

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**CARACTERIZACIÓN DE *Xanthomonas* spp. CAUSANTES DE LA MANCHA
BACTERIANA DEL TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) EN URUGUAY**

por

María José MONTELONGO GARCÍA

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de *Magister*
en Ciencias Agrarias opción Ciencias
Vegetales

MONTEVIDEO
URUGUAY
2012

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. (MSc.) Vivienne Gepp (Presidente), Ing. Agr. (MSc.) Elena Pérez (Vocal) e Ing. Agr. (Dr.) Gustavo Giménez (Vocal) el 6 de agosto de 2012. Autor: Ing. Agr. María José Montelongo García. Tutor: Ing. Agr. (MSc.) Diego Maeso Tozzi. Co- tutor: Ing. Agr. (MSc.) Pablo González Rabellino.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Diego Maeso Tozzi y Pablo González Rabellino, por su constante apoyo y dedicación, que hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria – Uruguay, por la beca de estudios de Maestría y por financiar el trabajo experimental.

A los productores que permitieron tomar muestras de sus cultivos.

A Alfredo, Wilma, Beatriz, Carolina, Alberto, Noelia, Paula, Lucía, Mariana, Akira, Inés, Victoria, Sebastián y al personal de INIA Las Brujas que me ayudaron mucho en la realización del trabajo y por el apoyo humano constante.

A los compañeros de la Cátedra de Fitopatología por su colaboración y apoyo constante.

A los integrantes del tribunal, Vivienne Gepp, Elena Pérez y Gustavo Giménez, por sus aportes.

Dedico este trabajo a Sebastián, a toda mi familia y amigos por estar siempre a mi lado.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EL CULTIVO DEL TOMATE EN URUGUAY.....	1
1.2. MANCHA BACTERIANA DEL TOMATE.....	1
1.3. MANEJO DE LA ENFERMEDAD.....	6
1.4 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	8
2. <i>Xanthomonas</i> spp. en tomate en Uruguay: razas y sensibilidad <i>in vitro</i> a cobre y antibióticos	10
Resumen.....	10
Abstract.....	11
2.1. Introducción.....	12
2.2. Materiales y métodos.....	15
2.2.1. Obtención y preservación de los aislados de <i>Xanthomonas</i> spp.....	15
2.2.2. Caracterización de los aislados.....	16
a) Prueba de hipersensibilidad en tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	16
b) Caracterización bioquímica.....	16

	c) Prueba de patogenicidad.....	17
	2.2.3. <i>Identificación de las razas de Xanthomonas spp</i>	17
	2.2.4. <i>Evaluación de la sensibilidad a cobre, estreptomycin y kasugamicina in vitro</i>	18
	2.2.5. <i>Análisis estadístico</i>	19
2.3.	Resultados	19
	2.3.1. <i>Colección de Xanthomonas spp</i>	19
	2.3.4. <i>Sensibilidad a cobre, estreptomycin y kasugamicina in vitro</i>	21
2.4.	Discusión	26
2.5.	Bibliografía	29
3.	Evaluación de agresividad de aislados de <i>Xanthomonas spp</i>. causando mancha bacteriana del tomate en Uruguay	34
	Resumen	34
	Abstract	35
3.1.	Introducción	36
3.2.	Materiales y métodos	38
	3.2.1. <i>Aislados y material vegetal utilizado</i>	38
	3.2.1. <i>Metodología de inoculación y evaluación</i>	39
	3.2.3. <i>Análisis estadístico</i>	41
3.3.	Resultados	41
	3.3.1. <i>Diferencias entre agresividad de aislados</i>	41
	3.3.1. <i>Influencia del momento de evaluación en la discriminación de la agresividad de los aislados</i>	48
3.4.	Discusión	49
3.5.	Bibliografía	55

3.6. Anexos.....	58
3.6.1. Anexo1. Escala diagramática desarrollada por Mello et al. (1997).....	58
4. CONCLUSIONES GENERALES	59
5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL	61
6. ANEXOS	69
6.1. INSTRUCCIONES PARA AUTORES.....	69

RESUMEN

La mancha bacteriana es una de las enfermedades más importantes en el cultivo de tomate a campo en Uruguay. Es causada por cuatro especies de *Xanthomonas* y de acuerdo a su relación patogénica con determinadas plantas indicadoras se han definido cinco razas: T1 que corresponde a *X. euvesicatoria*; T2 a *X. vesicatoria* y *X. gardneri* y T3, T4 y T5 a *X. perforans*. Su manejo se basa en aplicaciones de productos cúpricos, mancozeb y antibióticos, sin embargo no se logra un control satisfactorio. Se ha iniciado un programa de mejoramiento basado en algunos genotipos de tomate identificados con cierta resistencia cuantitativa a esta enfermedad. Para realizar el tamizado de materiales según su tolerancia, es necesario ajustar un protocolo adaptado a condiciones locales. Entre 2007 y 2010 se obtuvieron 86 aislados de *Xanthomonas* spp. a partir de plantas de tomate con síntomas de la enfermedad, provenientes de las principales zonas de producción del país. Las razas se determinaron mediante la combinación de resultados (reacción de hipersensibilidad o sensibilidad) luego de la inoculación por infiltración de suspensión bacteriana de plantas indicadoras de *Solanum lycopersicum* (Bonny Best, Hawaii 7998, Florida 216), *S. pennellii* y *S. pennellii* x Hawaii 7998. La sensibilidad a antibióticos fue determinada sembrando los aislados en NAD suplementado con $CuSO_4$, estreptomina y kasugamicina. La agresividad de aislados locales de *Xanthomonas* spp. se evaluó mediante la inoculación con la aspersión de suspensión bacteriana de 5×10^8 ufc.ml⁻¹, en plantas de tomate bajo condiciones controladas. Se evaluó el número de lesiones y se midió la severidad en las hojas 5, 6 y 7 (número de hoja verdadera, siendo la 7 la hoja más nueva), a los 9, 13 y 15 días después de la inoculación. Se utilizó una escala diagramática y un programa de procesamiento de imagen (ImageJ). Las razas encontradas fueron T3 (86 %), T2 (5 %) y T4 (9 %). El 92 % de aislados presentaron resistencia *in vitro* a 200 ppm de Cu, 35% a 100 ppm de estreptomina y 23 % a 200 ppm de kasugamicina. No se encontró relación entre zona de origen, raza y sensibilidad *in vitro* a los productos. La evaluación de la severidad fue más apropiada para detectar diferencias significativas de agresividad entre aislados. Para detectar diferencias en la agresividad entre los aislados la evaluación se debe realizar en las hojas 5 y 6 y entre 9 y 13 días después de la inoculación.

Palabras clave: Mancha bacteriana del tomate, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, cobre, kasugamicina, estreptomina, inoculación, agresividad

CHARACTERIZATION OF *Xanthomonas* spp. CAUSING BACTERIAL LEAF SPOT IN TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) IN URUGUAY

SUMMARY

Bacterial leaf spot is one of the main diseases of open field tomato crops in Uruguay. It is caused by four *Xanthomonas* species and five races have been defined according to their pathogenicity on several indicator plants: T1 corresponding to *X. euvesicatoria*, T2 to *X. vesicatoria* and *X. gardneri* and T3, T4 and T5 to *X. perforans*. Its control is based on copper, mancozeb and antibiotic sprays, but satisfactory control is not achieved. A breeding program has started based on some tomato genotypes identified with quantitative resistance to this disease in Uruguay. To screen materials according to their tolerance, it is necessary to set up a protocol adapted to local conditions. Between 2007 and 2010 86 isolates of *Xanthomonas* spp. were collected from diseased tomato plants, from the main producing area of the country. Races were determined by the hypersensitive or susceptible reaction of indicator plants: *Solanum lycopersicum* (Bonny Best, Hawaii 7998, Florida 216), *S. pennellii* and *S. pennellii* x Hawaii 7998 after inoculation by infiltration of a bacterial suspension. Sensitivity to antibiotics was determined by plating isolates on NAD amended with CuSO₄, streptomycin or kasugamycin. The aggressiveness of local *Xanthomonas* spp. isolates was evaluated in controlled condition of tomato plants by spray inoculation with a bacterial suspension of 5×10^8 ufc.ml⁻¹. Lesion number and severity was measured on leaves number 5, 6 and 7, 7 being the newest leaf, 9, 13 and 15 days after inoculation. A diagrammatic scale and an image processing program (ImageJ) were used. Races T3 (86%), T2 (5%) and T4 (9%) were found. 92% of isolates showed *in vitro* resistance to 200 ppm Cu, 35% to 100 ppm of streptomycin and 23% to 200 ppm of kasugamycin. No relationship was found between origin, race and *in vitro* sensitivity to products. The severity assessment was suitable to detect significant differences in isolate aggressiveness. To detect aggressiveness differences among isolates, evaluation should be performed on leaves 5 and 6 and between 9 and 13 days after inoculation.

