

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE AGRONOMIA

**Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp
michiganensis en lotes comerciales de semilla de tomate.**

por

Denice GOMEZ BELTRAMELLI

Laura MARTINEZ PINTOS

TESIS presentada como uno de
Los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.
(Orientación Producción vegetal
intensiva)

MONTEVIDEO
URUGUAY
1999

Tesis aprobada por:

Director : Inq. Agr. MARIA CRISTINA TABANI.
Nombre completo y firma

Nombre completo y firma

Nombre completo y firma

Fecha : 17 / 12 / 99.

Autor : Denise Gómez De Hamelli.
Nombre completo y firma

Laura Martínez Pintos
Nombre completo y firma

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

- A nuestra directora de tesis, Ing. Agr. María Cristina Pagani por su constante apoyo y dedicación permanente durante el desarrollo del trabajo.
- A la laboratorista de INIA Las Brujas, Wilma Walasek por su colaboración.
- A las Ings. Agrs. María Emilia Casanello y Vivienne Gepp, por las sugerencias y correcciones realizadas al trabajo.
- A todos los compañeros y amigos que colaboraron y apoyaron en todo momento.
- Al personal de Microscopia y Biblioteca de la Facultad de Agronomía.
- A los funcionarios de INIA Las Brujas.

Dedicamos este trabajo a nuestros padres.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACION	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VII
 1- <u>INTRODUCCION</u>	 1
2- <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	2
2.1- ANTECEDENTES.....	2
2.2- CARACTERIZACIÓN DEL CANCRO BACTERIANO.....	2
2.2.1- <u>Sintomatología</u>	2
2.2.2- <u>Organismo causal</u>	3
2.2.3- <u>Ciclo y desarrollo de la enfermedad</u>	4
2.2.4- <u>Control</u>	6
2.3- DIAGNOSTICO DE <i>Clavibacter michiganensis subsp.</i> <i>michiganensis</i>	8
2.3.1- <u>Test de hipersensibilidad en tabaco</u>	8
2.3.2- <u>Test de KOH</u>	8
2.3.3- <u>Pruebas bioquímicas</u>	8
2.3.3.1- Catalasa	8
2.3.3.2- Producción de citocromo oxidasa.....	9
2.3.3.3- Hidrólisis de la gelatina.....	9
2.3.3.4- Rojo de metilo.....	10
2.3.3.5- Hidrólisis del almidón	10
2.3.3.6- Hidrólisis del Tween.....	10
2.3.3.7- Reducción de nitrato	11
2.4- PRUEBAS DE LABORATORIO PARA LA DETECCION DE <i>Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis</i>	11
2.4.1- <u>Test de ELISA</u>	11
2.4.2- <u>Test de Inmunofluorescencia</u>	13
2.4.3- <u>Medios semiselectivos</u>	13
2.5- INOCULACION ARTIFICIAL DE BACT. FITOPATOGENAS.....	15
 3- <u>MATERIALES Y METODOS</u>	 17
3.1- OBTENCION DE CULTIVOS PUROS	17
3.1.1 - <u>Pruebas bioquímicas</u>	18
3.1.1.1- Catalasa	18
3.1.1.2- Producción de citocromo oxidasa	19
3.1.1.3- Hidrólisis de la gelatina.....	19
3.1.1.4- Rojo de metilo.....	20
3.1.1.5- Hidrólisis del almidón	20
3.1.1.6- Hidrólisis del Tween.....	20
3.1.1.7- Reducción de nitrato	21

3.1.2- <u>Test de KOH y Test de Elisa</u>	21
3.1.3- <u>Test de Hipersensibilidad en el tabaco</u>	21
3.1.4- <u>Conservación de la bacteria</u>	22
3.2- <u>DETECCION DE LA BACTERIA EN VARIEDADES COMERCIALES DE LA SEMILLA</u>	22
3.2.1- <u>Comparación de medios de cultivos</u>	22
3.2.2- <u>Métodos de extracción y detección de la bacteria en las semilla</u>	24
3.2.3- <u>Inoculación y reislamiento de la bacteria</u>	27
4- <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	28
4.1- <u>IDENTIFICACION DE AISLAMIENTOS</u>	28
4.2- <u>COMPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO</u>	29
4.3- <u>DETECCION DE Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis EN SEMILLAS DE TOMATE</u>	30
4.3.1- <u>Medios semiselectivos</u>	30
4.3.2- <u>Test de ELISA</u>	33
4.4- <u>TEST DE HIPERSENSIBILIDAD</u>	39
4.5- <u>TEST DE PATOGENICIDAD</u>	40
4- <u>CONCLUSIONES</u>	42
6- <u>RESUMEN</u>	43
7- <u>SUMMARY</u>	44
8- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	45
9- <u>APENDICES</u>	48

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro N°	Página
1. Identificación de los aislamientos bacterianos	18
2. Resultados de las pruebas bioquímicas	28
3. Conteo en dilución.....	29
4. Valores de absorbancia correspondientes al test de ELISA de los aislamientos provenientes de las variedades Coloso y Supermax	33
5. Valores de absorbancia correspondiente al test de ELISA de los aislamientos provenientes de las variedades Tommy y Fortaleza.....	34
6. Valores de absorbancia correspondiente al test de ELISA de los aislamientos provenientes de las cuatro variedades.....	36
7. Resultados de la inoculación de plantínes.....	40

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en el Uruguay es relevante dentro del sector hortifrutícola, ocupando una superficie de 1989 has y una producción de alrededor de 28.200 ton de acuerdo a información extraída del Censo General Agropecuario del Año 1990.

JUNAGRA destaca al tomate como uno de los rubros hortícolas de mayor incidencia en volumen total ingresado en el Mercado Modelo.

Se distinguen claramente dos zonas de producción; la zona sur, que se caracteriza por una producción de estación a campo y en menor proporción bajo invernáculo y la zona norte con producción de primor en contraestación y casi en su totalidad bajo invernáculo.

Las características de la producción bajo invernáculo y las condiciones dentro de éste han llevado a un incremento en la problemática sanitaria. Dentro de las enfermedades bacterianas, el cancro bacteriano del tomate, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, ha tenido una relevancia creciente en estos últimos años por su incidencia en la producción, provocando pérdidas importantes en los cultivos.

Este trabajo se origina ante la necesidad de determinar si la semilla de tomate comercializada en el país constituye una fuente de inóculo de *Clavibacter m.* subsp. *m.* siendo su detección, el objetivo central de la presente investigación.

Para cumplir con este objetivo se llevaron a cabo pruebas de laboratorio para la detección de la bacteria en lotes de semillas de diferentes orígenes.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTECEDENTES

Según SHERF, A. F. et al. (1986) el cancro bacteriano fue identificado por primera vez en Michigan en 1909 y la causa fue reportada un año más tarde. Esta enfermedad ha sido llamada Grand Rapids Disease, marchitamiento bacteriano del tomate, podredumbre del tallo, cancro del tallo, y mancha en ojo de pájaro. Actualmente se lo denomina cancro bacteriano del tomate.

Según SARASOLA, (1975), WARE en 1944 cita a Smith como el primero en describir esta enfermedad y denominarla Grand Rapids Disease, al encontrarla por primera vez en esa zona, en Michigan (EEUU).

Su presencia ha sido detectada en casi todos los países del mundo donde se cultiva tomate. En Uruguay fue reportado por primera vez por MOSCARDI, et al. en el año 1977.

2.2 CARACTERIZACIÓN DEL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE

2.2.1 Sintomatología

Según SHERF, A. F. et al. (1986) los síntomas del cancro bacteriano del tomate pueden presentarse en todas las partes de las plantas. Estas pueden ser afectadas en cualquier estado de su desarrollo. Dichos síntomas son manchas que se manifiestan en hojas, tallos y frutos, así como marchitamiento de hojas y en casos severos, de toda la planta.

El primer síntoma de marchitamiento es en las hojas inferiores. Por lo general se ve afectada una mitad del folíolo o un solo lado de la planta (marchitamiento unilateral) siendo ésta una característica particular de la enfermedad. Los pecíolos permanecen unidos al tallo. A medida que la enfermedad avanza el marchitamiento se generaliza y finalmente toda la planta colapsa.

SARASOLA, en 1975 describe que en los tallos, ramas y pecíolos

aparecen largas líneas, al principio de color amarillento y luego castaño, que pueden llegar a extenderse hacia la base del tallo. Bajo ciertas condiciones pueden abrirse y formar verdaderos canchales, que aparecen también en las nervaduras principales, los que han originado el nombre de cancro bacteriano con que se conoce esta enfermedad. En los tallos la médula se separa de la corteza y aparece de color amarillento y con numerosas cavidades.

Los síntomas en frutos se presentan como pequeñas manchas circulares, blancas al principio, castañas luego, con centro rugoso y un halo blanco. Las características de estas manchas han hecho que esta fase de la enfermedad se conozca con el nombre de "ojo de pájaro".

Estudios realizados por SAMISH, Z. et al. (1962) evidenciaron la entrada de la bacteria hacia el interior de la fruta a través del tejido conectivo del pedúnculo, y su posterior distribución en la pulpa. En caso de ataques muy severos, las lesiones pueden profundizarse y llegar a las semillas, las cuales de este modo serían portadoras de la bacteria. De las semillas infectadas tempranamente, la mayoría llegan a presentar manchas o a oscurecerse completamente y no maduran.

2.2.2 Organismo causal

El agente causal de esta enfermedad es la bacteria *Clavibacter m. subsp. m.* Dicha bacteria es un organismo aeróbico, Gram positivo, con una temperatura óptima de desarrollo entre 24-27°C, máxima de 35°C y mínima de 1°C.

Según la descripción del CMI (Commonwealth Mycological Institute) (1964) presenta formas corineforme miden 0.6-0.7 x 0.7-1.2 micras, las células aparecen simples o en pares, considerada actualmente móvil, de acidificación lenta, no forma esporas. La bacteria puede oxidar medios con carbohidratos. No es lipolítica. Puede licuar medianamente la gelatina, la hidrólisis del almidón es débil o ausente. Requiere aminoácidos para su crecimiento incluyendo biotina, ácido nicotínico y tiamina.

El patógeno puede ser mantenido en una condición viable y virulenta en nutriente agar, a 13°C, por al menos 58 meses.

Las colonias bacterianas pueden aparecer de colores amarillo, blanco y

rosado, siendo las más virulentas las amarillas y blancas.

2.2.3 Ciclo y desarrollo de la enfermedad

BRYAN, M (1930); STRIDER, D (1967); THYR, B (1971); UEMATSU, T et al (1977) citados por FATMI, et al (1988) afirman que la semilla de tomate es considerada la fuente de inóculo más importante de este organismo.

SHERF, A et al (1986) cita que existen referencias que indican que el organismo causal del cancro bacteriano puede sobrevivir en plantas vivas de tomate y en semillas, de 2,5 a 5 años en el suelo, 2 años en compost. 10 meses asociado a partes leñosas de la planta, en tallos muertos, y posiblemente en otros restos de plantas enfermas, y en malezas hospederas como solanáceas perennes.

Según el mismo autor, la diseminación ocurre por lluvia, viento, insectos, es trasladada por el agua, trabajadores e implementos usados durante el transplante, cultivo, cosecha, poda, raleo, pulverización.

El ciclo primario de la enfermedad puede comenzar por cualquiera de las fuentes en las que sobrevive el inóculo. La infección aparece posiblemente a través de los estomas, pero es más probable que penetre por heridas. Algunas heridas pueden ser causadas por movimiento de plantas asociado con viento, lluvia y prácticas culturales. Después de la infección, el patógeno puede moverse sistémicamente a través del xilema desde el cual invade el floema, médula y corteza.

La propagación secundaria puede ocurrir tanto en almácigos como en campos de producción. Las células bacterianas expuestas sobre la superficie de canchales y sobre tallos, hojas y manchas de los frutos pueden ser inóculo de nuevas infecciones. Otras fuentes son las bacterias dentro de la planta; estas bacterias pueden ser llevadas a otras plantas por tijeras e implementos durante la poda y otras prácticas culturales.

La propagación secundaria puede ser efectiva, dado que la incidencia de la enfermedad en el almácigo puede tener un incremento del 1% de infección asociado con las semillas infectadas, a 100% de infección al transplante.

La enfermedad se ve beneficiada por las condiciones ambientales que

propician el crecimiento succulento de las plantas de tomate. Las condiciones específicas que favorecen el desarrollo de la enfermedad incluyen una temperatura del aire entre 24 y 32°C, un periodo predisponente en el que la temperatura del aire o del suelo esté varios grados por encima o por debajo de 24 °C, condiciones de humedad óptima para el crecimiento de las plantas, intensidad de luz relativamente baja, alta concentración de nutrientes y un pH de 8.

Los síntomas aparecen más rápidamente en plantas jóvenes que en plantas viejas. Los mismos son más severos en suelos arenosos que en suelos con más materia orgánica. La infección en frutos, que da un síntoma de ojo de pájaro, es favorecida por el riego por aspersión el cual humedece el fruto; este síntoma raramente ocurre en invernáculos donde el fruto no es salpicado por el riego.

Según investigaciones realizadas por BERRY, S. Z. et al. (1988) el desarrollo de esta enfermedad en las plantas es más rápido con bajos aportes de calcio y nitrógeno, mientras que con altos niveles de dichos nutrientes, la tasa de desarrollo de la enfermedad disminuye. También se observó que una proporción alta de $(Ca+Mg)/(Na+K)$ tiene una alta correlación con la reducción de la severidad de la enfermedad.

4. Según CHANG et al (1992), el período de incubación y la severidad del cancro bacteriano, se ven influenciados por diferentes factores como temperatura, concentración del inóculo, edad y resistencia del huésped. El período mínimo de incubación requerido para la aparición de síntomas localizados. (manchas en hojas, daño en ojo de pájaro en frutos, etc.), es de 3 a 5 días. mientras que el período de incubación para síntomas sistémicos varía entre 7 y 84 días, dependiendo de la interacción entre huésped - patógeno y ambiente.

Estos mismos autores observaron que el marchitamiento se presenta más frecuentemente con altas temperaturas, mientras que los canchros prevalecen a bajas temperaturas.

2.2.4 Control

De acuerdo con SHERF, A. et al. (1986) luego de la infección y al comienzo de la propagación de la enfermedad es muy difícil su control. Los controles más efectivos son aquellos que reducen el inóculo inicial, el cual es importante en el ciclo primario de la enfermedad. Esta puede ser probablemente prevenida siguiendo una adecuada rotación de cultivos, erradicación de malezas solanáceas, usando sólo semillas sanas, pulverizando los plantines con productos adecuados, y usando materiales para el entutorado libres del patógeno.

La infección secundaria en el cultivo puede ser minimizada si se evita trabajar cuando la humedad ambiental es alta.

Según SARASOLA, A. (1975) es importante como medida de control el quemado de las plantas atacadas y evitar su empleo en la producción de abono. También es necesario realizar la desinfección de manos y materiales usados en las prácticas de manejo como en el desbrote.

Al no tener certeza de la sanidad de la semilla es conveniente proceder a su desinfección. SHERF, A. et al. (1986) cita tres tratamientos efectivos para la desinfección de semillas; mantener la semilla en remojo durante 30 minutos en agua caliente a 55,5 °C; durante 20 a 40 minutos en 1,05% de hipoclorito de sodio, o sumergirla durante 5 o 10 horas en ácido clorhídrico al 5%.

BLOOD (1937) citado por SARASOLA, A. (1975) sugiere la inmersión de las semillas en una solución de ácido acético al 0,6% durante 24 horas.

MOSCARDI et al (1977) recomiendan la fermentación de la semilla en un lugar fresco durante 4 días. Se pone en recipiente de vidrio, pulpa, jugo y semilla sin agregar agua. Se debe revolver la pasta 2 veces por día para sumergir la parte que flota. La semilla tratada por este procedimiento toma un color más oscuro pero no es alterada en su germinación. Los mismos autores también sugieren sumergir la semilla en ácido acético glacial al 0,6- 0,8% durante 24 horas y luego dejar secar.

En el año 1959 ya discutían el uso de compuestos mercuriales orgánicos como herramienta química para eliminar la bacteria de la superficie de la semilla. Posteriormente en el año 1970, según GITAITIS et al., estos compuestos fueron prohibidos.

Según BRYAN (1930), no se conoce ningún tratamiento para la destrucción de la infección interna bajo condiciones comerciales sin peligro de dañar la semilla.

Con respecto a la resistencia varietal, SARASOLA, A. (1975) cita los trabajos de hibridación que se llevaron a cabo en Rusia con variedades que resultaban promisorias (HAYWARD, 1964). En Italia, los cultivares locales parecen ser más resistentes que los americanos. THYR, B D (1967) señala que la resistencia es expresada como tolerancia a la enfermedad por sobrevivencia prolongada de plantas, cuando son sistémicamente inoculadas en estado de tres hojas, pero no como resistencia a la infección.

BERRY et al (1988), más recientemente, demostraron que es posible identificar plantas con resistencia intermedia, presentando resistencia ante niveles bajos de concentración de inóculo.

Con respecto al control químico del cancro bacteriano, SHERF, A.F et al (1986) señalan que la propagación puede disminuirse en un 50% con el uso de cobre, pulverizando en intervalos regulares de 5 a 7 días. Según STRIDER, D.L (1969) el cobre tendría que ser usado porque la estreptomycin no tiene un efecto claro para el uso sobre las tomatas después que estas han fructificado. El mismo autor cita que pulverizaciones con cobre y estreptomycin han sido previamente reportadas por su efecto en la reducción de la propagación de cancro bacteriano en Nueva Zelanda y Australia.

En una publicación más actual, TELLO, J.C. et al, (1995), señalan ciertos tratamientos que deberían entenderse como preventivos para evitar infecciones entre plantas y/o entre cultivos. Destacan el uso de compuestos de cobre mezclados con Zineb (etilen- bisditiocarbamato de Zinc).

En Uruguay, MOSCARDI et al (1977), en una publicación que aún mantiene su vigencia, recomiendan la aplicación de productos cúpricos (Caldo Bordelés, oxicluros), o mezclas de cúpricos con Manzate D o Dithane M 45, para proteger las infecciones externas a frutos verdes o follaje, pero dichos tratamientos no afectan las infecciones vasculares internas. Cabe señalar que los productos cúpricos tienen una importante acción bacteriostática.

Cabe destacar que el caldo bordelés (mezcla de CuSO_4 y Ca(OH)_2) presenta una mayor persistencia sobre la superficie vegetal, con respecto al oxicluro de cobre, liberando lentamente sus iones Cu al mojarse con la lluvia. Tanto Zineb como Mancozeb (Manzate D, Dithane M 45) son fungicidas orgánicos pertenecientes al grupo de los Ditiocarbamatos, que contienen Zinc

en su fórmula, y se aplican comúnmente con productos cúpricos para controlar bacterias.

2.3 DIAGNOSTICO DE *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

2.3.1 Test de Hipersensibilidad en tabaco

KLEMENT (1963), KLEMENT et al (1964), citado por KLEMENT (1990), expresa que, como sólo las bacterias fitopatógenas, pero no las saprófitas tienen la propiedad de inducir necrosis hipersensitiva en hojas de tabaco o de otras plantas no hospedadoras, el Test del tabaco es ideal para una rápida detección de la patogenicidad de la bacteria en cuestión.

2.3.2 Test de KOH

Según CMI (1964) la bacteria en estudio pertenece al grupo de las Gram positivas.

En 1938, RYU, citado por SUSLOW, T.V et al (1982) describió el método que utiliza hidróxido de potasio (KOH) al 3% para diferenciar bacterias Gram positivas y negativas sin tinción. En el mismo artículo se destaca al test de KOH como una prueba rápida, simple y completamente precisa. Este método se basa en una disrupción de la pared celular de las bacterias Gram negativa, en solución alcalina liberando ácido deoxyribonucleico el cuál causa el hilo viscoso. Las bacterias que pertenecen al grupo Gram-positivo no hacen lisis con KOH al 3 %.

