s/x6732s03.pdf

47. STALL, R. E.; MARCÓ, G. M.; CANTEROS DE ECHENIQUE, B. J. 1982. Importance of mesophyll in mature-leaf resistance to cancrosis of citrus. Phytopathology. 72 (8): 1097- 1100.

48. TARANCO, J. O. 2001. Historia de la citricultura de Uruguay. Montevideo, Ediciones de la Plaza. 302 p.

49. TIMMER, L. W.; MAROIS, J. J.; ACHOR, D. 1987. Growth and survival of xanthomonads under conditions nonconductive to disease development. Phytopathology. 77 (9): 1341-1345.

50. _____.; GOTTWALD, T. R.; ZITKO, S.E. 1991. Bacterial exudation from lesions of Asiatic citrus canker and citrus bacterial spot. Plant Disease. 75 (2): 192- 195.

51. UNCTAD. 2009. Market information in the commodities area. Citrus fruit. (en línea). s.l. s.p. Consultado 24 jul. 2009. Disponible en http://www.unctad.org/infocomm/anglais/orange/sitemap.htm

52. UNDERWOOD, W.; MELOTTO, M.; HE, S.Y. 2008. Role of plant stomata in bacterial invasion. Annual Review of Phytopathology. 46:101-122.

53. URUGUAY MINISTERIO DE GANADERIA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCIÓN DE ESTADISTICAS AGROPECUARIAS. 2003. La Citricultura en Uruguay; contribución a su conocimiento. Montevideo. 31 p.

54. _____. _____. _____. 2008. Encuesta citrícola primavera 2008. Montevideo. 11 p.

55. VERNIERE, C.J.; GOTTWALD, T.R.; PRUVOST, O. 2003. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. Phytopathology. 93 (7): 832–843.

56. ZUBRZYCKI, H.M., ZUBRZYCKI, A.D., 1984. Relationship between the amount of inoculum and the infection caused by *Xanthomonas campestris* pv. c*itri* on citrus seedlings through natural infections in the field. Proceedings of International Society of Citriculture. 1: 379 – 382.

9. ANEXOS

9.1. Sustrato para el cultivo de plantines de citrus [a] [4]

1. Colocar en hormigonera [b]:

A) Turba 30 Lts
B) Arena fina 30 Lts.

2. Agregar los ingredientes para fertilización de base según el siguiente detalle:

PRODUCTO	CANTIDAD (en gramos)
Superfosfato de calcio	100
Nitrato de potasio	15
Sulfato de magnesio	30

3. Agregar 25 mL de solución madre [c] de Fetrilón Combi disueltos en 3 Lts de agua.
4. Mezclar hasta que el sustrato se vea homogéneo.
5. Esterilizar con basamid o al vapor.

NOTA: El volumen está ajustado para hormigonera con capacidad para 60 Lts. En almácigos rinde tres cajones de 56 cm x 36 cm (dimensiones internas) y 10 cm de altura de sustrato. Para transplante rinde 60 macetas de 14 cm de diámetro.

[a] : Válido solamente para turba del tipo canadiense, con pH ligeramente ácido a neutro, que no necesita ser neutralizado.

[b]: Se aconseja utilizar una hormigonera para el mezclado, por ser una forma práctica y simple de obtener una mezcla homogénea. Debería ser de uso exclusivo para preparación de sustrato.

[c]: Solución madre: 12 gr de Fetrilón Combi en 250 mL de agua.

[4] Bertalmio, A. 2008. Com. personal.

Medio de cultivo wakimoto

Nitrato de calcio tetrahidratado ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$)	0.5 g
Fosfato de sodio dodecahidratado ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	2 g
Peptona	5 g
Sacarosa.	15 g
Sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4.7H_2O$)	0.5 g
Agar.	15 g
Agua destilada	1 L

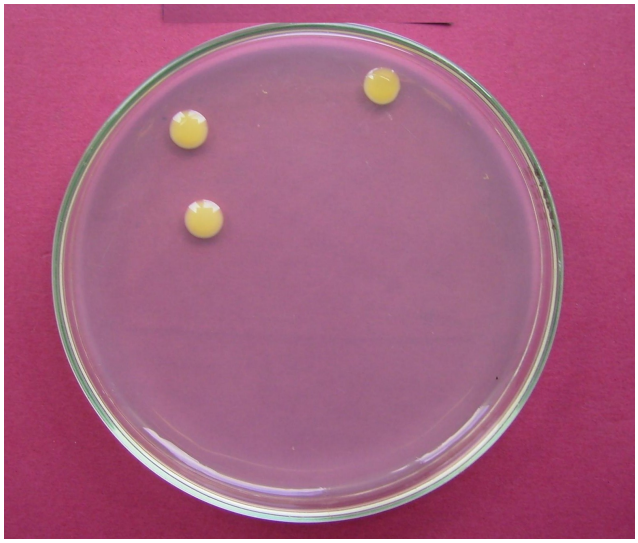
Los ingredientes se disuelven en agua destilada, se calienta en agitación hasta la ebullición, se coloca en los recipientes apropiados y se esteriliza en autoclave a 121ºC, a 1 atm de presión, durante 15 minutos.

9.3. Medio nutritivo líquido

Caldo nutritivo	13 g
Dextrosa	1 g
Agua destilada	1 L

Los ingredientes se disuelven en agua destilada, se calienta en agitación se coloca en los recipientes apropiados y se esteriliza en autoclave a 121ºC, a 1 atm de presión, durante 15 minutos.

9.4. Plantas hospederas en cámara húmeda

9.5. Fitotrón Sanyo Modelo MLR350

9.6. Morfología de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* en medio de cultivo wakimoto (cepa 49b)