Keywords: bacterial spot of tomato, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, copper, kasugamycin, streptomycin, inoculation, aggressiveness

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CULTIVO DE TOMATE EN URUGUAY

El tomate (*Solanum lycopersicum* L., sinónimo *Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las solanáceas. Su centro de origen es la región andina, área donde crecen espontáneamente diversas especies del género (Nuez, 1995). La especie está adaptada a climas cálidos, su crecimiento se detiene a temperaturas medias por debajo de 10 °C o por encima de 35 °C, no tolera heladas ni condiciones de anegamiento del suelo (Dogliotti, 2007; Aldabe, 2000). Su crecimiento y desarrollo es óptimo en el rango entre 15 y 25 °C. La especie es potencialmente perenne en su lugar de origen, pero en regiones de clima templado, como es el caso de Uruguay, presenta un ciclo anual definido por la ocurrencia de heladas y bajas temperaturas durante la estación invernal (Aldabe, 2000). Es una especie de porte arbustivo, que puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta, o erecta (Nuez, 1995).

En Uruguay se realiza el cultivo de tomate para consumo en fresco (tomate de mesa) y para industria. El tomate de mesa se produce a campo en la zona sur en verano-otoño y bajo cubierta, en la zona norte y sur. El tomate industria se produce en la zona sur, a campo. Más del 86% de la cosecha se destina al consumo en fresco. En la zafra 2008/2009 el cultivo de tomate ocupó una superficie de 574 ha, de las cuales el 66 % se realizó a campo. Los cultivos a campo se realizan principalmente en la zona sur (Uruguay, 2010).

1.2. MANCHA BACTERIANA DEL TOMATE

La mancha bacteriana está ampliamente distribuida a nivel mundial, causando importantes pérdidas en los cultivos de tomate y pimiento (CAB International, 2007; Jones y Stall, 1998). Es considerada una de las enfermedades más importantes del cultivo de tomate a campo ya que si las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad, ésta se disemina rápidamente en el cultivo. No existen cultivares con resistencia adecuada y la eficiencia en el control químico es variable (Jones *et al.*, 1997).

Esta enfermedad es causada por bacterias del género *Xanthomonas* y sus cultivos hospedantes son tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) (CAB International, 2007; Sun *et al.*, 2002; Blancard, 1992). También ha sido reportada en otras especies vegetales, las que incluyen *Capsicum frutescens*, *Datura stramonium*, *Hyoscyamus* spp., *H. niger*, *H. aureus*., *Lycium* spp., *L. chinense*, *L. halimifolium*, *Lycopersicon pimpinellifolium*, *Nicotiana rustica*, *Nicandra physalodes*, *Physalis minima*, *Solanum* spp., *S. dulcamara*, *S. nigrum*, *S. rostratum*, *S. tuberosum* y *S. melongena*. Éstas son especies hospedantes naturales o inoculadas artificialmente y están reportadas como hospedantes de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, sin diferenciar los distintos grupo genéticos que causan la enfermedad (CAB International, 2007; Jones y Stall, 1998).

Afecta todos los órganos aéreos de la planta. En las hojas el síntoma inicial consiste en una mancha acuosa de color verde claro y forma irregular. Luego se torna de color marrón, con borde definido; puede presentar halo clorótico. Bajo condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad las lesiones pueden coalescer, formando grandes superficies de tejido necrótico y puede ocurrir defoliación. Este tipo de síntomas también se producen en tallo y raquis. El síntoma inicial en los frutos consiste en pequeñas áreas de color verde claro, con relieve y con un borde acuoso. Luego, estas lesiones se vuelven de color marrón-negro y aspecto corchoso. Las lesiones no penetran en profundidad en los frutos pero pueden ser vía de entrada para patógenos secundarios causantes de podredumbres. Además puede provocar caída de flores y de frutos en formación (Sun *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 1997).

La mancha bacteriana ocasiona pérdidas importantes en la producción de tomate de mesa y tomate industria, causa importantes pérdidas económicas directas por disminución en la cantidad y calidad de frutos. Debido a la defoliación, los frutos quedan expuestos, son quemados por el sol y disminuye el contenido de sólidos solubles, lo que desvaloriza al producto para su industrialización. Las lesiones que se producen en los frutos, reducen la calidad comercial tanto para el consumo en fresco como para el procesamiento industrial (Quezado-Duval y Lopes, 2010; Sun *et al.*, 2002; Blancard, 1992; Jones *et al.*, 1991). En condiciones experimentales de campo Quezado-Soares *et al.* (1998) registraron una pérdida de rendimiento del 52% de tomate rastrero en Brasil.

La mancha bacteriana se transmite a través de semilla contaminada (infectada o infestada), por lo tanto la semilla puede actuar como fuente de inóculo y de esta manera

puede ser transportada a largas distancias. La bacteria puede sobrevivir de una temporada a otra en restos de cultivos o en plantas voluntarias. El desarrollo de la enfermedad es favorecido por temperaturas entre 20 y 30°C, alta humedad y lluvias asociadas a vientos fuertes (Quezado-Duval y Lopes, 2010; Sun *et al.*, 2002; Blancard, 1992). La penetración a la planta se da a través de los estomas o heridas. La diseminación a corta distancia se da a través del salpicado de agua (Romeiro, 1995).

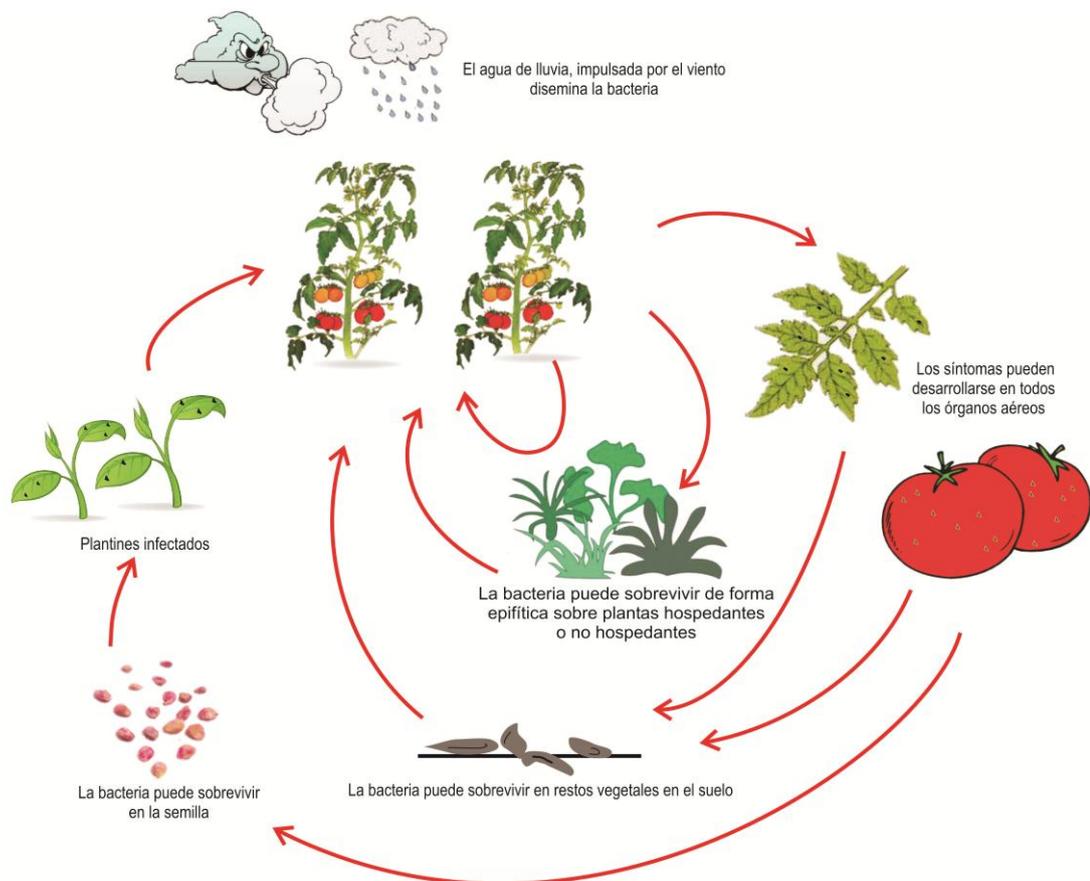


Figura 1. Ciclo de la mancha bacteriana de tomate (Adaptado de Ritchie, 2000)