2.3.3 Pruebas bioquímicas

2.3.3.1 Catalasa

La catalasa es una enzima producida por determinados microorganismos que tiene la propiedad de desdoblar el peróxido de hidrógeno.(agua oxigenada).



Según SANDS, D.C. (1990), la mayoría de las bacterias patogénicas dan una reacción positiva, por lo que no es un test particularmente usado, excepto para ver la viabilidad del cultivo.

2.3.3.2 Producción de citocromo oxidasa

Este test fue desarrollado por KOVACS en 1956, citado por SANDS, D.C. (1990).

Según DA SILVA ROMEIRO, R. (1982), esta prueba tiene como objetivo comprobar la producción de citocromo oxidasa por la bacteria. Se basa en el principio de que, en presencia de tetrametil o dimetil-p-fenileno diamina, esa enzima induce la formación de un compuesto que posee un grupo cromóforo. Si el alfa-naftol no es producido por la bacteria, se forma, por la polimerización de dos moléculas de dimetil-p-fenileno-diamina, un dímero que también posee un grupo cromóforo.

La bacteria en estudio presenta una reacción negativa en esta prueba, sin viraje de color en el tiempo prefijado.

2.3.3.3 Hidrólisis de la gelatina

Este test citado por DA SILVA ROMEIRO, R. (1982) comprueba la producción por la bacteria de la enzima extracelular denominada gelatinasa, que tiene la propiedad de licuar la gelatina.

Según SANDS, D.C. (1990) la gelatina es hidrolizada por un número de *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Erwinia*. Se espera para *Clavibacter m. subsp. m.* un resultado negativo.

2.3.3.4 Rojo de Metilo

DA SILVA ROMEIRO, R (1982), cita al Rojo de Metilo como un indicador que comprueba la producción de ácidos por la bacteria. Por la descomposición enzimática de azúcares como la glucosa, hay producción de ácidos orgánicos lo que disminuye el pH y el indicador vira a coloraciones rojizas determinando una reacción positiva.

La bacteria en estudio no produce ácidos a partir de carbohidratos, por lo que se espera un resultado negativo, sin viraje de coloración.

2.3.3.5 Hidrólisis del Almidón

Según DA SILVA ROMEIRO, R(1982) con esta prueba se pretende observar la producción de β -amilasa; esta enzima desdobla el almidón en sacáridos más simples, más solubles y de cadena menor, como glucosa, dextrosa, etc.

La bacteria en estudio presenta un resultado negativo ante esta prueba.

2.3.3.6 Hidrólisis del Tween

Esta prueba citada por SANDS, D.C. (1990) permite observar la actividad del ácido graso estérico en un medio conteniendo Cloruro de Ca y Tween 80. Una reacción positiva aparece cuando el ácido oleico es hidrolizado por el Tween 80. El calcio en el medio forma un complejo insoluble con el ácido graso, dando una zona opaca de cristales rodeando la colonia positiva.

La bacteria estudiada tiene una reacción negativa al ser sometida a esta prueba.

2.3.3.7 Reducción de Nitrato

Según Lelliot, R. A.(1987) algunas bacterias oxidativas tienen la habilidad de crecer en condiciones anaeróbicas ricas en iones nitrato. La energía es derivada de la reducción del nitrato a nitrito.

Tanto el CMI (1964) como BRADBURY, J.F (1986) señalan a la *Clavibacter m.subsp.m.* como una bacteria incapaz de llevar a cabo la reducción del nitrato.

2.4 PRUEBAS DE LABORATORIO PARA LA DETECCIÓN DE *Clavibacter m. subsp. m.*

Para proceder a la detección de *Clavibacter m. subsp m.* en semillas, se utilizaron tradicionalmente las siguientes técnicas: pruebas serológicas como Test de ELISA y Test de Inmunofluorescencia; y medios semiselectivos.

Las reacciones serológicas son el resultado de la combinación específica entre antígenos y anticuerpos. Un antígeno se define como una sustancia (generalmente una proteína) que cuando se le inyecta a un animal de sangre caliente induce la formación de proteínas que reaccionan específicamente con el antígeno y se denominan anticuerpos.

2.4.1 Test de ELISA.

El Test de ELISA (Enzyme -Linked Immunosorbent Assay) fue reportado inicialmente en 1971 por Engvall y Perlmann. Ha llegado a ser reconocido por su potencial en la detección de bacterias patógenas de plantas, organismos micoplasmáticos y virus.

El test de ELISA es una técnica serológica de alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía.

Desde su primer reporte el Test de ELISA ha sido sometido a algunas variaciones en su procedimiento. En 1988 una publicación del MGAP (Convenio

IICA – DSV) diferencia los siguientes tipos de reacción inmunoenzimática:

- a- Antígeno marcado. -ELISA competición
- b- Anticuerpo marcado. -ELISA directo.
 -ELISA indirecto.
 -ELISA "sandwich" -doble DAS
 -heterólogo (HADAS)

El método de ELISA indirecto usa un anticuerpo secundario, usualmente una antiglobulina conjugada con enzima que es agregado después de la adición del anticuerpo primario.

El más usado en patología vegetal es el ELISA DAS (double antibody sandwich) que usa el método directo, y en el que el anticuerpo se fija inicialmente en un soporte sólido; luego se agrega el antígeno que reacciona con el anticuerpo formando el complejo antígeno-anticuerpo y posteriormente se adicionan anticuerpos específicos al antígeno marcados con una enzima que reacciona donde se encuentra el antígeno previamente inmovilizado. Para detectar la reacción finalmente se agrega un sustrato sobre el cual actúa la enzima de marcaje.

Para llevar a cabo la detección de la bacteria en estudio se utilizó el método de ELISA DAS, cuyo desarrollo se explicita en detalle más adelante.

GITAITIS, R.D *et al.* (1991) compara en su trabajo el medio semiselectivo CNS, el FAMES (basado en análisis de cromatografía gas líquida) y el Test de ELISA, concluyendo que este último método puede ser el más práctico debido a que abarca un gran número de muestras en un menor tiempo, pudiendo obtener resultados dentro de las 4 a 6 horas. Además destaca la ventaja de que pueden ser testeadas 96 muestras a la vez ocupando un espacio reducido en el incubador.

VAN VUURDE, J.W.L en 1985 describe las ventajas y desventajas de varios métodos en la detección y diagnóstico de bacterias patogénicas. Destaca como ventajas de las técnicas serológicas en general la ausencia de interferencias de saprófitas (antisuero específico) y el hecho de ser adecuadas para la aplicación rutinaria de muestras en serie.

Con respecto al Test de ELISA señala que puede ser automatizado (incluyendo cuantificación e interpretación). Dentro de las desventajas se incluye el riesgo de falso positivo (interpretación basada en un solo criterio) la

baja sensibilidad $1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ células/ml⁻¹ mientras tanto STEPHENS et al, 1988 citado por GITAITIS, R.D et al en 1991 estiman que fue necesario 1×10^4 unidades formadoras de colonias de *Clavibacter m subsp m* /ml de buffer extracción para obtener una reacción positiva buffer. Esto representa una sensibilidad de 1×10^3 ufc. por celda.

2.4.2 Test de inmunofluorescencia

Según VAN VUURDE. et al (1990), los antígenos expuestos de una pared celular bacteriana fijada sobre un portaobjeto reaccionan con anticuerpos contra esos antígenos. Como una célula cubierta con anticuerpo no puede distinguirse de una célula no cubierta, con una luz microscópica, los anticuerpos son conjugados con un colorante. Por ejemplo Isotiocinato fluorescente (FITC), conjugado con anticuerpos, da una fluorescencia verde brillante en las reacciones positivas contrastando contra un fondo oscuro bajo luz ultravioleta en un microscopio compuesto. Este proceso se conoce como inmunofluorescencia directa o tñido fluorescente del anticuerpo.

En un test de inmunofluorescencia indirecto, anticuerpos específicos no conjugados, producidos en un conejo, reaccionan en un primer paso con los antígenos de la pared celular. En un segundo paso, las células de anticuerpo de recubrimiento son teñidas con tinte fluorescente, etiquetado como segundo anticuerpo producido en cabras u ovejas contra el anticuerpo del conejo.

No se han observado diferencias claras en cuanto a la especificidad y sensibilidad del Test de inmunofluorescencia directo o indirecto para bacterias fitopatogénicas.

2.4.3 Medios semiselectivos

Según DA SILVA ROMEIRO, R. (1982) la composición de algunos medios selectivos se realiza para permitir solo el crecimiento de determinada especie o grupo de especies. En otros casos, el medio se formula de tal manera que aunque en él crezcan otros organismos, las colonias de organismos en estudio se distinguen fácilmente por la forma, color, aspecto, etc. La mayoría de los medios selectivos combinan esos dos principios básicos.

KLEMENT, et al (1990) cita la definición de medios semi- selectivos extraída del Manual Difco (1984). son supresivos o previenen el crecimiento de un grupo de organismos mientras que permiten el crecimiento de otro grupo, proveniente de una flora mixta.

Aunque los medios selectivos se emplean principalmente para facilitar los trabajos de aislamiento de bacterias fitopatógenas del órgano vegetal enfermo pueden ser importantes en la identificación. Después de comprobada la patogenicidad de un aislamiento bacteriano, los medios selectivos pueden ser útiles en la identificación del género o también de la especie en ciertos casos.

Dentro de las ventajas de dichos medios se destaca su fácil realización, su bajo costo y la recuperación del cultivo en forma viable que posibilita su uso para la determinación de patogenicidad.

Las desventajas son el tiempo necesario para el crecimiento del organismo en las placas, el espacio requerido para la incubación de las mismas, su complejidad, el gran número de componentes que son necesarios y la dificultad de encontrar en el mercado nacional algunos de los reactivos.

Para *Clavibacter m. subsp. m.* se citan en bibliografía los medios semiselectivos SCM, KBTS, CNS.

GITAITIS, R.D, et al. (1989) destaca que el medio CNS fue desarrollado para la recuperación de *C. nebraskense* a partir de plantas de maíz, rastrojo y suelo. En este medio *Clavibacter. m. subsp. m.* se desarrolla con un color amarillo brillante, convexa, colonias brillantes con una tendencia a ser fluida, un promedio de recuperación del 85%.

FATMI, M et al. (1988) catalogan al medio CNS y otros medios como no útiles e inadecuados en la selectividad de *C. m. subsp. m.* para ensayos con semillas de tomate. El porcentaje de recuperación citado para este medio es de 11 - 62,4% en comparación al medio NBY. Dentro de los problemas en su uso, se destaca la dificultad de diferenciar colonias amarillas de *Clavibacter m. subsp. m.* de otras colonias amarillas saprófitas. Mientras tanto, para el medio SCM los mismos autores destacan el control de crecimiento de colonias saprófitas asociadas a la mayoría de las semillas, y los altos resultados obtenidos en la recuperación de *C. michiganensis*. Las colonias de *Clavibacter michiganensis* son distinguidas debido a su mucosidad y a su coloración moteado gris a negro, mientras que las bacterias saprófitas toman más telurito de potasio tornándose negras o no lo toman y permanecen con menos color.

Según FATMI, M et al. en otro trabajo (1989) las colonias de *Clavibacter m. subsp. m* en el medio SCM, crecen irregulares, convexas, mucosas, y presentan un moteado de coloraciones grises a negras.

GITAITIS, R.D et al. (1989) destacan al medio KBTS como un medio útil en el aislamiento de *Clavibacter m. subsp. m* de semillas de tomate y partes de plantas. Las colonias de *Clavibacter m. subsp. m* en este medio son grandes, mucosas y grises o pequeñas, negras y llanas

2.5 INOCULACIÓN ARTIFICIAL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Según DA SILVA ROMEIRO, R (1982), este método permite la confirmación de la fitopatogenicidad de la bacteria aislada, enriqueciendo además la información con respecto a la enfermedad, al patógeno, al modo de penetración, período latente de infección, sintomatología típica y atípica y evolución de síntomas.

En la inoculación artificial de bacterias fitopatógenas se debe tener siempre presente que la penetración es típicamente pasiva, a través de aberturas naturales o de heridas.

Algunos factores de los cuales depende el éxito de la inoculación artificial son: concentración de la suspensión bacteriana, edad de la planta y del cultivo, técnica elegida, uso o no de pre-tratamiento, condiciones ambientales, etc.

DA SILVA ROMEIRO, R (1982), afirma que para las inoculaciones se deben utilizar cultivos jóvenes, con 18 a 24 horas de edad. La concentración de la suspensión debe estar entre 1×10^7 a 1×10^8 células/ μ l.

El mismo autor cita que las técnicas utilizadas con las cuales se pretende obtener mayor éxito son:

Atomización: Es una técnica generalmente empleada para patógenos de hojas que penetran principalmente a través de los estomas.

Consecuentemente, las plantas que se van a inocular se mantienen 24 horas en una cámara húmeda para facilitar la penetración. Después de la inoculación, las plantas se deben mantener nuevamente en la cámara húmeda

por 24 horas más para evitar que los estomas se cierren • la suspensión se evapora antes de que ocurra la penetración. Se debe atomizar en ambas caras de la hoja, principalmente en la cara inferior, donde los estomas están presentes en mayor número.

Inyección: Con auxilio de una jeringa hipodérmica provista de una aguja bien fina, se inyecta o se infiltra la suspensión bacteriana en el tejido. Generalmente esta técnica se utiliza para la realización de la reacción de hipersensibilidad.

Uso de abrasivos: Esta técnica se emplea generalmente para patógenos que penetran principalmente a través de heridas. Se considera muy eficiente para órganos vegetales que se hayan recubiertos por una capa cerosa. Se aplica el abrasivo (Por ejemplo, carborundum), en pequeña cantidad sobre la superficie del órgano vegetal y enseguida, con el dedo, pincel o gasa, se esparce la suspensión bacteriana. Después se lleva la planta inoculada a una cámara húmeda por 24 horas, lo que generalmente beneficia el proceso infectivo.

Picado: Con un estilete o una aguja estéril se toca la colonia o se sumerge en la suspensión bacteriana y se pica algunas veces el órgano vegetal que se va a inocular. Una variante más práctica del método consiste en acoplar una aguja o estilete a un pincel. Se moja el conjunto en la suspensión y se pica el órgano.

Raíces: Muchas bacterias como *C. michiganensis* penetran a través de las raíces. Una técnica que usualmente se emplea para la inoculación artificial consiste en lavar cuidadosamente el sistema radicular de la planta - prueba y después de seccionar la extremidad de algunas raíces, el sistema radicular se sumerge por algún tiempo en la suspensión del inóculo. Luego de este tratamiento la planta - prueba se transplanta.

En algunos casos se acostumbra a sembrar las secciones de las extremidades de las raíces, pues el simple arranque y lavado del sistema radicular puede ocasionar heridas suficientes para la penetración de la bacteria.

• Otra posibilidad sería el transplante de la hospedante susceptible a un recipiente conteniendo tierra estéril, la cual previamente se regó con una suspensión del inóculo.

3. MATERIALES Y METODOS

El trabajo fue realizado en el laboratorio de fitopatología del INIA Las Brujas, Rincón del Colorado, Canelones. En primer lugar se obtuvieron cultivos puros de la bacteria en estudio a partir de materiales proporcionados por la Facultad de Agronomía y productores del Norte y Sur del país. Para ello se recurrió a las siguientes técnicas: pruebas bioquímicas, test de KOH, Test de hipersensibilidad en tabaco y Test de ELISA. Estos cultivos fueron utilizados como testigo positivo en las pruebas siguientes.

Posteriormente se llevo a cabo la detección de la bacteria *Clavibacter m.* subsp. *m.* en lotes de semillas de tomate comercializadas a nivel nacional. El procedimiento utilizado consistió en la extracción de la bacteria mediante los procesos de macerado y agitación, y su detección con medios semiselectivos y test de ELISA. Su presencia fue confirmada con la inoculación y el reaislamiento en plantines de tomate de las colonias sospechosas y mediante un nuevo test de ELISA.

4 3.1 OBTENCION DE CULTIVOS PUROS

Se realizaron aislamientos a partir de plantas enfermas de tomate que presentaron sintomatología típica de cancro bacteriano, provenientes de cultivos en invernáculos de Salto y de Canelones; de plántulas infectadas artificialmente en Facultad de Agronomía (Montevideo), y repiques de cultivos liofilizados (DGSA-UY 069-12/97) y (DGSA-UY 023-03/97).

Se dilaceraron fragmentos de vasos y médula de zonas con síntomas y fragmentos de hojas con manchas blanquecinas, en agua destilada estéril. El material vegetal fue desinfectado con hipoclorito al 2% durante 2 minutos y con agua destilada. Se maceraron los fragmentos vegetales, y se estrilaron en placas con NAD (Nutrient Agar Dextrose), (Agar nutritivo 23gr/lit, dextrosa 5 gr/lit).

Las placas se incubaron a 25°C durante 48 a 72 hs. Se hicieron repiques con una frecuencia de 48- 72 horas con el objetivo de obtener cultivos puros y jóvenes. El número de repeticiones fue de 2 o 3 placas por aislamiento.

La selección de placas a repicar, y dentro de ellas la zona a repicar se determinaba por observaciones de las características morfológicas del cultivo, seleccionando colonias de forma no muy circular, elevación convexa, borde entero, 1 a 2 mm. de diámetro, de color amarillo pálido.

La procedencia de los aislamientos bacterianos realizados con el objetivo de ser utilizados como testigos en los posteriores test para la detección del patógeno en las semillas, se señalan a continuación en el cuadro N° 1.

CUADRO N° 1 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS

Aislamientos	Lugar de extracción	Origen de procedencia
N° 2	Plántula	Facultad de Agronomía
N° 3	Plántula	Facultad de Agronomía
N° 4	Plántula	Facultad de Agronomía
N° 5	Sistema vascular de planta.	Predio de la zona Norte
N° 7	Sistema vascular de planta.	Predio de la zona Norte
N° 9	Sistema vascular de planta.	Predio de la zona Norte
N° 10	Sistema vascular de planta.	Predio de la zona Norte
N° 18	Sistema vascular de planta.	Predio de la zona Sur
Cm 12	Liofilizado	INIA Las Brujas
Cm 13	Liofilizado	INIA Las Brujas
Xc	Congelada	INIA Las Brujas

Cm *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*

Xc *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

3.1.1 Pruebas bioquímicas

3.1.1.1 Catalasa

Se preparó un medio de cultivo conteniendo los siguientes componentes: 10 gr. de sacarosa, 8 gr. de caseína ácida hidrolizada, 4 gr. de extracto de levadura, 2 gr. de K_2HPO_4 (Anhidro), 0,3 gr. de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Luego de crecer la bacteria en este medio durante 48 horas, se adicionaron algunas gotas de

agua oxigenada.

La producción de catalasa por el organismo (reacción positiva) se observó a través de la formación de burbujas o efervescencia.

3.1.1.2 Producción de citocromo oxidasa

Con anza de platino se extrajeron muestras de los distintos aislamientos a testear desde colonias creciendo en NAD (Nutrient agar dextrose). Dichas muestras fueron colocadas sobre un pequeño disco (Differentiation Disk Oxidase). Una reacción púrpura dentro de 10 segundos indicaba una reacción positiva. Una reacción retardada se obtenía entre 10 y 60 segundos. Se consideró una reacción negativa cuando la coloración púrpura demorara más de 60 segundos en aparecer.

3.1.1.3 Hidrolisis de la gelatina

Se preparó un medio de cultivo con los siguientes componentes por litro de agua destilada: 8gr. de caseína ácida hidrolizada, 4gr. de extracto de levadura, 150 gr. de gelatina. Dicho medio fue distribuido en tubos, los cuales se autoclavarón y enfriaron en agua helada.

Posteriormente se procedió a la siembra con anza de platino recta, sumergiéndola en el centro de la columna del medio. Los tubos fueron mantenidos durante dos semanas con temperaturas iguales o inferiores a 20 C, y luego se colocaron en el refrigerador por un tiempo antes de realizar la interpretación de los resultados. Los tubos que luego de esta práctica permanecían sólidos evidenciaban resultados negativos ante esta prueba.

