



**Universidad de la República
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**ESTUDIO DE VARIACIONES
ESTACIONALES Y AJUSTE DE
METODOLOGIA DE DETECCION
PARA *Xanthomonas campestris pv. pruni*
(E.F. SMITH) DOWSON**

por

Alicia Fátima ASSANDRI CATALDO

T E S I S

1998

MONTEVIDEO

URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA

ESTUDIO DE VARIACIONES ESTACIONALES
Y AJUSTE DE METODOLOGIA
DE DETECCION PARA
Xanthomonas campestris
pv. *pruni* (E.F. SMITH) DOWSON

por

Alicia Fátima ASSANDRI CATALDO

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.
(Orientación Granjera).

MONTEVIDEO
URUGUAY
1998

Tesis aprobada por:

Directores :

..... ANA MARIA PERALTA

Nombre completo y firma

..... VIVIENNE GEPP

Nombre completo y firma

..... MARIA EMILIA CASSANELLO

Nombre completo y firma

Fecha:

.....

Autor:

.....

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a la Ing. Agr. Ana María Peralta y al Ing. Agr. Enrique Verdier por su gran apoyo en esta investigación.

A las Ing. Agr. Vivienne Gepp y María Emilia Cassanello por la corrección de este trabajo.

A la Ing. Agr. Cristina Pagani por la corrección y orientación en este trabajo.

A los Sres. Moizo, Peña, Ayphassoro y Vásquez y Ferrando quienes gentilmente cedieron sus predios para la realización de este trabajo.

Al personal de laboratorio de Servicios de Protección Agrícola del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca por su colaboración en la entrega de material en tiempo y forma y de apoyo a las necesidades de transporte.

Al personal del Departamento de Documentación y Biblioteca por su asesoramiento y colaboración.

A la Cátedra de Agrometeorología de la Facultad de Agronomía, por el aporte de los datos meteorológicos.

A todas aquellas personas que de algún modo hicieron posible la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
<u>PAGINA DE APROBACION</u>	II
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	III
<u>LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES</u>	VIII
I. <u>INTRODUCCION</u>	I
II. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	3
A. LA MANCHA BACTERIANA	3
1. <u>Antecedentes y distribución geográfica</u>	3
2. <u>Hospederos</u>	4
3. <u>Importancia económica</u>	5
4. <u>Daños</u>	6
5. <u>Sintomatología</u>	7
a. Hoja	7
b. Rama	8
c. Fruto	10
6. <u>Signo</u>	11
7. <u>Condiciones predisponentes</u>	11
8. <u>Control</u>	12
B. LA BACTERIA	14
1. <u>Descripción del género</u>	14
2. <u>Diferencias con otros géneros</u>	15
3. <u>Características de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i></u>	15

	V
4. <u>Biología</u>	16
a. Ciclo biológico	16
b. Sobrevivencia	19
c. Dispersión	20
d. Penetración	21
e. Infección	23
f. Translocación	24
C. TECNICAS DE DETECCION DE LA BACTERIA	26
1. <u>Medios de cultivo</u>	26
a. Medio de cultivo selectivo XPSM (Civerolo <u>et al</u> , 1982)	26
b. Comparación del medio de cultivo selectivo (XPSM) con el medio de cultivo no selectivo	27
2. <u>Serología</u>	28
a. Características generales	28
b. Utilización de técnicas serológicas en Bacteriología	31
c. Detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> por medio de técnicas serológicas	32
III. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	33
A. UBICACION Y CARACTERISTICAS DE LOS MONTES DEL ENSAYO	33
B. TRABAJO DE LABORATORIO	40
1. <u>Medios de cultivos utilizados</u>	40
2. <u>Metodología de extracción y procesamiento de muestras</u>	41
3. <u>Siembra en medio de cultivo</u>	42
4. <u>Serología</u>	42

	VI
IV. <u>RESULTADOS</u>	44
A. VARIACIONES ESTACIONALES	44
1. <u>Síntomas observados</u>	44
2. <u>Aparición de síntomas en ramas y hojas de cada cultivar</u>	45
3. <u>Comparación del porcentaje de muestreos con síntomas en los diferentes cultivares</u>	46
4. <u>Comparación entre fechas de muestreo</u>	48
5. <u>Condiciones predisponentes</u>	49
B. METODOS DE DETECCION UTILIZADOS EN EL LABORATORIO	50
1. <u>Aislación de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en medio de cultivo no selectivo (NAD)</u>	50
2. <u>Aislación de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en medio de cultivo selectivo (XPSM)</u>	52
3. <u>Comparación del medio de cultivo selectivo (XPSM) con el medio de cultivo no selectivo (NAD)</u>	54
4. <u>Detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> por la técnica de ELISA-DAS</u>	56
C. COMPARACION DE LAS TECNICAS DE DETECCION DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i>	60
V. <u>DISCUSION</u>	66
A. VARIACIONES ESTACIONALES	66
1. <u>Síntomas observados</u>	66
2. <u>Comparación de la aparición de síntomas en los diferentes cultivares</u>	67
3. <u>Influencia de las condiciones predisponentes sobre la aparición de la Mancha Bacteriana</u>	72

	VII
B. METODOS DE DETECCION UTILIZADOS EN EL LABORATORIO	73
1. <u>Aislación de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en medio de cultivo no selectivo (NAD)</u>	73
2. <u>Aislación de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en medio de cultivo selectivo (XPSM)</u>	75
3. <u>Comparación del medio de cultivo selectivo (XPSM) con el medio de cultivo no selectivo (NAD)</u>	77
4. <u>Detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> por la técnica de ELISA-DAS</u>	
C. COMPARACION DE LAS TECNICAS DE DETECCION DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. PRUNI	83
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	86
VII. <u>RESUMEN</u>	87
VIII. <u>SUMMARY</u>	89
IX. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	91
X. <u>APENDICE</u>	100

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES**RESULTADOS**

<u>Cuadro N°</u>	<u>Página</u>
1. Fecha de aparición de los primeros síntomas en rama.	45
2. Porcentaje de muestreos con síntomas en ramas y hojas.	46
3. Porcentaje de muestreos con aislamientos en NAD en las 3 estaciones.	50
4. Porcentaje de muestreos con colonias características de la bacteria aislada en NAD .	52
5. Porcentaje de muestreos con aislamientos en XPSM en las 3 estaciones.	53
6. Porcentaje de muestreos con colonias de la bacteria aislada en XPSM .	54
7. Porcentaje de muestreos con resultados positivos de ELISA-DAS en hoja y rama en las 3 estaciones estudiadas.	56
8. Coincidencia entre resultados obtenidos en NAD y observación de síntomas (en porcentaje).	60
9. Total de cultivares que formaron colonias en NAD en las 3 estaciones.	61

	IX
10. Coincidencia entre aislaciones obtenidas en XPSM y observación de síntomas (en porcentaje)	62
11. Total de cultivares con aislación en XPSM en las 3 estaciones.	63
12. Porcentaje de coincidencia entre resultados de ELISA-DAS y observación de síntomas.	64
13. Total de cultivares con detección de la bacteria en ELISA-DAS en las 3 estaciones.	65

APÉNDICE

<u>Cuadro N°</u>	<u>Página</u>
1. Momentos de visualización de síntomas en hojas y ramas en los cultivares I, II, III y IV.	100
2. Momentos de visualización de síntomas en hojas y ramas en los cultivares V, VI, VII, VIII y IX.	101
3. Fecha de aislación de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <u>pruni</u> de hojas y ramas de los cultivares I, II, III y IV en medio de cultivo no selectivo (NAD).	102
4. Fecha de aislación de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> de hojas y ramas de los cultivares V, VI, VII, VIII y IX en medio de cultivo no selectivo (NAD).	103
5. Resultados del repique de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> desde medio de cultivo no selectivo (NAD) de los cultivares I, II, III y IV a medio de cultivo no selectivo (NAD).	104
6. Resultados del repique de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> desde medio de cultivo no selectivo (NAD) de los cultivares V, VI, VII, VIII y IX a medio de cultivo no selectivo (NAD).	105

	XI
7. Fecha de aislación de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> de hojas y ramas de los cultivares I, II, III, y IV en medio de cultivo selectivo (XPSM).	106
8. Fecha de aislación de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> de hojas y ramas de los cultivares V, VI, VII, VIII, y IX en medio de cultivo selectivo (XPSM).	107
9. Resultados del repique de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> desde medio de cultivo selectivo (XPSM) de los cultivares I, II, III y IV a medio de cultivo no selectivo (NAD).	108
10. Resultados del repique de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> desde medio de cultivo selectivo (XPSM) de los cultivares V, VI, VII, VIII y IX a medio de cultivo no selectivo (NAD).	109
11. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en rama del cultivar I.	110
12. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en hoja del cultivar I.	111
13. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en rama del cultivar II.	112

14. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar II. 113
15. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar III. 114
16. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar III. 115
17. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar IV. 116
18. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar IV. 117
19. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar V. 118
20. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar V. 119
21. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar VI. 120

	XIII
22. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en hoja del cultivar VI.	121
23. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en rama del cultivar VII.	122
24. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en hoja del cultivar VII.	123
25. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en rama del cultivar VIII.	124
26. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> en hoja del cultivar VIII.	125

REVISION BIBLIOGRAFICA

Figura N°	Página
1. Ciclo biológico de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <u>pruni</u> en ciruelo.	18

APENDICE

1. Resultados de **DAS - ELISA**
Nectarina Cv. Fantasía
2. Resultados de **DAS - ELISA**
Duraznero Cv. Brunetto
3. Resultados de **DAS - ELISA**
Duraznero Cv Rey del Monte
4. Resultados de **DAS - ELISA**
Duraznero Cv Junegold
5. Resultados de **DAS - ELISA**
Nectarina Cv. Nectared II
6. Resultados de **DAS - ELISA**
Damasco Cv. Bulida

7. Resultados de **DAS - ELISA**
Ciruelo Cv. Golden Japan

8. Resultados de **DAS - ELISA**
Ciruelo Cv. Golden Japan

9-10. Temperaturas máximas y mínimas diarias (°C)

11-12. Precipitaciones (mm/día)

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Prunus* spp. constituye un importante rubro de la fruticultura nacional. Dentro de las especies frutales de hoja caduca, el 49,5 % de la superficie cultivada corresponde a *Prunus* (JUNAGRA, 1991).

Los montes están localizados principalmente en la zona sur del país (Dptos de Canelones y Montevideo). Esto se debe fundamentalmente a la cercanía del mercado consumidor.

El principal canal de comercialización lo constituye el mercado interno, con la ventaja de presentar buena potencialidad como producto de exportación en la región. En este aspecto, en la temporada 1993-1994 se registraron exportaciones de durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch) del orden de 60.612 kg (59,37 % del total de la producción), siendo los países destinatarios Argentina y Brasil con 60 y 40 % de las ventas respectivamente. En el caso de ciruela, el principal país importador fue Brasil y la variedad Golden Japan representó el mayor volumen exportado. Con respecto a nectarina, las exportaciones se realizaron a Argentina y Brasil con 17,84 y 82,16 % de las ventas respectivamente.

Dentro de las enfermedades que afectan este género, la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* se encuentra muy extendida en todas las regiones en que se cultiva el mismo.

Esta enfermedad es destructiva durante la estación de crecimiento, atacando hojas, frutos y ramas de ciruelos, damascos, durazneros y nectarinas. Los árboles se pueden debilitar por el desarrollo de lesiones en hojas y canchros en ramas (Du Plessis, 1989).

La infección en fruta provoca que la misma se desvalorice comercialmente (Shepard y Zehr, 1994).

Los datos están estrechamente ligados a las condiciones climáticas y a la susceptibilidad diferencial de las variedades.

La mancha bacteriana es grave en ciertos países, en cambio en otros causa escasas pérdidas, siendo además la intensidad de los síntomas muy variable de un año a otro (Keil y Weaver, 1970).

Los escasos estudios realizados en nuestro país sobre esta bacteriosis no han permitido conocer aún detalles en cuanto a la incidencia de la misma y su posible control (INIA, 1983). Además existen en muchos casos confusiones en cuanto a su etiología, por ser los síntomas bastante semejantes a los producidos por algunas enfermedades a hongo.

À nivel internacional, desde que se comprobó la presencia del patógeno en árboles frutales, se ha intentado controlar con bactericidas y se han seleccionado cultivares con cierta resistencia. A pesar de ello, no están disponibles medidas de control efectivas. De acuerdo a estudios realizados a nivel mundial, el control de esta enfermedad se basa fundamentalmente en la resistencia de cultivares (Du Plessis, 1989).

Considerando la importancia actual o potencial del cultivo de *Prunus* spp. en nuestro país y la escasa información que a nivel nacional se posee sobre *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en relación a su incidencia y desarrollo en nuestro clima, en este trabajo se pretende :

a) conocer las variaciones estacionales del patógeno sobre diversos huéspedes instalados. Se pretende determinar los momentos clave de actividad de la bacteria con el propósito de establecer posibles programas de control;

b) comparar metodologías existentes a nivel nacional e internacional sobre detección de la bacteria a nivel de laboratorio, para determinar bajas poblaciones de la misma diferenciándola claramente de otros organismos.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

A. LA MANCHA BACTERIANA (*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*) (E. F. Smith) Dowson.

1. Antecedentes y distribución geográfica

Esta enfermedad ha sido reportada en la mayoría de los países donde se cultivan **frutales de carozo** (Hayward y Waterston, 1965, citados por Moffett y Croft, 1983).

Fue descrita por primera vez por Smith en el año 1902, en hojas y frutos de ciruelo japonés (*Prunus salicina*) en Michigan, Estados Unidos (Miles, 1977). En América del Norte además se la encuentra en Canadá y México (EPPO, 1990).

En Sudáfrica fue detectada en 1956 en duraznero (*Prunus persica*) y en 1958 en damasco (*Prunus armeniaca*) en las localidades de Villiersdorp, Franschoek, Ceres y Stellenbosch. De ahí se ha extendido a toda la zona donde se cultivan frutales de carozo (Du Plessis, 1989).

Es la principal enfermedad en frutales de carozo en Australia, encontrándose en los Estados de Queensland, Australia Occidental, Nueva Gales del Sur y Victoria (Moffett y Croft, 1983). También se la cita en Nueva Zelanda (EPPO, 1990).

En Europa ha sido reportada en casi todos los países productores de ciruela, damasco y durazno, excepción hecha de Suiza y Chipre, donde si bien se citó no se encuentra establecida. Otros países donde se ha reportado son: Austria, Bulgaria, Holanda, Italia, Líbano, Rumania y Rusia (EPPO, 1990).

En 1970, Durgopal la encuentra en cultivos de ciruelo, damasco, duraznero y nectarinas en la India. Posteriormente fue reportada en Arabia Saudita, Corea, Japón, Pakistán y China (aún no establecida) (EPPO, 1990).

En América del Sur, la primera cita de la enfermedad corresponde a Drummond (1944) en el Estado de San Pablo (Brasil).

Luego fue descrita en los Estados de Rio Grande del Sur, Santa Catarina y Paraná por Robbs et al (1971), Feliciano (1973) y Mohan (1977), citados por Nogueira y Rodrigues Neto (1982).

Se localizó también en cultivos de *Prunus* spp. en Argentina y Uruguay (EPPO, 1990).

2. Hospederos

Se cita sobre distintas especies del género *Prunus*, siendo los más comúnmente atacados: almendro (*Prunus amygdalus*), cerezo (*Prunus avium*), ciruelo (*Prunus salicina*), damasco (*Prunus armeniaca*), duraznero (*Prunus persica*) y nectarina (*Prunus persica* var. *nectarina*).

También son susceptibles especies exóticas u ornamentales como *Prunus davidiana* y *Prunus laurocerasus* (EPPO, 1990). Los cultivares provenientes del grupo japonés (*Prunus japonica* y *Prunus salicina*) son generalmente más susceptibles que los europeos (*Prunus domestica*) (Bazzi y Mazzucchi, 1984; Topp et al, 1989, citados por EPPO, 1990).

3. Importancia económica

De acuerdo a Dunegan (1932) las pérdidas económicas resultan de tres factores principales:

- a) debilitamiento del árbol;
- b) muerte de ramas;
- c) daño a la fruta.

El debilitamiento del árbol se produce por la continua infección foliar y posterior defoliación durante la estación de crecimiento, lo que conduce a una merma en la producción.

Los árboles muy afectados se caracterizan por una pérdida gradual de las ramas principales de estación en estación hasta que se vuelven económicamente improductivos (Moffett, 1973 citado por EPPO, 1990).

En variedades de ciruelo susceptibles se observan daños severos en las ramas; en duraznero el daño es más leve (Dunegan, 1932).

La aparición de manchas sobre la superficie del fruto lo desmerece, sobre todo en frutos amarillos o verdosos. Los frutos atacados pierden valor comercial y son producto de descarte a la hora de su venta como fruta fresca o para procesar, según la gravedad del ataque.

Dhanvantari et al (1978) reportan que la pérdida en rendimiento puede ser alta en algunas estaciones debido a que la fruta infectada no es aceptable para el procesamiento.

Por otro lado, se realizan tratamientos químicos que pesan en los costos finales del cultivo.

La EPPO (1990) considera a *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* plaga cuarentenaria. Debido a esto, en el futuro, podría ser motivo de restricción de las exportaciones de fruta a los mercados más exigentes.

4. Daños

Moffett (1973) citado por Topp et al (1989) opina que los canchros en ramas y la muerte de las mismas son problemas más graves que las manchas en hojas, debido a que la bacteria puede sobrevivir en el cancro durante el invierno.

Con el desarrollo de lesiones en hojas, su posterior defoliación y la aparición de canchros en ramas, los árboles se debilitan (Du Plessis, 1989).

En ciruelo, el daño causado es particularmente grave en árboles jóvenes donde el crecimiento se ve afectado por defoliación y muerte de ramas. En algunos años el daño producido en fruta puede disminuir la cosecha en un 50 % (Atkinson, 1971 citado por Bazzi y Mazzucchi, 1980).

Moffett (1973) señala que el manchado severo de la hoja resulta en caída prematura de la misma.

Desde el punto de vista comercial, el daño en fruta es lo más problemático (Du Plessis, 1989).

Agrios (1986) reporta que la enfermedad es más severa en árboles debilitados que en los vigorosos y por lo tanto mantener los árboles vigorosos ayuda a resistir la enfermedad.

5. Sintomatología

a. Hoja

Las lesiones en las hojas aparecen a principios de octubre (Hemisferio Sur) coincidiendo con el comienzo de la estación de crecimiento (Moffett, 1973).

Los primeros síntomas aparecen en el envés de la hoja como áreas pequeñas, circulares o irregulares, de 0,5 a 1 mm de diámetro, de color verde claro a amarillo, con el centro de color marrón claro (EPPO, 1990).

Estas manchas se distinguen claramente a contraluz (Scortichini y Simeone, 1990).

A medida que crecen se visualizan en el haz de la hoja, de forma angular, de 1 a 5 mm de diámetro y de color púrpura, marrón o negro (EPPO, 1990). El tejido circundante se colorea de amarillo, formando un halo alrededor de la mancha. Luego se desarrolla una zona de aspecto húmedo que rodea la mancha (Dunegan, 1932). Las áreas afectadas caen, usualmente luego de oscurecerse, dando una apariencia de cribado a la hoja (EPPO, 1990).

Las manchas en las hojas se desarrollan alrededor de 14 días después que la bacteria ha penetrado en los tejidos (Du Plessis, 1989).

Civerolo (1975) reporta la ocurrencia de lesiones circulares o angulares de color blanco grisáceo al realizar inoculaciones en hojas; observa además que si se realiza la inoculación en hojas más jóvenes el tamaño de la lesión es más grande.

Las manchas se concentran en el ápice de la hoja, debido a que la bacteria se acumula en esta zona en gotas de lluvia o rocío (EPPO, 1990).

Sin embargo, Du Plessis (1989) señala que las manchas se pueden localizar en cualquier lugar de la superficie de la hoja. Aunque se ha reportado su ubicación a lo largo de los nervios principal y secundarios en ciruelos y damascos. Las lesiones pueden ser tan numerosas que coalescen y afectan grandes partes de la lámina foliar.

Moffett (1973) observó en ciruelo que las hojas que emergían eran mal desarrolladas y atizonadas, no expandiéndose en algunas oportunidades. En hojas nuevas, las áreas de la lámina adyacentes al nervio central y el peciolo se encontraban descoloridas.

b. Rama

Se distinguen dos tipos de canchros en rama: de primavera y de verano.

Cancro de Primavera

Se desarrolla después de la brotación en la parte apical de las ramas de la estación anterior. Al principio los canchros son escasos y no se detectan hasta que las primeras hojas aparecen (Larsh y Anderson, 1948).

Al inicio del desarrollo el cancro es pequeño, de aspecto húmedo, y se extiende de 1 a 10 cm paralelo al eje de la rama. La punta de la rama puede necrosarse, mientras que el tejido por debajo de la lesión (donde la bacteria está presente) aparece de color negro, éste es el llamado "daño de punta negra" (EPPO, 1990).

De acuerdo a Du Plessis (1989) las lesiones se oscurecen y la epidermis se rompe, desarrollándose los canchros en una mitad de la circunferencia de la rama. Sin embargo, se ha observado que en duraznero pueden rodear la rama y causar muerte de ápices. El mismo autor señala que el cancro de primavera sólo se desarrolla cerca del ápice de la rama en duraznero, aunque en ciruelo puede desarrollarse a lo largo de la misma.

Larsh y Anderson (1948) reportan que no se produce desprendimiento de la corteza de la zona invadida por el patógeno como sucede en el cancro de verano.

Feliciano y Daines (1970) reportan que la incidencia del cancro de primavera puede variar de un año a otro, dependiendo de las condiciones ambientales que ocurren durante el período en que se produce la infección.

Cancro de Verano

Thornberry y Anderson (1933) citados por Moffett (1973) observaron que el cancro de verano se origina en las ramas jóvenes luego que las lesiones en las hojas se han desarrollado completamente.

Primero las lesiones son húmedas, de color púrpura y rodean a las lenticelas. Luego se secan, aparecen con bordes limitados, hundidos, circulares a elípticos, con un margen húmedo (EPPO, 1990).

El cancro de verano se desarrolla 5 semanas después que las ramas han comenzado a crecer en el caso de que la bacteria ingrese por heridas en la hoja o en el pecíolo. Pero también puede darse el caso de que el cancro se desarrolle a partir del movimiento sistémico de la bacteria desde ramas infectadas en la estación previa (Du Plessis, 1987).

Moffett (1973) reporta que es difícil encontrar cancos en durazneros hasta fines de enero (verano).

Los cancos se desarrollan justo por debajo de la inserción de los pecíolos con el tallo, levemente hundidos en el centro y de forma elíptica, con borde húmedo. La epidermis se rompe en el centro del cancro y se libera goma con bacteria. En algunos casos pueden rodear la circunferencia entera de la rama (Du Plessis, 1989).

De acuerdo a Du Plessis (1987), altas poblaciones del patógeno favorecen el desarrollo del cancro de verano. El mismo autor señala que ramas más viejas (con más de 7 semanas de edad) no desarrollan cancro, lo que demuestra un efecto retardador de los tejidos más viejos sobre el desarrollo del mismo.

Según Patrick (1978) los canchros formados en verano son fuente potencial de inóculo para la primavera siguiente.

c. Fruto

Du Plessis (1989) observa que las frutas se infectan cuando el patógeno se dispersa desde las hojas hacia ellas.

En fruto de duraznero aparecen manchas pequeñas, circulares, hundidas, de color marrón que le confieren una apariencia de moteado. Estas manchas pueden presentar márgenes húmedos y a menudo un halo de color verde claro. Como resultado del desarrollo del fruto, la zona de la mancha se agrieta (EPPO, 1990).

De acuerdo a Du Plessis, (1989) las lesiones son de 2 a 5 mm de diámetro las cuales se pueden extender 1 a 2 mm en el mesocarpo o en el endocarpo.

En ciruela, los síntomas pueden ser completamente diferentes en los distintos cultivares; en algunas variedades es común la ocurrencia de lesiones negras y hundidas, mientras que en otras sólo ocurren lesiones muy pequeñas, como puntos (EPPO, 1990).

De acuerdo a Ercolani (1970), el aspecto final de la lesión es una mancha necrótica, superficial, redonda o angulosa, de 2 a 6 mm de diámetro.

Con respecto a la incidencia de mancha bacteriana en fruta, Millikan y Hibbard (1964) y Du Plessis (1989) afirman que las lesiones pueden ser tan numerosas que afectan grandes partes del fruto, sin embargo, Topp et al (1989) determinan baja incidencia.