La mancha bacteriana del tomate fue observada por primera vez en 1914 en Sudáfrica y en 1920 la enfermedad fue descrita como cancro bacteriano por Ethel Doidge identificando el organismo causal como *Bacterium vesicatorium* (Dahlbeck y Stall y Doidge, citados por Jones *et al.*, 1998). Una enfermedad similar fue descrita en Estados Unidos de América por Gardner y Kendrick, 1921 (citados por Jones *et al.*, 1998); la denominaron mancha bacteriana y al organismo causal *B. exitiosa*. En la misma época Sherbakoff (citado por Jones *et al.*,

1998) describió la mancha bacteriana del pimiento. En 1923 Gardner y Kendrick (citados por Jones *et al.*, 1998) compararon las tres bacterias y concluyeron que eran prácticamente idénticas y propusieron que se lo denominara *B. vesicatorium* Doidge. En 1925 pasó a llamarse *Pseudomonas vesicatoria*, en 1930 *Phytomonas vesicatoria* y *Xanthomonas vesicatoria* en 1939 (Hayward y Waterston, citados por Jones *et al.*, 1998). Luego fue designada como *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Dye *et al.*, citados por Jones *et al.*, 1998).

En 1957, Sutic (citado por Jones *et al.*, 1998) en Yugoslavia denominó *Pseudomonas gardneri* a una bacteria causante del síntoma “ojo de pájaro” en frutos de tomate y *X. gardneri* var. *capsici* para las razas que afectaban pimiento. Dye (citado por Jones *et al.*, 1998), mediante pruebas bioquímicas y por morfología, determinó que *P. gardneri* era una típica xanthomona y estableció que *X. gardneri* era sinónimo de *X. vesicatoria*, ya que provocaban síntomas similares en tomate y no podían ser diferenciadas por pruebas en laboratorio e invernáculo. *P. gardneri* fue incorporada luego dentro del género *Xanthomonas* por estudios de hibridación DNA:rRNA (DeLey, citado por Jones *et al.*, 1998).

Vauterin *et al.* (citado por Jones *et al.*, 1998) y Stall *et al.* (1994) independientemente descubrieron que *X. campestris* pv. *vesicatoria* estaba compuesta por dos grupos genéticamente diferentes: grupo A y grupo B. Bouzar *et al.*, 1994 confirmaron que las bacterias del grupo A no tenían actividad aminolítica y las del grupo B tenían actividad aminolítica y pectolítica. Vauterin *et al.*, (citado por Jones *et al.*, 1998) clasificaron a las bacterias del grupo B como *X. vesicatoria* y las del grupo A como *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*.

Jones *et al.*, 1995 caracterizaron las bacterias clasificadas como *P. gardneri* y otro grupo de bacterias aisladas de tomate en Florida (Estados Unidos de América). Jones *et al.*, (2000) luego de caracterizar estos dos grupos, determinaron que pertenecían a dos grupos diferentes: C (caracterizada por Jones *et al.*, 1995) y D (*P. gardneri*).

Según la clasificación propuesta por Jones *et al.*, (2004) las especies que integran los distintos grupos son: el grupo A, *Xanthomonas euvesicatoria*; grupo B, *X. vesicatoria*; grupo C, *X. perforans* y grupo D, *X. gardneri*.

Además de las especies, las bacterias que afectan al tomate se han clasificado en cinco razas (T1, T2, T3, T4 y T5) de acuerdo a su relación patogénica con determinados cultivares de tomate (cultivares indicadores). La raza T1 corresponde a *X. euvesicatoria*; T2 a

X. vesicatoria y *X. gardneri* y las razas T3, T4 y T5 corresponden a *X. perforans* (Quezado-Duval y Lopes, 2010; Jones *et al.*, 2004).

En la Figura 2 se esquematiza la evolución de la clasificación del agente causal de la mancha bacteriana.

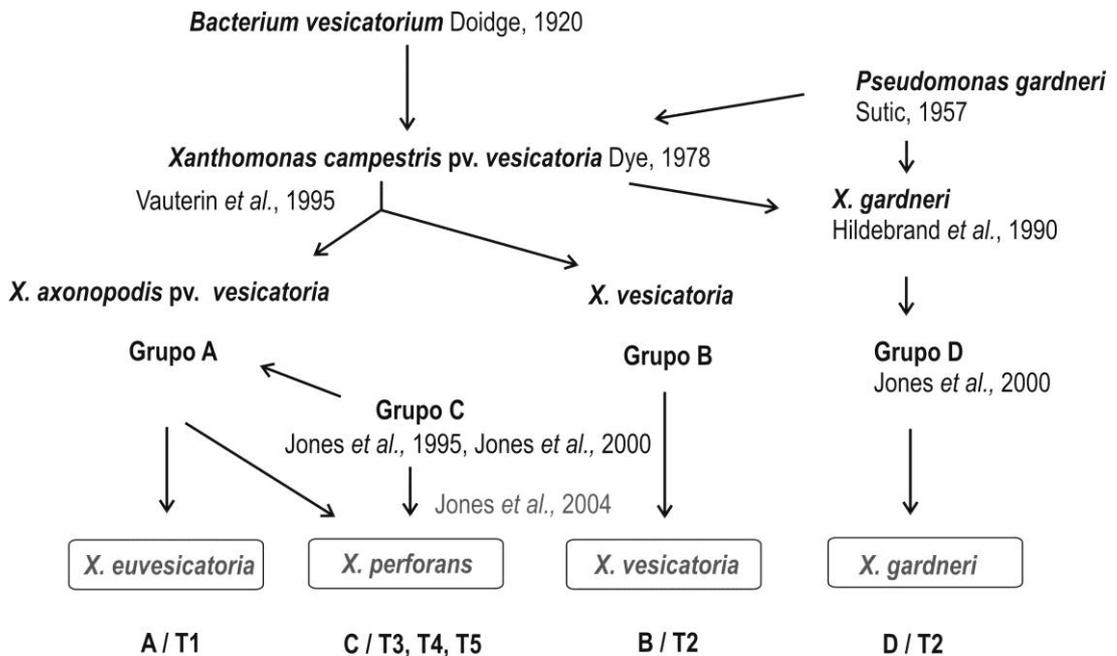


Figura 2. Evolución de la etiología de la mancha bacteriana (Adaptado de Quezado-Duval, 2008).

Las razas más frecuente en tomate en Estados Unidos de América es la raza T4 (Jones y Stall, citados por Stall *et al.*, 2009). En Brasil se han encontrado las razas T1, T2 y T3 en cultivos de tomate industria y la raza T3 es la predominante (Araújo *et al.*, 2011; Quezado-Duval y López, 2010).

Cuadro 1. Distribución mundial de las razas, grupos y especies *Xanthomonas* spp. asociadas al cultivo de tomate (adaptado de Jones *et al.*, 2004).