Se utilizó como testigo positivo, un cultivo de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

3.1.1.4 Rojo de metilo

La bacteria fue sembrada en un medio conteniendo por litro de agua destilada; 5 gr. de glucosa, 5 gr. de peptona, 5 gr. de K_2HPO_4 . Luego de crecer en este medio durante 72 horas, se le adicionaron 5 gotas de solución al 0,02% de Rojo de Metilo por mililitro de medio de cultivo. El desarrollo de una coloración roja indicaba una reacción positiva.

Para realizar la comparación con un testigo positivo, también fue sembrada la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

3.1.1.5 Hidrólisis del almidón

Se preparó un medio de cultivo conteniendo los siguientes componentes por litro de agua destilada : 10 gr. de almidón soluble, 10 gr. de caseína ácida hidrolizada, 1 gr. de glucosa, 3 gr. de Na_2HPO_4 , 0,1gr. de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15gr. de agar. La bacteria fue sembrada en cajas de Petri conteniendo el medio anteriormente descrito, en forma de estrías sinuosas, con anza de platino. La superficie del medio fue inundada con lugol 7días después de la siembra. En caso de que el almidón haya sido hidrolizado, alrededor de los lugares de crecimiento se formaban zonas claras, en contraste con el resto de la superficie del medio que se tornaban azul.

La bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, fue utilizada como testigo en esta prueba. Según descripción del CMI (1964) esta *Xanthomonas*, a diferencia de otros patovares, presenta en esta prueba una hidrólisis del almidón baja e incompleta.

3.1.1.6 Hidrólisis de Tween

Se realizó un medio base con los siguientes componentes por litro de agua destilada: 10 gr. de peptona, 0,1 gr. de $CaCl_2$, 5 gr. de $NaCl$, 15gr. de agar. El pH fue ajustado a 7,4. Por otro lado se autoclavarón 10 ml/lit. de Tween 80 a 121° C durante 15 minutos, separadamente de la base. Ambos componentes fueron combinados, luego se sembraron las bacterias en ese

medio. Las placas de Petri fueron incubadas durante 7 días a 25 °C. Un precipitado blanco lechoso alrededor de las colonias demostró la habilidad para hidrolizar el líquido Tween 80.

El testigo positivo fue *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*.

3.1.1.7 Reducción de nitrato

Para detectar una posible reducción de nitrato a nitrito en los aislamientos seleccionados, se sembraron las diferentes colonias en un medio conteniendo los siguientes componentes, creado por FAHY y HAYWARD (1983) (g/l): Peptone (Difco) 10; NaCl 5,0; KNO₃ 2,0; (Difco) 3,0. El pH se ajustó a 7,0 con NaOH concentrado. El medio se dispensó en tubos, se autoclavó y se sembró introduciendo el anza cargada dentro de éste. Posteriormente se llenaron los tubos con agar agua al 3%. Buen crecimiento en cinco días a 27 °C era indicativo de denitrificación.

3.1.2 Test de Hipersensibilidad en Tabaco.

Los aislamientos fueron sometidos a pruebas de Hipersensibilidad en Tabaco: se inoculó una suspensión bacteriana en agua estéril de aproximadamente 1×10^9 cel./ml de cada aislamiento en varias hojas de la misma planta. Se inoculó además una suspensión testigo (agua), y un testigo positivo constituido en nuestro caso por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Seguidamente se mantuvieron las inoculaciones en cámara húmeda por 24 hs. hasta observar los resultados.

3.1.3 Test de KOH y Test de ELISA

Los aislamientos que superaron los pasos anteriores, cumpliendo con los requisitos necesarios para *Clavibacter m.* subsp. *m.*, fueron sometidos a la determinación de Gram mediante el método de KOH y posteriormente a un test de ELISA para confirmar los resultados. Para el test de KOH se dispensaron

sobre un portaobjetos 2 gotas de solución de hidróxido de potasio al 3% (p/v). Con un anza flameada se tomó una muestra de las colonias bacterianas provenientes de los diferentes aislamientos a testear, mezclándolos con dicha solución, con movimientos circulares. Luego de 5 a 8 segundos se observó la presencia o ausencia de filancia.

3.1.4 Conservación de la bacteria

Para la conservación de las bacterias en estudio se utilizaron dos métodos. Por un lado se sembraron los aislamientos seleccionados en tubos de vidrio conteniendo NAD, el cual fue dispensado en forma de pico de flauta. Se incubaron a 26 °C durante 48 horas, luego fueron retirados de la incubadora y mantenidos a temperatura ambiente. El otro método fue, conservarlas en un freezer a - 45 °C en tubos Eppendorf con una solución acuosa de glicerol al 20%.

3.2 DETECCIÓN DE LA BACTERIA EN VARIEDADES COMERCIALES DE SEMILLA.

Para llevar a cabo la detección de la *Clavibacter m.subsp.m* a partir de lotes comerciales de semilla se utilizaron los siguientes métodos: Test de ELISA y Medios Semiselectivos.

Las variedades de semillas comerciales fueron seleccionadas por su importancia a nivel nacional. Dichas variedades son: Coloso, Supermax, Fortaleza y Tommy.

Variedades	Origen
♦ Coloso	Petoseed
♦ Supermax	Petoseed
♦ Fortaleza	Rogers- Novartis
♦ Tommy	Hazera

3.2.1 Comparación de medios de cultivos.

Previo a realizar dicha detección se procedió a un conteo en dilución con el objetivo de cuantificar el porcentaje de recuperación de *Clavibacter m. subsp. m.* en cada uno de los medios, con el objetivo de conocer el comportamiento de éstos. Además de esta manera se pudo aprender a caracterizar las colonias típicas de la bacteria y el tiempo de crecimiento en los diferentes medios con respecto al NAD.

Se seleccionaron los medios semiselectivos SCM, CNS y KBTS sugeridos por la bibliografía. Asimismo se realizó la siembra en el medio de crecimiento NAD como medio de referencia. El cultivo de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* fue tomado de los aislamientos puros obtenidos en el paso anterior.

El medio SCM, extraído de M. FATMY et al (1988) contiene los siguientes componentes por litro de agua destilada: 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5g de KH_2PO_4 , 2g de K_2HPO_4 , 10g de sucrosa, 0,1g de extracto de levadura, 1,5g de ácido bórico, 15g de agar, 200mg de cicloheximida (2ml de 100mg /ml de metanol 75%), 30 mg. de ácido nalidíxico(sal) (3 ml de solución de 10 mg/ml de NaOH 0,1N al 2%), y 100 mg de ácido nicotínico (10 ml de 10 mg/ml de solución disuelta en agua destilada). Se omitió en la composición, en el conteo en dilución y en la primera repetición de la detección de la bacteria en las semillas, 10 mg de telurito de potasio (1ml de solución de 1% de telurito Chapman de Difco), por su ausencia en el mercado nacional, contando con este producto para la segunda repetición. Las "soluciones stock" de ácido nalidíxico, ácido nicotínico, y cicloheximida fueron filtrados, esterilizados y agregados luego de que el medio fuera autoclavado y enfriado a 45-50 C.

El medio CNS (Gross y Vidaver) contiene los siguientes componentes por litro de agua destilada: 8,0gr Nutriente de crecimiento, 2,0gr de extracto de levadura, 2,0gr K_2HPO_4 , 0,5 KH_2PO_4 , 15,0 gr agar. Se autoclava 15 minutos y se agrega 50 ml/lit solución de glucosa al 10 %; 1,0M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0ml/lit. Luego de estéril debe tener un pH 7,2. Se enfría a 50°C y se agrega: 2,5ml/lit ácido nalidíxico (10 mg/lit en 0,1 M NaOH); 3,2ml/lit sulfato de polimixina (8000 USP units/mg; 10 mg/ml); 4,0ml/lit cicloheximida (10 mg/ml ethanol); 0,0625 ml/lit Bravo 6 F (Clorotalonil) (1:50 dilución en agua esteril). pH 6,9.

El medio KBTS agar, (Dhanvantari) se compone de :1,5gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

1,5gr K_2HPO_4 , 10gr sucrosa, 20gr proteasa peptone N°3, 1,5 gr ácido bórico, 17gr agar por litro de agua destilada. Se ajusta a pH 7,2 y se autoclava a 15 lb por 15 minutos. Se enfría el medio a 50°C y se agrega : 3ml/lit ácido nalidíxico (10 mg/ml en 0,1N NaOH); 1,0 ml/lit telurito de potasio (1% solución en agua destilada) (omitido de igual manera que en el medio SCM); 2,0 ml/lit cicloheximida (20 mg/ml en etanol); 0,05 ml/lit Bravo 500F (Clorotalonil) (1:37 dilución en agua destilada).

El medio NAD se compone de 23 g de agar nutritivo y 5 g de dextrosa por litro de agua destilada autoclavándose durante 20 minutos a 15 lb.

Para proceder a la siembra de *Clavibacter m. subsp. m.* en las placas conteniendo cada uno de los medios se realizaron diluciones sembrándose las siguientes: 1:100.000, 1:1.000.000 y 1:10.000.000, con 4 repeticiones por cada medio. Para llevar a cabo las diluciones se dispuso de 7 tubos conteniendo 9 ml de solución salina (NaCl 0,85%) cada uno. De cada una de las diluciones mencionadas anteriormente se extrajeron 100 μ l para la siembra en placas distribuyéndose homogéneamente en cada placa con una varilla de vidrio en forma de L. Cuando el crecimiento de las bacterias se hizo evidente, se llevó a cabo el conteo de las colonias presentes en cada placa para las diferentes diluciones y medios semiselectivos. A partir de estos datos se estimó el número de UFC/ml de la solución de la cual se partía.

3.2.2 Métodos de extracción y detección de la bacteria en las semillas.

Se fraccionó cada variedad en tres lotes de 300 semillas y a cada uno de ellos se les realizó un procedimiento de *agitación* y *macerado*. El primero de estos procesos permite la extracción de la bacteria a partir de la superficie de la semilla mientras que el segundo posibilita además la extracción desde su interior.

El procedimiento de *agitación* utilizado fue el siguiente: Cada lote de semilla se colocó en un agitador rotativo a 110 rpm (Ver foto N°2), en tubos conteniendo PBT-2 (0,05 M fosfato buffer + tween) en una proporción de 150 ml cada 10.000 semillas (Ver foto N°1), durante 72 hs a temperatura ambiente. Cumplido este tiempo, se separaron las semillas del PBT-2 y este último fue colocado en tubos Eppendorf y centrifugado a 14.000 rpm. durante 10 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante y los sedimentos provenientes de

un mismo lote fueron sumados, agregando PBT-2 en cantidades suficientes para lograr la resuspensión y hacer posible esta operación. Luego se agregó PBT-2 hasta completar la capacidad del Eppendorf.; se pipeteó y se sembró a razón de 100 μ l por placa con 3 repeticiones en los diferentes medios semiselectivos, SCM, KBTS y en NAD como medio de referencia. A esta solución sembrada se la denominó concentrado. Además de ésta, se sembró una solución diluída de 1:10 con tres repeticiones para cada medio. Para llevar a cabo esta dilución se extrajeron 100 μ l de la suspensión anterior y se diluyeron en 900 μ l de la solución salina.

Las semillas provenientes del proceso de agitación fueron re-utilizadas para el proceso de *macerado*. Para este proceso, a cada lote de semillas se las colocó en un mortero estéril con 4 ml. de PBT-2 y se las maceró manualmente. La suspensión obtenida fue centrifugada a 14.000 rpm durante 10 minutos y luego se siguieron los pasos para la siembra de la solución concentrada y diluída de la misma manera que se procedió para el método de agitación.

Las placas sembradas en los medios SCM, KBTS, NAD se incubaron a 26° C y se observó su crecimiento a partir del segundo hasta el noveno día de la siembra.

El procedimiento descrito se realizó en primera instancia para las variedades Coloso y Supermax y luego para las variedades Tommy y Fortaleza. Complementariamente se realizó un test serológico de ELISA en cada caso, con las soluciones concentradas y diluídas.

Posteriormente se llevó a cabo una repetición con las cuatro variedades en forma simultánea, sometiendo las semillas en esta ocasión al proceso de agitación y dilución.

Para los medios semiselectivos y el Test de ELISA con las variedades Tommy y Fortaleza se usaron como testigos positivos, además de un cultivo puro de *Clavibacter m. subsp. m.*, semillas de tomate infectadas. Se utilizaron con este fin semillas provenientes de una planta de tomate que presentaba síntomas característicos de cancro bacteriano. Por otro lado se infectaron semillas en forma artificial, con una suspensión bacteriana 1×10^7 . La semilla permaneció en remojo durante unos minutos en esta suspensión, con el objetivo de que la bacteria lograra adherirse a las paredes de ésta. Cumplido este tiempo, se colocaron las semillas en un tubo conteniendo el buffer extracción PBT-2 en la misma cantidad en que fue utilizado para las extracciones anteriores, y luego fue sometido al mismo proceso que las demás semillas. La variedad Tommy fue seleccionada aleatoriamente para la realización de esta infección artificial de semillas.

Posteriormente, en el Test de ELISA y Medios Semiselectivos a los que se sometieron las cuatro variedades en forma simultánea, también se utilizó como testigo positivo, además de la bacteria en forma pura, semillas de Tommy inoculadas artificialmente, de la forma descripta anteriormente.

Con el objetivo de obtener un cultivo puro de *Clavibacter m. subsp. m.*, se realizaron nuevos Test de ELISA a partir de repiques de las colonias que presentaron aspecto coincidente con las descripciones de la bacteria. También se tuvo en cuenta el resultado del Test de ELISA del lote de semillas.

Para los Test serológicos se usaron kits de ELISA (Agdia), preparados con anticuerpos policlonales específicos de *Clavibacter m. subsp. m.* En primer lugar se preparó el anticuerpo de recubrimiento diluyéndolo en 1x solución buffer de cobertura (g/l de agua destilada: carbonato de sodio, 1,59 g; bicarbonato de sodio, 2,93 g pH 9,6), con la proporción dada en su etiqueta. Se dispensaron 100 µl de esta preparación en cada celda y se incubó la placa a 4°C durante la noche en cámara húmeda. Cumplido este tiempo se realizó un lavado con 1X PBST (g/1000 ml de agua destilada: cloruro de sodio, 8g; fosfato de sodio dibásico, 1,15g; fosfato de potasio monobásico, 0,2g; cloruro de potasio, 0,2g; tween-20, 250 µl. PH 7,4.), repitiendo ocho veces este proceso.

Las muestras testeadas fueron tomadas de las suspensiones anteriores de agitación y macerado, tanto las concentradas como las diluidas. Luego de dispensadas fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. Como testigo positivo se usó una suspensión de cultivo puro, con una concentración de aproximadamente 1×10^7 de *Clavibacter m. subsp. m.* obtenida en la primer etapa de este trabajo aislamientos Cm13 y N°18, y como testigo negativo se utilizó *Xanthomonas arboricola pv. pruni*. Se dispensaron dos celdas con la solución salina como buffer de referencia. Tanto al testigo positivo como al negativo se le realizaron dos repeticiones.

Luego de la incubación se procedió nuevamente al lavado. Se preparó el conjugado enzimático con el buffer 1X ECI (g / 1000 ml 1X PBST; albúmina de suero bovino, 2g; polivinilpirrolidona MW 24-40.000, 20g. pH 7,4) con la solución dada en la etiqueta y se dispensaron 100 µl de este preparado en cada celda. Se procedió a la incubación de la placa y a su posterior lavado como en el paso anterior. Posteriormente se diluyó una tableta de PNP por cada 5 ml del buffer 1X PNP (cloruro de magnesio, 0,1g; dietanolamina, 97ml/ 1000 ml de agua destilada. pH 9,8) evitando el contacto con las tabletas y la exposición de la solución a la luz intensa lo que provocaría color de fondo en las celdas negativas. Luego de unos minutos de incubación se procedió a la interpretación

visual de la placa mediante la observación de viraje de color y a la lectura mediante un lector de placas.

3.2.3 Inoculación y reaislamiento de la bacteria

Con el objetivo de confirmar la patogenicidad de las muestras que dieron los valores más altos en el Test de ELISA se realizaron inoculaciones en plantines de tomate de dos a tres hojas verdaderas, de la variedad Tommy sembradas en almacigueras e inoculados y mantenidos en el laboratorio.

En esta prueba se utilizó como testigo negativo agua estéril, y como testigo positivo aislamiento puro de *Clavibacter m.subsp.m.* N°18.

Las técnicas de inoculación artificial fueron "picado" e inserción de trozo de escarbadiente. El picado consistió en la inmersión de una aguja estéril en una suspensión bacteriana y su posterior pinchado en la zona axilar de las hojas. Por otro lado, trozos de madera en forma de pequeñas estacas fueron incubados durante dos a tres horas en la suspensión bacteriana y luego se insertaron en la misma zona del vegetal que se describió para el método anterior, en plantines diferentes. Ambas técnicas fueron empleadas también en la inoculación del testigo negativo (agua estéril). Luego de la inoculación se los colocó bajo cámara húmeda durante 24 horas.

Para cumplir con los Postulados de Koch, se procedió al reaislamiento de la bacteria de plantines inoculados que mostraban síntomas de marchitamiento. Con este fin se tomó un trozo de tallo por debajo de la inserción de las hojas y se lo sumergió en un vaso de Bohemia conteniendo hipoclorito de sodio (2%), durante 3 segundos. Luego se procedió a su lavado con agua destilada, y finalmente con agua estéril. Posteriormente se fraccionó la muestra en pequeños trozos y se le agregó una gota de agua estéril, para permitir la liberación de la bacteria. Esta suspensión se sembró en el medio NAD, y al segundo día de crecimiento se repicaron en el mismo medio las bacterias crecidas que presentaban características típicas de la especie, las cuales posteriormente se evaluaron mediante el Test serológico de ELISA.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS

En el cuadro N° 2 se resumen los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas para la obtención de un cultivo puro de *C. m. subsp m.*, el cual fue utilizado como testigo en las pruebas posteriores para la detección de las bacterias en semillas de tomate.

CUADRO N°2 RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS

Aislamiento	Catalasa	Hidrólisis Del Tween	Citocromo Oxidasa	Liquefacción de la gelatina	Roja de Metilo	Reducción De nitrato	Hidrólisis Almidón
N° 2	***	dudosa	negativo	negativo	negativo	ausente	leve
N° 3	***	dudosa	negativo	negativo	dudoso	dudoso	leve
N° 4	***	dudosa	positivo	negativo	negativo	ausente	positivo
N° 5	**	negativo	positivo	negativo	negativo	dudoso	leve
N° 7	***	positivo	negativo	negativo	negativo	ausente	leve
N° 9	**	negativo	negativo	negativo	negativo	dudoso	leve
N°10	***	negativo	negativo	negativo	negativo	dudoso	leve
N°18	****	negativo	negativo	negativo	negativo	dudoso	leve
Cm12	****	negativo	negativo	negativo	negativo	dudoso	leve
Cm13	***	negativo	negativo	negativo	negativo	dudoso	leve
Xc	****	positivo	negativo	positivo	positivo	dudoso	positivo

Xc *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* – testigo negativo.

Cm *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis* (Cm 12 - Cm13) Testigo positivo

* indicador de grado de viabilidad

En la prueba de reducción de Nitrato no se obtuvieron resultados coherentes, lo que podría estar explicado por errores experimentales. Por esta razón, dichos resultados no fueron tenidos en cuenta en la determinación de aislamientos pertenecientes a la bacteria en estudio.

En tanto, los resultados obtenidos en la Prueba de Hipersensibilidad fueron negativos para los aislamientos Cm3, Cm4, Cm7.

A partir de estos datos se seleccionaron los aislamientos N° 9, 10, 18, y los testigos positivos, cuyos datos concuerdan con los resultados esperados para *Clavibacter m. subsp. m.* Dichos resultados fueron corroborados mediante la prueba de KOH y un Test de ELISA confirmando su identidad.