Según Moffett (1973) el fruto se hace resistente a la infección de 4 a 6 semanas antes de la cosecha.

Dhanvantari et al (1978) reportan que la incidencia de mancha bacteriana en fruto es más problemática en cultivares tardíos.

6. Signo

Dunegan (1932) determina la presencia de exudado bacteriano en el envés de la hoja en forma de una película blanquecina.

Durgapal (1970) reporta la presencia exuberante de exudado bacteriano en lesiones de hojas y canchros en ramas.

Miles et al (1977) señalan que se produce exudado en la superficie de la hoja 6 días antes de que los síntomas sean visibles.

Du Plessis (1989) observa la presencia de exudado bacteriano en canchros de primavera y verano en algunas oportunidades.

7. Condiciones predisponentes

De acuerdo a EPPO (1990) las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad son: estación cálida con temperaturas que oscilan entre 19 y 28°C, precipitaciones frecuentes y ligeras acompañadas de vientos fuertes y rocíos.

Los ataques severos del patógeno ocurren bajo condiciones de humedad y tiempo cálido (Shepard y Zehr, 1987).

Las poblaciones de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en las hojas se incrementan rápidamente sólo después de períodos de lluvias.

No se ha observado esta enfermedad en zonas áridas, EPPO (1990).

Shepard y Zehr (1987) trabajando en laboratorio, demostraron que se requiere un período de 24 a 48 horas de humedad a 24°C para que se produzca una infección significativa. A mayor temperatura, 30°C (considerando cualquier período de humedad), aumenta la severidad de la enfermedad.

Young et al (1976) citados por Goodman y Hattingh (1988) señalan que la bacteria no es tolerante al frío. Esto lo demuestran por el hecho de que al conservar yemas infectadas en un ambiente frío, éste no fue favorable para el desarrollo de la bacteria.

Matthee y Daines (1969) citados por Moffett (1973), encuentran que árboles de durazneros cultivados en suelos livianos son más susceptibles a la mancha que aquellos cultivados en suelos más pesados.

Además, la susceptibilidad a la enfermedad se modifica si se altera la nutrición mineral. En este aspecto, Matthee y Daines (1968) determinan que niveles altos de nitrógeno y bajos de potasio incrementan la susceptibilidad de las plantas a esta enfermedad.

8. Control

Es importante determinar la época más apropiada para la realización del control químico, de tal manera de reducir efectivamente la población del inóculo.

Sin embargo, debido al escaso conocimiento sobre el ciclo biológico, no es posible definir un programa preciso de tratamientos para combatir eficazmente la enfermedad (Stefani et al, 1989).

Bazzi y Mazzucchi (1980) recomiendan la realización de tratamientos en dos épocas durante la estación de crecimiento:

- a) a yema hinchada para proteger la nueva vegetación;
- b) en la estación propiamente dicha para prevenir la infección foliar.

Se obtiene control significativo de la enfermedad en árboles tratados hasta 50 días después del comienzo de la estación de crecimiento. Este período es suficientemente largo para permitir que la planta madure y los tejidos se vuelvan resistentes a la infección por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, ya que es probable que la bacteria invada los tejidos al principio de dicha estación (Keil y Civerolo, 1979).

Dhanvantari et al (1978) señalan que sería beneficioso un tratamiento que reduzca el inóculo que sobrevive en invierno antes que cause infecciones primarias y secundarias.

En este sentido Bazzi y Mazzucchi (1980) proponen dos tratamientos con productos cúpricos a la caída de la hoja, con el objetivo de proteger las heridas que se producen al caer las mismas, que son vía de entrada del patógeno.

Sands y Walton (1975) sugieren la aplicación de soluciones de antibióticos a bajo volumen y alta concentración en otoño. De este modo no hay posibilidad de que el fruto entre en contacto con el producto químico.

Keil y Weaver (1970), trabajando con durazneros, reportan un buen control de la enfermedad al realizar aplicaciones adicionales de antibióticos luego de períodos de lluvias.

B. LA BACTERIA

1. Descripción del género

Según Bradbury (1986), es aerobia obligatoria, Gram negativa, móvil con un flagelo polar, de tamaño de 0,4-0,7 x 0,7-1,6 μm .

No posee estructuras especiales como cubiertas, endosporas o tricomas.

Presenta colonias mucosas, circulares, viscosas, usualmente de color amarillo en medio nutritivo, aunque algunos aislamientos no poseen pigmento.

Durante mucho tiempo se pensó que el pigmento amarillo característico de la bacteria era caroteno; en la actualidad se les ha dado el nombre trivial de xanthomonadinas.

Presenta reacción positiva frente a la catalasa.

No realiza denitrificación o reducción de nitratos.

Produce pequeñas cantidades de ácido provenientes de varios carbohidratos y de similares fuentes de carbono, exceptuando ramnosa, adonitol, sorbitol, dulcitol, meso-inositol, inulina, y saficina. Además puede usar sales de varios ácidos orgánicos como fuente de carbono.

Para su crecimiento activo requiere sustancias orgánicas como metionina, ácido glutámico, ácido nicotínico.

Su crecimiento se inhibe con 0,02 % de cloruro de trifetil tetrazolio.

Con respecto a sensibilidad a antibióticos, varios patovares muestran sensibilidad a tetraciclina, estreptomina, eritromicina, kanamicina, cloranfenicol y ácido nalidíxico y resistencia a colistina y lincomicina.

2. Diferencias con otros géneros

Vidaver y Davis (1988) señalan las siguientes características para el género **Clavibacter** que lo distinguen del género **Xanthomonas**: no móvil y gram positiva.

Con respecto a las características bioquímicas, el género **Clavibacter** produce ácidos a partir de carbohidratos en forma lenta y débil; algunas razas producen ácidos a partir de glucosa y glicerol. Usa sales orgánicas como fuente de carbono, pero no utiliza benzoato, formato, galacturonato, malonato, oxalato o tartrato; además no hidroliza caseína (Davis et al., 1984).

Las siguientes características morfológicas del género **Pseudomonas** lo diferencian del género **Xanthomonas**: uno o más flagelos polares y forma de bastón recto o curvado.

En el aspecto bioquímico, el género **Pseudomonas** puede realizar denitrificación, mientras que el género **Xanthomonas** no realiza esta actividad. El género citado en primer término no produce xanthomonadinas (Hildebrand et al., 1988).

3. Características de **Xanthomonas campestris** pv. **pruni**

De acuerdo a Hayward y Waterston (1965) es aerobia, Gram negativa, de 0,2-0,8 x 0,8-1,7 μm con un flagelo polar simple. En medio nutritivo que contenga carbohidratos presenta colonias amarillas, mucosas, brillosas, y convexas.

Produce ácidos en forma oxidativa de glucosa, sucrosa, fructosa, arabinosa, rafinosa, galactosa, lactosa, maltosa (sólo en algunos casos en períodos prolongados de incubación), celobiosa y glicerol.

No produce ácidos de las siguientes fuentes de carbono: manitol, inulina, dulcitol, meso-inositol, sorbitol y salicina.

Presenta la capacidad de hidrolizar caseína y gelatina y en contraste con la mayoría de las especies de *Xanthomonas*, la hidrólisis del almidón es lenta e incompleta.

No produce nitritos provenientes de nitratos; no produce ureasa.

El medio de cultivo debe contener ácido nicotínico para su crecimiento (Wilson y Henderson, 1963, citados por Hayward y Waterston, 1965).

La temperatura mínima para su crecimiento es de 7°C, óptima de 25°C y máxima de 38°C.

4. Biología

a. **Ciclo biológico**

Durante el invierno, la bacteria sobrevive en los canchros de las ramas, en el interior de las yemas axilares y terminales (Dhanvantari, 1977), en las hojas infectadas que caen al suelo (Bucur et al, 1962) y en la base de la cicatriz foliar (Feliciano y Daines, 1970).

En primavera, antes de la brotación, la bacteria comienza a multiplicarse en dichos canchros y en las cicatrices foliares contaminadas en el otoño anterior. A partir de ahí la bacteria invade los espacios intercelulares de la base de las yemas, causando la muerte de los brotes jóvenes. Desde la base de la yema el patógeno puede difundirse a la corteza del entrenudo, formando los denominados canchros de primavera. En estos se encuentra la principal fuente de inóculo para las infecciones primarias de las hojas y flores, siendo las bacterias arrastradas por el viento y la lluvia (Bazzi y Mazzucchi, 1980).

Una vez dadas las condiciones predisponentes, la bacteria invade las hojas a través de estomas y heridas, causando lesiones que constituyen la fuente secundaria de inóculo para toda la estación de crecimiento (EPPO, 1990).

En los frutos, la entrada de la bacteria tiene lugar a través de estomas o pequeñas heridas causadas por granizo e insectos.

Durante el verano, la elevada temperatura, la baja humedad, y la cicatrización de algunos canchros obstaculizan la difusión de la enfermedad (EPPO, 1990).

En otoño, las bacterias procedentes de las manchas foliares y de los canchros, contaminan las heridas dejadas por las hojas, penetrando por los vasos y los espacios intercelulares del tejido expuesto. Esto se agrava cuando las hojas son arrancadas antes de tiempo por vientos fuertes sin que la capa de abscisión se haya formado aún (Bazzi y Mazzucchi, 1980).

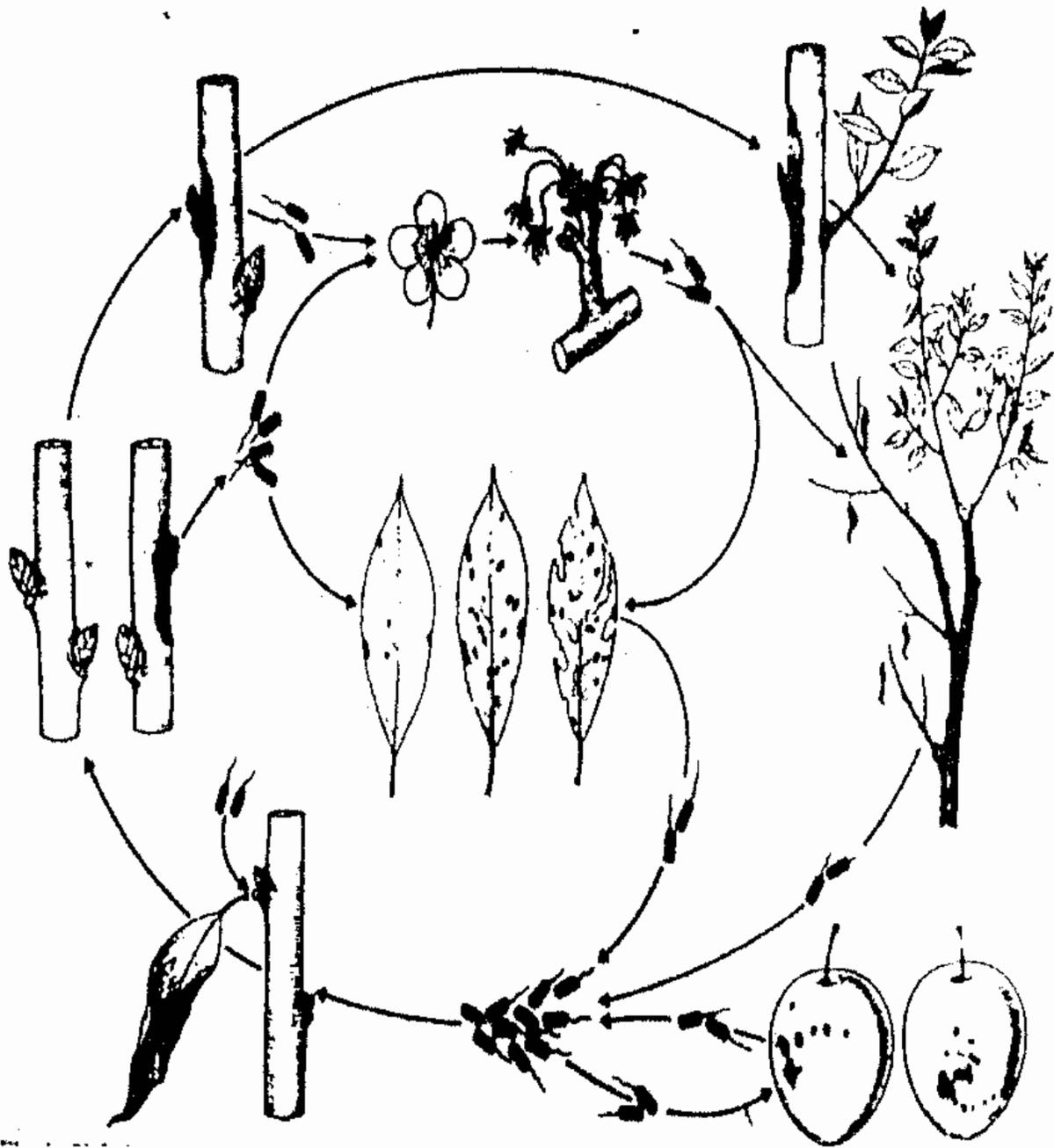


Figura N°1 Ciclo Biológico de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en ciruelo
 Fuente: Bazzi, C., Mazzucchi, U. 1980.

b. Sobrevivencia

En duraznero, la bacteria inverna en los espacios intercelulares de la corteza y en el parénquima del floema y xilema de la zona apical de las ramas formadas en la estación anterior. En ciruelo y damasco, los canchros de verano continúan desarrollándose y produciendo inóculo la primavera siguiente (EPPO, 1990).

Thornberry y Anderson (1933) y Stefani et al (1989) indican que la bacteria sobrevive durante el invierno en hojas infectadas que se encuentran en el suelo. Sin embargo, Dhanvantari (1971) señala que la bacteria no sobrevive en hojas infectadas enterradas en el suelo, sobreviviendo en suelo estéril durante más de un año a temperaturas que oscilan entre -20 y 20 °C.

Adam et al (1955) reportan que se puede aislar una cantidad suficiente de bacterias de ramas recolectadas luego del mes de diciembre (Hemisferio Norte), ya que en invierno, las temperaturas bajas reducen o inactivan la misma. Sin embargo, cuando las ramas se exponen durante 5 días a 24°C y una humedad relativa alta, se incrementa el número de aislaciones. Esto indica que una cantidad suficiente de bacterias es capaz de sobrevivir durante el invierno en los tejidos corticales de la rama.

Kuwatsuka (1921) citado por Dunegan (1932) señala que logró aislar la bacteria de canchros en ramas de ciruelo durante el invierno.

Moffett (1973) reporta la presencia de bacteria viable en un pequeño porcentaje de canchros en madera de 2 años.

Dhanvantari (1971) determina la presencia de colonias bacterianas en yemas axilares y apicales provenientes de árboles infectados a principios de la estación de crecimiento.

Feliciano y Daines (1970) al realizar inoculaciones en el ápice de la rama, determinan que se produce mayor número de canchros en éste que si las mismas se realizan en partes más basales de la rama. Por este motivo concluyen que el ápice de la misma provee de condiciones favorables para la sobrevivencia de la bacteria.

c. Dispersión

A corta distancia

Du Plessis (1987) reporta que la dispersión de la bacteria se ve favorecida por lluvias y vientos fuertes y que la misma se produce desde las lesiones en hojas y canchros de verano hacia las heridas de las hojas.

Miles et al (1977) observan que los estomas proveen un sitio importante para el egreso de la bacteria, la cual puede ser posteriormente diseminada y producir infecciones secundarias.

Los mismos autores reportan que la bacteria se dispersa desde las heridas de las hojas y de los canchros hacia los frutos, produciendo en éstos lesiones que se extienden 1 a 2 mm en el mesocarpo.

Goodman y Hattingh (1986), al realizar injerto en ciruelo, observan que las ramas presentan canchros a nivel de la unión con el injerto, lo que estaría demostrando la transmisión del patógeno por esta práctica cultural.

Goodman y Hattingh (1988) reportan la presencia de bacteria en los canchros, la cual se adhiere a los instrumentos de poda, lo que provee de un excelente vehículo para la transmisión del patógeno. La transmisión es más frecuente cuando la poda se realiza en condiciones frescas y húmedas que en condiciones de período seco y caluroso. Así, estos autores señalan que en un ensayo, el 66% de los árboles desarrollaron cancro cuando la poda se realizó en tiempo húmedo y fresco.

La dispersión del patógeno hacia árboles adyacentes se correlaciona con la dirección y velocidad del viento (Larsh y Anderson, 1948).

A larga distancia

El patógeno se distribuye de una localidad a otra por material infectado. Además lluvias frecuentes y rocíos acompañados de vientos leves a fuertes distribuyen la bacteria entre árboles, cultivos y regiones (Du Plessis, 1989).

Por otro lado, la introducción de material no saneado sería una fuente probable de entrada del patógeno a una zona libre del mismo.

d. Penetración

Smith (1903) reportado por Larsh y Anderson (1948) señala que la bacteria ingresa por los estomas y en las primeras etapas de la enfermedad se encuentra en la cámara subestomática.

De acuerdo a Agrios (1986) las bacterias que se encuentran en una película de agua sobre un estoma nadan con cierta facilidad hacia él y se introducen en la cavidad subestomática, donde se reproducen e inician la infección.

En concordancia con esto, Daines (1961) citado por Matthee y Daines (1969) explica que la bacteria requiere una capa de agua continua entre el interior y exterior de la hoja para ingresar a la misma a través de los estomas.

Miles et al (1977) reportan que en duraznero la bacteria es más abundante en el envés de la hoja que en el haz, debido a que en esta especie los estomas se encuentran en la cara inferior de la misma.

Mattheè y Daines (1969), trabajando con durazneros, encontraron que el incremento en la apertura estomática está correlacionado con un aumento en la congestión hídrica, siendo éste un factor importante para el desarrollo de la enfermedad. Además la mayor apertura estomática está en relación al nivel de nitrógeno y al cultivar. Con respecto al nivel de nitrógeno, al aumentar éste aumenta la apertura estomática, siendo ésta mayor en follaje de árboles que crecen en suelo liviano que en suelo pesado.

Feliciano y Daines (1970), observan que las heridas frescas de las hojas proveen un sitio apropiado para la penetración del patógeno. Además, el ingreso de la bacteria a nivel de la herida provocada por la defoliación sólo se produce cuando ésta no ha suberificado.

Ádam *et al* (1955) determinan que hay gran resistencia a la invasión en las zonas basales de la rama. Esto es debido a que en la porción basal los estomas son viejos, menos activos y posiblemente se encuentren en menor número que en la parte apical. La presencia de felógeno por debajo de la epidermis, en la porción basal, podría proteger la corteza contra la invasión externa.

La resistencia a la invasión por parte de las ramas en invierno podría explicarse por la inactividad de las células corticales en dicha época (Thornberry y Anderson, 1933).

Bazzi y Mazzucchi (1980) señalan que en fruto el ingreso de la bacteria se da a nivel de estomas y pequeñas heridas, causadas principalmente por granizo e insectos.

e. Infección

De acuerdo a Civerolo (1975) se requiere una concentración de inóculo de 10^6 a 10^8 UFC/ml para que se produzca clorosis en todo el sitio de inoculación en 2 días.

A una concentración de inóculo de 10^2 a 10^4 UFC/ml, aparecen lesiones circulares o angulares de color blanco grisáceo de 2 a 8 días después de la inoculación. A una concentración de inóculo de 10^7 a 10^8 UFC/ml, las hojas desarrollan clorosis general.

De estos resultados, Civerolo (1975) concluye que el intervalo de tiempo entre inoculación y aparición de síntomas depende de la concentración de inóculo.

Du Plessis (1987) señala que aún una baja población del patógeno inoculada en el pecíolo, causa altos porcentajes de canchales en los nudos (24 - 54%).

Civerolo (1975) menciona que hay una relación lineal entre el número de lesiones que se desarrollan en cada sitio de inoculación y la concentración de la bacteria en el inóculo (si el mismo contiene menos de 10^5 UFC/ml).

Shepard y Zehr (1994) y Du Plessis (1987) reportan que la bacteria se puede aislar de órganos que no presentan síntomas.

El último autor indica, que al realizar inoculaciones, no se desarrollaron síntomas en ramitas en un período de 12 semanas, luego de esta práctica. Esto estaría indicando que la bacteria podría sobrevivir y permanecer latente en las ramas durante el verano por lo menos de 8 a 12 semanas.

f. Trànslocación

Du Plessis (1985) sostiene que la migración de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en nervaduras de la hoja probablemente comienza luego de visualizarse los síntomas en la misma. La detección de la bacteria en vasos del xilema de pecíolos, sugiere que migra a través de los vasos. La presencia del patógeno en gran concentración en secciones discontinuas del mismo tallo, indica que el mismo migra en bajo número hacia lugares donde puede multiplicarse rápidamente.

Antes de la caída de la hoja, el patógeno migra sistémicamente a través de los haces vasculares de las hojas infectadas hacia las ramas. Esto se comprueba por el hecho de que se obtienen aislaciones provenientes de ramas con y sin hoja. Hay alta correlación entre infección en ramas y presencia de la bacteria en hojas adyacentes.

Du Plessis (1987), al realizar inoculaciones en árboles de ciruelo, cultivar Golden King, observa el desarrollo de cancro de primavera de 1 a 2 nudos de distancia desde el punto de inoculación, lo que confirma el movimiento sistémico del patógeno en la rama.

El desarrollo del cancro de primavera como el de verano en ciruelo, se deben al movimiento sistémico de la bacteria desde hojas y ramas infectadas.

Bazzi y Mazzucchi (1980) explican que la bacteria invade los espacios intercelulares del tejido de la base de la yema, luego de su penetración en la herida dejada por la hoja. La bacteria se puede difundir desde la base de la yema hacia la corteza limítrofe del entrenudo, formando el cancro primaveral.

Según Du Plessis (1990) el movimiento sistémico de la bacteria se extiende a frutos y semillas a través de los pedúnculos.

El mismo autor encontró que el 34% de la fruta cuyos pedúnculos habían sido inoculados con el patógeno, presentaban lesiones de mancha bacteriana, comparado con 8,6% de fruta control (sin inocular).

Du Plessis (1990) mediante microscopio electrónico, observó masas de bacteria en vasos del xilema de pedúnculos infectados, testa, endocarpo y mesocarpo y probó que la bacteria se mueve y prolifera en el sistema vascular de diferentes partes de la fruta.

Además se encontró el patógeno en semillas. Esto último sería importante en el caso de que se utilizaran semillas infectadas para obtener portainjertos.

Finalmente Du Plessis (1990) concluye que el movimiento sistémico de *Anthonomus campestris* pv. *pruni* hacia los frutos no es importante en la incidencia de la enfermedad, ni como fuente secundaria de inóculo.

C. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE LA BACTERIA

1. Medios de cultivo

a. Medio de cultivo selectivo **XPSM** (Civerolo et al, 1982)

Civerolo (1982) señala que cuando se realiza cultivo de la bacteria en **XPSM** y se incuba a 27°C, las colonias que se obtienen son convexas, mucosas, de color grisáceo (observadas a simple vista) o con el centro de color amarillo claro (observadas al microscopio). Además las colonias se presentan con márgenes enteros, de diámetro de 1 a 2 mm, son brillantes u opacas y lisas.

Para el crecimiento de las colonias en este medio de cultivo se requiere un período de incubación de 5 a 7 días a 27°C.

Una ventaja de **XPSM** es que otras bacterias u hongos que pueden estar asociados a *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* tanto en hojas infectadas como asintomáticas, se desarrollan con una tasa de crecimiento muy baja, lo que facilita su diferenciación.

Civerolo (1982) reporta que se desarrollan colonias de otros patovares de *Xanthomonas campestris* en **XPSM**, siendo la eficiencia de este medio en general alta para casi todas las razas de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*.

Si se realizaran modificaciones en la composición del medio, posiblemente se obtendría un crecimiento más rápido de la bacteria, con el desarrollo de colonias amarillas, mucosas, características del género *Xanthomonas*.

Por último, Civerolo (1982) concluye que **XPSM** es simple, barato, útil, y presenta buena sensibilidad y selectividad para la aislación de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* de árboles infectados naturalmente.

XPSM sería una herramienta potencial para el estudio epidemiológico cuando es necesario monitorear poblaciones de la bacteria que se encuentran en un amplio rango de huéspedes.

b. Comparación del medio de cultivo selectivo (XPSM) con el medio de cultivo no selectivo.

Civerolo (1982) al comparar el medio de cultivo selectivo con el medio **NGA** (agar nutritivo suplementado con 2% de glucosa) observa que se desarrollan más colonias en el primero que en el segundo. No obstante, las colonias crecen más rápido y de mayor tamaño en **NGA**.