Raza	Grupo	Especie	Distribución
T1	A	<i>X. euvesicatoria</i>	Mundial
T2	B	<i>X. vesicatoria</i>	Mundial
T2	D	<i>X. gardneri</i>	Brasil, Costa Rica, Estados Unidos de América y Ex-Yugoslavia
T3, T4 y T5	C	<i>X. perforans</i>	Brasil, México, Estados Unidos de América y Tailandia

Xanthomonas spp. pertenecen al Dominio Bacteria, Phylum Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Xanthomonadales, Familia Xanthomonadaceae. *Xanthomonas* spp. causantes de la mancha bacteriana del tomate son gram-negativas, tienen forma de bacilo, miden 0,6-0,7 x 1,0-1,5 μm , se pueden encontrar aislados o en pares, tiene flagelación monótrica y no producen esporas. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 25 y 30°C, son aerobias obligadas, quimioorganotróficas, la capacidad de hidrolizar almidón y la actividad pectolítica son variables (CAB International, 2007; Schaad *et al.*, 2001).

1.3. MANEJO DE LA ENFERMEDAD

Para manejar la mancha bacteriana del tomate es importante realizar un manejo integrado, aplicando medidas culturales, tales como el uso de semillas sanas o desinfectadas, la eliminación de fuentes de inóculo o la reducción del inóculo inicial y evitar la diseminación del patógeno; lo que se puede complementar con control biológico, la inducción de resistencia de las plantas, el uso de variedades resistentes y el control químico (Quezado- Duval y Lopes, 2010; CAB International, 2007).

Para bajar el inóculo en la semilla se pueden realizar tratamientos físicos (calor seco o húmedo) o químicos (desinfección con distintos productos) a las mismas, sin que se afecte significativamente la germinación. Para evitar otras fuentes de inóculo, se puede realizar la plantación en lugares donde la enfermedad no haya ocurrido, se deben eliminar las plantas

voluntarias y evitar tener las pilas de desechos del cultivo cerca del mismo. La rotación de cultivos es una práctica de manejo con la cual se busca disminuir el inóculo en los restos de cultivo en el suelo y las plantas voluntarias. Para el cultivo de tomate la rotación con gramíneas es lo más recomendable (Quezado-Duval y Lopes, 2010; CAB International, 2007).

También se pueden emplear prácticas que aceleren la descomposición de los restos del cultivo afectado por la enfermedad, tales como aplicación de herbicidas asociado con aplicación de urea y enterrado del rastrojo. Estas medidas deben ser acompañadas con la eliminación de plantas voluntarias y no se deben sembrar especies susceptibles a la enfermedad antes de seis meses (Quezado-Duval y Lopes, 2010).

Para disminuir la diseminación de la enfermedad se deben incluir prácticas culturales que tengan como objetivo reducir el tiempo de hoja mojada en el cultivo, tales como sistematización del cultivo que evite la acumulación de agua en el suelo, el manejo de la densidad de plantación y la elección del tipo y momento de riego (Quezado-Duval y Lopes, 2010).

Para el control químico se utilizan productos a base de cobre y antibióticos (estreptomicina, oxitetraciclina y kasugamicina) (Quezado-Duval y Lopes, 2010). Las aplicaciones de productos cúpricos mezclados con mancozeb son más efectivas ya que mejora su solubilidad (Jones *et al.*, 1991; Ritchie y Dittapongpitch, 1991; Jones y Jones, 1985;; Marco y Stall, 1983). El control de la enfermedad mediante la aplicación de estos productos no siempre es efectiva y existen múltiples reportes de resistencia del patógeno a los productos cúpricos y antibióticos (Quezado-Duval y Lopes, 2010).

Debido a que no es posible obtener un buen control de la enfermedad con los productos tradicionalmente utilizados, se han llevado a cabo trabajos de investigación incluyendo el uso de otros productos como agentes de control biológico e inductores de resistencia. Abo-Elyousra y El-Hendawyb (2008) obtuvieron una reducción significativa de la severidad de la enfermedad mediante la aplicación por aspersión de *Pseudomonas fluorescens* en plantines de tomate. Del mismo modo Roberts *et al.*, (2008) lograron buenos resultados en el control de la mancha bacteriana del tomate con la aplicación de *Bacillus subtilis*. Romero *et al.*, (2001) y Louws *et al.*, (2001), obtuvieron buenos resultados en el control de la mancha bacteriana en tomate y pimiento mediante la aplicación del inductor de

resistencia acibenzolar-S-methyl (ASM). Según Fontenelle *et al.*, (2011), *Trichoderma* spp. pueden actuar como promotoras del crecimiento e inductoras de resistencia en tomate para esta enfermedad.

A nivel mundial también se ha trabajado en la búsqueda de genes de resistencia. Se ha identificado resistencia específica a las diferentes razas en diferentes cultivares de tomate (Robbins *et al.*, 2009; Yang y Francis; 2005; Scott *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1994). La resistencia es un carácter que está proporcionado por grupos de genes de efectos aditivos, los que deben ser combinados para obtener resistencia a las diferentes razas (Robbins *et al.*, 2009; Yang y Francis, 2005).

1.4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La mancha bacteriana es una de las enfermedades más importantes que ocurre en el cultivo de tomate a campo en Uruguay. Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad son muy frecuentes durante el ciclo del cultivo. En Uruguay, a nivel productivo su control se basa en aplicaciones de productos cúpricos, mancozeb y antibióticos (estreptomicina y kasugamicina). A pesar de la importante intervención química, el control muchas veces no es efectivo, ya sea por el modo de acción de los productos, por el desarrollo de cepas resistentes de la bacteria, o por condiciones ambientales muy favorables para el desarrollo de la enfermedad. Otra limitante son los costos y el impacto ambiental derivado del reiterado uso de estos productos.

La resistencia genética es una medida de control muy conveniente y si bien se han identificado algunos genotipos con cierta resistencia cuantitativa a esta enfermedad, los cultivares comerciales que se utilizan actualmente son susceptibles (Silva-Lobo *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1994; Scott y Jones, 1989).

El Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), busca desarrollar cultivares locales de tomate para industria con un grado de resistencia durable a la mancha bacteriana. Como primer paso en este proceso es fundamental conocer las características de las *Xanthomonas* spp. asociadas a la mancha bacteriana presentes en el país y ajustar un protocolo para comparar el comportamiento de distintos materiales frente a esta enfermedad.

El mismo, entre otras cosas, deberá incluir aislados caracterizados de las cepas predominantes en el país ya sea por su agresividad como por otras características (resistencia a productos químicos).

El objetivo general de este trabajo fue generar conocimientos para contribuir al manejo racional de la mancha bacteriana del tomate.

Los objetivos específicos fueron:

- 1) Crear una colección de bacterias del género *Xanthomonas*, causantes de la mancha bacteriana, con aislamientos realizados a partir de distintos órganos de plantas de tomate, con síntomas característicos de la enfermedad, provenientes de las principales zonas de producción de Uruguay.
- 2) Conocer las características de los aislados en relación a la sensibilidad a cobre, estreptomicina y kasugamicina, agresividad y razas (T1, T2, T3, T4, o T5).
- 3) Ajustar una metodología de inoculación adecuada para la comparación de materiales de tomate frente a la mancha bacteriana.

2.

***Xanthomonas* spp. en tomate en Uruguay: razas y sensibilidad *in vitro* a cobre y antibióticos**

Resumen

La mancha bacteriana es una de las enfermedades más importantes en el cultivo de tomate a campo en Uruguay. Es causada por *Xanthomonas* spp. De acuerdo a su relación patogénica con determinadas plantas indicadoras se han definido cinco razas: T1 que corresponde a *X. euvesicatoria*; T2 a *X. vesicatoria* y *X. gardneri* y T3, T4 y T5 a *X. perforans*. Su manejo se basa en aplicaciones de productos cúpricos, mancozeb y antibióticos. Entre 2007 y 2010 se obtuvieron 86 aislados de *Xanthomonas* spp. a partir de plantas de tomate con síntomas de la enfermedad, provenientes de las principales zonas de producción del país. Las razas a las que pertenecían se determinaron mediante la combinación de resultados (reacción de hipersensibilidad o sensibilidad) luego de la inoculación por infiltración de suspensión bacteriana de plantas indicadoras de *Solanum lycopersicum* (Bonny Best, Hawaii 7998, Florida 216), *S. pennellii* y *S. pennellii* x Hawaii 7998. La sensibilidad a antibióticos fue determinada sembrando los aislados en NAD suplementado con $CuSO_4$ (50, 100, 200, 300 y 400 ppm de Cu), estreptomina (10, 25, 50, 100 y 200 ppm) y kasugamicina (40, 80, 150, 200 y 300 ppm). Las razas encontradas fueron T3 (86 %), T2 (5 %) y T4 (9 %). El 92 % de aislados presentaron resistencia *in vitro* a 200 ppm de Cu, 35% a 100 ppm de estreptomina y 23 % a 200 ppm de kasugamicina. No se encontró relación entre zona de origen, raza y sensibilidad *in vitro* a los productos. Se trata del primer registro de razas de este patógeno en tomate para Uruguay.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, Mancha bacteriana del tomate, cobre, kasugamicina, estreptomina