4.2 COMPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

Los resultados obtenidos al sembrar el cultivo puro en los medios con las diluciones empleadas se presentan en el siguiente cuadro.

CUADRO N° 3 CONTEO EN DILUCION

MEDIOS	DILUCIÓN	REP 1	REP2	REP3	PROMEDIO	UFC/ ml de Solución
NAD	5	*	*	*	-	-
	6	122	124	134	127	1.26×10^9
	7	31	24	17	24	2.4×10^9
KBTS	5	688	711	768	722	0.7×10^9
	6	98	102	98	99	0.9×10^9
	7	12	15	15	14	1.4×10^9
SCM	5	627	537	540	586	0.56×10^9
	6	98	109	96	108	1.0×10^9
	7	25	21	15	15	2.0×10^9
CNS	5	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0

* incontables

5- 1:100.000, 6- 1:1.000.000, 7- 1:10.000.000

A partir de estos datos se calculó el porcentaje de recuperación de la

bacteria, considerando al medio NAD como medio de referencia. El porcentaje de recuperación obtenido en el medio SCM fue de 65 %, en el medio KBTS fue de 55% mientras que en el medio CNS fue de 0%. (ver foto N° 3). Estos valores difirieron de los encontrados en la bibliografía extranjera, lo que podría atribuirse a la influencia del ambiente en el comportamiento de los medios y al uso de un medio de referencia diferente.

A partir de los datos de este cuadro se descartó el uso del medio CNS en la detección de la bacteria en estudio.

El crecimiento en el medio NAD se caracterizó por colonias de coloración crema, elevación convexa, forma irregular y borde entero. (Ver foto N° 4)

En el medio KBTS las colonias de *Clavibacter m. subsp. m.* crecieron de forma circular, elevación convexa, borde entero, de coloración amarillo-crema. (Ver foto N° 5).

Mientras tanto para el medio SCM las colonias presentaron una forma irregular, elevada, de coloración más tenue. (Ver foto N° 5). Cabe destacar que en esta etapa del trabajo se omitió en la composición de los medios el Telurito de potasio el cual imprime a las colonias tonos grisáceos.

4.3 DETECCIÓN DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN SEMILLAS COMERCIALES DE TOMATE

4.3.1 Medios semiselectivos

Para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en las semillas de tomate se utilizaron los medios semiselectivos seleccionados SCM, KBTS y el medio NAD como referencia.

En la primera tanda en la cual se evaluaron las variedades Coloso y Supermax y en la segunda tanda para la evaluación de Tommy y Fortaleza, sin telurito de potasio, el testigo positivo sembrado (Aislamiento N° 18) mostró colonias semejantes a las observadas durante el conteo en dilución realizado en el paso anterior del presente trabajo.

El comportamiento que presentaron las colonias del testigo positivo de *Clavibacter m. subsp. m.* (Aislamiento N° 18) en los medios de SCM y KBTS para la repetición en la cual se evaluaron las cuatro variedades simultáneamente con la adición de telurito de potasio, coincide con lo descrito en la bibliografía (Fatmi, M; 1989 y Gitaitis, R.D; 1989 respectivamente) se observaron colonias irregulares, convexas, mucosas y moteadas con coloraciones grises a negras para el SCM; colonias grandes, mucosas y grises o pequeñas negras y sin elevación para el medio KBTS.(ver foto N° 6 y 7)

Los cuadros N° 5, 6 y 7 del Apéndice describen los crecimientos de las colonias bacterianas al sembrarse las soluciones pertenecientes a la primera y segunda tanda de evaluación (Coloso y Supermáx y Tommy y Fortaleza respectivamente.)

En la primer tanda de evaluación de las variedades Coloso y Supermax, se encontraron notorias diferencias en los crecimientos de las placas entre ambas variedades, en las observaciones realizadas a los 4 y 9 días de la siembra en los medios de cultivo.

En la variedad Supermax tanto en el Medio KBTS como en el medio SCM no se observó crecimiento de colonias a simple vista hasta pasados los nueve días. Luego de este período crecieron sólo dos colonias diferentes, las cuales son descritas en el Cuadro N° 6 (Apéndice). Mientras tanto para la variedad Coloso se observó un notorio crecimiento con formación de diferentes colonias a partir de los cuatro días.

Al igual que en los medios semiselectivos, para el medio NAD ambas variedades mostraron notorias diferencias en la intensidad y diversidad de las colonias.

En segundo lugar se evaluaron las variedades Tommy y Fortaleza. En el cuadro N° 8 se presenta la observación de las colonias a los seis días de la siembra. Se destaca un menor número de colonias diferentes y un menor crecimiento, en comparación a la variedad Coloso testada con anterioridad. No se observaron colonias con coloraciones intensas, rosadas ni amarillas.

El crecimiento de colonias no presentó diferencias entre los procesos de extracción, macerado y agitación para todos los medios y variedades utilizadas. Por lo tanto en los cuadros N° 5, 6 y 8 no se presentan los datos diferenciados para cada procedimiento. Con respecto a la otra variable, concentrado y diluido, se encontraron claras diferencias. Mientras que en el primer caso las colonias mostraron un rápido crecimiento en los días sucesivos a la siembra, con su

consiguiente dificultad en la observación, en el segundo caso, la menor concentración de bacterias permitió una mejor visualización de las colonias.

En la repetición de la evaluación de las cuatro variedades en forma simultánea, el uso de telurito de potasio formando parte de la composición de los medios semiselectivos, provocó cambios tanto a nivel de selectividad como de coloración de las colonias facilitando su identificación. Se logró un incremento en la selectividad de los medios, mientras que el aspecto de las colonias fue diferente en ambos medios semiselectivos. En el medio SCM, las colonias que anteriormente crecían transparentes, presentaron moteados en forma de bastones de coloraciones grises en tanto para el medio KBTS surgieron colonias con tonalidades gris-oscuro.

A partir de colonias de aspecto similar al descripto en bibliografía para la bacteria en el medio KBTS, se comenzaron a hacer sucesivos repiques a los cuales se les fue confirmando su identificación mediante Test de Elisa hasta lograr la obtención de un cultivo puro de la bacteria.

La detección final de la bacteria *Clavibacter m. subsp. m.*, lograda en la variedad Coloso, se realizó a partir de una colonia creciendo en el medio semiselectivo KBTS, el cual contenía en su fórmula telurito de potasio. De esta forma se resalta la importancia de esta formulación del medio KBTS en el logro de los objetivos de este trabajo, mejorando notoriamente la practicidad en la identificación de la bacteria en estudio.

Se destaca la importancia del uso de medios semiselectivos, especialmente en variedades, que acarrean una gran diversidad de bacterias en su semilla, como Coloso en este trabajo.

En el medio NAD se observó un crecimiento rápido de mayor número de colonias y diferentes tipos evidenciándose la presencia de otras bacterias contaminando rápidamente las placas para todas las variedades. En algunas placas se observó la presencia de pigmentos fluorescentes, que constituyen sideróforos, los cuales permiten identificar las bacterias del género *Pseudomonas*.

4.3.2 Test de ELISA

En el Cuadro N° 4 se presentan los resultados obtenidos al realizar el Test serológico de ELISA a las semillas de las variedades Coloso y Supermax y en el Cuadro N°5 los de Tommy y Fortaleza, luego de ser sometidas a los procesos de agitación y macerado.

CUADRO N° 4 VALORES DE ABSORBANCIA CORRESPONDIENTES AL TEST DE ELISA DE LOS AISLAMIENTOS PROVENIENTES DE LAS VARIEDADES COLOSO Y SUPERMAX

VARIEDAD	CONCENTRADO			DILUÍDO		
	LOTE	AGITACIÓN	MACERADO	LOTE	AGITACIÓN	MACERADO
COLOSO	1	0.105	0.075	1	0.085	-
	2	0.091	0.071	2	0.123	0.070
	3	0.104	0.055	3	0.094	0.067
	X	0.100	0.067	X	0.100	0.068
SUPERMAX	1	0.112	0.068	1	0.092	0.071
	2	0.099	0.068	2	0.103	0.072
	3	0.093	0.083	3	0.090	0.073
	X	0.101	0.073	X	0.095	0.072
	DATO N°1		DATO N°2	PROMEDIO		
SALINE	0.069		0.075	0.074		
POSITIVO	1.042		1.187	1114.5		
NEGATIVO	0.056		0.066	0.061		

CUADRO N°5 VALORES DE ABSORBANCIA CORRESPONDIENTES AL TEST DE ELISA DE LOS AISLAMIENTOS PROVENIENTES DE LAS VARIEDADES TOMMY Y FORTALEZA

VARIEDAD	CONCENTRADO			DILUÍDO		
	LOTE	AGITACIÓN	MACERADO	LOTE	AGITACIÓN	MACERADO
TOMMY	1	0.132	0.149	1	0.317	0.256
	2	0.170	0.162	2	0.257	0.239
	3	0.154	0.176	3	0.274	0.241
	X	0.152	0.162	X	0.283	0.245
FORTALEZA	1	0.263	0.152	1	0.300	0.257
	2	0.306	0.167	2	0.339	0.288
	3	0.254	0.172	3	0.217	0.258
	X	0.289	0.164	X	0.318	0.268
Sem.INF NAT	1	0.287	0.200	1	0.315	0.277
Sem.INF ART	1	0.895	0.524	1	0.504	0.350
POSITIVO		Over		Over		
NEGATIVO		0.244		0.250		
SALINE		0.330		0.293		

Con el procedimiento extractivo de macerado, se observaron valores menores con respecto a los obtenidos en las semillas tratadas con el proceso de agitación, para cada variedad, a excepción de la variedad Tommy, lo cual podría verse explicado por un error experimental. Para estos resultados, la explicación podría ser que las semillas utilizadas para el macerado ya habían sido usadas en el proceso de agitación. De esta manera las bacterias detectadas corresponderían a las que se encuentran internamente en la semilla,

y en menor grado a las que habitan en el exterior de ésta, las cuales ya habrían sido removidas en gran parte en el proceso de agitación. Si esta hipótesis fuese correcta, estaría determinando la presencia de un mayor número de bacterias en el exterior de la semilla. Otra posible explicación es la presencia de compuestos vegetales que se liberan de la semilla al realizar el macerado, y que impiden a la bacteria adherirse al anticuerpo. Por otro lado el escaso tiempo en que estuvo el macerado en contacto con la solución extractiva PBST2 podría estar explicando estos resultados. Esta hipótesis sería avalada por la afirmación de Rat 1984 citada por Van Vaerenbergh, J.P.C *et al.* (1985) el cual destaca en su artículo la importancia del tiempo de contacto entre el buffer de extracción y el macerado de la semilla.

Al comparar los preparados diluido y concentrado para cada variedad en el test de ELISA se observaron los siguientes resultados. Para las variedades Coloso y Supermax no se encontraron diferencias en los resultados. Estas diferencias sí se observaron en la evaluación de las semillas Tommy y Fortaleza, encontrándose mayores valores en los preparados diluidos para ambas variedades y métodos de extracción con respecto a los preparados concentrados. A estos resultados no se les encontró una explicación satisfactoria. Sin embargo se podrían atribuir a algún error experimental.

La semilla de tomate infectada naturalmente, en el Test de ELISA con las variedades Tommy y Fortaleza, mostró valores muy bajos con respecto al cultivo puro de la bacteria utilizada como positivo. Estos valores fueron similares a los obtenidos con el resto de las muestras testeadas. Esto sugiere el hecho de que, aunque una planta se encuentre afectada por el cancro bacteriano, no necesariamente la infección va a pasar a la semilla o en caso de que así ocurra, las concentraciones alcanzadas no lograrán los niveles necesarios para ser detectados en forma clara.

Por otro lado en este mismo Test de ELISA se utilizó también como testigo positivo, semilla de tomate infestada artificialmente, la que presentó resultados muy inferiores al testigo puro. (Cuadro N° 5). Estos resultados permiten inferir la conveniencia en el uso de este tipo de testigo, ya que permite una mejor valoración de las muestras al compararlas con un valor positivo de semillas contaminadas más cercano a la realidad.

En el Cuadro N° 6 se muestran los resultados obtenidos de un Test de ELISA a un segundo lote de semillas de las 4 variedades evaluadas, con el fin de confirmar los resultados obtenidos en primera instancia

CUADRO N° 6 VALORES DE ABSORBANCIA CORRESPONDIENTES AL TEST DE ELISA DE LOS AISLAMIENTOS PROVENIENTES DE LAS CUATRO VARIEDADES

AGITACION –DILUIDO					
VARIEDAD	Lote	Rep. N°1	Rep.N°2	Rep.N°3	PROMEDIO
TOMMY	1	0.067	0.070	0.060	0.065
	2	0.054	0.065	-	0.059
	3	0.068	0.068	0.056	0.064
	X				0.063
FORTALEZA	1	0.089	0.083	0.090	0.087
	2	0.078	0.078	0.073	0.076
	3	0.081	0.083	0.072	0.078
	X				0.080
SUPERMAX	1	0.062	0.080	0.070	0.071
	2	0.095	0.091	0.075	0.087
	3	0.070	0.069	0.068	0.069
	X				0.075
COLOSO	1	0.074	0.073	0.089	0.078
	2	0.079	0.082	0.085	0.082
	3	0.099	0.090	0.108	0.099
	X				0.086
SEMILLA IFES. ART	—	0.403	0.425	0.379	0.402
POSITIVO		0.762	0.758	-	0.760
NEGATIVO		0.068	0.064	-	0.066
SOLUCION SALINE		0.083	0.078	0.072	0.077

En esta tanda sólo se le realizó a las semillas el proceso de agitación, con la suspensión diluída, debido a que estos procedimientos fueron los que presentaron mejores resultados en las pruebas efectuadas con anterioridad. El buen comportamiento de la suspensión diluída confirma lo visto en la observación de las colonias en las placas con los Medios semiselectivos.

En este Test se utilizó como testigo positivo, nuevamente, semilla de tomate inoculada artificialmente, confirmando los resultados obtenidos en el test anterior. Se descartó el uso de semillas infectadas naturalmente como testigo, debido a los bajos valores que mostró en el segundo Test de ELISA. Los resultados obtenidos a partir de semillas infestadas artificialmente fueron superiores al promedio de las demás muestras. Comparando con los datos obtenidos en la muestra positiva, estos son menores, lo que demuestra la diferencia entre el uso de un testigo positivo proveniente de una colonia pura de la bacteria, con un positivo procedente de una contaminación con una suspensión bacteriana y su consecuencia en la comparación de éste con las muestras. De este modo, las muestras testeadas que dieron valores ligeramente mayores al promedio, podrían evidenciar la presencia de cierto grado de concentración de la bacteria.

Se llevó a cabo el cálculo de un límite matemático con el objetivo de catalogar los valores de las muestras evaluadas en el Test de ELISA como positivas y negativas con respecto a la presencia de la bacteria.

Para el cálculo de los límites se utilizaron los valores de la lectura del ELISA que mostraron las mayores diferencias entre el testigo positivo, con respecto al testigo negativo y al buffer; y en general antes que el testigo positivo alcance valores que queden por fuera del rango aceptado por el lector de placas (over).

La fórmula matemática utilizada para la determinación del límite fue el promedio de los negativos más el doble de la varianza de estos, o sea:

$$\bar{X} + 2 \cdot \sigma^2 \text{ negativo}$$

Para el Test de ELISA que evaluó las variedades Coloso y Supermax el límite calculado fue de 0,061 con lo que todas las muestras de ambas variedades se ubican por encima del límite, en mayor o menor grado.

El Test de ELISA realizado para la evaluación de las variedades Tommy y Fortaleza presentó un límite de 0,247. De este modo, las muestras de la

variedad Tommy, con el procedimiento de extracción de agitación, diluías, mostraron valores por encima del límite calculado. A su vez las muestras correspondientes a la variedad Fortaleza, tanto diluías con ambos procedimientos de extracción, como concentradas sometidas al procedimiento de agitación, superaron el valor del límite establecido.

En el Test de ELISA que evaluó todas las variedades simultáneamente se observó que los valores obtenidos superaban el límite de 0,066 establecido, a excepción de la variedad Tommy, la cual se ubicó por debajo de dicho límite.

Aunque *Clavibacter m. subsp. m.* hasta este momento no pudo ser detectada en forma concluyente mediante los Test de Elisa, se resolvió continuar haciendo repiques de las colonias que coincidían con las descripciones de la bacteria creciendo en los medios semiselectivos de bibliografía. A estas colonias que se iban purificando mediante sucesivos repiques, se las fue sometiendo a Test de Elisa, obteniendo valores que se acercaban más al positivo, al lograr concentraciones de la bacteria detectables en esta prueba. Esto coincide con la bibliografía que determina un mínimo de la bacteria en estudio por mililitro de solución para obtener una reacción positiva. (STEPHENS et al, 1988).

El Cuadro N° 1 (Apéndice) muestra los resultados de un Test de ELISA en el que se evaluaron cultivos en medios semiselectivos obtenidos por repiques de las placas que alcanzaron valores más altos en las pruebas serológicas realizadas con anterioridad. El valor más destacado corresponde a una muestra proveniente de un medio semiselectivo con el proceso de extracción agitación, concentrado de la variedad Coloso. (Ver foto N° 8)

Un nuevo Test de ELISA, Cuadro N° 2 (Apéndice) (Ver foto N° 9) realizado a partir de cultivos sospechosos, que crecieron en medios semiselectivos mostró valores positivos que incluso superaron el control positivo utilizado. Las muestras señalizadas con los números del 30 al 44 provenientes de una misma placa, fueron las que obtuvieron valores más altos. Dicha placa corresponde a la que resultó con el mejor valor en el ELISA anterior. (Muestra N°1 de Cuadro N°1 en Apéndice). Con el objetivo de obtener aislamientos puros de *Clavibacter m. subsp. m.* se la dividió la placa N°1 en 8 partes, con dos repeticiones cada una. El sector en el cual se encontraron los valores más destacados se corresponde con los números del 39 al 43, lo que determina la presencia de colonias más puras en esa zona de la placa. Estos aislamientos fueron inoculados a los plantines de tomate.

Con las placas obtenidas de los reaislamientos y otras placas de

repiques de los aislamientos 39 al 43 se realizó un nuevo Test de ELISA, con resultados más claros (Cuadro N° 3 de Apéndice). Se realizaron sucesivos repiques en el medio NAD de las colonias que presentaban aspecto más semejante a la descripción del testigo positivo y mediante un test de ELISA se confirmaron los postulados de Koch y se obtuvieron aislamientos más puros de la bacteria. (Cuadro N° 4, Apéndice) (Ver foto N°10). Cabe destacar que el aislamiento de *Clavibacter m. subsp. m.* obtenido presenta coloraciones rosadas, lo cual está contemplado en la bibliografía consultada.(CMI)

4.4 TEST DE HIPERSENSIBILIDAD

Las muestras de los dos primeros test de ELISA que resultaron con valores mas cercanos a los que presentaron las colonias de *Clavibacter m. subsp. m.* puras fueron sometidas a un test de hipersensibilidad. Los resultados de este test no pudieron ser recuperadas de la planta de tabaco. Esto se debió a que esta planta colapsó al poco tiempo de ser inoculada. Una posible explicación de este hecho sería la contaminación de una de las muestras con un patógeno, ante el cual el tabaco presentara una gran sensibilidad.