Las características cualitativas de las colonias en **XPSM**, como forma y textura, son similares a aquellas en **NGA**, en cambio difieren en la pigmentación (colonias de color amarillo en **NGA**) y el período de incubación, el cual es de alrededor de 2 a 3 días para **NGA**.

Cuando se usa **NGA**, las aislaciones provenientes de hojas tienen que ser diluidas por lo menos 100 veces para reducir el número de colonias de otras bacterias, que puedan interferir con el desarrollo de ésta.

Cuando se realiza repique de colonias tomadas al azar de **XPSM** a **NGA**, se obtienen colonias típicamente amarillas, mucosas y convexas en un lapso de incubación de 2 a 3 días a 27°C.

2. Serología

a. **Características generales**

Las técnicas serológicas han adquirido un mayor auge en el campo de la Patología Vegetal en las últimas décadas en el testaje rutinario de muestras vegetales.

Esta metodología ha sido reconocida como una técnica potencial para la detección de bacterias, virus y micoplasmas causantes de enfermedades en plantas (Clark, 1981).

De acuerdo a Schaad (1979) la serología es una herramienta importante en biología molecular, usándose en la actualidad para la determinación de organismos patógenos e identificación de compuestos específicos.

Las técnicas serológicas inmunoenzimáticas como por ejemplo Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (**ELISA**) se basan en una reacción serológica que utiliza conjugados. La técnica inmunoenzimática más comúnmente usada para la detección de fitopatógenos es el **ELISA** doble sandwich de anticuerpos.

Esta técnica ha sido usada exitosamente desde 1976 (Nomé et al., 1980).

Consiste esencialmente en los siguientes pasos:

1) la inmunoglobulina específica para el patógeno a determinar se adsorbe a una superficie sólida de material plástico (microplacas de poliestireno);

2) al agregar una suspensión del patógeno correspondiente, éste es atrapado por la inmunoglobulina fijada;

3) se adiciona el anticuerpo ligado a una enzima; el patógeno que quedó atrapado en el paso anterior fija este anticuerpo marcado;

4) luego de lavado, se agrega un sustrato específico de la enzima, que así es hidrolizado.

Luego de cada uno de los pasos anteriores, excepto el último, se procede al lavado de la superficie para eliminar los excedentes que no permanecen fijados (Voller *et al*, 1978).

La reacción se detecta por un cambio de color de la solución y se puede evaluar visualmente o midiendo la absorbancia con espectrofotómetro.

Si la enzima utilizada es la fosfatasa alcalina, su sustrato, p-nitrofenil fosfato incoloro es transformado a p-nitrofenol de color amarillo, cuya intensidad se mide con espectrofotómetro a 405 nm.

Según Clark (1981) la técnica de **ELISA** presenta algunas ventajas frente a otras técnicas serológicas y a métodos tradicionales de detección de patógenos.

Es capaz de detectar patógenos que aparecen en concentraciones más bajas que las que pueden ser determinadas por métodos clásicos de precipitación, debiéndose a dos causas:

a) el trapeo selectivo del patógeno con anticuerpos específicos previamente adsorbidos a la fase sólida;

b) el empleo de un sistema de detección de sensibilidad y capacidad de discriminación suficientemente alta como para detectar la presencia del patógeno.

Una segunda ventaja de esta técnica es su habilidad para detectar antígenos de diferente tamaño y morfología. Esto hace posible que se use el mismo protocolo para casi todos los grupos de patógenos vegetales.

Una tercera ventaja es la objetividad que presenta en sus resultados (Clark, 1981).

Sin duda, la mayor ventaja que posee es su capacidad de proveer datos de tipo cuantitativo. Esto permite obtener estimaciones confiables de la población del patógeno (Trigalet *et al.*, 1978) y confirmar resultados preliminares obtenidos con otras técnicas (Vruggink, 1978).

Debido a su potencial de tipo cuantitativo, teóricamente todo valor superior al control negativo debe ser positivo. Pero en las muestras de control negativo también existe una variación en la intensidad de coloración del sustrato. Debido a esta variación se hace necesario determinar arbitrariamente un valor de absorbancia para el límite superior del control negativo. Diferentes autores han adoptado como límite superior del mismo, el promedio de los testigos sanos más 2 o 3 veces la desviación estándar de los mismos (Clark, 1981).

Además esta técnica es efectiva cuando se necesita evaluar gran cantidad de muestras a corto plazo (Clark, 1981).

Es útil además cuando se deben confirmar resultados preliminares en la identificación de un patógeno (Schaad, 1979).

Clark (1981) señala que la técnica se utiliza para investigar la existencia de posibles huéspedes alternativos de fitopatógenos, y en este aspecto, varios investigadores usan el método para ese propósito, entre ellos: Bar Joseph, M., Saillard, C. y Sweet, J.B.

Por último, es una técnica versátil, que se realiza rápidamente, con gran precisión y bajo costo, comparada con otros métodos de detección de patógenos. En tests al azar, la técnica puede rápidamente discriminar plantas sanas de enfermas (Nomé *et al.*, 1980).

b. Utilización de técnicas serológicas en Bacteriología.

Muchos investigadores usan técnicas serológicas para la identificación de bacterias obtenidas directamente de tejidos vegetales enfermos.

La alta sensibilidad del test **ELISA** ha sido reportada como útil en el diagnóstico de *Erwinia atroseptica*, *Xanthomonas c.* pv. *pelargonii* y *Clavibacter m.* subsp. *sepedonicum* (Schaad, 1979).

Vruggink (1978) por su parte, confirma que la técnica es útil en la detección de bacterias fitopatógenas.

El test de **ELISA** doble sandwich (**DAS**) puede ser usado para detectar e identificar razas de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Además permite el diagnóstico rápido de esta bacteria en tejidos enfermos de citrus. Pero también puede ser útil para detectar en forma rápida la presencia de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* en tejidos que no muestran síntomas y en huéspedes alternativos (Civerolo y Fan, 1982).

De acuerdo a Afanador y Victoria (1981) los métodos serológicos se consideran de alta confiabilidad en la identificación de bacterias fitopatógenas.

El test de **ELISA** puede ser una herramienta válida en el estudio de la distribución geográfica de bacterias fitopatógenas (Nomé et al., 1980).

c. Detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* por medio de técnicas serológicas.

Du Plessis et al (1979) reportan el uso del test de aglutinación y de Outcherlony para el estudio de distintas aislaciones de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*.

French et al (1978) trabajaron con la técnica de inmunofluorescencia en el estudio de varias bacterias en *Prunus* spp.

Schaad (1978) usó la técnica de inmunofluorescencia para la identificación de varias especies de *Xanthomonas*, entre ellas *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* proveniente de una muestra de duraznero.

III. MATERIALES Y METODOS

A. UBICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS MONTES DEL ENSAYO

Para este trabajo se utilizaron muestras de hojas y ramas de diferentes especies de *Prunus*, recogidas en quintas en producción en Montevideo, Progreso y Juanicó (Departamento de Canelones). Para facilitar la identificación de los cultivares estudiados se nombran con números romanos, los que se ubican a continuación del nombre, entre paréntesis.

NECTARINA cv. FANTASIA (I)

Este monte está ubicado en el predio del Sr. Domingo Moizo, Camino al Gigante, Juanicó, Departamento de Canelones.

Consiste en un cultivo de **nectarina** de la variedad **Fantasia**, de 10 años de edad, con un marco de plantación de 4,0 x 4,5 m.

El cultivo se encuentra instalado sobre suelo arcilloso.

El manejo de suelo que se realiza es el siguiente: se aplica herbicida en la fila y en la entrefila se trabaja con excéntrica.

La fertilización se realiza a base de urea y la misma se aplica en tres épocas: antes de la floración, después de cuajado y postcosecha.

El estado sanitario general del cultivo es satisfactorio.

Se realizan tratamientos en forma calendaria.

Fecha	Producto
25- 7- 92	Aceite - DNOC (Selinon)
18- 8- 92	Oxicloruro de Cobre (Fanavid Flowable)
27- 8- 92	Oxicloruro de Cobre -Carbendazim (Fanavid Flowable)-(Carbendazim)
15- 9- 92	Carbendazim (Carbendazim)-Captan (Captan)
3- 10- 92	Ziram (Ziram Bayer)-Parathion
19- 10- 92	Captan (Captan)-Parathion
9- 11- 92	Captan (Captan)-Metidation (Suprathion 40 EC)
18- 12- 92	Captan (Captan)-Metidation (Supracid 40)
20- 1- 93	Iprodione (Rovral)
29- 4- 93	Oxicloruro de Cobre (Fanavid Flowable)

DURAZNERO cv. BRUNETTO (II)

El monte está ubicado en el predio del Sr. Domingo Moizo. Camino al Gigante, Juanicó, Departamento de Canelones.

Consiste en un cultivo de **duraznero** de la variedad **Brunetto**, de 13 años de edad, con un marco de plantación de 4,0 x 4,5 m.

El manejo que se realiza en este monte es igual al anterior.

El estado sanitario general del cultivo es satisfactorio, se realizan tratamientos en forma calendaria.

Fecha	Producto
25- 7- 92	Aceite - DNOC (Selinon)
18- 8- 92	Oxicloruro de Cobre (Fanauid Flowable)
27- 8- 92	Oxicloruro de Cobre -Carbendazim (Fanauid Flowable)-(Carbendazim)
15- 9- 92	Carbendazim (Carbendazim)-Captan (Captan)
3- 10- 92	Ziram (Ziram Bayer)-Parathion
19- 10- 92	Captan (Captan)-Parathion
9- 11- 92	Captan (Captan)-Metidation (Suprathion 40 EC)
18- 12- 92	Captan (Captan)-Metidation (Supracid 40)
20- 1- 93	Iprodione (Rovral)
29- 4- 93	Oxicloruro de Cobre (Fanauid Flowable)

DURAZNERO cv. REY DEL MONTE (III)

Dicho monte se localiza en el predio del Sr. Peña, Camino al Gigante, Juanicó, Departamento de Canelones.

Se trata de un cultivo de **duraznero**, variedad **Rey del Monte**, de aproximadamente 14 años de edad, con un marco de plantación de 3,5 x 5,0 m.

El cultivo está instalado sobre suelo arcilloso y el mismo se trabaja con excéntrica.

El estado sanitario general del cultivo es satisfactorio.

Al principio de la estación de crecimiento se aplica mezcla sulfocálcica de cabecera (mes de setiembre). En el mes de octubre se aplica sulfato de cobre al 2% y en el mes de abril se realiza tratamiento con mezcla sulfocálcica al 10 %.

DURAZNERO cv. JUNEGOLD (IV)

Este monte está ubicado en el predio de los Srs. Vázquez y Ferrando, Ruta Nacional Nº 5 (Gral. Fructuoso Rivera), km 28, Progreso, Departamento de Canelones.

Consiste en un cultivo de **duraznero** de la variedad **Junegold** de 9 años de edad, con un marco de plantación de 3,5 x 5,0 m plantado a tresbolillo.

El cultivo se encuentra instalado sobre suelo arcilloso con un horizonte A de 30 cm. El manejo de suelo que se realiza es el siguiente: en la fila se aplica herbicida sistémico y en la entrefila se deja empastado. La fertilización nitrogenada se realiza en dos épocas: a caída de hoja y luego del cuajado. Se aplican 50 unidades de nitrato de potasio con el riego.

El estado sanitario general del cultivo es satisfactorio.

Se realizan tratamientos en forma calendaria:

Fecha	Producto
8- 7-92	Oxicloruro de Cobre (Fanavid Flowable)
28- 7-92	Oxicloruro de Cobre (Fanavid Flowable)
28- 8-92	Ziram (Ziram Bayer)
8- 9-92	Ziram (Ziram Bayer)
3-10-92	Ziram (Ziram Bayer)-Endosulfan (Thionex 35)
27-11-92	Ziram (Ziram Bayer)-Fosalone (Zolone F.N.)
11-12-92	Carbaril (Sevin 85 S)-Captan (Captan)
1- 4-93	Oxicloruro de Cobre (Fanavid Flowable)

NECTARINA cv. NECTARED II (V)

El monte está ubicado en el predio de los Srs. Vázquez y Ferrando, Ruta Nacional N° 5 (Gral. Fructuoso Rivera), Progreso, Departamento de Canelones.

Consiste en un cultivo de **nectarina** de la variedad **Nectared II**, de 9 años de edad, con un marco de plantación de 3,5 x 5,0 m cultivado a tresbolillo.

El manejo que se realiza en este cultivo es igual al anterior.

Se realizan tratamientos en forma calendaria.

Fecha	Producto
8- 7-92	Oxicloruro de Cobre (Fanavid Flowable)
28- 7-92	Oxicloruro de Cobre (Fanavid Flowable)
28- 8-92	Ziram (Ziram Bayer)
8- 9-92	Ziram (Ziram Bayer)
3-10-92	Ziram (Ziram Bayer)-Endosulfan (Thionex 35)
27-11-92	Ziram (Ziram Bayer)-Fosalone (Zolone F.N.)
11-12-92	Carbaril (Sevin 85 S)-Captan (Captan)
1- 4-93	Oxicloruro de Cobre (Fanavid Flowable)

DAMASCO cv. BULIDA (VI)

Este monte está ubicado en el predio de la Facultad de Agronomía, Avda. Garzón 780, Montevideo.

Consiste en un cultivo de damasco de la variedad Bulida, de 15 años de edad y consta de 15 árboles sobre los que se tomaron las muestras al azar.

CIRUELO cv. GOLDEN JAPAN (VII)

Este monte se encuentra ubicado en el predio de la Facultad de Agronomía, Avda. Garzón 780, Montevideo.

Consiste en un cultivo de **ciruelo** de la variedad **Golden Japan**, de 10 años de edad. En este monte se tomaron muestras de un árbol inoculado previamente con la bacteria en estudio.

CIRUELO cv. GOLDEN JAPAN (VIII)

Dicho monte está ubicado en el predio del Sr. Ayphassoro, Progreso, Departamento de Canelones.

Consiste en un cultivo de **ciruelo** de la variedad **Golden Japan**. El mismo tiene una edad de 12 años, con un marco de plantación de 3,5 x 5,0 m.

El cultivo se encuentra instalado sobre suelo arcilloso. El manejo de suelo que se realiza es el siguiente: en la fila se aplica herbicida y en la entrefila se trabaja con chirquera o disquera. La fertilización nitrogenada se realiza aplicando 100 kg de urea previo a la floración.

El estado sanitario general del cultivo es satisfactorio.

Se realizan tratámientos en forma calendaria:

Fecha	Producto
27-8-92	Oxicloruro de Cobre
3-9-92	Oxicloruro de Cobre - Ziram (Ziram Bayer)
14-9-92	Ziram (Ziram Bayer)
23-9-92	Ziram (Ziram Bayer)
7- 10-92	Endosulfan (Thionex 35)
22-10-92	Etilfosfito de Aluminio + Folpet (Mikal)
11-11-92	Mancozeb (Dithane M-45)
12-11-92	Metilazinfos (Gusathion M35)
30-11-92	Metilazinfos (Gusathion M35)
2-12-92	Mancozeb (Dithane M45) - Metilazinfos (Gusathion M35)
16-12-92	Carbaryl (Sevin 85 S) - Iprodione (Rovral)
4- 1-93	Mancozeb (Dithane M45)
28- 1-93	Captan (Captan)-Iprodione (Rovral)
28- 4-93	Oxicloruro de Cobre
29- 4-93	Oxicloruro de Cobre

CIRUELO cv. GOLDEN JAPAN (IX)

Se usó como testigo un árbol de **ciruelo** de la variedad **Golden Japan** cultivado en Montevideo, en jardín de casa particular, fuera del área de montes comerciales, de 10 años de edad, en producción. El mismo no presentó síntomas de la enfermedad en estudio en el transcurso del ensayo realizado.

B. TRABAJO DE LABORATORIO

El ensayo se realizó en los Laboratorios Biológicos de la Dirección de Servicios de Protección Agrícola del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

1. Medios de cultivos utilizados

Se usaron dos medios de cultivo:

NAD (nutriente agar dextrosa) no selectivo

Agar nutritivo	23	gr
Dextrosa	5	gr
Agua destilada	1000	ml

XPSM (Civerolo et al 1982)

Acido algínico	2	gr
8-azaguanina	0,2	gr
Acido nicotínico	2	gr
Cisteína	3	mgr
KH ₂ PO ₄	0,8	gr
K ₂ HPO ₄	0,8	gr
Bacto agar	15	gr
Chlorotalonil	106	mgr
Kasugamicina	16,8	mgr
Agua destilada	1000	ml

Los antibióticos - fungicidas referidos en último término se adicionaron luego del autoclavado.

Una vez preparados ambos medios se dispensaron en matraces de 500 ml cada uno para ser autoclavados y conservados a 4°C. En el momento de su utilización se fundieron en horno microondas durante 3 minutos y se dispensaron en placas de Petri.

2. Metodología de extracción y procesamiento de muestras.

Se recolectaron 16 muestras entre el 23-10-92 al 23-4-93, período que coincide con la etapa productiva de la especie.

Se tomaron al azar ramas del crecimiento del año, de 15 cm, siguiendo las diagonales del monte. Se recolectaron 3 ramas de cada diagonal del monte, de las cuales se removieron las hojas más jóvenes. No se consideraron frutos.

Se separaron ramas y hojas de cada muestra y se procedió a la observación visual para detectar síntomas causados por la bacteria en estudio.

Las ramas y las hojas por separado se colocaron en bolsas de polietileno transparente debidamente identificadas y se conservaron a 4°C por 24 horas.

Luego se colocaron en bolsas de polietileno a las que se agregó una solución de buffer peptonado (0,85% de NaCl, 0,1% de peptona, 25 ul de Tween-20) y se sellaron. La cantidad de buffer adicionado fue de 150 cc en caso de hojas y de 50 cc en caso de ramas, cantidad suficiente para cubrir completamente el material. Las mismas se colocaron en agitador recíprocante a 50 rpm por aproximadamente 20 minutos para asegurar el total lavado de bacterias presentes en la superficie de hojas y ramas.

Luego de este último paso, el líquido contenido en las bolsas de polietileno se colocó en frascos plásticos aptos para centrifugar. Las muestras así acondicionadas se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos para obtener el precipitado de las bacterias. Se extrajo el líquido sobrenadante por medio de bomba de vacío.

3. Siembra en medio de cultivo

El precipitado se resuspendió en 5 cc de saline al 50% y se utilizaron 100 ul para sembrar en placas de Petri conteniendo aproximadamente 10 ml del medio de cultivo. Se efectuaron dos repeticiones para cada medio de cultivo.

Las placas se incubaron a 27°C para favorecer el desarrollo de colonias. Paralelamente las soluciones se analizaron por el test de **ELISA-DAS**.

Se realizó la observación de las colonias en **NAD** a las 48 horas y en **XPSM** a los 7 días, tomando como criterios morfológicos: color, forma, borde y consistencia. En ambos casos se realizó el repicado de las colonias más representativas a **NAD**, las que se observaron 48 horas después.

4. Serología

El test **ELISA** se realizó según lo descrito por Bidwell, Voller y Bartlett con el siguiente detalle:

1) En placas de poliestireno adecuadas para dicho test, se colocaron 200 ul de inmunoglobulina por hoyo a una concentración de 10 ug/ml de buffer coating. La placa se envolvió completamente con plástico adherente (Rollopac) para evitar la evaporación y se mantuvo a 4°C durante 18 horas

2) Pasado dicho período se realizaron 3 lavados de la placa (1 minuto cada una) con PBS-Tween para extraer el sobrante no adherido a las paredes y fondo de la placa.

3) Se colocaron 200 ul de la muestra a analizar en cada hoyo, realizándose 4 repeticiones para cada muestra.

Las muestras controles consistieron en saline puro, testigo negativo proveniente del lavado de hojas y ramas sanas y testigo positivo proveniente de suspensión de bacterias obtenidas a través del cultivo en **NAD** de lesiones típicas en fruto. La placa se envolvió convenientemente y se colocó a 37°C durante 2 horas.

4) Luego se realizó el lavado según item 2.

5) El conjugado anti *Xanthomonas campestris* pv.*pruni* con fosfatasa alcalina, se diluyó en PBS-Tween a una relación 1/100; se agregó 200 ul/hoyo. La placa se envolvió y se colocó a 37°C por un lapso de 2 horas.

6) Se realizó lavado según item 2.

7) El sustrato usado fue p-nitrofenil fosfato de sodio, disuelto en buffer sustrato en una relación de 1 mg/ml, usándose 200 ul/hoyo.

8) Se incubó a temperatura ambiente y al cabo de 15 minutos se realizó la primer lectura de la placa según colorimetría (absorbancia) con lector semiautomático (Minireader II, Dynatech Instruments). Las lecturas se repitieron a los 20 y 30 minutos.

IV. RESULTADOS

A. VARIACIONES ESTACIONALES

En cada fecha de muestreo se realizó observación de síntomas en hojas y ramas y éstos se registraron con el propósito de obtener las fechas de aparición de las primeras lesiones y el porcentaje de muestreos con síntomas en ambos órganos.

1. Síntomas observados.

En las hojas (aparentemente afectadas) de todos los cultivares en estudio se observaron lesiones en los espacios internervales, próximo a las nervaduras principal y secundarias. Las lesiones se podían observar a contraluz.

En algunos casos había dudas sobre la presencia de síntomas específicos de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* debido a que los mismos se pueden confundir con los producidos por ciertas enfermedades a hongos, como mal del chumbo.

En las ramas jóvenes se observaron canchales cerca del ápice, por debajo de la unión de los peciolo con el tallo y en los entrenudos. Estos eran de forma elíptica, alargados, hundidos en el centro y se disponían siempre en forma paralela al eje de la rama.

En algunas oportunidades el cancro rodeaba la circunferencia entera de la rama.

No se observaron canchales de primavera.

No se visualizó exudado en hojas ni en ramas.

2. Aparición de síntomas en ramas y hojas de cada cultivar.

La fecha de aparición de los primeros síntomas en rama difiere para cada cultivar, como se aprecia en el cuadro N° 1.

Los primeros síntomas en ramas se observaron de 2 a 4 meses luego de comenzar el muestreo de las mismas al azar.

En cambio, los primeros síntomas en hojas se observaron el 19 de noviembre en todos los cultivares (cuadros N° 1 y 2, apéndice).

En el cultivar Golden Japan, que se utilizó como testigo control, no se observaron síntomas característicos de la enfermedad.

Cuadro N° 1. Fecha de aparición de los primeros síntomas en rama.

CULTIVARES	FECHA
Nectarina cv. Fantasia (I)	15/02
Duraznero cv. Brunetto (II)	15/02
Duraznero cv. Rey del Monte (III)	19/03
Duraznero cv. Junegold (IV)	11/01
Nectarina cv. Nectared II (V)	11/01
Damasco cv. Bulida (VI)	19/03
Ciruelo cv. Golden Japan (VII)	25/02
Ciruelo cv. Golden Japan (VIII)	4/03

3. Comparación del porcentaje de muestreos con síntomas en los diferentes cultivares.

Cuadro N° 2. Porcentaje de muestreos con síntomas en ramas y hojas.

CULTIVARES	ORGANO	
	<u>HOJA</u>	<u>RAMA</u>
Nectarina cv. Fantasia (I)	64	7
Duraznero cv. Brunetto (II)	57	21
Duraznero cv. Rey del Monte (III)	43	21
Duraznero cv. Junegold (IV)	31	23
Nectarina cv. Nectared II (V)	57	14
Damasco cv. Bulida (VI)	86	7
Ciruelo cv. Golden Japan (VII)	78	21
Ciruelo cv. Golden Japan (VIII)	71	7

Al comparar los cultivares de **nectarina**, se observa que el porcentaje de muestreos que presentaron síntomas en hojas fue aproximadamente igual.

En el cultivar **I** la mayoría de los muestreos presentaron síntomas en hojas en la misma época en que aparecieron los primeros canchros en ramas.

El cultivar **V** mostró mayor porcentaje de muestreos con síntomas en ramas que el cultivar **I**. Estos se observaron un mes más temprano en el cultivar **V** (Cuadros N° 1 y 2, apéndice).

Comparando los cultivares de **duraznero**, el cultivar **IV** presentó el menor porcentaje de muestreos con síntomas en hojas.

La fecha de aparición de síntomas en hojas difirió en los 3 cultivares. Así en el **II** se observaron síntomas en hojas en la mayoría de los muestreos realizados a fines de febrero y en el mes de marzo. El cultivar **III** presentó mayor porcentaje de muestreos con lesiones en hojas al final del período. En el cultivar **IV** se observó mayor número de muestreos con síntomas en hojas en el mes de enero (cuadros N° 1 y 2, apéndice).