***Xanthomonas* spp. in tomato in Uruguay: races and *in vitro* sensibility to copper and antibiotics**

Abstract

Bacterial leaf spot is one of the main diseases of open field tomato crops in Uruguay. It is caused by four *Xanthomonas* spp. According to their pathogenic relationship to several indicator plants five races have been defined: T1 corresponding to *X. euvesicatoria*; T2 to *X. vesicatoria* and *X. gardneri* and T3, T4 y T5 to *X. perforans*. Its control is based on copper, mancozeb and antibiotic sprays. Between 2007 y 2010 86 *Xanthomonas* spp. isolates were collected from diseased tomato plants, in the main producing areas of the country. Races were determined by the combination of results (hypersensitive or suseptible reaction) after the inoculation by infiltration of a bacterial suspension of *Solanum lycopersicum* (Bonny Best, Hawaii 7998, Florida 216), *S. pennellii* y *S. pennellii* x Hawaii 7998 indicator plants. Sensibility to antibiotics was determined by plating isolates on NAD amended with $CuSO_4$ (50, 100, 200, 300 y 400 ppm de Cu), streptomycin (10, 25, 50, 100 y 200 ppm) and kasugamycin (40, 80, 150, 200 y 300 ppm). T3 (86 %), T2 (5 %) and T4 (9 %) races were determined. 92 % of the isolates showed *in vitro* resistance to 200 ppm Cu, 35% to 100 ppm streptomycin and 23% to 200 ppm kasugamicyn. There was no relationship between area of collection, race or *in vitro* sensitivity. This is the first report of races of this pathogen in tomato for Uruguay.

Key words: *Solanum lycopersicum*, tomato bacterial leaf spot, copper, kasugamycin, Streptomycin.

2.1. Introducción

En la zafra 2008/2009 el cultivo de tomate en Uruguay ocupó una superficie de 574 ha, de las cuales el 66 % se realizó a campo para consumo en fresco (tomate de mesa) y para industria. Los cultivos a campo se realizan principalmente en la zona sur, en verano - otoño. (Uruguay, 2010).

Una de las enfermedades más importantes, que limita la producción, es la mancha bacteriana, debido a que las condiciones ambientales son muy favorables para el desarrollo de la misma. Esta enfermedad, ampliamente distribuida a nivel mundial, provoca síntomas en todos los órganos aéreos de la planta, causando pérdidas económicas directas por disminución en la cantidad y calidad de frutos (Jones, 1991).

La clasificación del agente causal ha sido modificada muchas veces desde su denominación original como *Bacterium vesicatorium*, realizada en 1920 por Ethel Doidge (Doidge, citados por Jones *et al.*, 1998). El nombre de *X. campestris* pv. *vesicatoria* propuesto por Dye *et al.* (citados por Jones *et al.*, 1998) ha sido utilizado hasta la actualidad. No obstante, Jones *et al.* (2004) proponen cuatro especies del género *Xanthomonas* como causantes de la mancha bacteriana del tomate: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri*.

Las colonias de *Xanthomonas* spp. que se forman en medio Nutriente Agar Dextrosa (NAD), luego de 48 horas de incubación a 28 °C, son de 1-2 mm de diámetro, redondas, de borde definido, mucoides, convexas, de color amarillo cremoso y brillantes. El pigmento amarillo, no difusible en el medio, es el heteropolisacárido xantomonadina (CAB International, 2007; Romeiro, 2001; Schaad *et al.*, 2001; Lelliott *et al.*, 1987).

De acuerdo a su relación patogénica con determinadas plantas indicadoras, las *Xanthomonas* spp. causantes de la mancha bacteriana del tomate se han separado en cinco razas: T1, T2, T3, T4 y T5. La raza T1 corresponde a *X. euvesicatoria*; T2 a *X. vesicatoria*; T2 a *X. gardneri* y las razas T3, T4 y T5 corresponden a *X. perforans* (Quezado-Duval y Lopes, 2010; Jones *et al.*, 2004).

Antes de 1989 la raza T1 era la predominante en Florida, Estados Unidos de América (Jones *et al.*, 1998; Bouzar *et al.*, 1994). En 1991 la raza T3 fue detectada por primera vez en este lugar (Jones *et al.*, 1995) y en pocos años se convirtió en la raza dominante (Jones *et al.*,

1998). En una prospección realizada en el año 2006, el 77 % de los aislados eran raza T4 y el resto T3 (Jones y Stall, citados por Stall *et al.*, 2009).

En Brasil se han encontrado las razas T1, T2 y T3 en cultivos de tomate industria. Entre los años 1995 y 2000 predominaba la raza T2 (Quezado-Duval *et al.*, 2004) pero en los muestreos realizados entre los años 2002 y 2010 la raza T3 era la predominante (Araújo *et al.*, 2011; Quezado-Duval y López, 2010).

El control de la mancha bacteriana del tomate es difícil de lograr, especialmente si las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad (Scott *et al.*, 1995). El control químico es la medida de manejo comúnmente aplicada, realizándose aplicaciones preventivas de cúpricos y/o antibióticos (Quezado-Duval y Lopes, 2010; Obradovic *et al.*, 2008).

El cobre es un fungicida con acción bacteriostática que posee múltiples sitios de acción ya que los iones solubles se unen a los grupos sulfridrilos. Este producto afecta sólo a las bacterias que se encuentran en la superficie de las plantas y si penetra en los tejidos es fitotóxico (Momol *et al.*, 2008). La resistencia del patógeno al cobre ha sido reportada en distintas partes del mundo desde el primer registro realizado por Marco y Stall (1983) en Florida, Estados Unidos de América (Mirik *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004; Quezado-Duval *et al.*, 2003, Bouzar *et al.*, 1999; Sahin y Miller, 1996; Buonario *et al.*, 1994; Ritchie y Dittapongpitch, 1991; Adaskaveg y Hine, 1985). Donde predominan las poblaciones de *Xanthomonas* spp. resistentes a cobre, las aplicaciones de éste se realizan combinadas con etilen bis ditiocarbamatos (mancozeb o maneb) para mejorar su solubilidad (Ritchie y Dittapongpitch, 1991; Jones y Jones, 1985; Marco y Stall, 1983;).

Estreptomina y kasugamicina son antibióticos del grupo de los aminoglucósidos, que inhiben la síntesis proteica (United States, 2005). Estreptomina, primer antibiótico desarrollado después de la penicilina, es producida por *Streptomyces griseus* y su actividad antimicrobiana fue reportada en 1944 (Waksman, 1952). Kasugamicina tiene actividad bactericida y fungicida, es producida por *Streptomyces kasugaensis* y fue descubierta en Japón en la década de 1960 (Adaskaveg *et al.*, 2010).

Estreptomina se ha utilizado para el control de la mancha bacteriana desde la década de 1950 (Jones y Kelly, 1995) pero en 1954 Darby, citado por Thayer y Stall (1962), reportó la ineficacia del control de este antibiótico y en 1961 Thayer y Stall reportaron por primera vez la

existencia de aislados *X. vesicatoria* resistentes a estreptomicina en Florida, Estados Unidos de América. Stall y Thayer (1962) concluyeron que la proporción de aislados resistentes a estreptomicina aumentó muy rápido luego de las aplicaciones del antibiótico.

Kasugamicina sólo se usa para el control de fitopatógenos ya que no es efectivo en el control de patógenos humanos o animales (Vallad *et al.*, 2010; United States, 2005). Ignjatov *et al.*, (2010) reportaron la existencia de aislados de *X. euvesicatoria* de morrón resistentes a 50 ppm kasugamicina *in vitro*.