4.5 TEST DE PATOGENICIDAD

Los resultados obtenidos en la inoculación de los aislamientos seleccionados en plantines de tomate, se presentan en el Cuadro N° 7. (Ver foto N° 12, 13, 14, 15, 16)

CUADRO N° 7 RESULTADOS DE LA INOCULACIÓN DE PLANTINES

Aislamientos	N° de Plantines Inoculados	N° de Plantines Con marchitamiento Damp.off inoculación		N° de Plantines sanos
N° 3.3	6	3	3	0
N° 41	3	1	2	0
N° 42	2	0	1	1
N° 43	2	0	1	1
N° 39	2	0	1	1
Total inoc ais*	15	4	8	3
Agua estéril	10	3	2	5
Positivo	2	0	1	1
Total inoculadas	27	7	10	9

* Total de plantines inoculados con aislamientos

Se diferenciaron los marchitamientos causados por la inoculación con los aislamientos seleccionados de los atacados por damping off, de la siguiente manera: el marchitamiento provocado por la inoculación se manifestó como un decaimiento típico, dado por la infección de los haces vasculares, mientras que el damping off provocó una pudrición radicular y a nivel de tallo, en la zona de contacto con el suelo.

Dentro de los plantines inoculados, el marchitamiento del 54 % de los mismos puede atribuirse exclusivamente a la inoculación por *Clavibacter m. subsp. m.*

Un Test de ELISA realizado posteriormente permitió la detección de *Clavibacter m. subsp. m.*, recuperada de los plantínes que murieron por la inoculación. (Cuadro N° 3). De este modo se confirma la presencia de *Clavibacter* patógenas en los aislamientos obtenidos de las semillas.

El alto porcentaje de ataque de plantínes por damping off que se observó en las bandejas, fue mayor en plantínes no inoculados con respecto a los inoculados.

Al analizar los resultados de la inoculación con el testigo positivo (aislamiento Cm.13), debido a la sobrevivencia de uno de los dos plantínes, se desprende la posibilidad de que existan errores en la práctica de la inoculación.

las 2 muertes de plantínes registradas ante la inoculación con agua estéril, ocurrieron por daños provocados en el momento de la inoculación.

5. CONCLUSIONES

A partir de este trabajo se logró concluir que la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* se encuentra presente en lotes de semilla de tomate que se comercializan a nivel nacional. De este modo se logró confirmar la sospecha de muchos productores, cuyos cultivos presentaban altos grados de infección por esta bacteria, aún en los casos en que se tomaban precauciones para evitar otras posibles fuentes de inóculo en el cultivo.

Aunque esta bacteria se obtuvo con total certeza solo en las semillas de una de las variedades evaluadas en este trabajo, no se descarta su presencia en las semillas de otras variedades comerciales, o en otros lotes de las mismas variedades tanto evaluadas como no evaluadas durante esta investigación. De este modo, se recomienda al productor la desinfección de las semillas a plantar, cualquiera sea su origen, con el fin de destruir el inóculo que pudieran estar introduciendo por este medio en el cultivo.

Al ser el objetivo de este trabajo la determinación de la presencia o ausencia de la bacteria en las semillas, los medios semiselectivos cumplieron un importante rol, permitiendo la obtención de aislamientos de *Clavibacter m. subsp. m.*, aún encontrándose estas en bajas concentraciones en la semilla (una bacteria es suficiente para la formación de una colonia). A su vez el Test de ELISA, resultó de gran efectividad en la identificación de la bacteria aislada en medio de cultivo, pero presentó una sensibilidad insuficiente para la detección en la semilla con la metodología utilizada en este trabajo.

El medio KBTS fue el que permitió el aislamiento de *Clavibacter m. subsp. m.* en el presente trabajo, a partir de las semillas de la variedad Coloso. Cabe destacar que el método de extracción utilizado con mayor éxito fue el proceso de agitación, con la suspensión diluida.

Con respecto al uso de testigos positivos en la detección de la bacteria mediante el Test serológico de ELISA, se destaca la conveniencia de usar semillas inoculadas en forma artificial con este fin, ya que permite una mejor comparación con las muestras procedentes de semillas contaminadas con la bacteria en forma natural.

6. RESUMEN

El cancro bacteriano en tomate causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ha producido en los últimos años grandes pérdidas en el cultivo de tomate en el Uruguay, siendo una importante fuente de inóculo la semilla.

Ante la sospecha de la presencia de la bacteria en la semilla comercializable a nivel nacional se procuró su detección a nivel de laboratorio.

Las variedades testeadas fueron; Coloso, Supermax, Tommy y Fortaleza.

Los métodos empleados para la detección fueron Test de ELISA y siembras en medios semiselectivos. Para la extracción de la bacteria a partir de la semilla se utilizaron los procedimientos de agitación y macerado.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* fue detectada en la variedad, no descartándose la presencia en otras variedades evaluadas.

La detección se realizó a partir de una colonia creciendo en el medio KBTS habiéndose extraído por el método de agitación. Para confirmar la identidad de la colonia, ésta fue inoculada en plantines de tomate y posteriormente reaislada mediante el método serológico de ELISA.

7- SUMMARY

The canker bacterial of tomato causes severe losses in the production of tomato in Uruguay.

The disease can be seed transmitted.

Were evaluated 4 importants commercials tomato seeds varieties: Supermax, Coloso, Tommy and Fortaleza. The two methods used to detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed lots were ELISA test and two semiselective medium: KBTS and SCM.

Recovery of *Clavibacter m.* subsp. *m.* from KBTS and SCM in comparation to NAD was 55% and 65% respectively, and while CNS was 0%.

Extracting seed by shaking resulted better than blending procedure.

The bacteria was detected in one of the seed lots tested from Coloso.

The sanitary selection of seed lots is a direct prophylactic control method.

8. BIBLIOGRAFIA

1. BERRY, S.Z.; MADUMADU, G.G.; UDDIN, M.R.; COPLIN, D.L. 1989. Virulence Studies and Resistance to Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis in tomato germplasm. HortScience 24(2): 362- 365.
2. BRADBURY, J.F. 1986 Guide to plant pathogenic bacteria. London C.A.B International Mycological Institute. 46-49 pp.
3. BRYAN, M.K. 1930. Studies on bacterial canker of tomato. Journal of Agricultural Research. 41 (12). 825-851.
4. CHANG, R.J.; RIES, S. M; PATAKY, J. K. 1992. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration, and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. Plant Disease. 76 (11) 1150-1155.
5. CONVENIO IICA – DSV .1988. Primer curso de técnicas de laboratorio en protección vegetal. 40p.
6. CMI Commonwealth Mycological Institute. Corynebacterium michiganense. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Nº19. 1964.
7. CURSO DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATOGENAS. 1982 Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Brasil. Reginaldo Da Silva Romeiro. 109 p
8. FATMY, M; SHAAD, N W .1987. Semiselective Agar Medium for Isolation of Clavibacter michiganensis subsp michiganensis from tomato seed. Phytopathology 78(1).
9. _____; SHAAD, N. W. 1989. Detection of Clavibacter michiganense subsp. michiganense in tomato seed . In Detection of bacterial in seed. Saettler, A. W; Schaad, N.W; Roth, D. A. Minnesota. APS PRESS. pp 45-48.
10. GITAITIS, R. D; BEAVER, R. W. 1989. Detection of Clavibacter michiganense subsp. michiganense in tomato transplants. In Detection of bacterial in seed. Saettler, A. W; Schaad, N.W; Roth, D. A. Minnesota. APS PRESS. pp 116-122.

11. _____; BEAVER, R.W.; VOLOUDAKS, A.E. 1991. Detection of Clavibacter michiganensis subsp michiganensis in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*. 5 (8): 834-838.
12. _____; Mc CARTER, S.; JONES, J. 1992. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. *Plant Disease*. 76 (7): 651-656.
13. KLEMENT, Z. 1990. Tobacco (HR) test for the quick demonstration of pathogenicity. In Klement, Z; Rudolph, K; Sands, D.C. Budapest. Akademiai Kiado. pp 101-102.
14. LELLIOT, R. A; STEAD, D. 1986. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of Plants. *Methods in Plant Pathology* . Vol 2 .216 p.
15. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERIA AGRICULTURA Y PESCA. 1981. Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprófitas en el Uruguay. Montevideo. 140 p.
16. MOSCARDI, C; GARCIA, S; CARBONELL, J; Y BRIOZZO, J. 1977. Recomendaciones para control de plagas y enfermedades del tomate. In Primeras Jornadas de Extensión Agrícola. Intendencia Municipal de Canelones. Dirección de Coordinación y Planificación. Canelones 260p.
17. SARASOLA, A.A; ROCCA DE SARASOLA, M.A. 1975. Fitopatología; curso moderno. Buenos Aires. Editorial Hemisferio Sur. V3.
18. SAMISH, Z; ETUNGER-TULCZNSKA, R. 1963. Distribution of Bacteria within the tissue of healthy tomatoes. *Appl. Microbiology*. 11:7-10.
19. SANDS, D.C. 1990. Physiological criteria- determinative tests. In *Methods in Phyto- bacteriology*. Klement, Z; Rudolph, K; Sands, D.C. Budapest. Akademiai Kiado. pp 134-143.
20. SHERF, A F; MAC NAB, A A. 1986. Vegetable diseases and their control. Second Edition. Nueva York Interscience Publication. 728p
21. SUSLOW, T. V; SCHROTH, M. N; ISAKA, M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* . 72. pp 917 -918.

22. TELLO MARQUINA, J. C; DEL MORAL DE LA VEGA, J.1995. Enfermedades no víricas del tomate. In El cultivo del tomate. Nuez, F. Barcelona. Ediciones Mundi- Prensa.pp 525-563.
23. TRIDER, D.L; 1969 Foliage blight phase of bacterial canker of tomato and survival of *Corynebacterium michiganense* in toxicants and in an air-dried condition. Plant Disease Reporter. 53(11):864-868.
24. THYR, B.D; 1967. Resistance to bacterial canker in tomato, and its evaluation. Phytopathology. 58: 279-281.
25. URUGUAY. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA. Dirección de Censos y Encuestas 1994. Censo General Agropecuario.1990. Montevideo.239p
26. VAN VAERENBERGH, J. P.C; CHAUVEAU, J. F.1985. Detection of *Corynebacterium michiganense* in tomato seed lots. In Conference on New Methods of Diagnosis in Plant Protection. Eppo.Wageningen 131-138.
27. VAN VUURDE, J. W. 1987. New Approach in detecting phytopathogenic bacteria by combined immunoisolation and immunoidentification assays. EPPO. Bulletin 17. 139-148
28. _____.1990. Immunofluorescence assays. In Methods in Phyto-bacteriology. Klement, Z; Rudolph, K; Sands, D.C. Budapest. Akademiai Kiado.pp172-176.

9. APENDICES

CUADRO N°1 VALORES DE ABSORBANCIA DEL TEST DE ELISA DE LAS MEJORES COLONIAS PROVENIENTES DE LAS CUATRO VARIEDADES.

N° de MUESTRA	REPETICIONES		MEDIA
1	0.201	0.210	0.205
2	0.106	0.094	0.100
3	0.088	0.096	0.092
4	0.082	0.092	0.087
5	0.096	0.084	0.090
6	0.085	0.087	0.086
7	0.091	0.093	0.092
8	0.076	0.085	0.080
9	0.086	0.090	0.088
10	0.084	0.071	0.077
11	0.088	0.096	0.092
12	0.081	0.095	0.088
13	0.091	0.078	0.084
14	0.082	0.082	0.082
15	0.092	0.069	0.080
16	0.092	0.086	0.089
17	0.094	0.086	0.090
18	0.082	0.095	0.088
19	0.094	0.084	0.089
20	0.082	0.090	0.086
21	0.085	0.088	0.086
22	0.091	0.082	0.086
23	0.074	0.092	0.083
24	0.088	0.082	0.085
25	0.089	0.086	0.087
26	0.088	0.092	0.090
27	0.089	0.085	0.087
28	0.086	0.094	0.090
29	0.081	0.094	0.087
30	0.096	0.076	0.086
+	0.917	0.866	0.891
-	0.094	0.084	0.089
Agua destilada	0.083	0.087	0.085

NOTA: En negrita se presenta el valor más destacado en la prueba perteneciente al medio KBTS de la variedad coloso. Límite: 0.089

CUADRO N° 2 VALORES DE ABSORBANCIA DEL TEST DE ELISA CORRESPONDIENTE A COLONIAS BACTERIANAS CRECIDAS EN MEDIOS DE KBTS, SCM y NAD DE LAS CUATRO VARIEDADES.

N° de MUESTRA	REPETICIONES		MEDIA
1	+++++	+++++	
2	0.099	0.107	0.103
3	0.089	0.057	0.087
4	0.057	0.094	0.097
5	0.094	0.090	0.092
6	0.062	0.100	0.081
7	0.053	0.073	0.063
8	0.090	0.048	0.069
9	0.073	0.087	0.080
10	0.078	0.080	0.079
11	0.074	0.041	0.057
12	0.081	0.084	0.082
13	0.054	0.087	0.070
14	0.063	0.098	0.080
15	0.092	0.076	0.084
16	0.089	0.073	0.081
17	0.057	0.087	0.072
18	0.072	0.089	0.080
19	0.080	0.056	0.068
20	0.092	0.079	0.085
21	0.094	0.090	0.092
22	0.071	0.092	0.081
23	0.079	0.069	0.074
24	0.080	0.049	0.064
25	0.081	0.055	0.068
26	0.083	0.085	0.084
27	0.048	0.082	0.065
28	0.094	0.070	0.082
29	0.098	0.072	0.085
30	0.315	0.182	0.248
31	0.215	0.237	0.226
32	0.186	0.094	0.140
33	0.178	0.277	0.227
34	0.134	0.168	0.151

35	0.170	0.235	0.202
36	0.347	0.314	0.330
37	0.117	0.325	0.221
38	0.358	0.274	0.316
39	0.747	1.060	0.903
40	0.330	0.164	0.247
41	0.084	0.116	0.100
42	1.326	0.556	0.941
43	1.181	0.576	0.878
44	0.247	0.227	0.237
45	0.079	0.060	0.069
+	0.289	1.077	0.683
-	0.087	0.053	0.07
H2O	0.084	0.062	0.073

NOTA: Los valores con negrita provienen de repiques en medio NAD provenientes de la muestra 1 del test de ELISA anterior. En azul se presentan los valores más destacados de ellos límite 0.07

CUADRO N° 3 VALORES DE ABSORBANCIA DEL TEST DE ELISA DE COLONIAS BACTERIANAS PROVENIENTES DE REPIQUES DE LA MUESTRA N° 1 EL CUADRO N° 1 (APENDICE) Y DE COLONIAS CRECIDAS EN MEDIO NAD A PARTIR DE LOS REAISLAMIENTOS DE PLANTINES INOCULADOS.

MUESTRAS	REPETICIONES		MEDIA
A	0.065	0.072	0.068
B	0.077	0.081	0.079
C	0.057	0.070	0.063
D	0.063	0.055	0.059
E	0.072	0.060	0.066
F	0.067	0.060	0.063
G	0.067	0.050	0.058
H	0.171	0.180	0.175
I	0.083	0.078	0.080
J	0.052	0.056	0.054
K	0.070	0.071	0.070
L	0.096	0.086	0.091
M	0.059	0.065	0.062
N	0.080	0.092	0.091
N	0.276	0.268	0.272
O	0.098	0.098	0.098
P	0.067	0.061	0.064
Q	0.074	0.066	0.070
R	0.102	0.110	0.115
T	0.119	0.125	0.122
U	0.072	0.087	0.079
W	0.117	0.128	0.122
Y	0.140	0.148	0.144
Z	0.072	0.073	0.072
PQ	0.151	0.167	0.159
MA	0.187	0.180	0.183
+	0.359	0.300	0.329
-	0.067	0.075	0.071
Agua destilada	0.058	0.070	0.064

NOTA: La muestra en rojo corresponde al reislamiento de mayor absorbancia. obtenidos de los plantines inoculados. En azul se presentan los valores mas destacados en la prueba Límite: 0.071

CUADRO N° 4 VALORES DE ABSORBANCIA DEL TEST DE ELISA CORRESPONDIENTE A REPIQUES EN NAD DE COLONIAS BACTERIANAS CON MAYORES VALORES DE ABSORBANCIA EN EL TEST DE ELISA ANTERIOR.

N° de MUESTRA	REPETICIONES		MEDIA
1	0.449	0.461	0.455
2	0.976	1.085	1.030
3	0.964	1.024	0.994
4	0.120	0.083	0.101
5	0.462	0.508	0.485
6	0.072	0.070	0.071
7	0.087	0.110	0.098
8	0.996	0.999	0.997
9	1.081	0.941	1.011
10	0.189	0.089	0.139
11	0.064	0.069	0.066
12	0.082	0.093	0.087
13	0.190	0.208	0.199
14	1.187	0.994	1.090
15	0.205	0.389	0.297
16	0.144	0.168	0.156
17	0.233	0.224	0.228
18	0.389	0.261	0.325
19	0.343	0.287	0.315
20	0.289	0.172	0.230
21	0.088	0.079	0.083
22	0.191	0.194	0.192
23	0.128	0.141	0.134
24	0.145	0.146	0.145
25	0.535	0.467	0.501
26	0.496	0.466	0.481
27	0.135	0.207	0.171
28	0.298	0.329	0.309
29	0.630	0.690	0.660
+	1.426	1.403	1.414
-	0.092	0.085	0.089
Agua destilada	0.066	0.082	0.074

NOTA : Valores más destacados de los reislamientos en azul.
 En negrita, valores más destacados de repiques de placas que
 presentaron los mejores valores en el Test de ELISA anterior. Limite: 0.088

CUADRO N°5 DESCRIPCION DE LOS CRECIMIENTOS DE COLONIAS BACTERIANAS EN LOS MEDIOS KBTS, SCM Y NAD PROVENIENTES DE LOS AISLAMIENTOS DE LAS VARIEDADES COLOSO Y SUPERMAX A LOS CUATRO DÍAS DE LA SIEMBRA.

COLOSO		
KBTS	SCM	NAD
1- Circular grande, elevación convexa, diámetro de 5mm, color beige transparente.	1- Circular, grande; 5-6mm, convexa, transparente.	1- Numerosas colonias. Presencia de fuertes olores ácidos.
2- 1-Forma puntiforme convexa, 2mm, color amarillo.	2- Puntiforme, apenas visible, color crema.	
3- Circular, mediana, 3-4mm, color – crema		
SUPERMAX		
KBTS	SCM	NAD
1- Sin crecimiento	1- Sin crecimiento	1- Numerosas colonias

CUADRO N°6 DESCRIPCION DE LOS CRECIMIENTOS DE COLONIAS BACTERIANAS EN LOS MEDIOS KBTS, SCM Y NAD PROVENIENTES DE LOS AISLAMIENTOS DE COLOSO Y SUPERMAX A LOS 9 DÍAS DE LA SIEMBRA

COLOSO		
KBTS	SCM	NAD
1- Puntiforme, elevación convexa, color rosado. 2- Puntiforme, convexa, color crema. 3- Circular, convexa, color amarillo. 4- Forma irregular, elevada, color crema, presencia de fluorescencia.	1- Colonia circular, convexa, borde entero, transparente. 2- Puntiforme, borde entero, color amarillo-crema.	1- Abundante número y tipo de colonias, masa indiferenciable, Crecimiento de saprófitas.
SUPERMAX	SCM	NAD
KBTS		
1- Puntiforme, color crema. 2- Puntiforme, convexa, color rosado.	1- Sin crecimiento.	1- Puntiforme, convexa, coloración rosada. 2- Irregular, achatada, color crema, borde ondulado. 3- Irregular, de coloración amarilla. 4- Circular, convexa, color crema.

CUADRO N°7 DESCRIPCION COMPARATIVA ENTRE LOS PROCESOS DE AGITACION, MACERADO; CONCENTRADO Y DILUIDO PARA AISLAMIENTOS PROCEDENTES DE LA VARIEDAD SUPERMAX

SUPERMAX Agitación Concentrado KBTS	SCM	NAD
1- Puntiforme, color crema. 2- Puntiforme, convexa, Color rosado.	1- Sin crecimiento.	1- Puntiforme, convexa, coloración rosada 2- Irregular, achataca, color crema, borde ondulado. 3- Irregular de coloración amarilla. 4- Circular, convexa, color crema
Agitación Diluido KBTS	SCM	NAD
1- Puntiforme, borde entero, color crema 2- Puntiforme, convexa, color rosado (Ambos con menor crecimiento con respecto a KBTS-agitación concentrado.)	1- Sin crecimiento	1- Idem a NAD agitación concentrado, Menor crecimiento posibilitando una mejor observación de las colonias aisladas.
Macerado Concentrado KBTS	SCM	NAD
1- Puntiforme, coloración crema 2- Puntiforme, convexa, color rosado	1- Sin crecimiento.	1- Idem NAD agitación concentrado
Macerado Diluido KBTS	SCM	NAD
1- Puntiforme, color crema. 2- Puntiforme, de coloración rosada.	1- Sin crecimiento	1- Idem NAD agitación concentrado.