En los cultivares **II** y **III** se visualizaron síntomas en hojas y ramas adyacentes en el mes de marzo (cuadro N° 1, apéndice).

En los 3 cultivares se obtuvo aproximadamente igual porcentaje de muestreos con síntomas en ramas.

El orden de aparición de los canchros en ramas fue el siguiente:

enero ----- cultivar **JUNEGOLD**
 febrero ----- cultivar **BRUNETTO**
 marzo ----- cultivar **REY DEL MONTE**

En ambos cultivos de **ciruelo**, cultivar **Golden Japan**, se obtuvo aproximadamente igual porcentaje de muestreos con síntomas en hojas, sin embargo, la aparición de los mismos se detectó en diferentes épocas (cuadro N° 2, apéndice).

Así, el ciruelo japonés (**VII**) proveniente del predio de Facultad de Agronomía presentó el mayor porcentaje antes del 15 de febrero. Después de dicha fecha, el porcentaje no difirió considerablemente en ambos cultivos.

En el cultivar **VII** los primeros síntomas en ramas aparecieron una semana antes que en el cultivar **VIII**.

Cuando se comparan **cultivos de un mismo predio**, se observa que la primera fecha de visualización de canchros coincide para ellos (cultivares **I** y **II**, **IV** y **V**) (cuadros N° 1 y 2, apéndice).

El porcentaje de muestreos con lesiones en hojas fue aproximadamente igual en cultivos de un mismo predio (cultivares **I** y **II**, **VI** y **VII**).

4. Comparación entre fechas de muestreo

De las 14 fechas de muestreos en las cuales se realizó observación de plantas, se constata que en 11 de ellas se visualizaron lesiones en hojas en mayoría de los cultivares.

Estos 11 muestreos corresponden a los meses de noviembre (desde mediados del mes), enero, principios y fines de febrero, marzo y abril. Los 3 muestreos restantes se ubican a principios de noviembre, diciembre y a mediados de febrero. A principios de noviembre no se constataron síntomas en hojas en ningún cultivar.

Con respecto a muestreos de rama, no se observaron síntomas en ningún cultivar en los meses de noviembre, diciembre, fines de enero hasta principios de febrero. En otoño, se obtiene mayor número de cultivares con lesiones en rama en la misma fecha.

5. Condiciones predisponentes

Las gráficas N°9 al 12 del apéndice muestran las lluvias y temperaturas registradas durante la estación de crecimiento.

Las temperaturas registradas durante todo el período fueron en general superiores a la requerida para el desarrollo de la enfermedad.

Precipitaciones acumuladas (mm) durante la estación de crecimiento.

<u>MES</u>	<u>pp (mm)</u>
Octubre	137,7
Noviembre	52,1
Diciembre	10,8
Enero	103,2
Febrero	276,6
Marzo	58
Abril	359,9

Se observa un incremento de las precipitaciones desde la primavera hacia el otoño.

B. METODOS DE DETECCION UTILIZADOS EN EL LABORATORIO.

Se describen las características morfológicas de las colonias aisladas en **NAD** y **XPSM**, el porcentaje de muestreos con aislamientos en **NAD** y **XPSM**, la comparación entre ambos medios de cultivo y la detección de la bacteria en **NAD**, **XPSM** y **DAS-ELISA**.

1. Aislación de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en medio de cultivo no selectivo (NAD).

En este medio de cultivo se observó crecimiento bacteriano abundante y rápido a las 48 horas de realizada la siembra en placas de Petri. Las colonias que se obtuvieron se presentaron con las siguientes características morfológicas: color amarillo (característico del género *Xanthomonas*), circulares, con margen entero, mucosas, convexas, de aspecto viscoso y brillante.

Las primeras colonias se obtuvieron en el mes de noviembre y provenían de extracto de hojas (cuadros N° 3 y 4, apéndice).

Los resultados obtenidos en el repicado (cuadros N° 5 y 6, apéndice) se utilizaron para hallar el porcentaje de muestreos con aislamientos en **NAD** en las 3 estaciones estudiadas, como se aprecia en el siguiente cuadro.

Cuadro N° 3. Porcentaje de muestreos con aislamientos en NAD en las 3 estaciones.

ESTACION	ORGANO	
	<u>HOJA</u>	<u>RAMA</u>
PRIMAVERA	21	15,8
VERANO	30,4	28,6
OTOÑO	68,8	81,3

El porcentaje de muestreos con aislamientos en **NAD** tanto en hoja como en rama aumenta desde la primavera hacia el otoño.

El comportamiento de los diferentes cultivares en cuanto a la época de obtención de mayor porcentaje de aislaciones en **NAD** varió considerablemente.

En los cultivares de **duraznero** se constata que en los primeros muestreos realizados se pudo aislar la bacteria de hojas en un solo cultivar y de ramas en 2 de ellos (cuadro N°5, apéndice).

Al comparar los cultivares de **nectarina**, en **Nectared II** no se pudo aislar la bacteria al principio de la estación y en **Fantasía** se obtuvo bajo porcentaje de aislaciones (cuadros N° 5 y 6, apéndice).

En los cultivos de **ciruelo** se aisló el patógeno de hojas y ramas en forma abundante al principio del muestreo (cuadro N° 6, apéndice).

En **damasco** se obtuvo bajo porcentaje de aislaciones proveniente de extracto de hoja al comienzo de la estación de crecimiento y no se obtuvieron aislaciones de rama en dicha época (cuadro N° 6, apéndice).

Cuadro N° 4. Porcentaje de muestreos con colonias características de la bacteria aislada en NAD

CULTIVARES	ORGANO	
	HOJA	RAMA
Nectarina cv. Fantasía (I)	28	21
Duraznero cv. Brunetto (II)	35	28
Duraznero cv. Rey del Monte (III)	21	21
Duraznero cv. Junegold (IV)	14	57
Nectarina cv. Nectared II (V)	28	28
Damasco cv. Bulida (VI)	43	21
Ciruelo cv. Golden Japan (VII)	50	35
Ciruelo cv. Golden Japan (VIII)	35	35

En general, el porcentaje de aislaciones tanto en hoja como en rama fue bajo.

2. Aislación de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en medio de cultivo selectivo (XPSM).

En este medio de cultivo se observó crecimiento bacteriano lento y recién a los 7 días luego de la siembra se pudieron observar colonias. Las colonias que se obtuvieron presentaron las siguientes características morfológicas: color grisáceo, mucosas, lisas, de aspecto viscoso, opacas y el margen entero o irregular. No se observaron estas colonias al microscopio.

Los resultados obtenidos en el repicado (cuadros N° 9 y 10, apéndice) se procesaron para calcular el porcentaje de muestreos con aislamientos en este medio de cultivo en las 3 estaciones.

Cuadro N° 5. Porcentaje de muestreos con aislamientos en XPSM en las 3 estaciones.

ESTACION	ORGANO	
	<u>HOJA</u>	<u>RAMA</u>
PRIMAVERA	0	0
VERANO	15,6	15,6
OTOÑO	37,5	37,5

No se logró aislar la bacteria en hoja ni en rama al comienzo de la estación de crecimiento.

Las primeras colonias provenientes de extracto de ambos órganos se obtuvieron a principios de verano.

El porcentaje de muestreos en los cuales se obtuvieron colonias aumentó hacia fines del período (otoño), observándose mayor frecuencia en los cultivos de **ciruelo**.

Cuadro N° 6. Porcentaje de muestreos con colonias de la bacteria aislada en XPSM.

CULTIVARES	ORGANO	
	<u>HOJA</u>	<u>RAMA</u>
Nectarina cv. Fantasía (I)	9	0
Duraznero cv. Brunetto (II)	9	0
Duraznero cv. Rey del Monte (III)	9	9
Duraznero cv. Junegold (IV)	27	27
Nectarina cv. Nectared II (V)	0	0
Damasco cv. Bulida (VI)	0	0
Ciruelo cv. Golden Japan (VII)	18	36
Ciruelo cv. Golden Japan (VIII)	21	27

De este cuadro se deduce que el porcentaje de aislamientos fue muy bajo en hoja y rama de todos los cultivares.

3. Comparación del medio de cultivo selectivo (XPSM) con el medio de cultivo no selectivo (NAD)

El aislamiento de la bacteria de los diferentes órganos varió con el medio de cultivo utilizado.

Así en **XPSM** el crecimiento bacteriano no fue tan abundante ni se produjo en forma tan rápida como en **NAD**.

La pigmentación de las colonias difirió en ambos medios de cultivo.

En **NAD** se observaron colonias más nítidas y características del género **Xanthomonas**.

Las colonias eran más pequeñas, menos convexas y a veces difíciles de identificar en **XPSM**.

En **NAD** se obtuvieron colonias bacterianas provenientes de extracto de hoja durante todo el período, incrementándose hacia el otoño.

En **XPSM** no se observaron colonias durante la primavera, aunque si en verano y otoño.

Las primeras colonias provenientes de extracto de ambos órganos se comenzaron a obtener más temprano en **NAD** que en **XPSM**, en un período que varió entre 1 mes y medio y 4 meses.

Comparando los 2 medios de cultivo se observa una clara diferencia en cuanto al porcentaje de muestreos en los cuales se obtuvieron colonias. Se obtuvo un promedio de 32% de aislaciones en **NAD** y 12% en **XPSM**.

En **nectarinas**, el porcentaje fue muy bajo en **XPSM**, en cambio en **NAD**, se obtuvieron aislaciones en gran parte de los muestreos realizados a fines del período.

En los cultivos de **duraznero** y **ciruelo** el porcentaje de aislación aumenta en los 2 medios de cultivo en los meses de marzo y abril. En estos cultivos se obtienen aislaciones en **NAD** y en **XPSM** en la misma fecha de muestreo.

4. Detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* por la técnica de ELISA-DAS.

Cuadro N° 7. Porcentaje de muestreos con resultados positivos de ELISA-DAS en hoja y rama en las 3 estaciones estudiadas.

ESTACION	ORGANO	
	<u>HOJA</u>	<u>RAMA</u>
PRIMAVERA	43	30
VERANO	31	30
OTOÑO	75	43

Con este método fue posible detectar la bacteria en todas las épocas de muestreo (Cuadro N° 7).

El porcentaje de muestreos en los cuales se logró detectar el patógeno aumentó hacia principios de otoño.

Dicho incremento fue más marcado en hoja que en rama.

En verano, el porcentaje fue aproximadamente igual en ambos órganos.

Cultivares de Nectarinas

Los valores obtenidos para el extracto de hoja en el cultivar **Fantasia** son bajos en todo el período (figura N° 1, apéndice).

Para el extracto de rama, el máximo que se obtiene (29/12) sigue a un pico de hoja detectado un mes antes de dicho muestreo. Además, este valor más pronunciado coincide con la ausencia de detección de la bacteria en hoja.

A mediados del mes de enero los resultados en ambos extractos son bajos y no difieren demasiado entre si.

A principios de otoño, se observa una tendencia al aumento de dichos valores.

En el cultivar **Nectared II** no se observan resultados tan pronunciados en hojas ni en ramas en todos los muestreos realizados (figura N° 5, apéndice).

Al igual que en el cultivar **Fantasia**, el pico de rama que se da a principios de verano coincide con la falta de detección de la bacteria en hoja y dicho incremento es precedido por un pico de hoja obtenido 12 días antes.

A partir del mes de enero, los valores obtenidos en los 2 extractos son bajos y no hay diferencia entre ellos, observándose el mismo comportamiento que en el cultivar **Fantasia**.

Hacia principios de otoño se produce un aumento de los resultados en los 2 órganos.

Al comparar los 2 cultivares, se observa que en el cultivar **Fantasia** se lograron valores más altos de rama a principios de verano y otoño.

En cambio, en hoja se obtuvieron valores muy bajos para los 2 cultivares, encontrándose poca variación entre ellos.

Cultivares de Durazneros

En el cultivar **Brunetto** se observan picos de rama a comienzos de verano y otoño.

El pico de rama en el mes de enero coincide con una baja detección de la bacteria en hoja.

Con respecto a extracto de hoja, los valores detectados son bajos en todo el período, con una tendencia a aumentar hacia el otoño (figura N° 2, apéndice).

En el cultivar **Rey del Monte** se obtienen valores bajos en todo el período para el extracto de rama; luego del 25/03 aumentan.

Los resultados de extracto de hoja son considerablemente mayores a los de rama, obteniéndose picos a fines de diciembre, mediados de enero y principios de otoño, siendo el último el más pronunciado, superando a los anteriores de 2,4 a 2,8 veces.

El aumento obtenido el 25/03 se comenzaba a visualizar desde el mes de febrero (figura N° 3, apéndice).

En el cultivar **Junegold** se observa un pico a fines del mes de octubre en rama, después del cual sigue una disminución marcada hacia fines de primavera, una baja detección en verano y un fuerte aumento a principios de otoño. Este último coincide con la ausencia de detección del patógeno en hoja.

Los niveles obtenidos en hoja son bajos a lo largo de toda la estación de crecimiento, tendiendo a aumentar en otoño (figura N° 4, apéndice).

Cultivo de Damasco

En este cultivo se visualizan 2 picos de rama, uno a fines de diciembre y otro a principios de otoño (figura N° 6, apéndice).

El pico de rama que se da en diciembre coincide con un pico de hoja.

En extracto de hoja no se observaron valores altos en todo el período, sin embargo, se observa una leve tendencia a aumentar en otoño.

Cultivos de Ciruelo

En el cultivar **Golden Japan (VII)** del predio de Facultad se obtienen 2 picos de rama, uno a fines del mes de diciembre y otro a mediados de febrero, siendo el primero más pronunciado que el segundo.

En relación a hoja, los valores máximos se obtienen en primavera, principios y mediados de verano. El mayor pico en hoja se produce a fines de diciembre, el cual coincide con un pico de rama (figura N° 7, apéndice).

En el cultivar **VIII** se observan valores de extracto de rama mucho más bajos que en el cultivar **VII**; dichos valores presentan una tendencia a aumentar a principios de otoño (figura N° 8, apéndice).

Los resultados de hoja y rama del cultivar **VIII** no varían considerablemente en todo el período, con excepción de un pico de hoja que se da en otoño.

En el mes de abril hay una tendencia de aumento en extracto de rama.

Por último, cuando se comparan **cultivos de un mismo predio** se observa que las curvas de absorbancia siguen la misma tendencia tanto en hoja como en rama.

**C. COMPARACION DE LAS TECNICAS DE DETECCION DE
*Xanthomonas campestris pv. pruni.***

Cuadro N° 8. Coincidencia entre resultados obtenidos en NAD y observación de síntomas (en porcentaje).

CULTIVARES	MUESTREOS			
	HOJAS		RAMAS	
	c/s*	s/s**	c/s*	s/s**
Nectarina cv. Fantasia (I)	25	50	0	27
Duraznero cv. Brunetto (II)	37,5	50	33	33
Duraznero cv. Rey del Monte (III)	33	16,6	100	0
Duraznero cv. Junegold (IV)	50	0	50	70
Nectarina cv. Nectared II (V)	57	0	100	27
Damasco cv. Bulida (VI)	50	50	0	27
Ciruelo cv. Golden Japan (VII)	66	33	66	33
Ciruelo cv. Golden Japan (VIII)	55	0	100	36
\bar{X}	46	25	56	32

* con síntomas

** sin síntomas

En la mayoría de los muestreos, tanto en los que se observaron síntomas en hojas y ramas, como en los que no se observaron, se obtuvieron aislaciones en **NAD** (cuadro N° 8).

Se obtuvo el mayor porcentaje de muestreos con aislaciones en **NAD** en los que presentaron lesiones en hojas y ramas.

Cuadro N° 9. Total de cultivares que formaron colonias en NAD en las 3 estaciones.

ESTACION	ORGANO	
	HOJA	RAMA
PRIMAVERA	5	3
VERANO	7	7
OTOÑO	8	8

De un total de 8 cultivares, en primavera fue posible aislar la bacteria en hoja y rama en 5 y 3 de ellos respectivamente (cuadro N° 9).

En los cultivos de **ciruelo** se aisló el patógeno en hoja y en rama durante la primavera, correspondiendo las restantes aislaciones de hoja en dicha época a **nectarina** cv. **Fantasia**, **duraznero** cv. **Brunetto** y al cultivo de **damasco**.

El cultivar de **duraznero Junegold** y los cultivos de **ciruelo** presentaron colonias en **NAD** proveniente de extracto de rama en primavera.

En verano se obtuvieron aislaciones de hoja y rama de 7 cultivares, exceptuando el cultivar de **duraznero Rey del Monte**.

En otoño todos los cultivares presentaron colonias en **NAD**.

Cuadro N° 10. Coincidencia entre aislaciones obtenidas en XPSM y observación de síntomas (en porcentaje).

CULTIVARES	MUESTREOS			
	HOJAS		RAMAS	
	c/s*	s/s**	c/s*	s/s**
Nectarina cv. Fantasia (I)	16	0	0	0
Duraznero cv. Brunetto (II)	16	0	0	0
Duraznero cv. Rey del Monte (III)	20	0	33	0
Duraznero cv. Junegold (IV)	50	20	100	14
Nectarina cv. Nectared II (V)	0	0	0	0
Damasco cv. Bulida (VI)	0	0	0	0
Ciruelo cv. Golden Japan (VII)	16	33	100	37,5
Ciruelo cv. Golden Japan (VIII)	42	0	0	33
\bar{X}	20	6,6	29	10,5

* con síntomas

** sin síntomas

Se obtuvieron aislaciones en **XPSM** en alrededor del 50% de los muestreos de hojas y ramas que presentaron o no lesiones.

El promedio de muestreos en los cuales se aisló la bacteria fue mayor en aquellos que mostraron síntomas en los 2 órganos.

Cuadro N° 11. Total de cultivares con aislación en XPSM en las 3 estaciones.

ESTACION	ORGANO	
	<u>HOJA</u>	<u>RAMA</u>
PRIMAVERA	0	0
VERANO	2	1
OTOÑO	5	4

En primavera no se aisló la bacteria en este medio de cultivo.

En verano y otoño, el patógeno se obtuvo en mayor número de cultivares.

Se detectó la bacteria en hoja en mayor número de cultivares que en rama.

En la estación cálida, se obtuvieron aislaciones de hoja sólo en los cultivares **Fantasia** y **Junegold** en una sola fecha de muestreo (cuadros N° 12 y 18, apéndice). La única aislación de rama se obtuvo en el cultivo de **ciruelo** proveniente del predio de Facultad.

En otoño se lograron aislaciones de hoja en los cultivares de **duraznero** y **ciruelo** y se observaron colonias de extracto de rama en los mismos cultivares que de hoja, con excepción del cultivar de **duraznero Brunetto**.

Cuadro N° 12. Porcentaje de coincidencia entre resultados de ELISA-DAS y observación de síntomas.

CULTIVARES	MUESTREOS			
	HOJAS		RAMAS	
	c/s*	s/s**	c/s*	s/s**
Nectarina cv. Fantasía (I)	22	0	100	45
Duraznero cv. Brunetto (II)	14	20	33	11
Duraznero cv. Rey del Monte (III)	60	71	33	20
Duraznero cv. Junegold (IV)	0	14	33	11
Nectarina cv. Nectared II (V)	0	20	50	0
Damasco cv. Bulida (VI)	25	0	0	33
Ciruelo cv. Golden Japan (VII)	82	100	50	40
Ciruelo cv. Golden Japan (VIII)	55	66	0	45
\bar{X}	32	36	37	25

* con síntomas

** sin síntomas

Se logró detectar la presencia de la bacteria en la mayoría de los muestreos realizados.

Se diagnosticó la presencia de este patógeno en mayor número de muestreos que presentaron canchales que en aquellos en que no se visualizaron los mismos.

En cambio, en hoja, el promedio fue mayor en los muestreos en los que no se observaron lesiones (cuadro N° 12).

Cuadro N° 13. Total de cultivares con detección de la bacteria en ELISA-DAS en las 3 estaciones.

ESTACION	ORGANO	
	<u>HOJA</u>	<u>RAMA</u>
PRIMAVERA	7	7
VERANO	4	7
OTOÑO	8	8

En las 3 estaciones se pudo detectar la bacteria en un porcentaje alto de cultivares, no habiendo diferencia entre hoja y rama, excepto en verano.

En primavera, no se detectó el patógeno en hoja ni en rama del cultivar de **ciruelo Golden Japan**, proveniente del predio comercial.

En el verano, la bacteria se logró detectar en hoja de los cultivares **Rey del Monte, Bulida y Golden Japan**, no detectándose en rama del cultivar **Junegold**.

En otoño, todos los cultivares presentaron resultados positivos en este test, tanto en hoja como en rama.

V. DISCUSION

A. VARIACIONES ESTACIONALES

1. Síntomas observados

Para la observación de síntomas se tomaron las hojas más jóvenes de ramas elegidas al azar, de acuerdo a lo señalado por Civerolo (1975) de que las mismas son más susceptibles a la infección.

La ubicación de las lesiones en las hojas en los espacios internervales, cercano a las nervaduras principal y secundarias está de acuerdo con lo que señalan Bazzi y Mazzucchi (1980) y Scortichini y Simeone (1990).

La observación de las lesiones en hojas a contraluz coincide con lo descrito por Scortichini y Simeone (1990).

Las dudas en algunos casos sobre la presencia de síntomas específicos de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* está de acuerdo con lo que subraya Dunegan (1932) de que las lesiones jóvenes en hojas podrían confundirse con otras enfermedades.

En relación a la descripción de los cancros en ramas, las observaciones realizadas coinciden con lo descrito por Goodman y Hattingh (1988) y EPPO (1990).

La ubicación de los cancros a lo largo de toda la rama está de acuerdo con lo que describen Du Plessis (1989) y EPPO (1990), no así con lo que señalan Goodman y Hattingh (1988) de que los cancros se encuentran usualmente en la mitad inferior de la misma.

Se pudo observar que el cancro rodeaba completamente la rama en algunas oportunidades. Esto coincide con lo reportado por Goodman y Hattingh (1986), Du Plessis (1989) y EPPO (1990).

2. Comparación de la aparición de síntomas en los diferentes cultivares.

Los primeros síntomas en hojas se observaron en el mes de noviembre en todos los cultivares. Esta observación coincide con lo descrito por Thornberry y Anderson (1933) quienes observaron las primeras lesiones en hojas de **duraznero** el 22/05 (Hemisferio Norte).

El porcentaje de muestreos con lesiones en hojas más bajo corresponde a **duraznero** cv. **Junegold**; se obtuvo sólo 31%, cifra que es inferior a los restantes cultivos y se considera como valor bajo. De acuerdo a Keil y Fogle (1973) el cultivar **Junegold** mostró en su ensayo un alto grado de resistencia (de 1 a 5% de hojas infectadas).

En **damasco** cv. **Bulida**, el 86% de los muestreos presentó síntomas en hojas, lo que indica un grado de infección alto y en consecuencia un cultivar muy susceptible a la bacteria. Du Plessis et al (1979) señalan que el cultivar **Bulida** puede ser afectado por varias aislaciones de **Xanthomonas campestris** pv. **pruni**. Layne (1966) sostiene que esta bacteria causa grave enfermedad en **damasco**.

Los primeros canchros en ramas se observaron en el mes de enero en **duraznero** cv. **Junegold** y **nectarina** cv. **Nectared II**. Esta observación coincide con la realizada por Moffett (1973) quien afirma que es difícil encontrar canchros en ramas de **duraznero** hasta el mes de enero (Hemisferio Sur).

En la mayoría de los cultivos los primeros síntomas en ramas aparecen alrededor de **2 a 4** meses después de comenzar a visualizar lesiones en hojas. Esto está de acuerdo con Thornberry y Anderson (1933) quienes señalan que los canchros en ramas se desarrollan 2 meses después de la infección primaria.

En la mayor parte de los cultivos se observaron síntomas en hojas en una misma fecha de muestreo, obteniéndose 78% de muestreos en los cuales se dio este resultado.

En el 50% de los muestreos de rama no se obtuvieron síntomas en ningún cultivar, observándose canchales en el 21% de los muestreos en la mayoría de los cultivares.

Esto sugiere que se produce un aumento de la población bacteriana en los diferentes cultivos bajo determinadas condiciones predisponentes.

Shepard y Zehr (1986) reportan haber hallado la bacteria en ramas y hojas de ciruelos y durazneros durante todos los muestreos realizados en la estación de crecimiento.

Comparación entre cultivares de Nectarinas

El porcentaje de muestreos que presentaron síntomas en hojas fue alto para los 2 cultivares de nectarinas estudiados. De esto se infiere que ambos son susceptibles a la infección por esta bacteria. Este resultado está de acuerdo con Young (1978) quien afirma que *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* causa graves infecciones en nectarinas. Sin embargo, no está de acuerdo con Stefani et al (1989) y López (1992) quienes señalan que el cultivar **Nectared II** es poco sensible a este patógeno.