Pernezy *et al.* (2008) compararon los medios cultivos casitone extracto de levadura (CYE, casitone yeast extract) modificado y nutriente agar dextrosa (NAD, nutrient agar dextrose) para la determinación de la resistencia a cobre de distintas razas de *X. euvesicatoria* y *X. perforans* de tomate y morrón y *X. campestris* pv. *vitians* de lechuga. Ellos concluyeron que el medio NAD era más apropiado para evaluar la resistencia de *Xanthomonas* spp. a cobre *in vitro*, ya que presentó mejor correlación con el control del patógeno *in vivo*. Este medio de cultivo también ha sido utilizado para evaluar la sensibilidad *in vitro* de *Xanthomonas* spp. a antibióticos (Quezado-Duval y Lopes *et al.*, 2003).

En Uruguay el manejo de la mancha bacteriana se basa en aplicaciones frecuentes de productos cúpricos, mancozeb y antibióticos (kasugamicina y estreptomicina), pero el control muchas veces es ineficiente y las causas pueden corresponderse al modo de acción de los productos, a la posible existencia de cepas resistentes a los productos utilizados y/o porque las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad. Además, esta estrategia de control representa un alto costo y produce contaminación ambiental.

La resistencia genética es una buena medida de control y si bien se han identificado algunos genotipos con cierta resistencia cuantitativa a esta enfermedad, los cultivares que se utilizan actualmente son susceptibles (Silva-Lobo *et al.*, 2005). Para desarrollar cultivares locales con cierto grado de resistencia durable a esta enfermedad, es necesario conocer las características de las *Xanthomonas* spp. presentes en el país.

Los objetivos del presente trabajo fueron crear una colección de aislados de *Xanthomonas* spp. causante de la mancha bacteriana del tomate en Uruguay, identificar las razas presentes y evaluar su sensibilidad a cobre, estreptomicina y kasugamicina *in vitro*.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Obtención y preservación de los aislados de *Xanthomonas* spp.

Durante las zafas 2007-2008, 2008-2009 y 2009-2010 se colectaron muestras de tomate con síntomas atribuibles a la mancha bacteriana, en predios ubicados en las principales zonas de producción de Uruguay, en los departamentos de Canelones, Colonia, San José y Salto y de las estaciones experimentales de INIA Las Brujas (Canelones) y Salto Grande (Salto) (Figura 1).



Figura 1. Frutos y hojas de tomate con síntomas de mancha bacteriana

Los órganos con síntomas fueron lavados con agua corriente. Se cortaron pequeños trozos del tejido afectado, se desinfectaron con NaHCl al 1% y se enjuagaron con agua

destilada estéril. Luego se maceraron en mortero con solución salina estéril (0,85% p/v de NaCl, en agua destilada) y se sembró por agotamiento, en placa de Petri conteniendo medio de cultivo Nutriente Agar Dextrosa (NAD, Oxoid Ltd., Reino Unido). Las placas se incubaron a 28 °C y luego de 48 horas, se repicaron las colonias típicas del género *Xanthomonas* (1-2 mm de diámetro, redondas, de borde definido, mucoides, convexas, de color amarillo y brillantes), utilizando el mismo medio. Los aislados fueron mantenidos en glicerol al 15 %, a -20 °C (Romeiro, 2001).

2.2.2. Caracterización de los aislados

a) Prueba de hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

Se recuperaron células viables de los aislados almacenados, sembrando por estriado en NAD, incubando durante 48-72 horas. Para la multiplicación, se partió de una colonia aislada y se sembró en Nutriente Agar (NA, Oxoid Ltd., Reino Unido). Se incubó a 28 °C y luego de 48 horas se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril al 0,85 % p/v de NaCl, en agua destilada. Se ajustó la concentración de la suspensión bacteriana 5×10^8 ufc.ml⁻¹, mediante espectrofotómetro $Abs_{550nm} = 0,1$ utilizando celda de cuarzo (Romeiro, 2001), la que fue confirmada en pruebas previas mediante recuento en placa en medio NAD.

Las hojas de tabaco fueron inoculadas por infiltración, en la cara abaxial, utilizando jeringas hipodérmicas plásticas descartables de 1 mL (sin aguja). Las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento, a 26-28 °C, con 14 h de luz/10 h oscuridad. Se evaluó la reacción de hipersensibilidad 24 h luego de la inoculación, registrando como positivo cuando la zona inoculada presentaba necrosis del tejido. Como testigo se inocularon plantas con solución salina estéril al 0,85% p/v de NaCl, en agua destilada.

b) Caracterización bioquímica

A los aislados que produjeron la reacción de hipersensibilidad en tabaco, se les realizaron las pruebas bioquímicas propuestas por Schaad *et al.*, (2001) para la confirmación de la identificación a nivel de género: prueba indirecta de Gram con KOH al 3 % (Suslow *et*

al., 1982), prueba de crecimiento aeróbico, fluorescencia en medio B de King, crecimiento de colonias amarillas en NAD y Dextrosa-extracto de levadura-CaCO₃ (Yest extract-dextrose-CaCO₃, YDC) y capacidad de degradar almidón.

c) Prueba de patogenicidad

Los aislados de *Xanthomonas* spp. fueron inoculados en plantas de tomate del cultivar Loica, susceptible a la enfermedad. Se sembraron las semillas en almacigueras de espuma plast de 104 celdas, de 50 cc, con sustrato estéril (Bioland, Finladia). Luego de 15-20 días los plantines fueron transplantados a macetas de 250 cc, conteniendo una mezcla estéril 1:1 de suelo:sustrato. Las plantas fueron inoculadas a 7-8 hojas totalmente expandidas (30-40 días de edad).

Se recuperaron células viables de los aislados almacenados y se prepararon las suspensiones de la manera descrita para la prueba de hipersensibilidad en tabaco. La inoculación se hizo mediante aspersion hasta punto de goteo. Como testigo se utilizó solución salina estéril al 0,85 % p/v de NaCl, en agua destilada. Luego de la inoculación, las plantas fueron mantenidas en cámara húmeda durante 48 h, utilizando bolsas plásticas. Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento a 26-28 °C, con 14 h de luz/10 h oscuridad durante 16 días. Las plantas fueron observadas diariamente y se verificó la presencia de los síntomas característicos de la enfermedad.

2.2.3. Identificación de las razas de *Xanthomonas* spp.

Se recuperaron células viables de los aislados almacenados y se prepararon las suspensiones de la manera descrita para la prueba de hipersensibilidad en tabaco. Se inocularon por infiltración de suspensión bacteriana (5×10^8 ufc.ml⁻¹) plantas indicadoras de *Solanum lycopersicum* (Bonny Best, Hawaii 7998, Florida 216), *S. pennellii* y *S. pennellii* x Hawaii 7998. Se determinaron las razas según la combinación de los resultados en las distintas indicadoras (reacción de hipersensibilidad o sensibilidad) presentada en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Reacciones de las plantas indicadoras según las razas de *Xanthomonas* ssp. causantes de la mancha bacteriana del tomate (Modificado de Quezado-Duval, 2008).

Especie	Raza	Plantas indicadoras				
		<i>Solanum lycopersicum</i>			<i>S. pennellii</i>	<i>S. pennellii</i> x H7998
		Bonny Best	Hawaii 7998	Florida 216		
		Reacción*				
<i>X. euvesicatoria</i>	T1	S	RH	S	S	S
<i>X. vesicatoria</i>						
<i>X. gardneri</i>	T2	S	S	S	S	S
	T3	S	S	RH	RH	RH
	T4	S	S	S	RH	RH
<i>X. perforans</i>	T5	S	S	S	S	RH

* S: reacción de sensibilidad; RH: reacción de hipersensibilidad

2.2.4. Evaluación de la sensibilidad a cobre, estreptomycin y kasugamicina in vitro

Se prepararon soluciones madre de los distintos productos utilizando agua destilada: sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Copper (II) sulfate pentahydrate, SIGMA PPA, 98 +%, A.C.S. reagent), a una concentración de 40.000 ppm de Cu; sulfato de estreptomycin (SIGMA) a 10.000 ppm y kasugamicina (SIGMA) a 10.000 ppm. Todas las soluciones fueron esterilizadas mediante filtración con filtro descartable estéril de 0,22 μm .