CUADRO N° 8 DESCRIPCIÓN DE LOS CRECIMIENTOS DE COLONIAS BACTERIANAS PROVENIENTES DE TOMMY Y FORTALEZA A LOS 6 DÍAS DESPUÉS DE LA SIEMBRA

TOMMY		
KBTS	SCM	NAD
1- Circular elevación convexa, color crema, borde entero. 2- Circular, elevada, transparente, borde entero.	1- Circular, convexa, transparente, bordes lisos.	1- Circular, elevada, coloración amarilla. 2- Irregular, achatada, color crema. 3- Presencia de hongos, olores fétidos.
FORTALEZA		
KBTS	SCM	NAD
1- Excesivo crecimiento que impidió la observación de colonias aisladas.	1- Colonia circular, convexa, transparente.	1- Numerosos tipos de colonias de difícil observación.

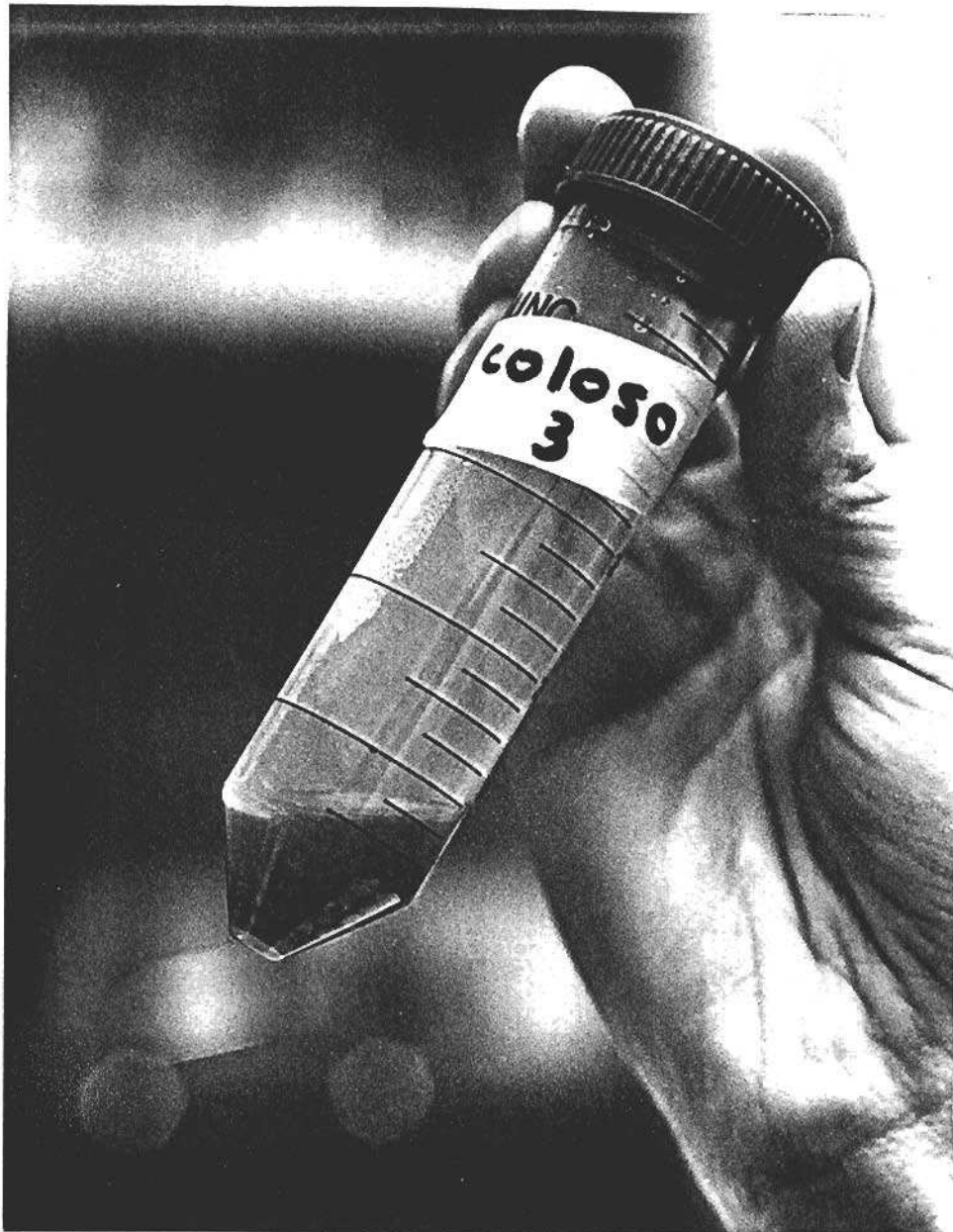


Foto N°1 Observación de un tubo con un lote de semilla de la variedad Coloso

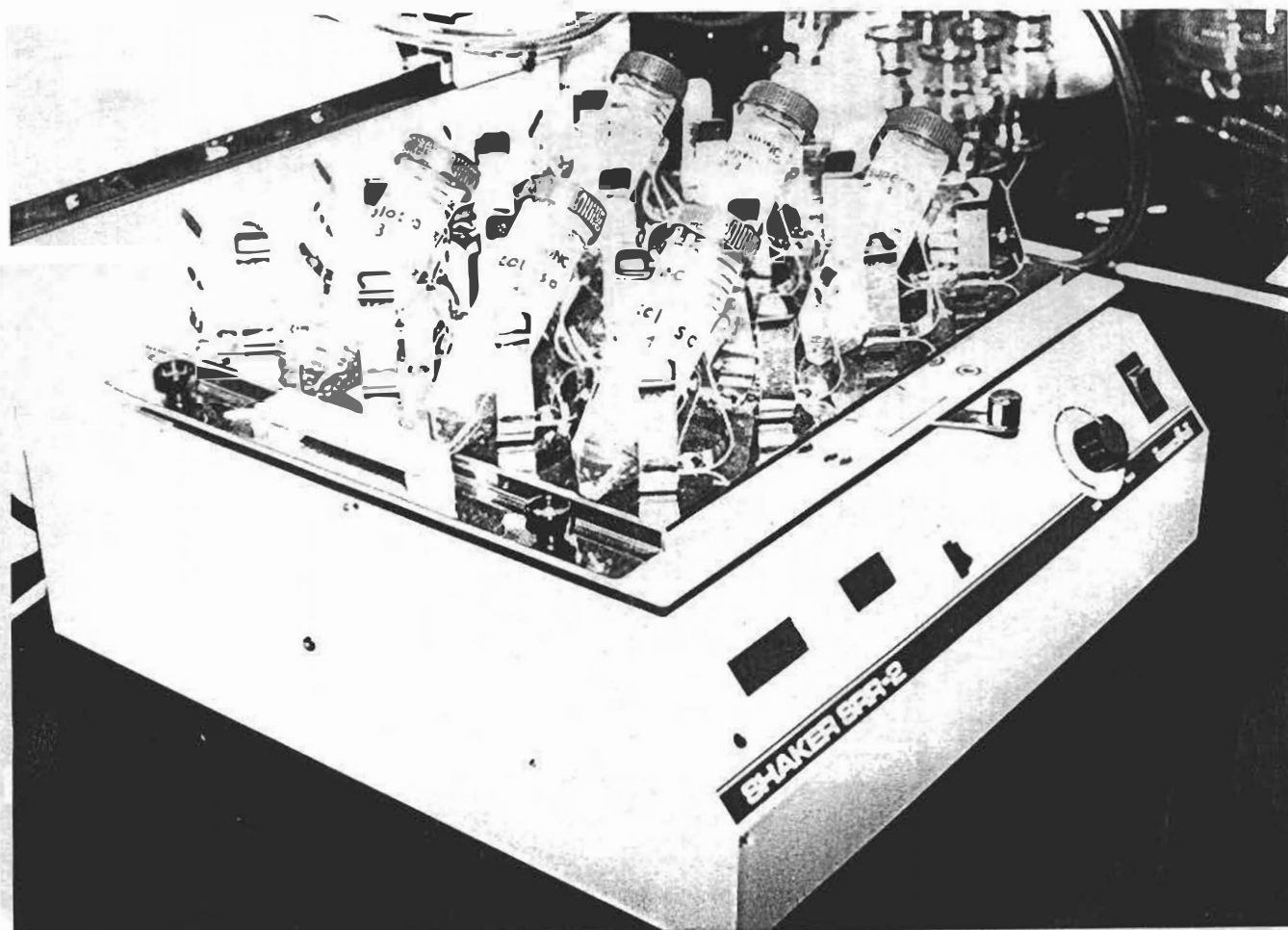


Foto N° 2 Oservación del agitador rotativo

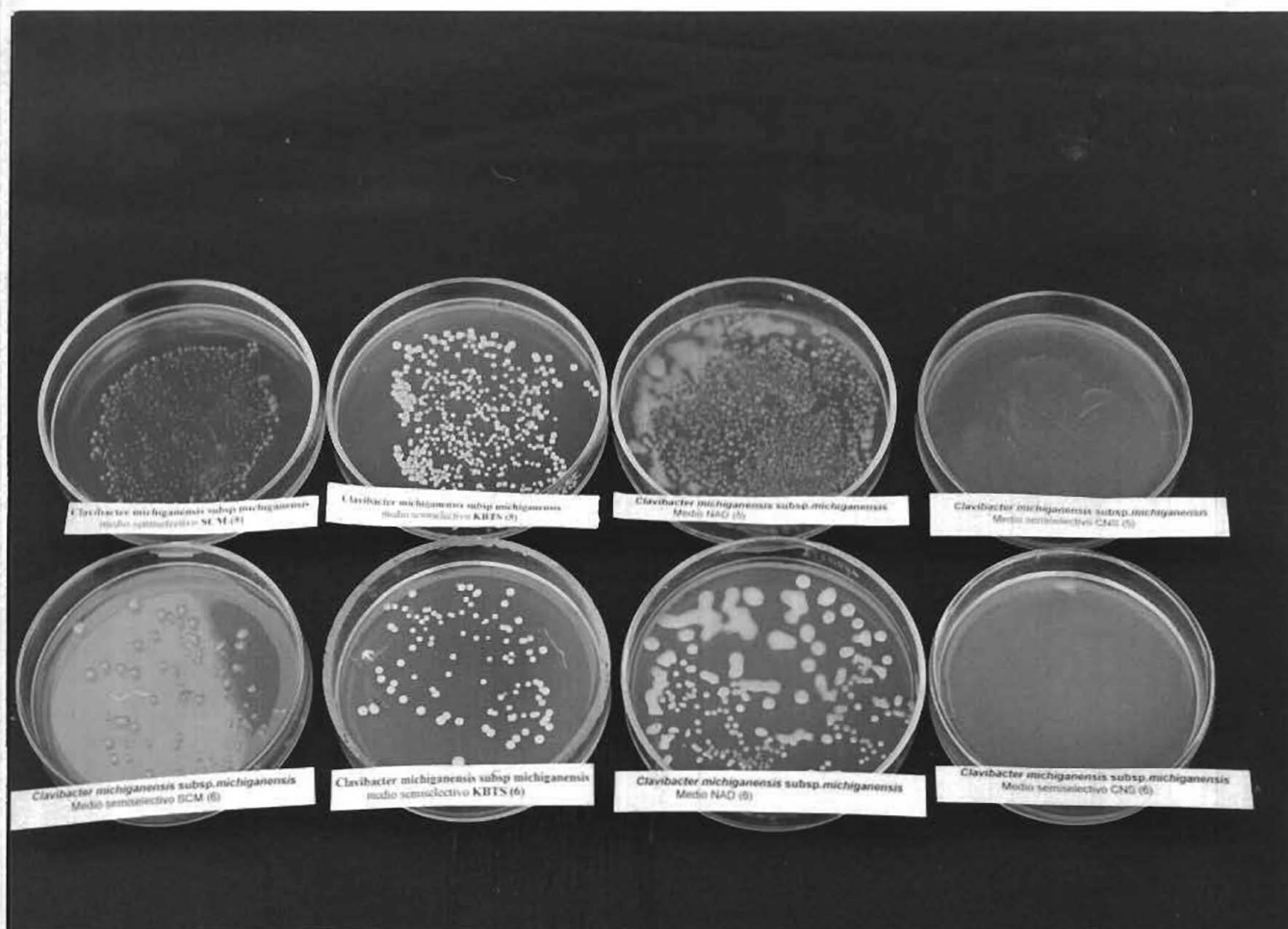


Foto N° 3 Observación de recuperación de colonias de *Clavibacter m.* subsp. *m.* en los medios SCM, KBTS, CNS y NAD en diluciones de 1×10^5 y 1×10^6

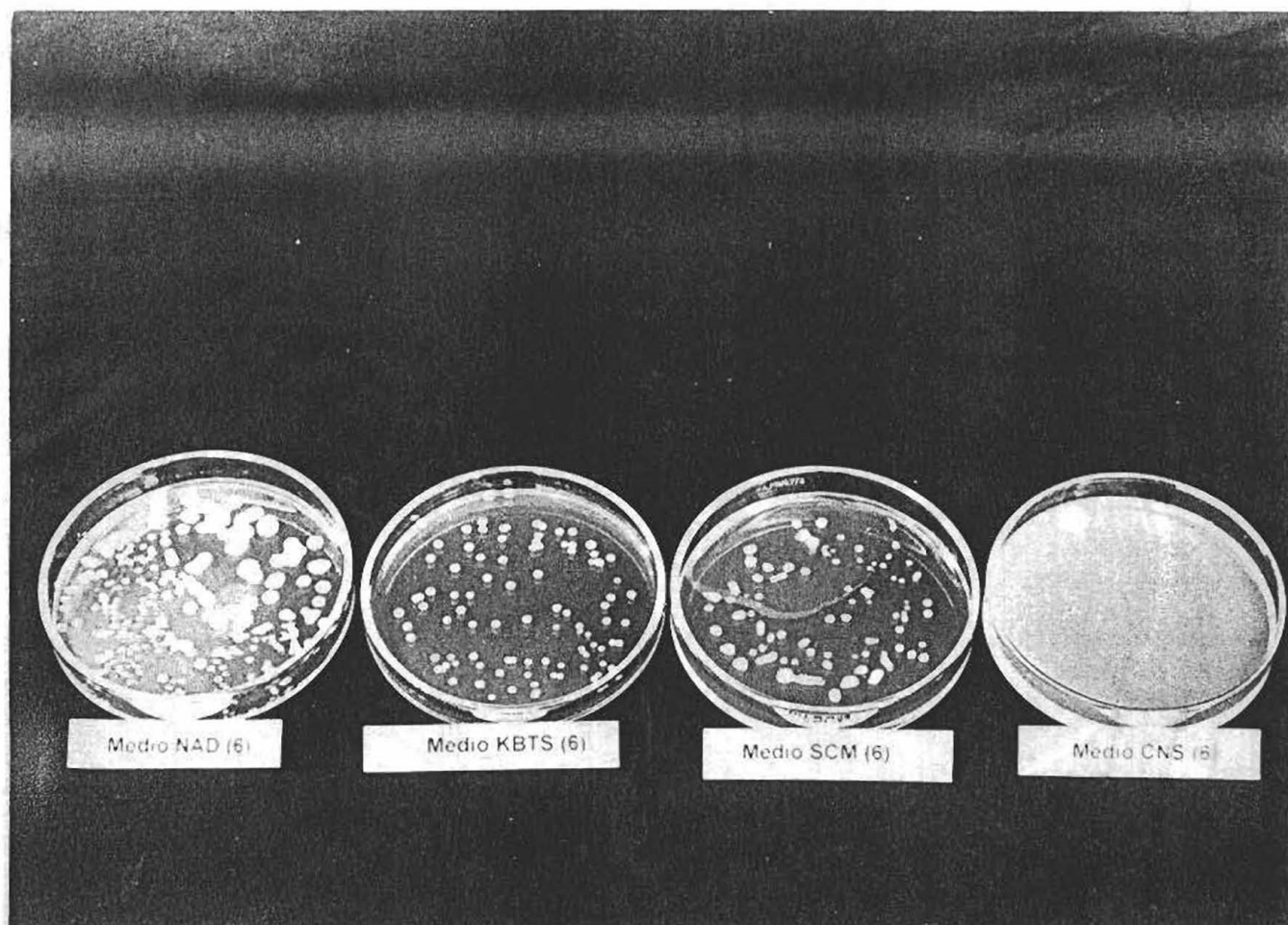


Foto N° 4 Observación de colonias de *Clavibacter m. subsp. m.* en los medios SCM, KBTS, CNS, y NAD.

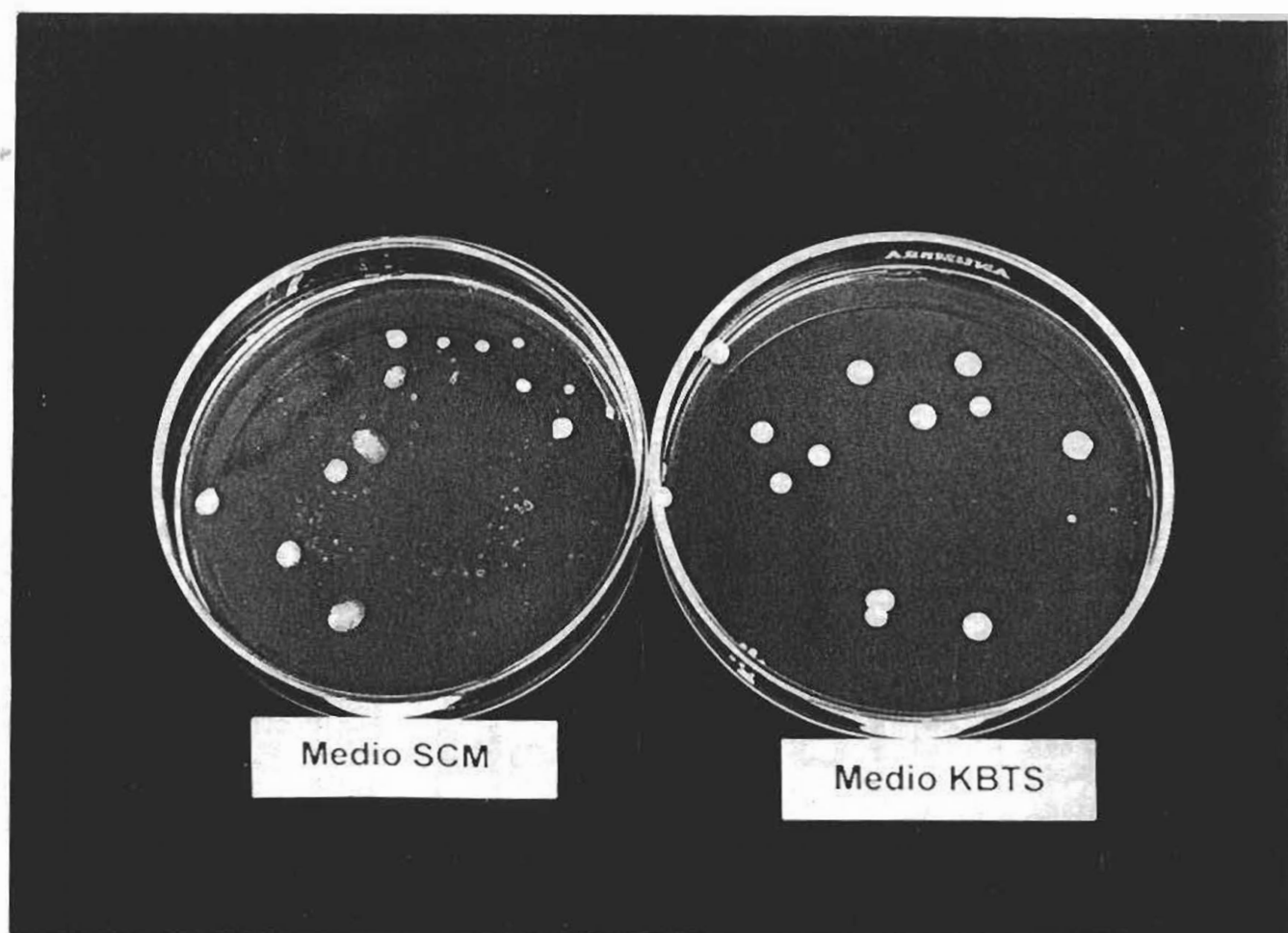


Foto Nº 5 Observación de colonias de *Clavibacter m. subsp. m.* en los medios SCM y KBTS.