El mayor porcentaje de muestreos que presentaron síntomas en hojas en el cultivar **Fantasia** se obtuvo luego de los últimos tratamientos químicos realizados. En ambos cultivos, los primeros síntomas en ramas tomadas al azar aparecieron alrededor de un mes después de la última aplicación de producto químico. De esto se deduce que la aplicación de productos químicos protegen a la planta contra el ingreso del patógeno.

Comparación entre cultivares de durazneros.

De los resultados obtenidos se deduce que la época de obtención de mayor número de muestreos con síntomas en hojas coincide con la aparición de los primeros canchros en ramas para los 3 cultivares.

Sólo en algunas oportunidades (4/03 y 19/03) se observaron síntomas en hojas y ramas adyacentes, lo que indica que hubo una baja relación entre ramas con síntomas y hojas de las mismas con lesiones.

Esto estaría indicando que la bacteria infecta las hojas y luego necesita un periodo para llegar hasta la rama, vía peciolo, colonizarla y producir infección, como lo señala Du Plessis (1986).

La época de observación de síntomas en hojas y en ramas adyacentes, está de acuerdo con lo que señala Du Plessis (1985) de que antes de la caída de la hoja, el patógeno migra desde las hojas hacia las ramas; aunque este autor afirma haber tenido una buena relación entre ramas infectadas y hojas infectadas adyacentes, dicho resultado no se obtuvo en este trabajo.

El último tratamiento químico que realizó el productor en el cultivar **Brunetto** fue el 20/01; se obtuvo el mayor porcentaje de muestreos con síntomas en hojas luego de dicho tratamiento.

En el cultivar **Junegold**, se observaron síntomas en hojas en gran parte de los muestreos realizados alrededor de un mes después del último tratamiento químico.

En **Rey del Monte**, se observó el mayor porcentaje de muestreos con síntomas en hojas alrededor de 1 mes y medio después de la cosecha, probablemente luego de los últimos tratamientos.

De esto se deduce que los tratamientos químicos realizados protegen a la planta contra el ingreso de la bacteria.

En el cultivar **Rey del Monte**, los canchros en rama aparecieron más tarde que en los otros cultivos de durazneros, concentrándose hacia el final del período. Esto se debe probablemente a una mayor resistencia por parte de este cultivo a formar canchros en rama, lo que lo haría más resistente con respecto a los otros cultivos en relación al debilitamiento del árbol. No se han encontrado referencias bibliográficas que avalen esta afirmación. Puede deberse además a que las ramas más viejas retarden al desarrollo del cancro de acuerdo a lo que señala Du Plessis (1987).

Comparación entre cultivos de ciruelo

Estos cultivos presentaron síntomas en hojas en un alto porcentaje de los muestreos; de esto se deduce un alto grado de infección en los mismos y por ende de cultivares muy susceptibles a la mancha bacteriana.

Esta conclusión coincide con Scortichini y Simeone (1990) y EPPO (1990) quienes señalan que el ciruelo japonés es muy susceptible a **Xanthomonas campestris** pv. **pruni**.

La diferencia que se observa en ambos cultivos en cuanto a la época de mayor número de muestreos con síntomas en hojas se debe probablemente al efecto de los productos químicos utilizados en el cultivar comercial que disminuyen la población bacteriana. Esta afirmación sería avalada por el hecho de que en el cultivar comercial se observa un aumento de los muestreos presentando síntomas en hoja luego del último tratamiento químico.

El retraso en la aparición de síntomas en ramas y la menor obtención de los mismos en el cultivar comercial con respecto al cultivar del predio de Facultad se atribuye también a la aplicación de fitosanitarios.

Comparación entre cultivos de un mismo predio

Al realizar la comparación, se concluye que en 2 predios fue posible encontrar canchros en ramas en cultivos contiguos (duraznero y nectarina) en la misma fecha de muestreo.

En general, el porcentaje de muestreos con síntomas en hojas fue similar para los cultivos de un mismo predio.

Estas 2 conclusiones permiten inferir que la bacteria puede dispersarse entre cultivos, como lo señala Du Plessis (1989). Goodman y Hattingh (1988) reportan que a menudo las herramientas de podar no se desinfectan cuando se podan diferentes cultivos en un mismo predio, por lo que la bacteria puede dispersarse por medio de las mismas.

Además el manejo realizado en cultivos de un mismo predio permitiría la obtención de resultados similares en los mismos.

En cambio, el porcentaje de muestreos presentando canchros varió para cada cultivo en cada predio, lo que se atribuye al diferente grado de susceptibilidad.

Con respecto al cultivar de damasco, Scortichini y Tropiano (1992) subrayan que el cultivo de damasco puede ser infectado por esta bacteria si el mismo está situado en las proximidades del cultivo de ciruelo japonés; esta afirmación ha sido constatada en este trabajo.

3. Influencia de las condiciones predisponentes sobre la aparición de la Mancha Bacteriana

En la temporada que se realizó este trabajo, las condiciones ambientales fueron favorables para la dispersión de la bacteria.

Las temperaturas máximas registradas en todo el período fueron en general superiores a la requerida para el desarrollo de la enfermedad, como lo señala EPPO (1990).

Durante la primavera se registraron precipitaciones en menor cuantía que en verano y otoño, visualizándose lesiones sólo en las hojas.

En verano y otoño se produjeron lluvias abundantes, observándose lesiones en hojas y ramas. Esta afirmación concuerda con Dunegan (1932) quien indica que las fluctuaciones anuales de la enfermedad pueden ser atribuidas a los cambios en la cantidad de precipitaciones, ya que éstas permiten la dispersión de la bacteria entre árboles y cultivos.

En la mayoría de los cultivos se obtuvo el mayor porcentaje de muestreos con síntomas en hojas y se observaron los primeros canchros en rama alrededor de un mes después de los últimos tratamientos químicos realizados.

Es probable que la residualidad de los productos químicos aplicados influya en la época de aparición de síntomas.

B. METODOS DE DETECCION UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

1. Aislación de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en medio de cultivo no selectivo (NAD).

Las características morfológicas de las colonias bacterianas que se describen en este trabajo coinciden con las expresadas por Dunegan (1932), Durgapal (1970), Ercolani (1970), Civerolo (1982), Stefani et al (1989) y Scottichini (1990) para el crecimiento de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en medio de cultivo conteniendo agar nutritivo.

El período de incubación en **NAD** fue similar al que señala Civerolo (1982).

Por este método se logró aislar la bacteria de rama durante la primavera. Este resultado no coincide con el obtenido por Thornberry y Anderson (1933) quienes afirman que es difícil aislar el patógeno de ramas durante esta época del año. Sin embargo, está de acuerdo con Dunegan (1926) quien aisló la bacteria de extracto de ramas al comienzo de la estación de crecimiento.

Las primeras colonias provenientes de extracto de hojas se obtuvieron en el mes de noviembre. Este resultado está de acuerdo con Thornberry y Anderson (1933) quienes lograron obtener aislaciones de hojas de durazneros en el mes de mayo (Hemisferio Norte).

El mayor porcentaje de aislaciones de hojas y ramas al comienzo de la estación se obtuvo en los cultivos de ciruelo. Ello se puede deber a la mayor susceptibilidad que presentan estos cultivares, tal como indican Scottichini y Tropiano (1992).

En el resto de los cultivos se obtuvo bajo porcentaje de aislaciones al comienzo de la estación de crecimiento, probablemente por la baja población del patógeno en dicha época.

Durante el verano las aislaciones de hojas y ramas fueron escasas debido probablemente a que temperatura elevada y humedad baja afectan la dispersión e infección de la bacteria.

Bazzi y Mazzucchi (1980) citados por López (1992) señalan que la diseminación de la bacteria se realiza en primavera y otoño, ya que en el verano las temperaturas elevadas cicatrizan los canchros obstaculizando la difusión de la enfermedad.

La población bacteriana disminuye en la superficie foliar (Young, 1978) y en los canchros que se secan (Thornberry y Anderson, 1933) durante el verano.

La obtención a principios de otoño de aislaciones abundantes en casi todos los cultivares se atribuye al aumento de la población del patógeno.

Este medio de cultivo presenta la ventaja de que en él se pueden obtener colonias típicas del género *Xanthomonas*, las cuales son fáciles de reconocer a simple vista.

Además es un medio de cultivo de bajo costo, de fácil preparación y manejo y en el cual se obtienen colonias en un corto período de tiempo, facilitando la detección rápida de la bacteria.

La obtención de los extractos para la siembra 24 horas después de la recolección de las muestras, fue causa probablemente de bajos porcentajes de muestreos en los cuales se obtuvieron colonias típicas de la bacteria, ya que la bibliografía indica que **NAD** es eficaz en la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*.

2. Aislación de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en medio de cultivo selectivo (XPSM).

En el medio de cultivo selectivo se observó crecimiento bacteriano lento. Se observaron colonias 7 días luego de la siembra. Esto concuerda con lo observado por Civerolo (1982) y Shepard y Zehr (1994).

La mayoría de las características morfológicas de las colonias obtenidas en este medio de cultivo coinciden con las descritas por Civerolo (1982); sin embargo, este autor reporta que las colonias pueden presentar aspecto brillante, característica que no se constató en este estudio.

Cuando se obtuvieron colonias provenientes del repicado desde **XPSM** a **NAD**, se observaron colonias típicas del género *Xanthomonas* en un período de incubación de 48 horas. Este resultado coincide con el obtenido por Civerolo (1982).

El porcentaje de muestreos en los cuales se obtuvieron colonias en general fue muy bajo durante toda la estación de crecimiento.

En primavera no se obtuvieron colonias en **XPSM** debido probablemente a la baja población bacteriana existente en dicha época. Este resultado no concuerda con el obtenido por Shepard y Zehr (1994) quienes aislaron la bacteria en **XPSM** durante todo el año.

A principios de otoño se logró aislar la bacteria de los cultivos de **ciruelo** y **duraznero**. Esto último se atribuye al aumento de la población bacteriana en esta época. Esto concuerda con Shepard y Zehr (1994) quienes aislaron la bacteria en **XPSM** de hojas y ramas de **duraznero** y **ciruelo** al comenzar el otoño, cuando hay un incremento de la población del patógeno.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se considera que **XPSM** no es eficaz en la detección de la bacteria en todas las épocas de muestreo.

Al aumentar la población de la misma, **XPSM** es más efectivo en la detección, que en la época en que ella es baja.

Presenta como desventaja el hecho de que las colonias se obtienen en un período muy largo (7 días) lo que impide realizar una detección rápida de la bacteria.

Por otra parte, en **XPSM** las colonias no son fáciles de reconocer ya que no presentan el típico color amarillo característico de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*.

Se considera que **XPSM** es un medio de cultivo que tiene alto costo por la cantidad de sustancias que lo componen y además, en algún momento es posible carecer de un componente lo que limita su utilidad.

Estas afirmaciones no están de acuerdo con Civerolo (1982) quien señala que **XPSM** es barato y tiene buena sensibilidad y selectividad.

3. Comparación del medio de cultivo selectivo (**XPSM**) con el medio de cultivo no selectivo (**NAD**).

Al comparar ambos medios de cultivo se deduce lo siguiente.

La pigmentación de las colonias obtenidas difirió en los 2 medios de cultivo y las colonias crecieron más rápido en **NAD** que en **XPSM**; esto está de acuerdo con lo señalado por Civerolo (1982).

Con respecto al desarrollo de las colonias, los resultados obtenidos no concuerdan con lo reportado por Civerolo (1982) quien obtuvo mayor número de colonias en **XPSM** que en el medio de cultivo conteniendo agar nutritivo.

A pesar de las buenas características mencionadas para **XPSM** por Civerolo (1982), en el presente trabajo se obtuvo menor porcentaje de aislación en todas las épocas de muestreo realizadas, comparado con **NAD**.

El hecho de detectarse la bacteria más temprano en **NAD** que en **XPSM** le otorga una mayor ventaja.

Al considerar que en primavera hubo una población bacteriana baja, **NAD** sería más efectivo o más sensible en la detección de la bacteria que **XPSM**.

A principios de otoño, época en que se prevee un aumento de la población del patógeno, en **NAD** se obtienen colonias provenientes de todos los cultivares estudiados. En **XPSM** sólo se obtuvieron colonias de los cultivos de **ciruelo** y **duraznero** en dicha época.

El uso simultáneo de los 2 medios de cultivo permitiría una rápida aislación e identificación de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*.

En conclusión, el uso de **XPSM** comparado con **NAD** no sería una herramienta útil en el monitoreo de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* o en el estudio de desarrollo de la enfermedad, a menos que se revea la composición del medio y se estudie el comportamiento de los aislamientos nacionales.

4. Detección de la bacteria por la técnica de **ELISA-DAS**

Los resultados obtenidos en este trabajo indican en primera instancia que este test fue adecuado ya que con él se pudo detectar la presencia de la bacteria en hoja y rama de todos los cultivares en todo el ciclo.

Comparando los resultados del cuadro N° 7, se observan diferencias en el porcentaje de muestreos con resultados positivos en las 3 estaciones.

Desde la primavera al verano, el porcentaje de muestreos con resultados positivos en hoja descende. Además en esta última estación no se observa diferencia entre hoja y rama.

Esto permite concluir que las condiciones atmosféricas en la estación cálida limitan la dispersión e infección por este patógeno.

El hecho de obtenerse siempre mayor porcentaje de muestreos con resultados positivos en hoja que en rama, indica probablemente que la bacteria puede ser aislada más fácilmente de la superficie foliar que de las ramas.

Se nota un incremento de la detección hacia principios de otoño. Esto está asociado a la mayor concentración de inóculo que se encuentra en dicha época.

Según EPPO (1990), la bacteria aparece y se dispersa en primavera, en verano se reduce la población y las infecciones tardías ocurren en otoño, afirmaciones que están de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo.

Los extractos de árboles sanos siempre dieron valores de absorbancia muy bajos lo que permitió comparar con las muestras provenientes de árboles aparentemente infectados.

Cultivares de Nectarinas

Los cultivares de nectarinas presentan un comportamiento similar en relación a extracto de hoja y la forma general de las curvas es de la misma tendencia.

La obtención de valores más altos en rama del cultivar **Fantasía** a principios de verano y otoño estaría indicando mayor infestación en este cultivar.

Sin embargo, se observan valores de absorbancia bajos en general en los 2 cultivos tanto en hoja como en rama, con respecto a los otros cultivares estudiados.

Este resultado sugiere que estos cultivares de nectarinas son resistentes a este patógeno.

Cultivares de Durazneros

En relación a los cultivares de durazneros, **Rey del Monte** presenta valores foliares más altos que **Brunetto** y **Junegold**, con picos pronunciados en verano.

En este sentido, **Rey del Monte** presentaría mayor concentración de inóculo en hoja. No se han encontrado referencias bibliográficas sobre el nivel de susceptibilidad de esta variedad.

En general se encontró poca variación entre los resultados de ramas de los 3 cultivares, exceptuando un fuerte aumento en el cultivar **Junegold** en el otoño. Esto se debe probablemente al aumento de la población bacteriana en este cultivo en dicha época.

Con respecto al cultivar **Junegold**, los resultados obtenidos no concuerdan con lo que reportan Keil y Fogle (1973) de que este cultivar es resistente a la mancha bacteriana. Sin embargo, estos autores señalan que el comportamiento obtenido en dicho cultivar se da en una determinada localidad y en un año en particular. Ellos concluyen que dicho comportamiento puede variar en otros lugares y en años diferentes, lo que está de acuerdo con lo obtenido en este trabajo.

Cultivos de Ciruelos

En el cultivar del predio de Facultad (VII) se observa una relativa constancia de los resultados obtenidos en todo el período, siendo los mismos muy altos. Los picos de rama en general coinciden con los picos de hoja. Estos resultados sugieren la presencia de gran concentración de inóculo en este cultivo. Esto estaría indicando la alta susceptibilidad del cultivar como lo señala EPPO (1990).

La diferencia observada en los 2 cultivos de ciruelo se debe posiblemente al efecto predio. Aunque también puede darse la posibilidad de que están actuando diferentes aislaciones en los mismos.

Por último, podría darse el caso de que el patógeno no se encontrara uniformemente distribuido en todos los tejidos del vegetal, como lo señalan Shepard y Zehr (1994) lo que habría dificultado la obtención del mismo en el ciruelo del predio comercial.

Independientemente del cultivar y de acuerdo a la técnica de **ELISA-DAS**, hay 2 picos estacionales marcados que se dan a principios de verano y otoño.

El pico de rama que se obtiene a principios de verano es precedido por un pico de hoja en los cultivos de **ciruelo** y en el cultivar de nectarina **Nectared II**.

Los picos de rama coinciden con la ausencia de detección de la bacteria en hoja en 5 cultivos.

Estos resultados sugieren que en primer lugar la bacteria infecta a las hojas y luego se dirige a las ramas, colonizándolas y produciendo infección, como lo afirma Du Plessis (1986).

Basado en los resultados de los test de **ELISA-DAS**, se concluye que el método puede ser usado para detectar la presencia de la bacteria.

De acuerdo a revisión bibliográfica, esta técnica no se ha utilizado en la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. En este aspecto, EPPO (1990) subraya que aunque las técnicas serológicas han sido utilizadas para el diagnóstico de otros patovares de *Xanthomonas campestris* en frutales, las mismas no se han utilizado para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*.

Se considera que esta técnica es suficientemente sensible para detectar la presencia de la bacteria en poblaciones bajas como sucedió en primavera.

Vruggink (1978), Schaad (1979), y Civerolo y Fan (1982) consideran que la sensibilidad de esta técnica en la detección de este patógeno es similar a la reportada para otras bacterias fitopatógenas.

Este método presentó las siguientes ventajas:

- a) no se necesita equipo muy costoso;
- b) es de fácil manipulación;
- c) ahorra tiempo en el diagnóstico;
- d) útil para corroborar síntomas dudosos;
- e) resultados cuantificables.

Presenta como desventaja la preparación de los extractos, la cual se compensa con las ventajas antedichas.

C. COMPARACION DE LAS TECNICAS DE DETECCION DE *Xanthomonas campestris pv. pruni*.

La bacteria se logró detectar en todos los métodos en hojas y ramas que presentaron o no síntomas. Sin embargo, la eficiencia de detección dependió del método utilizado.

Así en hojas con síntomas, **NAD** presentó el mayor valor promedio de muestreos en los que se consiguió detectar la bacteria con respecto a **XPSM** y **ELISA-DAS**. Sucedió lo mismo en ramas con canchros.

En hojas y ramas sin síntomas, **XPSM** presentó el menor valor promedio de muestreos en los que se obtuvo aislaciones.

En ramas sin síntomas se obtuvo el mayor porcentaje en **NAD**.

En hojas asintomáticas el promedio mayor se obtuvo en el método serológico.

De los muestreos de ramas que no presentaron síntomas, se obtuvo mayor porcentaje de detección en **NAD** que en **ELISA-DAS**. Dicha diferencia sólo estuvo dada por 2 cultivares de durazneros y uno de nectarina.

De estos resultados se deduce que se encontró una mejor relación entre **NAD** y observación de síntomas que en los otros métodos.

El hecho de obtener resultados positivos en muestras asintomáticas, indica que la bacteria está presente en los tejidos aparentemente no afectados.

La mayoría de las bacterias fitopatógenas producen reacciones en las plantas afectadas en un corto período de tiempo, permitiendo el diagnóstico rápido de la enfermedad por medio de la observación de los síntomas producidos por éstas (Agrios, 1985). Pero este no es el caso de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, ya que las manchas que se desarrollan en hojas demoran alrededor de 14 días en hacerse visibles, de acuerdo a lo reportado por Dhanvantari (1977) y Du Plessis (1989).

Esto sucede también en ramas donde la bacteria puede permanecer latente sin producir síntomas de 8 a 12 semanas (Du Plessis, 1987). Los resultados obtenidos por estos autores han sido confirmados en este trabajo.

Además, la detección de la bacteria en hojas y ramas asintomáticas ayudaría a monitorear la misma, y en consecuencia, se podrían realizar tratamientos en la época más adecuada tendientes a disminuir la población.

Es posible que las muestras asintomáticas contengan una menor concentración de inóculo, que aquellas que presentan lesiones. En este aspecto, la técnica de **ELISA-DAS** presentó mayor sensibilidad en la detección con respecto a los medios de cultivo.

ELISA-DAS permitió detectar la bacteria en hoja y rama de la mayoría de los cultivares más temprano que los medios de cultivo.

El período entre la primera detección por esta técnica y la primera observación de síntomas o aislamiento en **NAD** o **XPSM**, fue en general más corto en hoja que en rama. En 5 cultivares, se observaron síntomas en hojas y se aisló la bacteria de las mismas en **NAD** alrededor de 20 días después de la primera detección en el test serológico. En rama, en cambio, se visualizaron los primeros canchales de 3 a 5 meses luego que se detectara por primera vez en **ELISA-DAS** y de 1 a 2 meses después de su aislamiento en **NAD**.

En **XPSM** en general se aisló la bacteria luego de su detección en **NAD** y **ELISA-DAS**, con excepción de algunos cultivares en los que no se observó crecimiento bacteriano.

La detección de la bacteria en una época más temprana en **ELISA-DAS** le otorga una mayor ventaja a esta técnica con respecto a **NAD** y **XPSM**, lo que sería beneficioso para realizar controles preventivos antes de que ocurra la dispersión de la misma.

De acuerdo a Schaad (1979) el diagnóstico correcto de cualquier enfermedad es un requisito para el control de la misma y cuanto más rápido se detecta el patógeno, se pueden implementar medidas hacia su prevención o erradicación. En este sentido, **ELISA-DAS** sería la técnica más adecuada, ya que en pocas horas se obtienen resultados satisfactorios aún con baja densidad poblacional. En cambio, los medios de cultivo necesitan varios días para que se desarrolle la bacteria.

Debido a que los síntomas pueden confundirse con los producidos por otras enfermedades, como lo afirma Dunegan (1932) **ELISA-DAS** sería útil en la confirmación de los mismos.

Además permite la confirmación de resultados obtenidos en los medios de cultivo, como lo señala Schaad (1979) para *Xanthomonas campestris*, ya que con él se obtienen resultados cuantificables.

La simplicidad, el diagnóstico rápido, el bajo costo como lo reportan Nomé et al (1980) y el hecho de detectar la bacteria más temprano en **ELISA-DAS** que en los medios de cultivo, hacen de este método una herramienta eficaz para ser usada en la detección de este patógeno, tanto en estudios epidemiológicos como cuarentenarios.

VI. CONCLUSIONES

De la interpretación de los resultados se puede concluir que:

1) la primera observación de síntomas en hojas se realizó en el mes de noviembre, apareciendo los primeros canchros 2 o 3 meses después;

2) el mayor porcentaje de muestreos que presentaron síntomas en hojas se obtuvo después de la cosecha de los cultivos; este período coincide con la aparición de los primeros canchros en la mayoría de los cultivares;

3) **NAD** fue más eficaz que **XPSM** en la aislación de la bacteria, detectándola más temprano y durante todo el período;

4) en **ELISA-DAS** se encontraron 2 picos estacionales a principios de verano y otoño, independientemente del cultivar; este método resultó ser adecuado presentando varias ventajas: fácil manipulación, diagnóstico rápido, bajo costo, útil para corroborar síntomas dudosos y resultados cuantificables;

5) el método de detección que se relacionó mejor con la observación de síntomas fue **NAD**;

6) la bacteria se aisló de muestras asintomáticas, lo que indicó que la misma se encontraba en dichos tejidos;

7) en **ELISA-DAS** se detectó la presencia de la bacteria más temprano que en los medios de cultivo;

8) **NAD** y **ELISA-DAS** presentaron mejor relación entre ellos ya que con ambos se detectó el patógeno casi en los mismos cultivares en las 3 estaciones.

VII. RESUMEN

En la temporada 1992 - 1993 se llevó a cabo un estudio sobre *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* causante de la mancha bacteriana en *Prunus* spp.

Esta enfermedad se halla muy extendida en las regiones donde se cultiva este género, atacando a todas sus especies y siendo destructiva durante la estación de crecimiento.

El presente trabajo tuvo los siguientes objetivos:

a) conocer las variaciones estacionales de la bacteria en montes comerciales, determinando los momentos claves de actividad de la misma;

b) comparar la metodología a nivel de laboratorio para determinar bajas poblaciones bacterianas y poder diferenciar a esta bacteria de otros patógenos.

Se estudiaron 4 especies de *Prunus* spp: **ciruelo**, **damasco**, **duraznero** y **nectarina**.