Las soluciones de antibióticos y el cobre se agregaron al medio estéril NAD, a una temperatura de 40-45°C, en las cantidades necesarias para obtener las concentraciones deseadas. Se utilizaron placas de 24 pocillos, de 20 mm de diámetro y se colocó 1500 ml de medio en cada uno.

Se recuperaron células viables de 78 aislados almacenados y se prepararon las suspensiones de la manera descrita para la prueba de hipersensibilidad en tabaco. Se utilizó un aislado de *Xanthomonas* sp. cedido y caracterizado por el Laboratorio de Fitopatología de INTA Bella Vista (Argentina), como resistente a cobre.

Se sembraron 5 μl de suspensión bacteriana de 5×10^8 ufc.ml⁻¹ en NAD con distintas concentraciones de Cu (50, 100, 200, 300 y 400 ppm), estreptomycin (10, 25, 50, 100 y 200 ppm) y kasugamicina (40, 80, 150, 200 y 300 ppm). Como testigo se utilizó el medio de cultivo NAD sin agregados. Se incluyeron dos repeticiones por aislado/dosis. Luego de 48 horas de

incubación a 28 °C se registró la presencia de colonias. Se calculó el porcentaje de aislados resistentes a los distintos productos y dosis.

2.2.5. Análisis estadístico

Se realizó la prueba de chi-cuadrado para verificar la asociación entre la zona de origen de los aislados y las razas, la resistencia de los aislados a Cu y a kasugamicina y entre la zona de origen de los aislados con la sensibilidad a las distintas concentraciones de productos los productos evaluados.

2.3. Resultados

2.3.1. Colección de *Xanthomonas* spp.

Se creó una colección de 86 aislados de *Xanthomonas* spp. a partir de muestras de tomate, con síntomas atribuibles a la mancha bacteriana, colectadas en predios ubicados en las principales zonas de producción de Uruguay, 48 % provenientes de Canelones, 3 % de Colonia, 2 % de Montevideo, 16 % de San José y 30 % de Salto. Los aislados fueron obtenidos de frutos (65 %), hojas (27 %), sépalos (7 %) y raquis (1 %) (Cuadro 2).

Según las reacciones obtenidas de las inoculaciones en las plantas indicadoras, el 86 % de los aislados pertenecen a la raza T3, también se encontraron aislados pertenecientes a las razas T2 (5 %) y T4 (9 %).

Cuadro 2. Aislados de *Xanthomonas* spp. según órgano del cual fue aislado, zafra de la colecta, lugar de origen, reacción en plantas indicadoras y raza.

AISLADO	ÓRGANO	AÑO	ORIGEN	Platas indicadoras					Raza
				<i>Solanum lycopersicum</i>			<i>S. pennellii</i>	<i>S. pennellii</i> x Hawaii 7998	
				Bonny Best	Hawaii 7998	Florida 216			
1	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
2	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
3	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
4	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
5	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
6	F	07/08	Canelones	S	S	S	HR	HR	4

7	F	07/08	San José	S	S	HR	HR	HR	3
8	S	07/08	Canelones	S	S	S	HR	HR	4
9	H	08/09	Montevideo	S	S	HR	HR	HR	3
10	F	07/08	Colonia	S	S	HR	HR	HR	3
11	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
12	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
13	H	07/08	Canelones	S	S	S	HR	HR	4
14	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
15	H	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
16	F	07/08	Canelones	S	S	S	S	S	2
17	H	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
18	H	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
19	F	07/08	San José	S	S	S	S	S	2
20	F	08/09	Canelones	S	S	S	HR	HR	4
21	F	07/08	Colonia	S	S	HR	HR	HR	3
22	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
23	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
24	H	07/08	San José	S	S	HR	HR	HR	3
25	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
26	H	07/08	Canelones	S	S	S	HR	HR	4
27	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
28	F	07/08	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
29	F	07/08	Colonia	S	S	HR	HR	HR	3
30	H	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
31	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
32	H	07/08	Canelones	S	S	S	HR	HR	4
33	F	07/08	San José	S	S	HR	HR	HR	3
34	H	07/08	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
35	F	07/08	Canelones	S	S	S	S	S	2
36	F	08/09	Canelones	S	S	S	HR	HR	4
37	H	07/08	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
38	F	08/09	Canelones	S	S	S	HR	HR	4
39	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
40	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
41	H	08/09	San José	S	S	HR	HR	HR	3
42	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
43	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
44	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
45	F	08/09	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
46	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
47	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
48	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
49	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
50	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
51	R	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
52	R	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
53	R	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
54	R	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
55	R	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
56	R	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3

57	H	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
58	H	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
59	H	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
60	H	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
61	H	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
62	H	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
63	F	09/10	San José	S	S	HR	HR	HR	3
64	F	09/10	San José	S	S	HR	HR	HR	3
65	F	09/10	San José	S	S	HR	HR	HR	3
66	H	09/10	San José	S	S	HR	HR	HR	3
67	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
68	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
69	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
70	H	09/10	San José	S	S	HR	HR	HR	3
71	H	09/10	San José	S	S	HR	HR	HR	3
72	H	09/10	San José	S	S	HR	HR	HR	3
73	H	09/10	San José	S	S	HR	HR	HR	3
74	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
75	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
76	F	09/10	Salto	S	S	HR	HR	HR	3
77	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
78	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
79	F	07/08	Montevideo	S	S	HR	HR	HR	3
80	F	07/08	San José	S	S	HR	HR	HR	3
81	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
82	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
83	F	07/08	Canelones	S	S	S	S	S	2
84	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
85	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3
86	F	07/08	Canelones	S	S	HR	HR	HR	3

H hoja, F fruto, R raquis, S reacción de sensibilidad, HR reacción de hipersensibilidad

No se encontró asociación entre la zona de origen de los aislados y las razas según la prueba de Chi-cuadrado.

2.3.2. Sensibilidad a cobre, estreptomycin y kasugamicina *in vitro*

El 46 % de los aislados analizados fue sensible a estreptomycin incluso a las concentraciones más bajas pero no se encontraron aislados sensibles a kasugamicina y cobre. Todos los aislados fueron resistentes a 50 y 100 ppm de cobre, 92 % resistentes a 200 ppm, 85 % a 300 ppm y 32 % a 400 ppm de este producto. Todos los aislados fueron resistentes a 40 y 80 ppm de kasugamicina, 42 % fueron resistentes a 150 ppm, 23 % a 200

ppm y 8 % a 300 ppm. El 54 % de los aislados fueron resistentes a 10 ppm de estreptomicina, 53 % a 25 ppm, 44 % a 50 ppm, 35 % a 100 ppm y 23 % a 200 ppm (Figura 2).

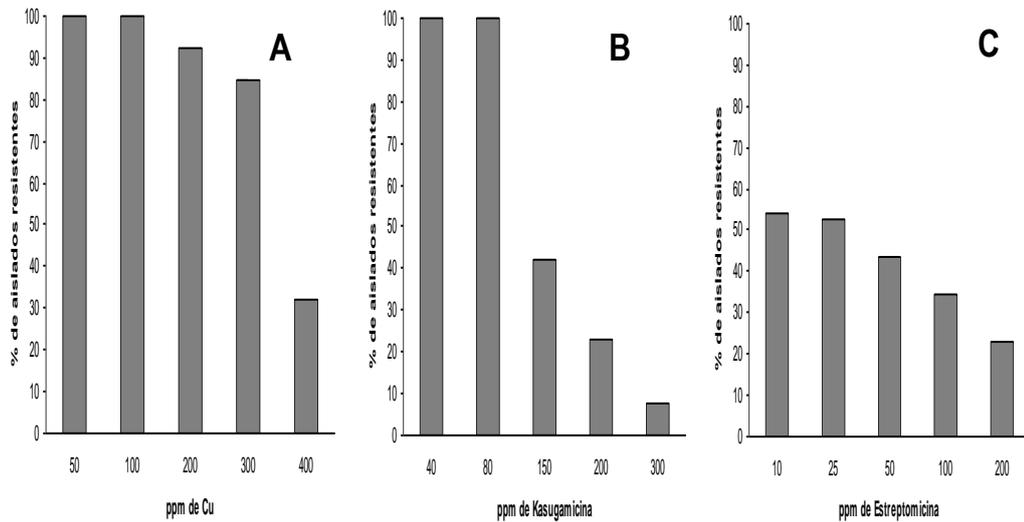


Figura 2. Porcentaje de aislados de *Xanthomonas* spp. resistentes a distintas dosis de cobre (Cu), kasugamicina y estreptomicina.