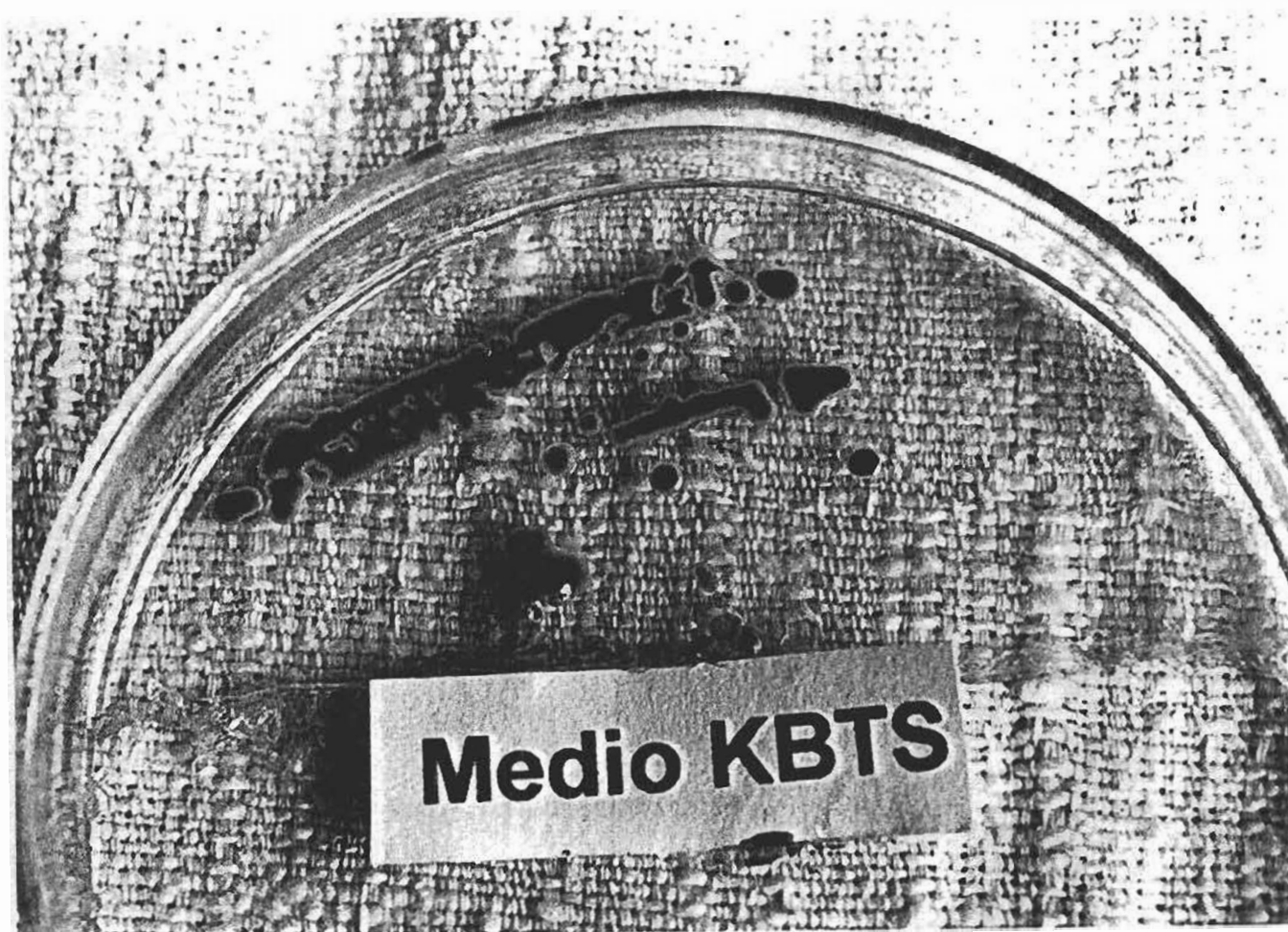


Foto N° 6 Observación de colonias de *Clavibacter m. subsp. m.* en el medio KBTS.

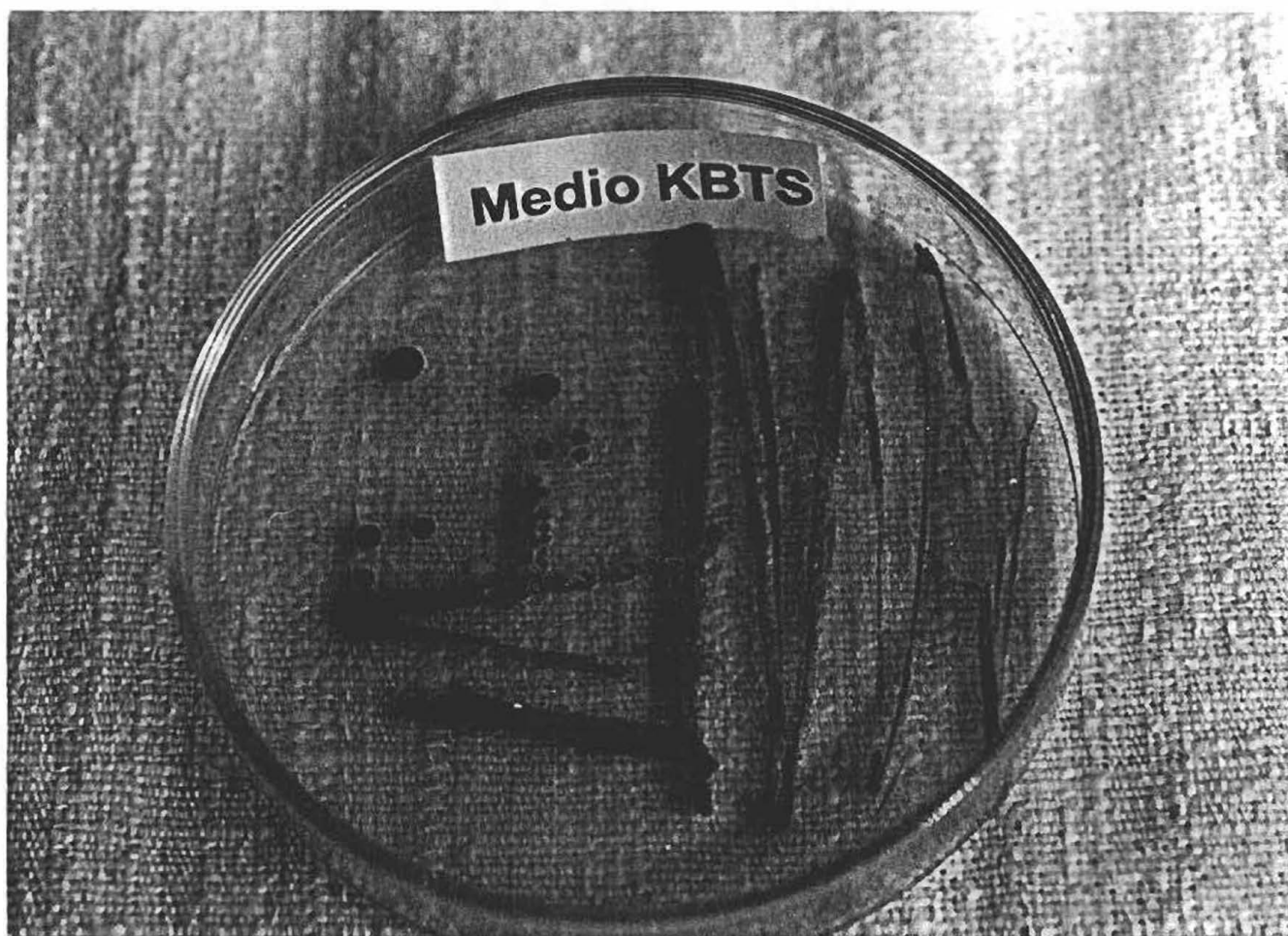


Foto N° 7 Observación de colonias de *Clavibacter m.* subsp. *m.* en el medio KBTS.

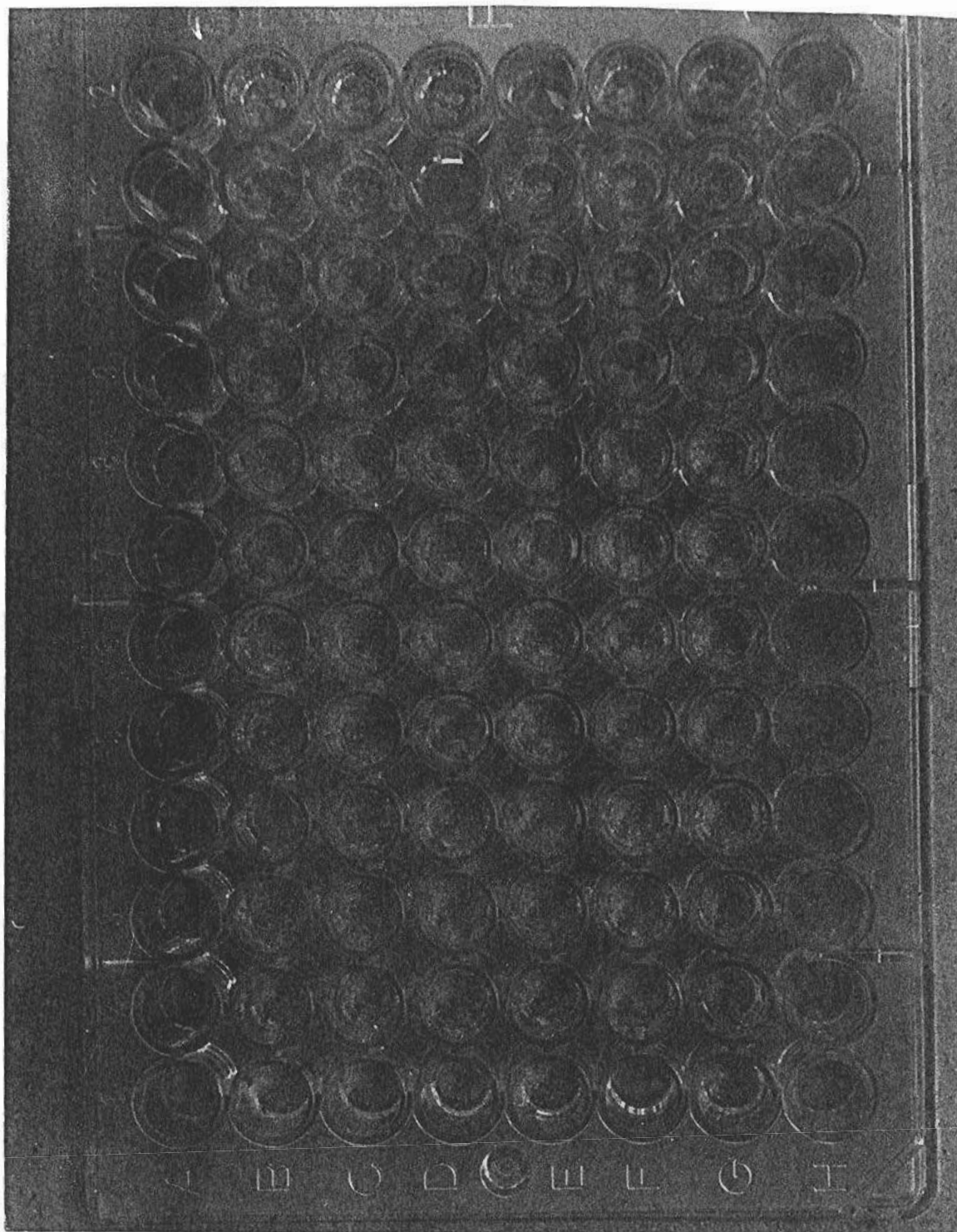


Foto N° 8 Placa de test de ELISA correspondiente a los datos presentados en el cuadro N° 1 de apéndice.

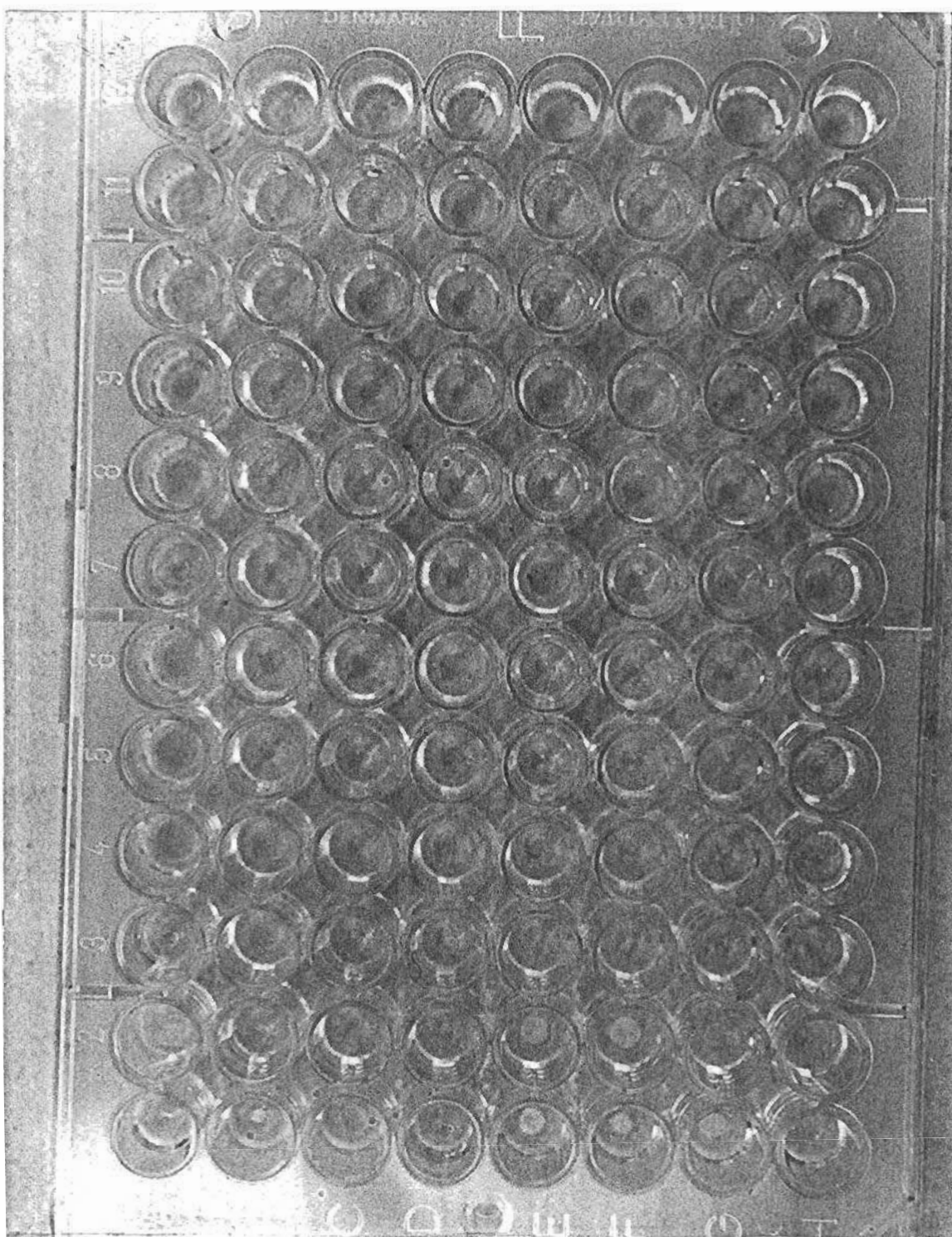


Foto N° 9 Placa de test de ELISA correspondiente a los datos presentados en el cuadro N°2 de apendice.

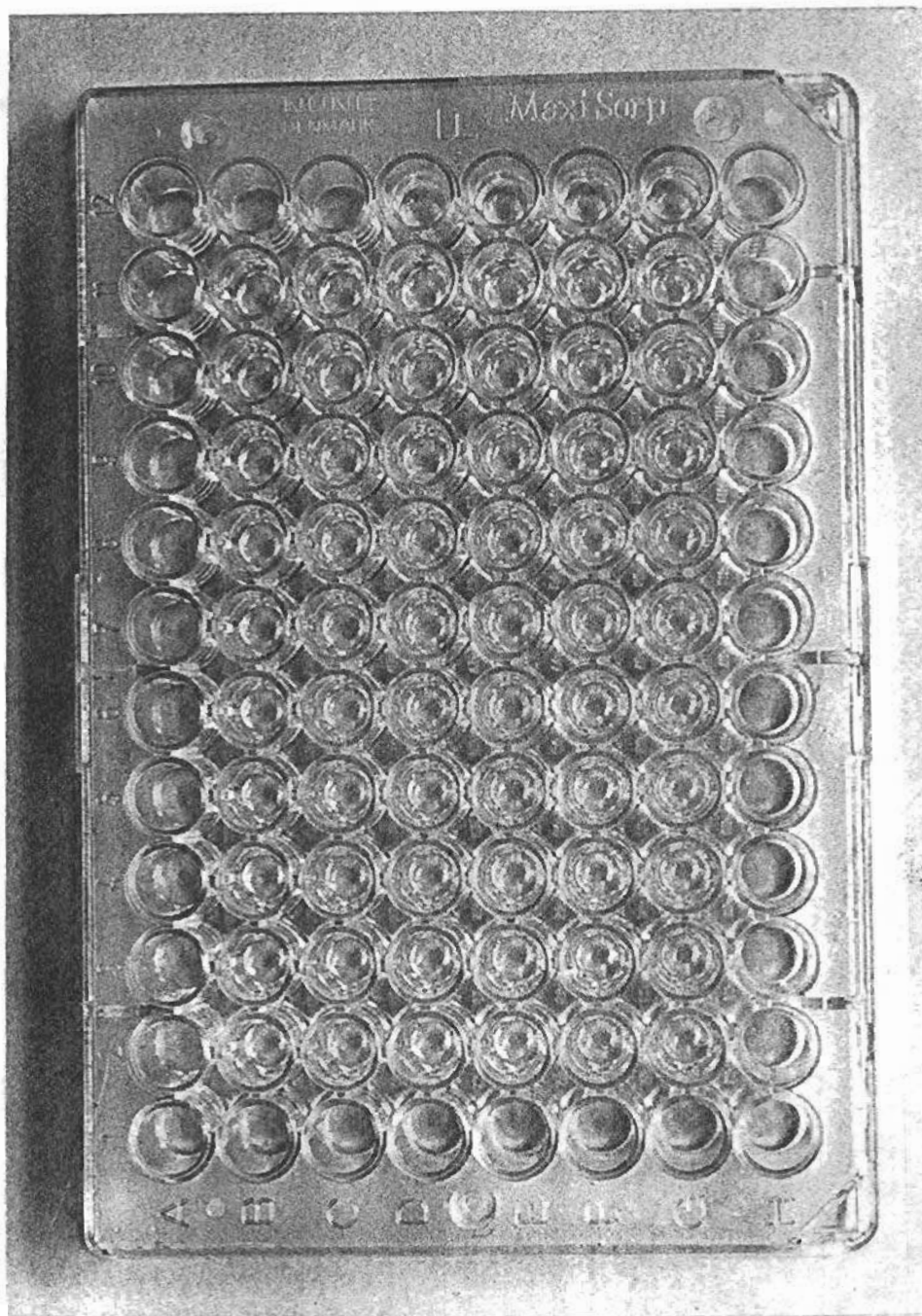


Foto N° 10 Placa de tes de ELISA correspondiente a los datos presentados en el cuadro N° 4 de apendice.