Las muestras (ramas y hojas) se recolectaron en montes comerciales de Montevideo, y de Juanicó y Progreso (Departamento de Canelones).

El trabajo de laboratorio se realizó en los Laboratorios Biológicos de la Dirección de Servicios de Protección Agrícola del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

Se utilizaron 2 métodos de detección: medios de cultivo y test serológico, los que se compararon con la presencia o ausencia de síntomas.

Los medios de cultivo utilizados fueron: **NAD** (nutriente agar dextrosa, medio no selectivo) y **XPSM** (Civerolo et al, 1982, medio selectivo); en el test serológico se trabajó con **ELISA-DAS**.

La técnica de **ELISA-DAS** resultó ser el método más efectivo en la detección de la bacteria. Esto se debe a que:

a) se detectó la presencia de la bacteria más temprano que en los medios de cultivo;

b) se realizó un diagnóstico rápido; se necesitaron pocas horas para detectar el patógeno vs. días en los medios de cultivos;

c) los resultados fueron cuantificables ;

d) fue útil en la confirmación de síntomas dudosos.

El medio de cultivo no selectivo (**NAD**) fue más eficaz en la aislación de la bacteria que el medio de cultivo selectivo (**XPSM**).

NAD y **ELISA-DAS** presentaron buena relación entre ellos, detectándose la bacteria casi en los mismos cultivares a lo largo de todo el ciclo.

La bacteria se logró aislar de muestras asintomáticas.

Se encontraron 2 picos estacionales :

a) a principio de verano ;

b) en otoño.

VIII. SUMMARY

Xanthomonas campestris pv. **pruni** which causes bacterial spot on **Prunus** spp., was studied throughout the 1992 - 1993 season.

This disease is found around the world where this genus is cultivated, affecting all the species and is destructive during the growing season.

This work had the following objectives:

a) determine the seasonal variations in the population of the bacterium in commercial orchard in order to establish key moments of activity;

b) compare laboratory techniques used to detect low population of the bacterium and to differentiate it from another pathogens.

Four species of **Prunus** spp were studied: **plum**, **apricot**, **peach** and **nectarine**.

The samples (twigs and leaves) were collected in commercial orchards of Montevideo, and Juanicó and Progreso (Canelones Department).

The laboratory work was carried out in the Biological Laboratories of the Plant Protection Services Direction of the Ministry of Agriculture.

The methods of detection used were: **NAD** (non-selective medium), **XPSM** (selective medium, Civerolo et al, 1982); and the serological test, **ELISA-DAS**.

ELISA-DAS test was the most effective method for detection, for the following reasons:

a) it detected the presence of the bacterium earlier than culture ;

b) the diagnosis was quick; a few hours were needed to detect the pathogen vs. days in cultures;

c) the results were measurable.

d) it was useful to confirm doubtful symptoms.

The non selective medium (**NAD**) was more efficient in detecting the bacterium than the selective medium (**XPSM**).

The results of **NAD** and **ELISA-DAS** were related because they detected the bacterium in almost the same cultivars during the growing season.

* The bacterium was isolated from asymptomatic samples.

Two seasonal increases in the population of the bacterium were detected :

a) at the beginning of the summer ;

b) in autumn.

X. BIBLIOGRAFIA

1. ADAM, A. V., POWELL, D., ANDERSON, H.W. 1955. Time of peach twig infection by *Xanthomonas pruni* in relation to spring canker incidence. *Phytopathology* 45 (5):285-287.
2. AFANADOR, L., VICTORIA, J.I. 1981. Specificity of ELISA to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* identification. In International Conference on Plant Pathogenic Bacteria (41, 1978, Angers, France). Proceedings, pp. 113-121.
3. AGRIOS, G.N. 1985. Fitopatología. México, ed. Limusa. 530 p.
4. BAZZI, C., MAZZUCCHI, U. 1980. Epidemia di *Xanthomonas pruni* su susino. *Informatore fitopatologico* 30 (5):11- 17.
5. -----, STEFANI, E., MINARDI, P., MAZZUCCHI, U. 1990. Suscettibility comparativa del susino a *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Informatore Agrario* 40:71-74.
6. BRADBURY, J.F. 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Review of Plant Pathology* 49 (5):213-217.
7. -----, 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. Farnham Royal, CAB International Mycological Institute. pp 198-199.
8. BUCUR, E., OLANGIU, M., LAZAR, I., POPA, T. 1962. The bacterial disease of plum and its control. *Review of Applied Mycology* 41(10):608.
9. CANALE, F., CASSANELLO, M. E. 1983. Detección de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* "A" mediante la técnica ELISA (DAS). In 6^a Reunión Técnica de la Facultad de Agronomía. Montevideo 05-06/12/83.

10. CIVEROLO, E.L. 1975. Quantitative aspects of pathogenesis of *Xanthomonas pruni* in peach leaves. *Phytopathology* 65 (3):258-264.
11. -----, SASSER, M., HELKIE, C., BURBAGE, D. 1982a. Selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Plant Disease* 66 (1):39-43.
12. -----, FAN, F. 1982b. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detection and identification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Plant Disease* 66 (3):231-236.
13. CLARK, M.F. 1981. Immunosorbent assays in Plant Pathology. *Annual Review of Phytopathology* 19:83-106.
14. COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE. 1965. *Xanthomonas pruni*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, N° 50.
15. DAINES, R.H., FELICIANO, A. 1971. A previous undescribed symptom of bacterial spot of peach. *Plant Disease Reporter* 55(9) 774-775.
16. DHANVANTARI, B.N. 1971. Overwintering sources of inoculum of bacterial spot of peach (*Xanthomonas pruni*) in Southwestern Ontario. *Review of Applied Mycology* 50:616.
17. -----, DIRKS, V.A., BROWN, R.J. 1978. Effectiveness of antibiotics for control of bacterial spot of peach in Southwestern Ontario. *Canadian Journal of Plant Science* 58:953-959.
18. DUNEGAN, J.C. 1932. The bacterial spot disease of the peach and other stone fruits. *Technical Bulletin* N° 273. 53 p.
19. DU PLESSIS, H.J., MATTHEE, F.N., LOOS, M.A. 1979. Serology and host specificity of *Xanthomonas pruni* isolates from different stone fruits species. *Phytophylactica* 11:137-140.

20. -----, 1984. Scanning electron microscopy of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** in plum petioles and buds. *Phytopathology Z.* 109:277-284.
21. -----, 1986. Systemic migration and establishment of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** in plum leaves and twigs. *Journal of Phytopathology* 116:221-227.
22. -----, 1987a. Canker development on plum shoots following systemic movement of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** from inoculated leaves. *Plant Disease* 71(12):1078-1080.
23. -----, 1989. Bacterial spot disease of stone fruits: overview of findings. *Deciduous Fruit Grower* 39: 128-132.
24. -----, 1990. Systemic invasion of plum seed and fruit by **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** through stalks. *Journal of Phytopathology* 130:37-45.
25. DURGAPAL, J.C. 1970. A preliminary note on bacterial diseases of temperate plants in India. *Indian Phytopathology* 24:379-382.
26. EUROPEAN PLANT PATHOGENIC ORGANIZATION. 1990. Data sheets on quarantine pests. **Xanthomonas campestris** pv. **pruni**. pp. 818-821.
27. ERCOLANI, G. L. 1970. Individuazione di **Xanthomonas pruni** (E.F. Smith) Dowson quale agente de la maculatura batterica del Susino in Emilia. *Phytopathologia Mediterranea* 9:62-64.
28. FAHY, P.C., PERSLEY, G.J. eds. 1983. *Plant Bacterial diseases; a diagnostic guide*. Sydney, Academic Press. pp. 209- 210.

29. FELICIANO, A., DAINES, R.H. 1970. Factors influencing ingress of **Xanthomonas pruni** through peach leaf scars and subsequent development of spring cankers. *Phytopathology* 60 (12):1720-1726.
30. FERNANDEZ VALIELA, M.V. 1975. Introducción a la fitopatología. 3a. ed. Buenos Aires, INTA. pp 215-223.
31. FOSTER, H.H., PETERSEN, D. H. 1954. **Xanthomonas pruni** in summer cankers on peach in South Carolina. *Plant Disease Reporter* 38(11):783-785.
32. FRENCH, W.J., STASSI, D.L., SCHAAD, N.W. 1978. The use of immunofluorescence for the identification of phony peach bacterium. *Phytopathology* 68 (7):1106-1108.
33. GITAITIS, R., BERTRAND, P. 1986. Inoculation and survival of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** on peach leaves in South Georgia. *Phytopathology* 76(10):1139.
34. GOLDWORTHY, M.C., WILSON, R.A. 1952. Terminal bud and shoot infections and the overwintering of **Xanthomonas pruni** in peach trees. *Plant Disease Reporter* 36(11):408-409.
35. GOODMAN, C.A., HATTINGH, M.J. 1986. Transmission of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** in plum and apricot nursery trees by budding. *Hortscience* 21(4): 995-996.
36. -----, 1988a. Effect of plum and apricot bud origin, time cut, time budded on development of bacterial spot of stone fruit. *Phytophylactica* 20:133-134.
37. -----, 1988b. Mechanical transmission of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** in plum nursery trees. *Plant Disease* 72:643.

38. HAMMERSCHLAG, F.A. 1988. Screening peaches in vitro for resistance to **Xanthomonas campestris** pv. **pruni**. Journal of American Society Horticultural Science 113(1):164-166.
39. HILDEBRAND, D.C., SCHROTH, M.N., SANDS, D.C. 1988. Gram negative bacteria. Pseudomonas. In Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2ed. St. Paul, Minnesota, APS PRESS. pp. 60.
40. KEIL, H.L., WEAVER, L.O. 1970. Grower trials with oxytetracycline for control of peach bacterial spot in Maryland. Plant Disease Reporter 54(3):208-211.
41. -----, FOGLE, H.W. 1974. Orchard susceptibility of some apricot, peach and plum cultivars and selections to **Xanthomonas pruni**. Fruit Varieties Journal 28:16-19.
42. -----, 1979a. Control of bacterial spot (caused by **Xanthomonas pruni**) in apricot trees by trunk infusion with oxytetracycline. Plant Disease Reporter 63(5):407-409.
43. -----, CIVEROLO, E.L. 1979b. Effects of trunks injections of oxytetracycline on bacterial spot disease in peach trees. Plant Disease Reporter 63(1):1-5.
44. LAYNE, R.E.C. 1966. Susceptibility of apricots to bacterial spot infection of foliage and fruit. Plant Disease Reporter 50 (2):112-115.
45. LARSH, H.W., ANDERSON, H.W. 1948. Bacterial spot of stone fruit: with special reference to epiphytotics and dissemination of the causal organism. Bull. Ill. agric. Exp. Sta. no. 530: 31-55.
46. LOPEZ, M.M. 1990. Bacteriosis del Albaricoquero, Cerezo y Ciruelo. Fruticultura Profesional 30:78-84.

47. -----, 1992. Bacteriosis del melocotonero. *Fruticultura Profesional* 46:65-72.
48. MATTHEE, F.N., DAINES, R.H. 1968. Effects of soil types and substrate aeration on stomatal activity, water diffusion pressure deficit, water congestion, and bacterial infection of peach and pepper foliage. *Phytopathology* 58 (9):1298-1301.
49. -----, 1969. The influence of nutrition on susceptibility of peach foliage to water congestion and infection by **Xanthomonas pruni**. *Phytopathology* 59 (3):285-287.
50. MILES, W.G., DAINES, R.H., RUE, J.W. 1977. Presymptomatic egress of **Xanthomonas pruni** from infected peach leaves. *Phytopathology* 67 (7):895-897.
51. MILLIKAN, D.F., HIBBARD, A.D. 1964. Bacterial spot on apricots. *Plant Disease Reporter* 48(11): 900-901.
52. MOFFETT, M.L. 1973. Bacterial spot of stone fruit in Queensland. *Australian Journal of Biology Science* 26:171-179.
53. NOGUEIRA, E.M.C., RODRIGUES NETO, J. 1982. **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** em **Prunus** spp. no Estado de Sao Paulo. *Biologico* 48(9): 227-229.
54. NOME, S.F., RAJU, B.C., GOHECEN, A.C., NYLAND, G., DOCAMPO, D. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce's disease bacteria in plant tissues. *Phytopathology* 70(8):746-749.
55. PATRICK, Z. 1978. Survival of **Xanthomonas pruni** on apricot. In Internacional Conference on Plant Pathogenic Bacteria (41, 1978, Angers, France). *Proceedings*, pp. 815.

56. PERALTA, A.M. 1984. E.L.I.S.A. (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Fundamentos y Aplicaciones. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Documento interno.
57. RHANDAWA, P., CIVEROLO, E.L. 1985a. A detached leaf bioassay for **Xanthomonas campestris** pv. **pruni**. *Phytopathology* 75(9):1060-1063.
58. -----, 1985b. Pathogenicity of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** on detached peach leaves. *Phytopathology* 75(11): 1381.
59. SANDS, D.C., WALTON, G.C. 1975. Tetracycline injections for control of eastern X disease and bacterial spot of peach. *Plant Disease Reporter* 59: 573-576.
60. SCHAAD, N.W. 1978. Use of direct and indirect immunofluorescence tests for identification of **Xanthomonas campestris**. *Phytopathology* 68 (2):249-252.
61. -----, 1979. Serological identification of Plant Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 17:123-147.
62. SCORTICHINI, M., SIMEONE, A.M. 1990. Grave attacco di **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** su susino in Italia centrale. *Rivista di Frutticoltura e di ortofloricoltura* 52 (11):61-63.
63. -----, 1990. Outbreak of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** (Smith) Dye in plum orchards of Central Italy. *Advances in Horticultural Science*. 2:127-128.
64. -----, TROPIANO, F.G. 1992. Preoccupante diffusione e pericolosità di **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** su susino cino-giapponese. *Informatore Agrario* 12:65-67.

65. SHEPARD, D.P., ZEHR, E.I. 1986. Epiphytic behaviour of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** on peach and plum. *Phytopathology* 76(10):1070.
66. -----, 1987. Temperature and moisture effects on bacterial spot of peach caused by **Xanthomonas campestris** pv. **pruni**. *Phytopathology* 77(12):1709.
67. -----, 1994. Epiphytic persistence of **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** on peach and plum. *Plant Disease* 78 (6):627-629.
68. STEFANI, E., BAZZI, C., MAZZUCCHI, U., COLUSSI, A. 1989. **Xanthomonas campestris** pv. **pruni** in pescheti del Friuli. *Informatore fitopatologico* 7(8):60-63.
69. THORNBERRY, H.H., ANDERSON, H.W. 1933. Overwintering of **Phytopomonas pruni** on peach. *Phytopathology* 23(10): 787-801.
70. TOPP, B.L., HEATON, J.B., RUSSEL, D.M., MAYER, R. 1989. Field susceptibility of Japanese-type plums to **Xanthomonas campestris** pv. **pruni**. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 29:905-909.
71. -----, SHERMAN, W.B. 1990. Sources of bacterial spot resistance in Japanese-type plum cultivars. *Fruit Varieties Journal* 44(1):32-35.
72. TRIGALET, A., SAMSON, R., COLENO, A. 1978. Problems related to the use of serology in Phytobacteriology. *In International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* (41, 1978, Angers, France). *Proceedings*, pp. 271-288.

73. URUGUAY. DIRECCION GENERAL DE SERVICIOS AGRICOLAS. 1994. Exportaciones hortifrutícolas; zafra 1993-1994. Montevideo (Boletín N° 4).
74. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERIA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGROPECUARIA. ESTACION EXPERIMENTAL GRANJERA "LAS BRUJAS". RESULTADOS EXPERIMENTALES 1982-1983. Control de mancha bacteriana (*Xanthomonas pruni* (E.F. Smith) Dowson) en duraznero.
75. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERIA, AGRICULTURA Y PESCA. JUNTA NACIONAL DE LA GRANJA. 1991. Encuesta frutícola. 1988. Montevideo. p.irr.
76. VIDAVER, A.K., DAVIS, M.J. 1988. Gram Positive Bacteria. Coryneform Plant Pathogens. In Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2ed. St. Paul, Minnesota, APS PRESS. pp 104-105.
77. VOLLER, A., BARTLETT A., BIDWELL, D.E. 1978. Enzyme-immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology* 31: 507-520.
78. VRUGGINK, H. 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of plant pathogenic bacteria. In International Conference on Plant Pathogenic Bacteria (41, 1978, Angers, France). Proceedings, pp. 307- 310.
79. YOUNG, J.M. Survival of bacteria on **Prunus** leaves. In International Conference on Plant Pathogenic Bacteria (41, 1978, Angers, France). Proceedings, pp. 7.

XI. APENDICE

Cuadro N° 1. Momentos de visualización de síntomas en hojas y ramas en los cultivares I, II, III y IV.

<u>Organo</u>	<u>Cultivar</u>							
	<u>I</u>		<u>II</u>		<u>III</u>		<u>IV</u>	
	<u>R</u>	<u>H</u>	<u>R</u>	<u>H</u>	<u>R</u>	<u>H</u>	<u>R</u>	<u>H</u>
<u>Fecha de muestreo</u>								
12-11-92	-	-	-	-	-	-	-	-
19-11-92	-	+	-	+	-	+	-	+
26-11-92	-	+	-	+	-	+	-	+
29-12-92	-	+	-	+	-	-	-	-
11-1-93	-	-	-	-	-	-	+	-
21-1-93	-	+	-	-	-	+	-	+
28-1-93	-	+	-	-	-	-	-	+
4-2-93	-	+	-	+	-	-	-	-
15-2-93	+	-	+	-	-	-	-	-
25-2-93	-	+	-	+	-	-	-	-
4-3-93	-	+	+	+	-	+	-	-
19-3-93	-	-	-	+	+	+	+	-
25-3-93	-	-	-	-	+	-	-	+
23-4-93	-	+	+	+	+	+	+	-

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de síntomas

-: ausencia de síntomas

Cuadro N° 2. Momentos de visualización de síntomas en hojas y ramas en los cultivares V, VI, VII, VIII y IX.

Organo	<u>Cultivar</u>									
	V		VI		VII		VIII		IX	
	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H
<u>Fecha de muestreo</u>										
12-11-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19-11-92	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
26-11-92	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
29-12-92	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
11-1-93	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-
21-1-93	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
28-1-93	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
4-2-93	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
15-2-93	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
25-2-93	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
4-3-93	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
19-3-93	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
25-3-93	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
23-4-93	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de síntomas

-: ausencia de síntomas

Cuadro N° 3. Fecha de aislación de *Xanthomonas campestris pv. pruni* de hojas y ramas de los cultivares I, II, III y IV en medio de cultivo no selectivo (NAD).

Organo	<u>Fuente de aislación</u>							
	<u>Cultivar</u>							
	I		II		III		IV	
R	H	R	H	R	H	R	H	
<u>Fecha de muestreo</u>								
23-10-92	+	+	+	+	+	+	+	+
30-10-92	-	-	-	-	-	-	-	-
12-11-92	+	+	+	+	-	+	-	-
19-11-92	+	-	+	+	-	-	+	+
26-11-92	+	+	+	+	-	-	+	-
29-12-92	+	+	-	+	-	+	-	+
11-1-93								
21-1-93	+	+	-	-	-	+	+	+
28-1-93								
4-2-93	+	+	-	+	-	+	+	-
15-2-93	+	-	-	-	-	+	+	-
25-2-93	-	+	+	+	-	-	+	-
4-3-93	-	+	+	-	-	+	+	-
19-3-93	+	+	-	+	+	+	+	-
25-3-93	+	+	+	+	+	+	+	+
23-4-93	+	+	+	+	+	+	+	+

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de colonias características de la bacteria

-: ausencia de colonias características de la bacteria

En las fechas 11-1-93 y 28-1-93 se obtuvieron cultivos muy contaminados.

Cuadro N° 4. Fecha de aislación de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* de hojas y ramas de los cultivares V, VI, VII, VIII y IX en medio de cultivo no selectivo (NAD).

<u>Organo</u>	<u>Fuente de aislación</u>									
	<u>Cultivar</u>									
	V		VI		VII		VIII*		IX*	
	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H
<u>Fecha de muestreo</u>										
23-10-92	+	+	+	+	+	+				
30-10-92	-	+	+	+	+	+				
12-11-92	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
19-11-92	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
26-11-92	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
29-12-92	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
11-1-93										
21-1-93	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
28-1-93										
4-2-93	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
15-2-93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
25-2-93	+	+	-	+	+	+	+	+		
4-3-93	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
19-3-93	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
25-3-93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23-4-93	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de colonias características de la bacteria

-: ausencia de colonias características de la bacteria

En las fechas 11-1-93 y 28-1-93 se obtuvieron cultivos muy contaminados.

* dichas muestras se incorporaron al trabajo el 12 - 11 - 92.

Cuadro N° 5. Resultados del repique de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* desde medio de cultivo no selectivo (NAD) de los cultivares I, II, III y IV a medio de cultivo no selectivo (NAD).

Organo	<u>Fuente de aislación</u>								
	<u>Cultivar</u>								
	I		II		III		IV		
	R	H	R	H	R	H	R	H	
<u>Fecha de muestreo</u>									
23-10-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30-10-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-11-92	-	+	+	+	-	-	-	-	-
19-11-92	-	-	+	+	-	-	+	-	-
26-11-92	-	-	-	-	-	-	+	-	-
29-12-92	+	+	-	+	-	-	-	-	-
11-1-93									
21-1-93	-	-	-	-	-	-	-	+	-
28-1-93									
4-2-93	-	-	-	+	-	-	+	-	-
15-2-93	-	-	-	-	-	-	+	-	-
25-2-93	-	+	-	-	-	-	+	-	-
4-3-93	-	-	-	-	-	-	+	-	-
19-3-93	-	-	-	-	+	+	-	-	-
25-3-93	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23-4-93	+	-	+	-	+	+	+	-	-

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de colonias características de la bacteria

-: ausencia de colonias características de la bacteria

En las fechas 11-1-93 y 28-1-93 se obtuvieron cultivos muy contaminados.

Cuadro N° 6. Resultados del repique de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* desde medio de cultivo no selectivo (NAD) de los cultivares V, VI, VII, VIII y IX a medio de cultivo no selectivo (NAD).

Organo	Fuente de aislación									
	Cultivar									
	V		VI		VII		VIII*		IX*	
	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H
Fecha de muestreo										
23-10-92	-	-	-	-	-	-				
30-10-92	-	-	-	-	-	-				
12-11-92	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
19-11-92	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
26-11-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29-12-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11-1-93										
21-1-93	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
28-1-93										
4-2-93	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
15-2-93	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
25-2-93	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
4-3-93	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
19-3-93	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
25-3-93	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
23-4-93	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de colonias características de la bacteria

-: ausencia de colonias características de la bacteria

En las fechas 11-1-93 y 28-1-93 se obtuvieron cultivos muy contaminados.

* dichas muestras se incorporaron al trabajo el 12 - 11 - 92.

Cuadro N° 7. Fecha de aislación de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hojas y ramas en los cultivares I, II, III y IV en medio de cultivo selectivo (XPSM).

Organo	<u>Fuente de aislación</u>							
	<u>Cultivar</u>							
	I		II		III		IV	
R	H	R	H	R	H	R	H	
<u>Fecha de muestreo</u>								
23-10-92	-	-	-	-	-	-	-	-
30-10-92	-	-	-	-	-	-	-	-
12-11-92	-	-	+	+	-	-	-	-
19-11-92	+	+	+	+	-	+	+	-
26-11-92	-	+	-	-	+	-	+	-
29-12-92	+	+	+	+	+	+	+	+
11-1-93								
21-1-93	-	+	+	+	-	-	-	+
28-1-93								
4-2-93	-	+	+	+	+	+	+	+
15-2-93								
25-2-93								
4-3-93								
19-3-93	-	-	-	+	+	+	+	+
25-3-93	+	+	+	+	+	+	+	+
23-4-93	+	+	+	+	+	+	+	+

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de colonias características de la bacteria

-: ausencia de colonias características de la bacteria

En las fechas 11-1-93 y 28-1-93 se obtuvieron muestras muy contaminadas.

En el período comprendido entre el 15-2-93 y el 4-3-93 inclusive no se pudo realizar aislación en medio de cultivo selectivo por falta de material.

Cuadro N° 8. Fecha de aislación de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* de hojas y ramas de los cultivares V, VI, VII, VIII y IX en medio de cultivo selectivo (XPSM).

Organo	Fuente de aislación									
	Cultivar									
	V		VI		VII		VIII*		IX*	
R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	
Fecha de muestreo										
23-10-92	-	-	-	-	-	+				
30-10-92	-	-	-	-	-	-				
12-11-92	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
19-11-92	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
26-11-92	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
29-12-92	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
11-1-93										
21-1-93	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
28-1-93										
4-2-93	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
15-2-93										
25-2-93										
4-3-93										
19-3-93	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
25-3-93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23-4-93	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de colonias características de la bacteria

-: ausencia de colonias características de la bacteria

En las fechas 11-1-93 y 28-1-93 se obtuvieron cultivos muy contaminados.

En el período comprendido entre el 15-2-93 y el 4-3-93 inclusive no se pudo realizar aislación en medio de cultivo selectivo por falta de material.

* dichas muestras se incorporaron al trabajo el 12 - 11 - 92.

Cuadro N° 9. Resultados del repique de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* desde medio de cultivo selectivo (XPSM) de los cultivares I, II, III y IV a medio de cultivo no selectivo (NAD).

Organo	<u>Fuente de aislación</u>								
	<u>Cultivar</u>								
	I		II		III		IV		
	R	H	R	H	R	H	R	H	
<u>Fecha de muestreo</u>									
23-10-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30-10-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12-11-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19-11-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26-11-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29-12-92	-	+	-	-	-	-	-	-	-
11-1-93									
21-1-93	-	-	-	-	-	-	-	-	+
28-1-93									
4-2-93	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15-2-93									
25-2-93									
4-3-93									
19-3-93	-	-	-	-	+	+	+	-	
25-3-93	-	-	-	-	-	-	+	+	
23-4-93	-	-	-	+	-	-	+	+	

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de colonias características de la bacteria

-: ausencia de colonias características de la bacteria

En las fechas 11-1-93 y 28-1-93 se obtuvieron cultivos muy contaminados.

En el período comprendido entre el 15-2-93 y el 4-3-93 inclusive no se pudo realizar aislación en medio de cultivo selectivo por falta de material.

Cuadro N°10. Resultados del repique de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* desde medio de cultivo selectivo (XPSM) de los cultivares V, VI, VII, VIII y IX a medio de cultivo no selectivo (NAD).

Organo	Fuente de aislación									
	Cultivar									
	V		VI		VII		VIII*		IX*	
	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H
Fecha de muestreo										
23-10-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30-10-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19-11-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26-11-92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29-12-93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11-1-93										
21-1-93	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
28-1-93										
4-2-93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15-2-93										
25-2-93										
4-3-93										
19-3-93	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
25-3-93	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
23-4-93	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-

R: Rama

H: Hoja

+: presencia de colonias características de la bacteria

-: ausencia de colonias características de la bacteria

En las fechas 11-1-93 y 28-1-93 se obtuvieron cultivos muy contaminados.

En el período comprendido entre el 15-2-93 y el 4-3-93 inclusive no se pudo realizar aislación en medio de cultivo selectivo por falta de material.

* dichas muestras se incorporaron al trabajo el 12 - 11 - 92.

Cuadro N° 11. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar I

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	-	-	x
19-11	-	-	-	+
26-11	-	-	-	-
29-12 *	-	+	-	+
11-01	-	**	**	+
21-01	-	-	-	-
28-01	-	**	**	+
4-02	-	-	-	-
15-02	+	-	-	+
25-02	-	-	-	-
4-03	-	-	-	-
19-03	-	-	-	x
25-03	-	+	-	-
23-04	-	+	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 12. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar I

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	+
30-10	*	-	-	+
12-11	-	+	-	X
19-11	+	-	-	-
26-11 *	+	-	-	+
29-12	+	+	+	-
11-01	-	**	**	-
21-01	+	-	-	-
28-01	+	**	**	-
4-02	+	-	-	-
15-02	-	-	-	-
25-02	+	+	-	-
4-03	+	-	-	-
19-03	-	-	-	X
25-03	-	+	-	-
23-04	+	-	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 13. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar II.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	-	-	X
19-11	-	-	-	-
26-11	-	-	-	-
29-12	-	+	-	-
11-01	-	**	**	-
21-01	-	-	-	+
28-01	-	**	**	-
4-02	-	-	-	-
15-02	+	-	-	-
25-02	-	-	-	-
4-03	-	-	-	-
19-03	-	-	-	X
25-03	-	+	-	-
23-04	-	+	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 14. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar II.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	+
30-10	*	-	-	+
12-11	-	+	-	X
19-11	+	+	-	-
26-11	+	-	-	-
29-12	+	+	-	-
11-01	-	**	**	-
21-01	-	-	-	-
28-01	-	**	**	-
4-02	+	+	-	-
15-02	-	-	-	-
25-02	+	-	-	-
4-03	+	-	-	-
19-03	+	-	-	X
25-03	-	+	-	+
23-04	+	-	+	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 15. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar III.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	-	-	X
19-11	-	-	-	+
26-11	-	-	-	-
29-12	-	-	-	-
11-01	-	**	**	-
21-01	-	-	-	-
28-01	-	**	**	+
4-02	-	-	-	-
15-02	-	-	-	-
25-02	-	-	-	-
4-03	-	-	-	-
19-03	+	+	+	X
25-03	+	+	-	-
23-04	+	+	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 16. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de Xanthomonas campestris pv. pruni en hoja del cultivar Ill.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	+
30-10	*	-	-	+
12-11	-	-	-	x
19-11	+	-	-	-
26-11	+	-	-	-
29-12	-	-	-	+
11-01	-	**	**	-
21-01	+	-	-	+
28-01	-	**	**	+
4-02	-	-	-	-
15-02	-	-	-	+
25-02	-	-	-	+
4-03	+	-	-	+
19-03	+	+	+	x
25-03	-	+	-	+
23-04	+	+	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 17. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *prunij* en rama del cultivar IV.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	-	-	X
19-11	-	+	-	-
26-11	-	+	-	-
29-12	-	-	-	-
11-01	+	**	**	-
21-01	-	-	-	-
28-01	-	**	**	-
4-02	-	+	-	-
15-02	-	+	-	-
25-02	-	+	-	-
4-03	-	+	-	-
19-03	+	-	+	X
25-03	-	+	+	+
23-04	+	+	+	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 18. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar IV.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	-	-	x
19-11	+	-	-	-
26-11	+	-	-	-
29-12	-	-	-	-
11-01	-	**	**	-
21-01	+	+	+	-
28-01	-	**	**	-
4-02	-	-	-	-
15-02	-	-	-	-
25-02	-	-	-	-
4-03	-	-	-	-
19-03	-	-	-	x
25-03	+	+	+	-
23-04	-	-	+	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 19. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar V.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	-	-	X
19-11	-	-	-	-
26-11	-	-	-	-
29-12	-	-	-	-
11-01	+	**	**	+
21-01	-	-	-	-
28-01	-	**	**	-
4-02	-	-	-	-
15-02	-	-	-	-
25-02	-	+	-	-
4-03	+	+	-	-
19-03	-	-	-	X
25-03	-	+	-	-
23-04	-	+	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 20. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar V.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	-	-	X
19-11	+	-	-	-
26-11	+	-	-	-
29-12	-	-	-	-
11-01	-	**	**	-
21-01	+	-	-	-
28-01	+	**	**	-
4-02	-	-	-	-
15-02	-	-	-	-
25-02	+	+	-	-
4-03	+	+	-	-
19-03	+	+	-	X
25-03	+	+	-	-
23-04	-	-	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 21. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar VI.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	-	-	X
19-11	-	-	-	-
26-11	-	-	-	-
29-12	-	-	-	+
11-01	-	**	**	+
21-01	-	-	-	-
28-01	-	**	**	-
4-02	-	-	-	-
15-02	-	+		+
25-02	-	-		-
4-03	-	+		+
19-03	+	-	-	X
25-03	-	+	-	-
23-04	-	-	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 22. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar VI.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	+	-	x
19-11	+	+	-	-
26-11	+	-	-	-
29-12	+	-	-	-
11-01	+	**	**	+
21-01	+	-	-	-
28-01	+	**	**	+
4-02	+	-	-	-
15-02	+	+	-	-
25-02	+	+	-	-
4-03	+	+	-	-
19-03	-	-	-	x
25-03	+	-	-	-
23-04	+	+	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

**: cultivos contaminados

Cuadro Nº 23. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar VII.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	-
30-10	*	-	-	+
12-11	-	+	-	X
19-11	-	-	-	-
26-11	-	-	-	-
29-12	-	-	-	+
11-01	-	**	**	+
21-01	-	-	+	-
28-01	-	**	**	-
4-02	-	-	-	-
15-02	-	-		+
25-02	+	-		+
4-03	+	+		-
19-03	+	+	+	X
25-03	-	+	+	-
23-04	-	+	+	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N°24. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar VII.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10	*	-	-	+
30-10	*	-	-	+
12-11	-	+	-	X
19-11	+	+	-	+
26-11	+	-	-	-
29-12	-	-	-	+
11-01	+	**	**	+
21-01	+	-	-	+
28-01	+	**	**	+
4-02	+	+	-	+
15-02	+	-		+
25-02	+	+		-
4-03	+	+		+
19-03	-	-	+	X
25-03	+	+	+	+
23-04	+	+	-	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 25. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en rama del cultivar VIII.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10				
30-10				
12-11	-	-	-	x
19-11	-	+	-	-
26-11	-	-	-	-
29-12	-	-	-	-
11-01*	-	**	**	+
21-01	-	+	-	-
28-01	-	**	**	+
4-02	-	-	-	+
15-02	-	-		+
25-02	-	+		-
4-03	+	+		-
19-03	-	+	+	x
25-03	-	-	+	-
23-04	-	-	+	+

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

Cuadro N° 26. Resultados de las técnicas utilizadas para la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* en hoja del cultivar VIII.

Fecha de muestreo	Síntoma	NAD	XPSM	DAS - ELISA
23-10				
30-10				
12-11	-	-	-	X
19-11	+	+	-	-
26-11	+	-	-	-
29-12	-	-	-	+
11-01	+	**	**	+
21-01	+	-	-	-
28-01	-	**	**	+
4-02	+	-	-	+
15-02	-	-		-
25-02	+	+		-
4-03	+	+		+
19-03	+	-	+	X
25-03	+	+	+	+
23-04	+	+	+	+

Este cultivar se incorporó al trabajo el 12 - 11 - 92.

+: presencia de síntomas / detección de la bacteria

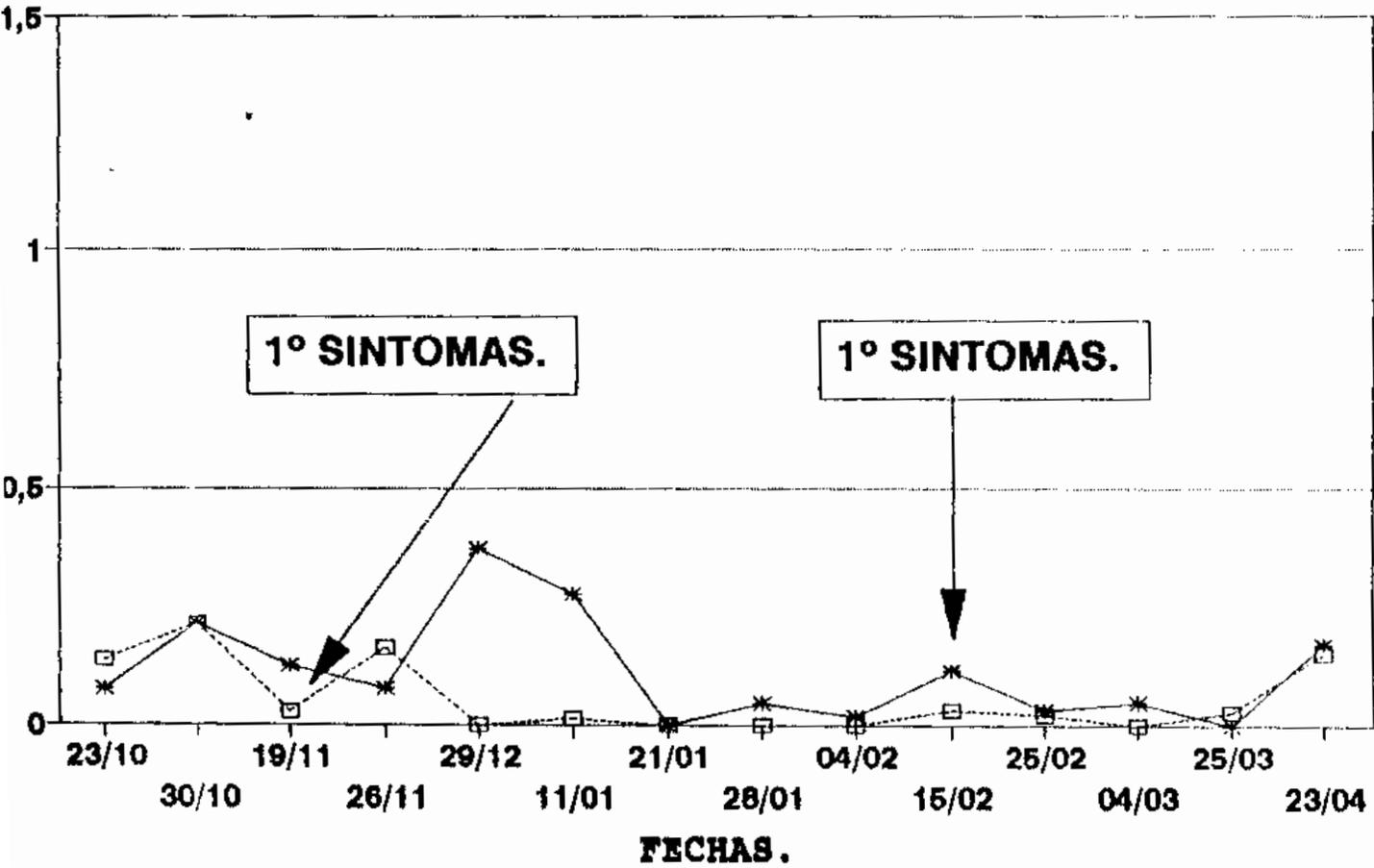
-: ausencia de síntomas / no detección de la bacteria

x: no se realizó lectura en el test de ELISA

*: no se realizó observación de síntomas

** : cultivos contaminados

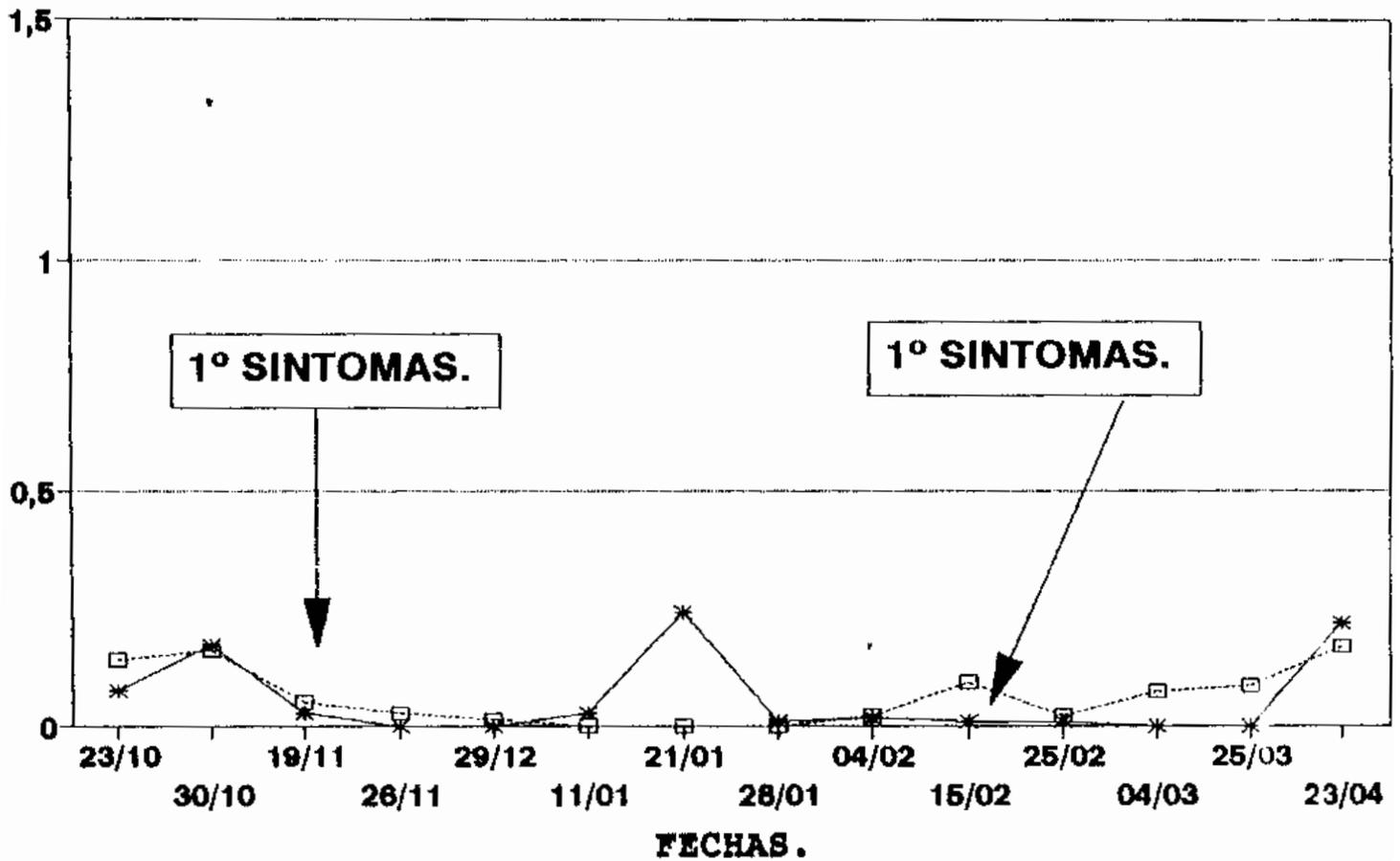
**RESULTADOS DE DAS - ELISA.
NECTARINA CV. FANTASIA (I).**



* RAMA. □ HOJA.

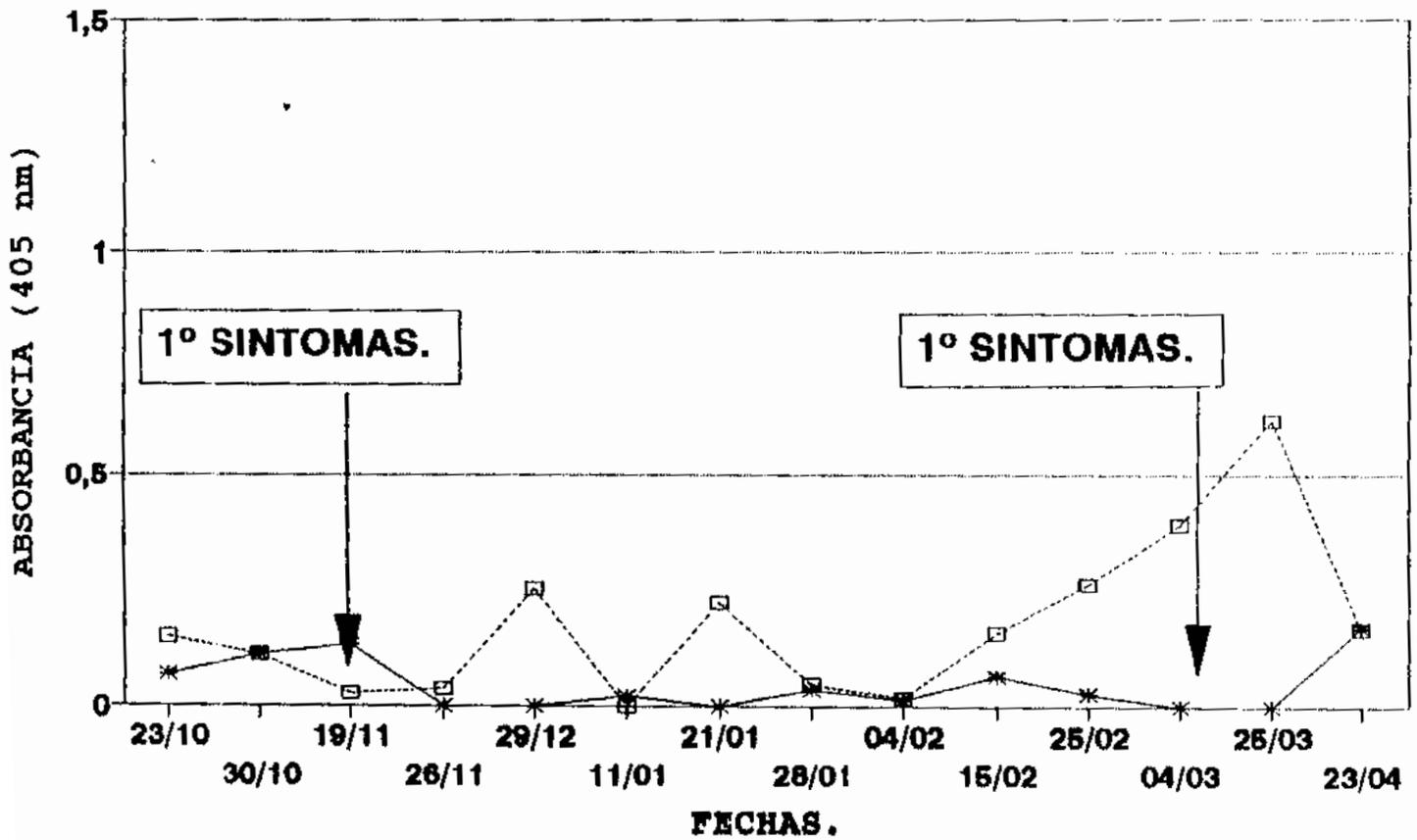
Fig. N° 1

**RESULTADOS DE DAS - ELISA.
DURAZNERO CV. BRUNETTO (II).**



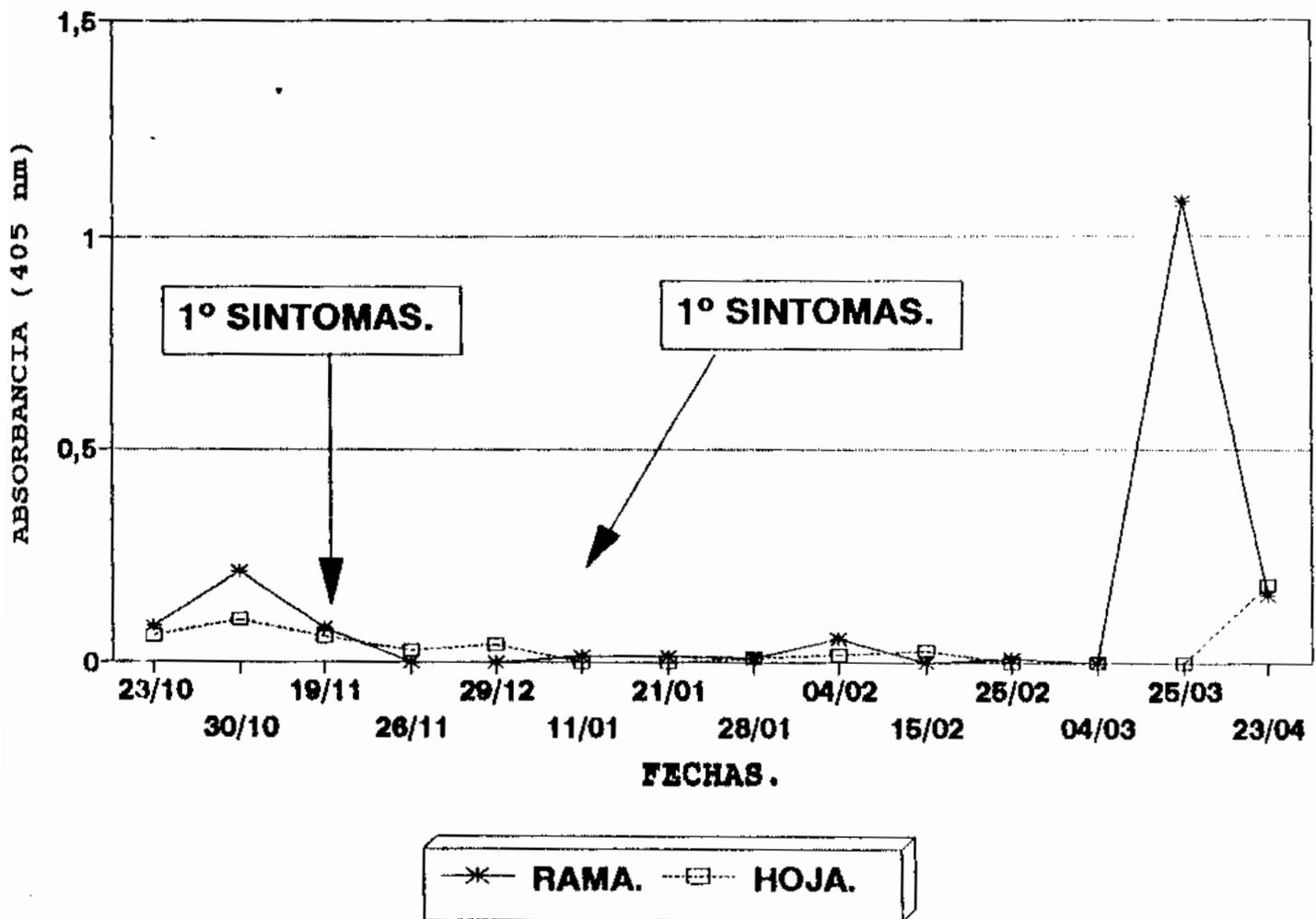
—*— RAMA. -□- HOJA.