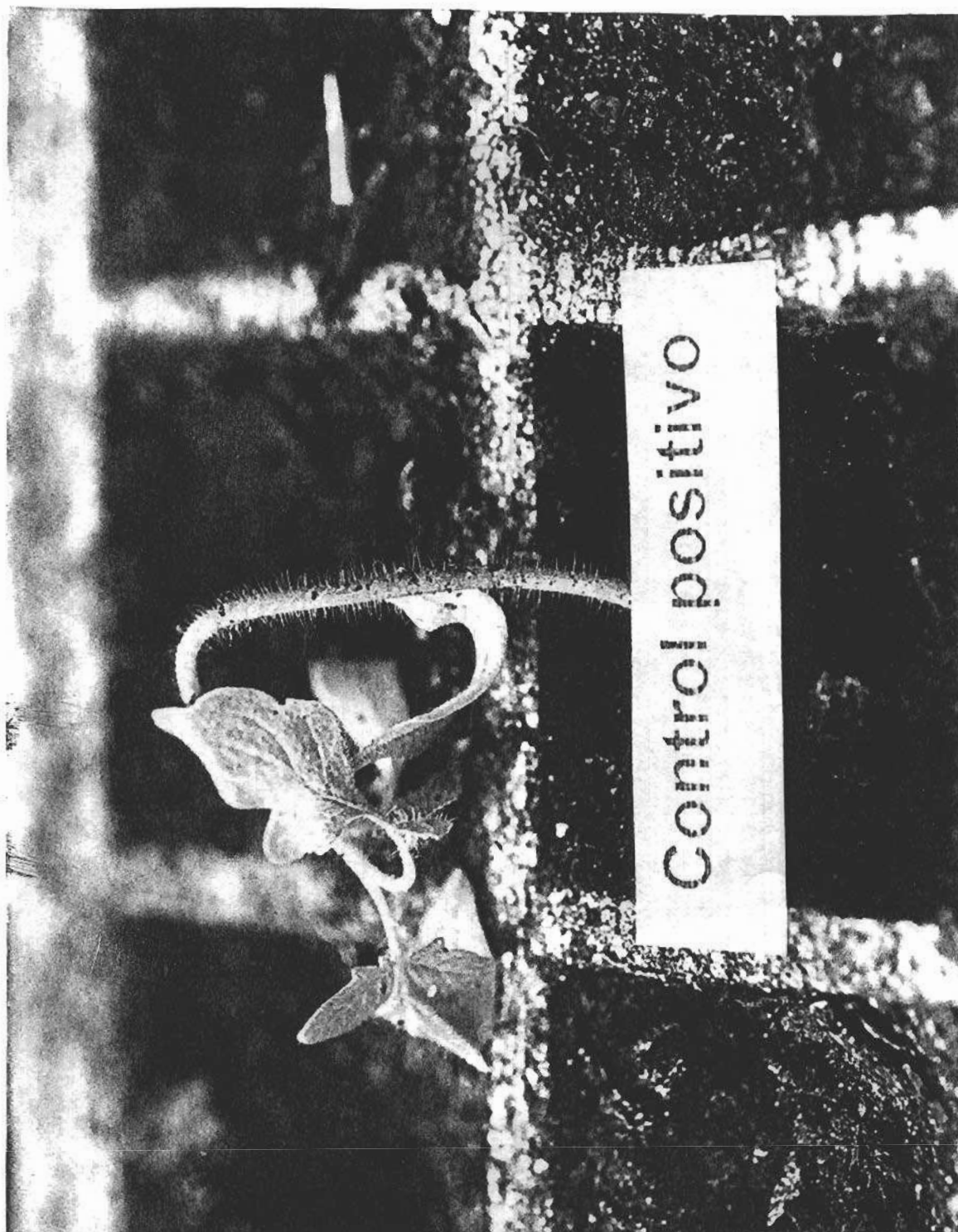


Foto N° 11 Observación de marchitamiento de un plantín inoculado con el aislamiento positivo.

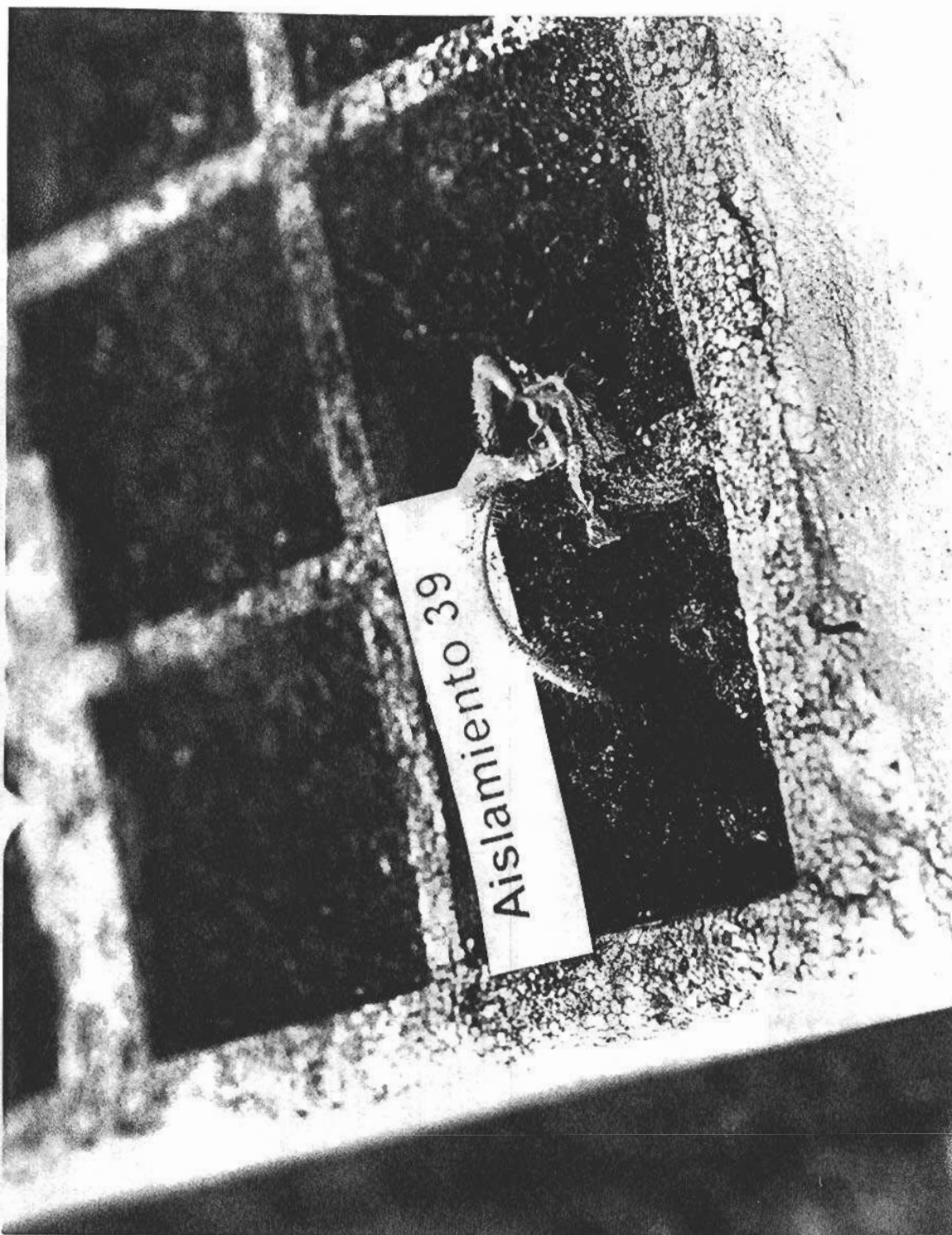


Foto N° 12 Observación de marchitamiento de un plantín inoculado con el aislamiento N° 39.

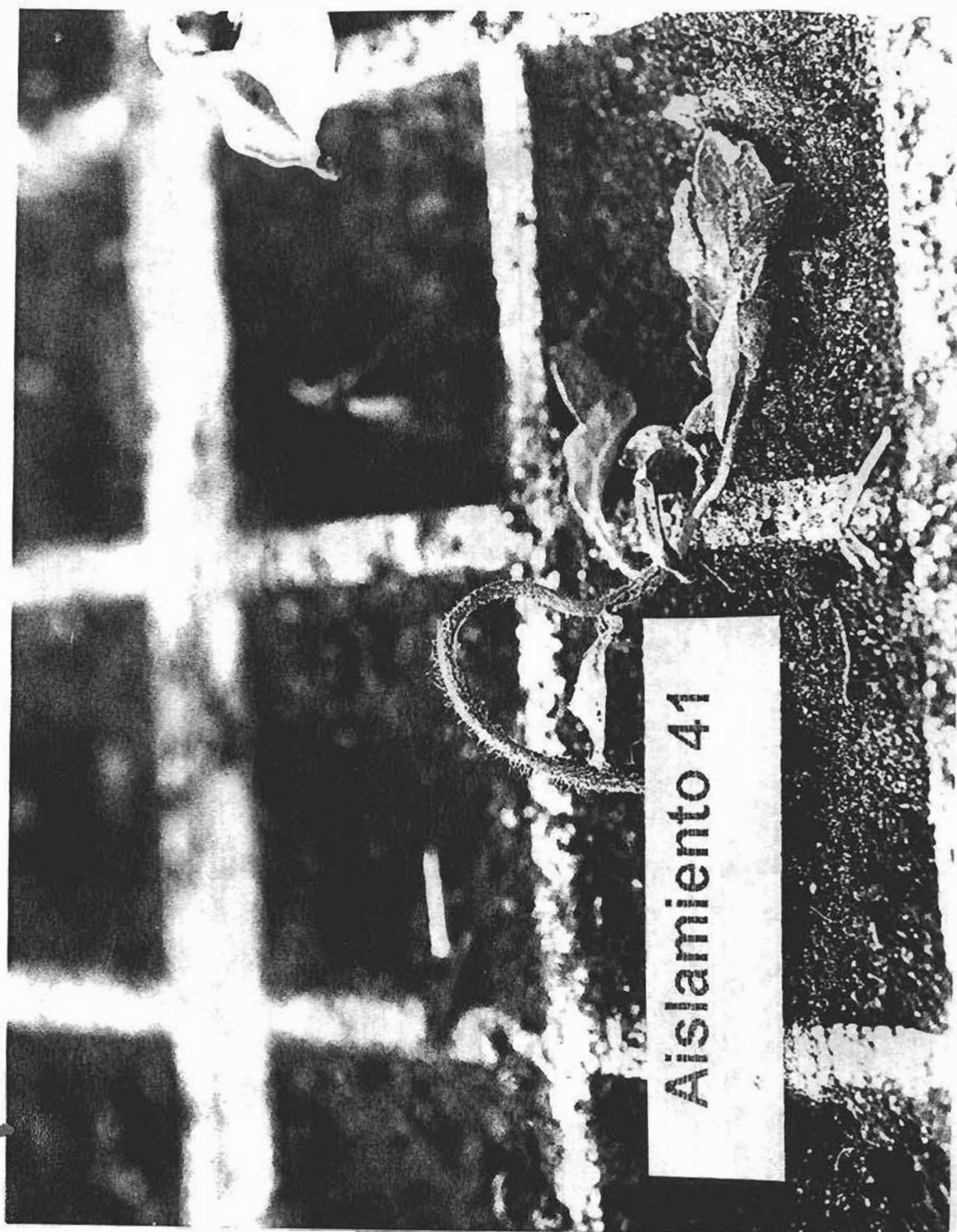


Foto N° 13 Observación de marchitamiento de un plantín inoculado con el aislamiento N° 41.



Foto N°14 Observación de marchitamiento de un plantín inoculado con el aislamiento N° 42

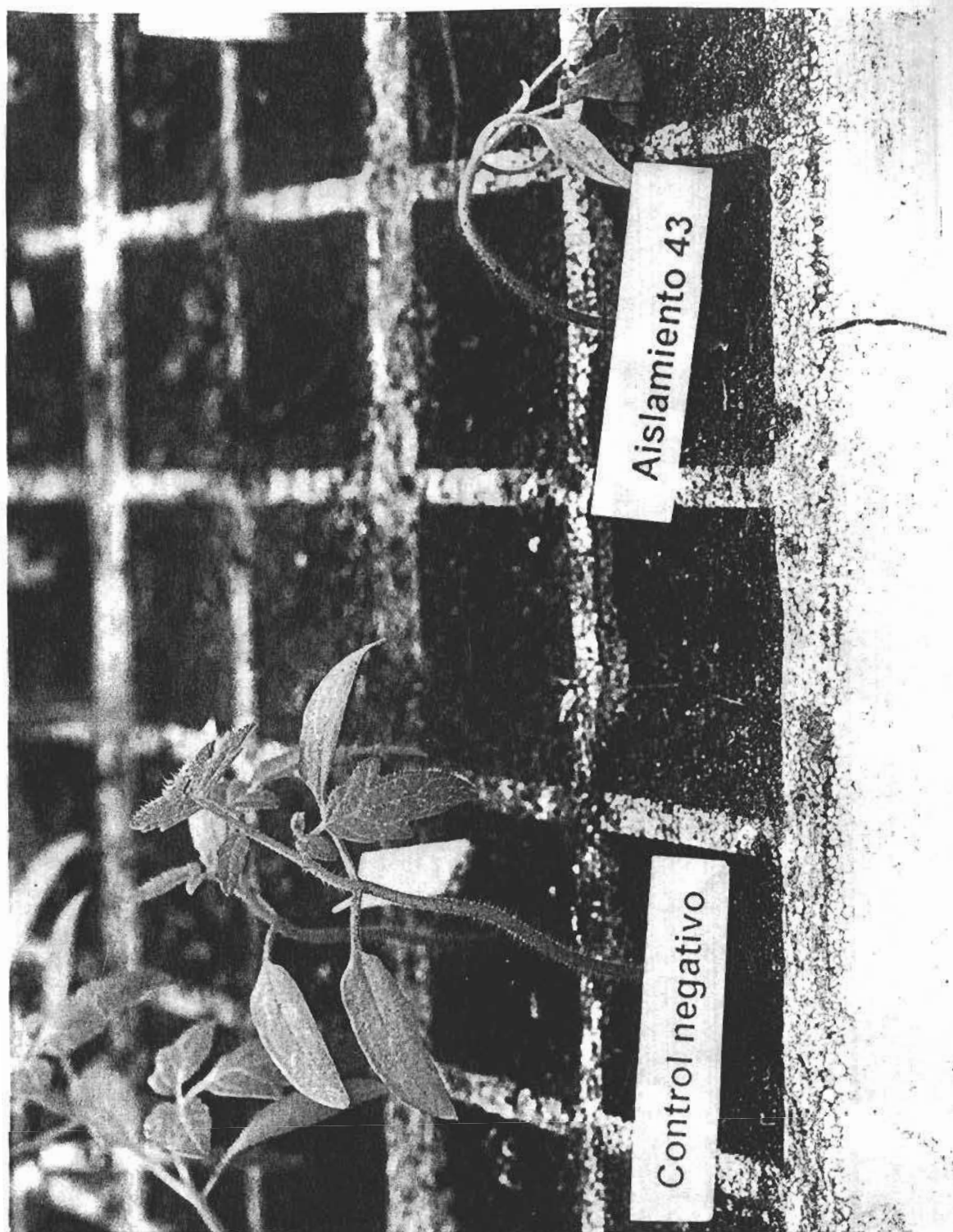


Foto N° 15 Comparación de un plantín inoculado con agua esteril y un plantín inoculado con un aislamiento.

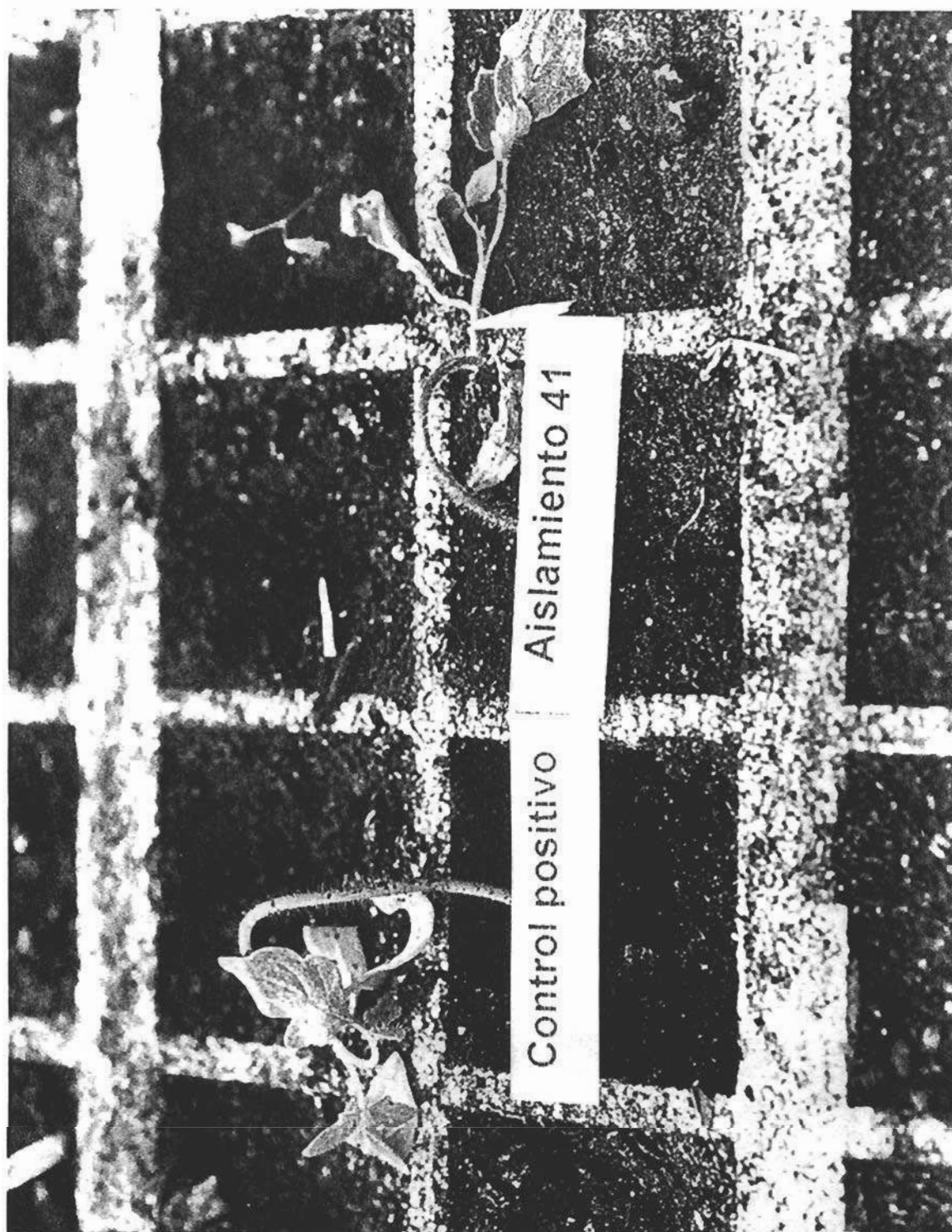


Foto N° 16 Comparación de un plantín inoculado con el aislamiento positivo y un plantín inoculado con un aislamiento.