**RESULTADOS DE DAS - ELISA.
DURAZNERO CV.REY DEL MONTE (III).**



* RAMA. □ HOJA.

**RESULTADOS DE DAS - ELISA.
DURAZNERO CV. JUNEGOLD (IV).**



**RESULTADOS DE DAS - ELISA.
NECTARINA CV. NECTARED II (V).**

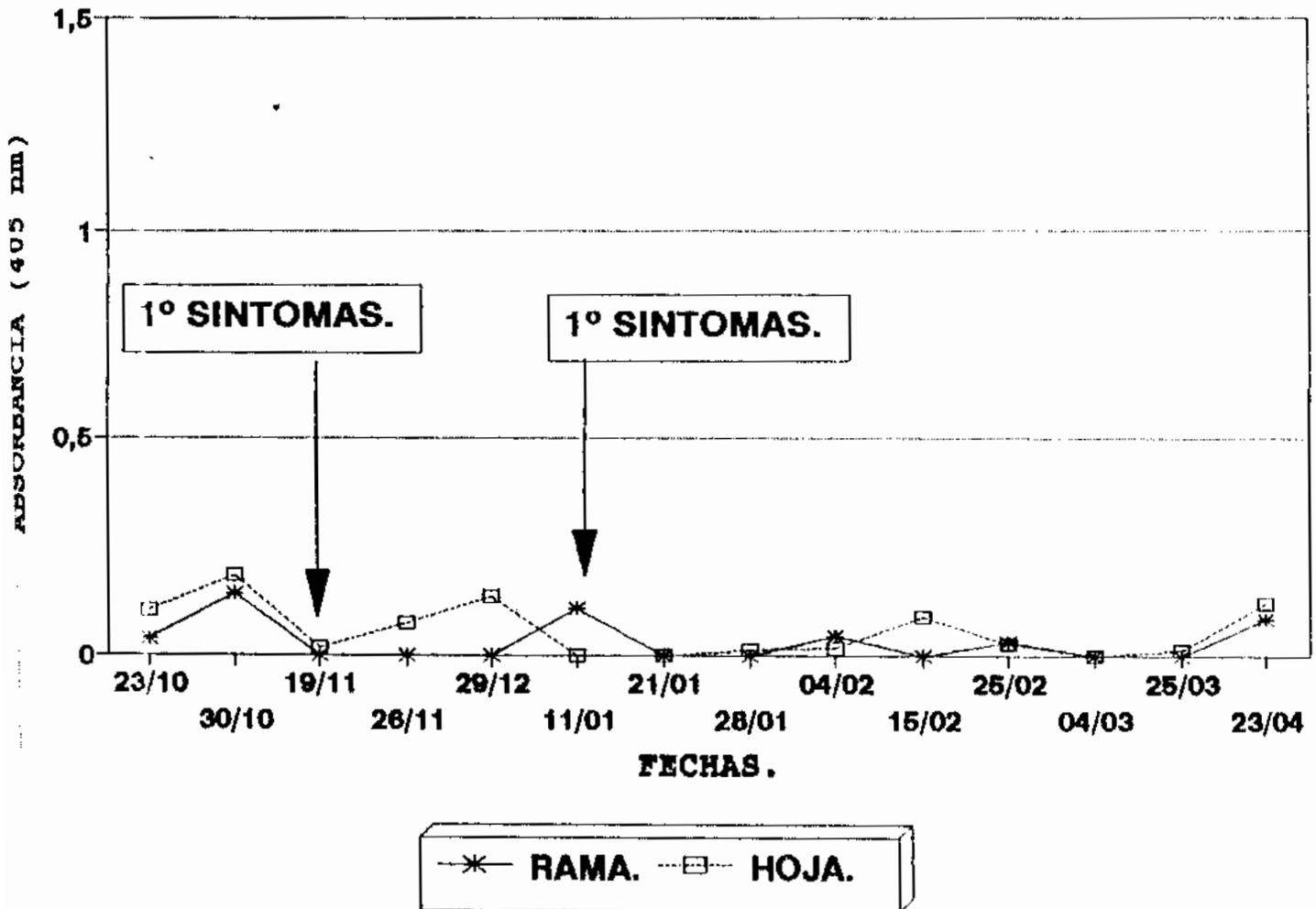
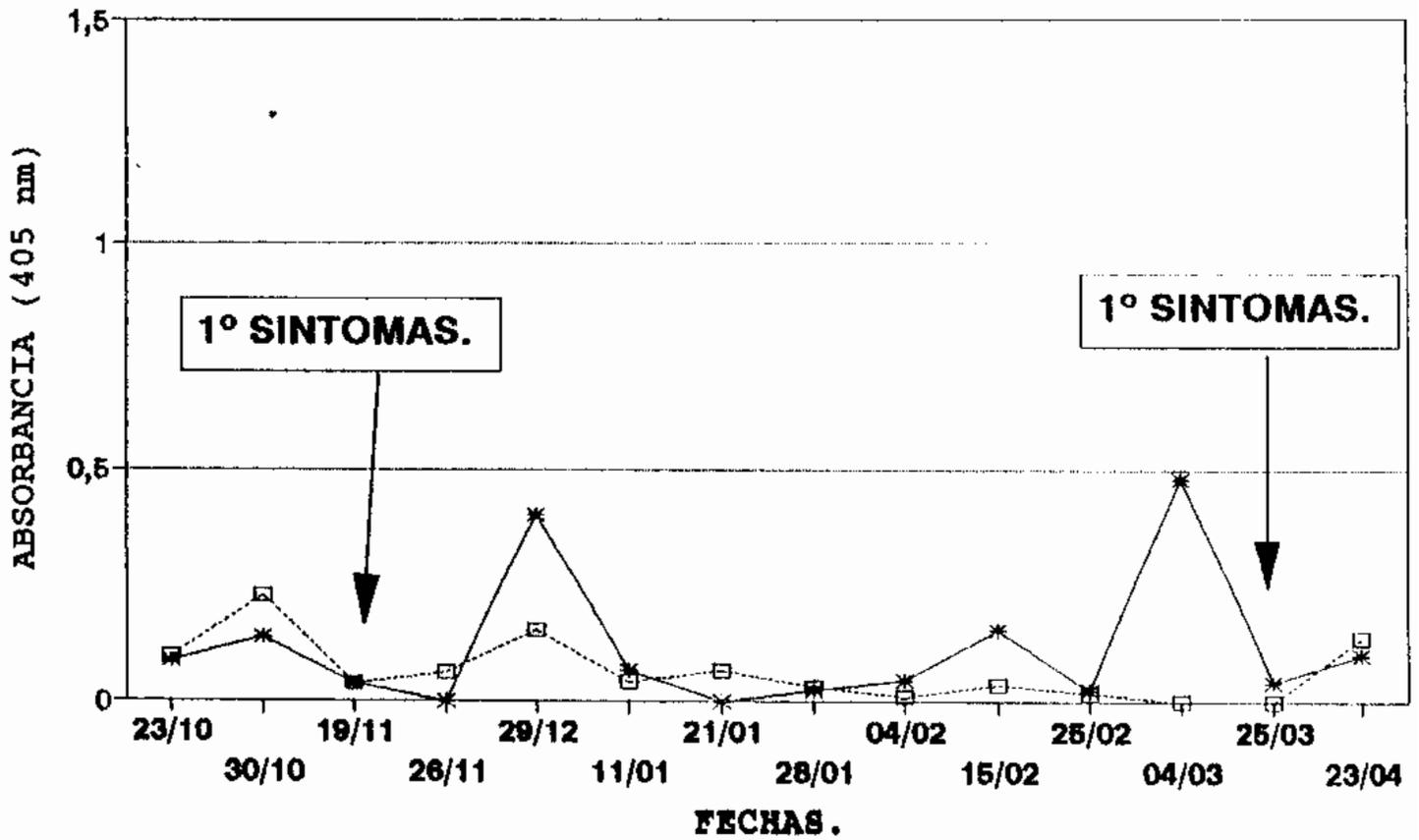


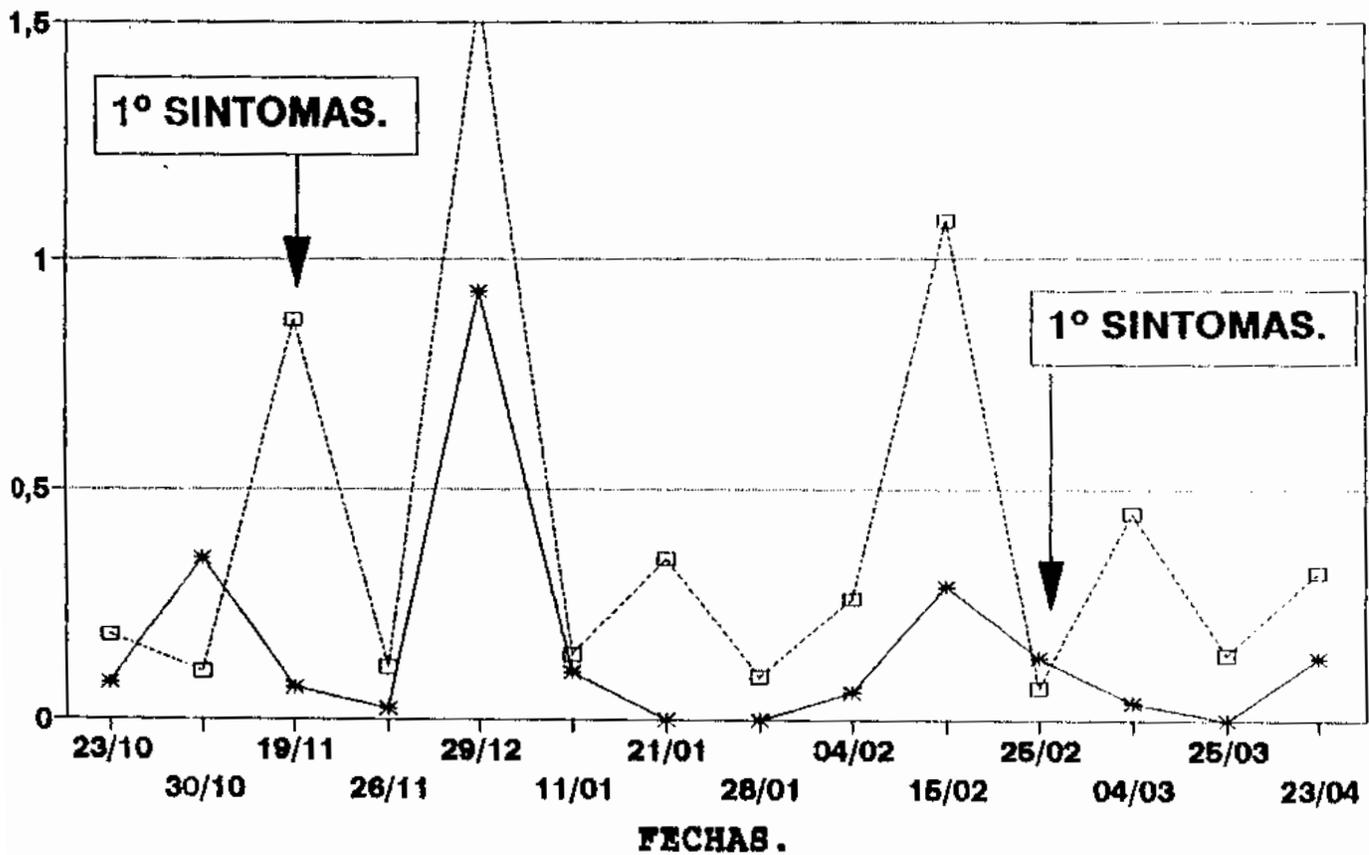
Fig. 1

**RESULTADOS DE DAS - ELISA.
DAMASCO CV. BULIDA (VI).**



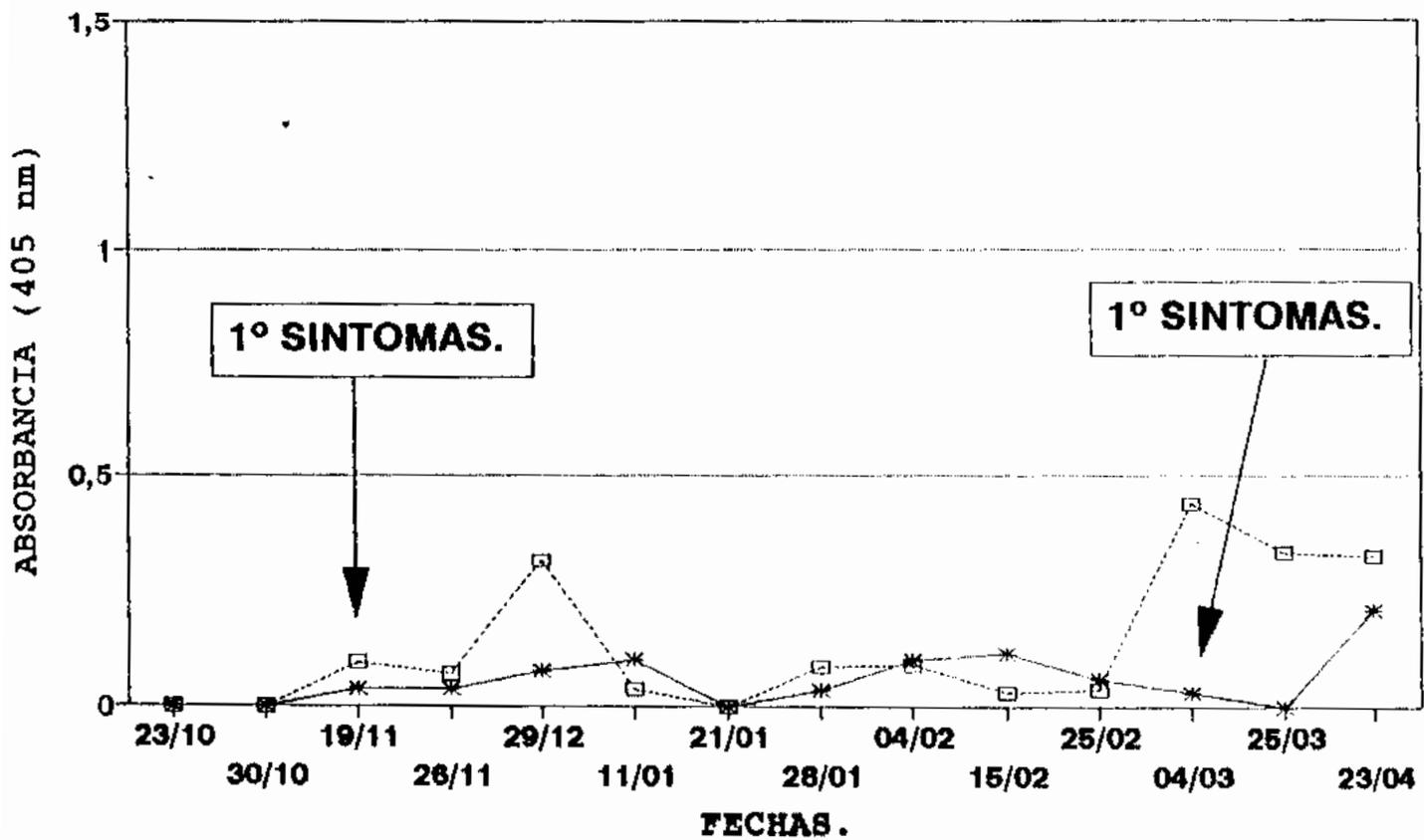
—*— RAMA. - -□- - HOJA.

**RESULTADOS DE DAS - ELISA.
CIRUELO CV.GOLDEN JAPAN (VII).**



—*— RAMA. —□— HOJA.

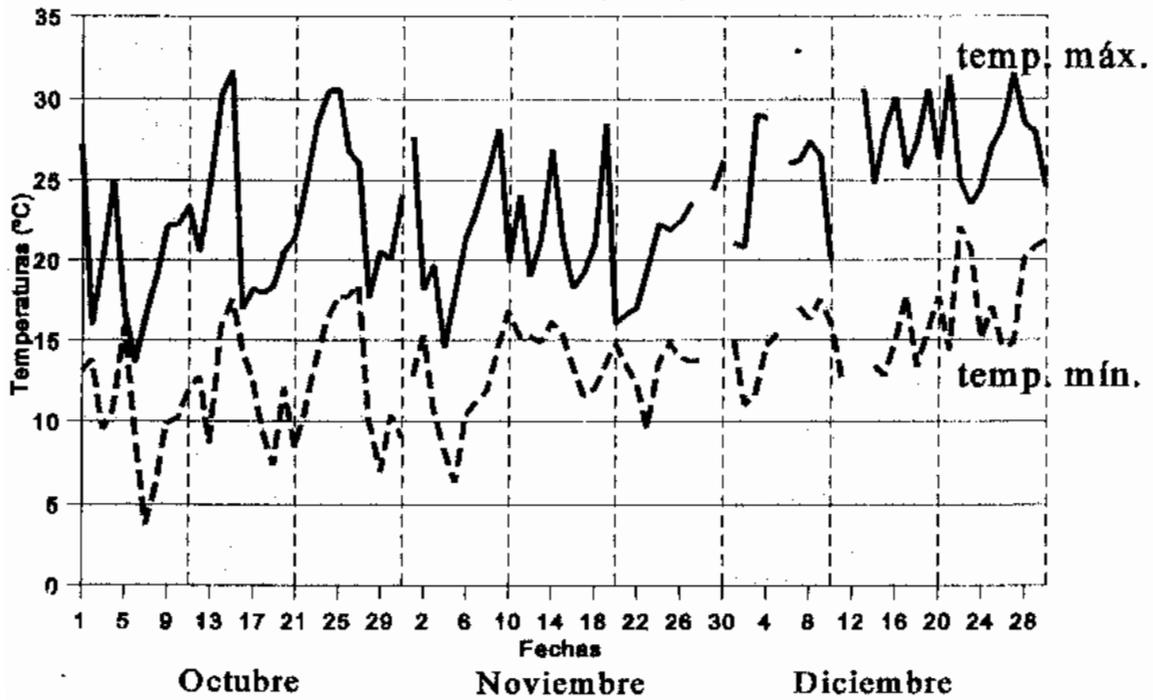
RESULTADOS DE DAS - ELISA.
CIRUELO CV. GOLDEN JAPAN (VIII).



—*— RAMA. - - □ - - HOJA.

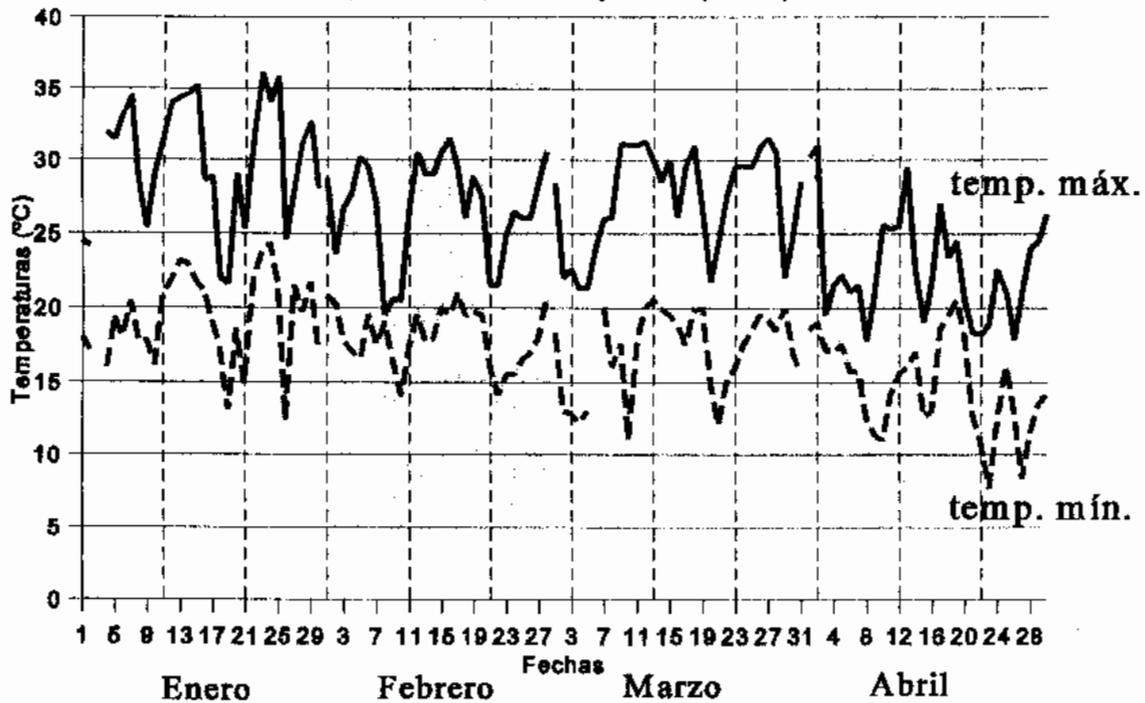
Temperaturas máx.y mín. diarias (°C)

Oct., Nov. y Dic. (1992).



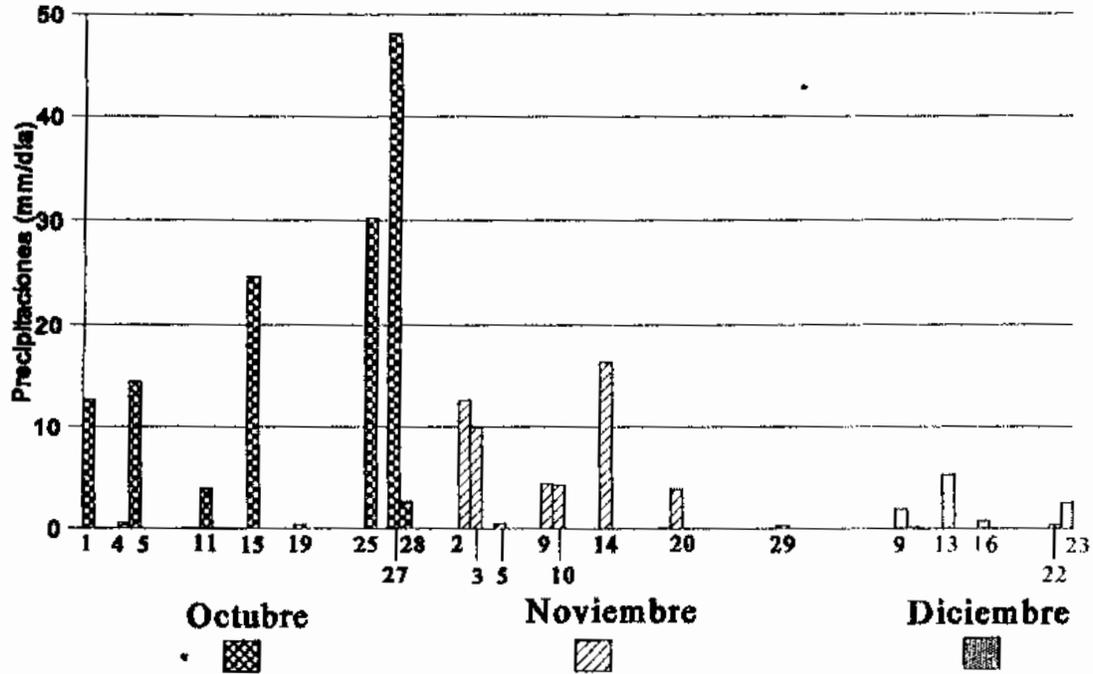
Temperaturas máx.y mín. diarias (°C)

Enero, Febrero, Marzo y Abril (1993)



Precipitaciones (mm/día)

Oct., Nov. y Dic. (1992).



Precipitaciones (mm/día)

Enero, Febrero, Marzo y Abril (1993).