En la Figura 3 se presenta el crecimiento de dos aislados en NAD suplementado con las diferentes dosis de cobre, estreptomicina y kasugamicina probadas.

En todos los casos, al aumentar la dosis del producto, el porcentaje de aislados resistentes disminuyó, pero en el caso de estreptomicina (54 % resistentes a 10 ppm y 23 % a 200 ppm) esta disminución no fue tan notoria como en el caso de kasugamicina (100 % resistente a 80 ppm y 8 % a 300 ppm) y el cobre (100 % resistente a 100 ppm de Cu y 32 % a 400 ppm) (Figura 2).

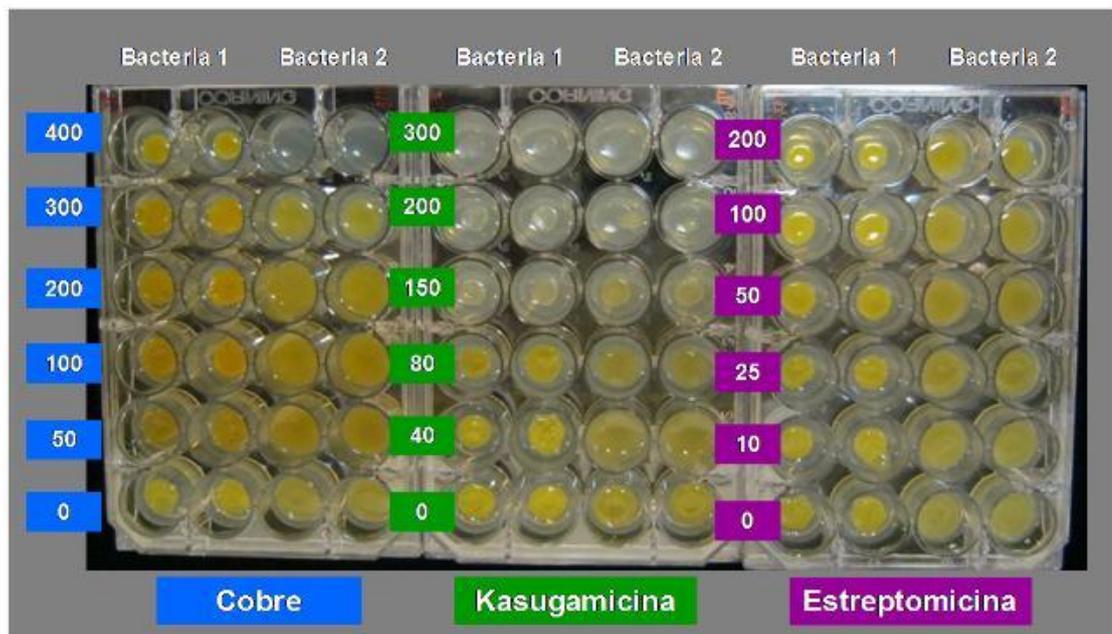


Figura 3. Crecimiento de dos aislados de *Xanthomonas* spp. en Nutriente Agar Dextrosa suplementado con Cu (50, 100, 200, 300 y 400 ppm), kasugamicina (40, 80, 150, 200 y 300 ppm) y estreptomycin (10, 25, 50, 100 y 200 ppm).

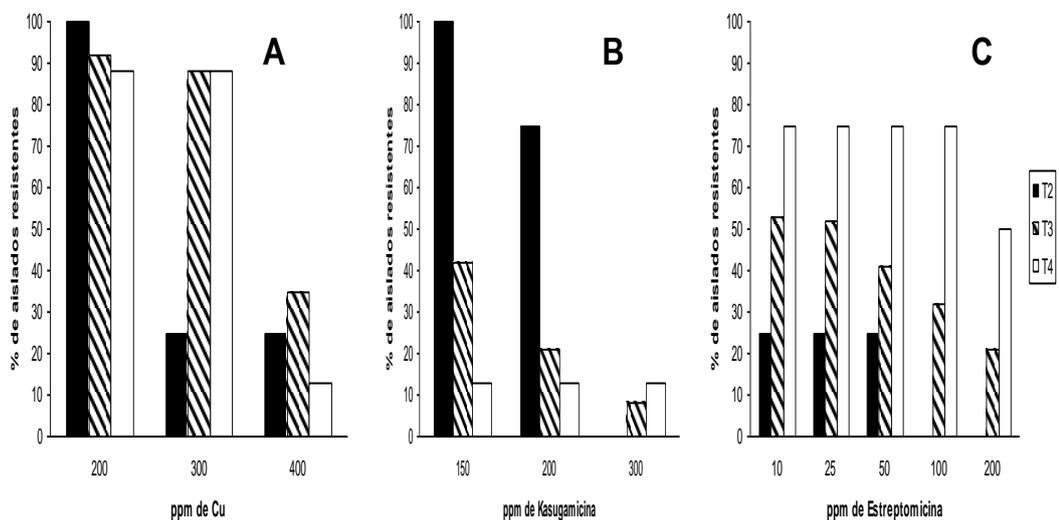


Figura 4. Porcentaje de aislados de las razas T2, T3 y T4 de *Xanthomonas* spp. resistentes a distintas dosis de: A cobre, B kasugamicina y C estreptomycin.

La cantidad de aislados de la raza T3 resistentes a cobre disminuyó al aumentar la concentración a 400 ppm pero comparados con los de las otras razas, son resistentes a mayores concentraciones de Cu. La cantidad de aislados de la raza T2 resistentes disminuyó al pasar de 200 ppm a 300 ppm de Cu pero no hubo cambios en la cantidad de aislados resistentes a 400 ppm. Para la raza T4, la misma cantidad de aislados fueron resistentes a 200 y 300 ppm pero éstos disminuyeron al aumentar la concentración a 400 ppm (Figura 4, A).

La cantidad de aislados de la raza T4 resistentes a kasugamicina no varió al aumentar la concentración de estas de 150 a 200 y a 300 ppm, en el caso de las razas T2 y T3 la cantidad aislados resistentes a este antibiótico disminuyó al aumentar la concentración (Figura 4, B).

La cantidad de aislados de la raza T2 que presentaron resistencia a estreptomicina no varió en las concentraciones de 10, 25 y 50 ppm y todos los aislados fueron sensibles a 100 y 200 ppm de este antibiótico. En el caso de la raza T3, se encontraron aislados resistentes a todas las concentraciones utilizadas pero la cantidad de aislados resistentes disminuyó entre las 25 y 200 ppm. La cantidad de aislados de la raza T4 resistentes a estreptomicina se mantuvo constante entre las concentraciones de 10 y 100 ppm y disminuyó al aumentar la concentración a 200 ppm (Figura 4, C). En el análisis de estos resultados se debe considerar que el porcentaje de aislados de cada raza fue muy diferente (86 % T3, 5 % T2 y 9 % T4), lo que puede haber influido en los resultados.

En los Cuadros 3, 4, 5 y 6 se presentan los porcentajes de aislados resistentes a los distintos productos simultáneamente.

Cuadro 3. Porcentaje de aislados de <i>Xanthomonas</i> spp. resistentes a distintas dosis de Cu y kasugamicina			
ppm Cu	ppm Kasugamicina		
	150	200	300
200	44	22	41
300	36	17	8
400	24	9	4

Se encontró asociación entre la resistencia de los aislados a Cu y a kasugamicina según la prueba de Chi-cuadrado.

Cuadro 4. Porcentaje de aislados de *Xanthomonas* spp. resistentes a distintas dosis de Cu y que fueron sensibles/resistentes a distintas dosis de estreptomina

ppm Cu	sensibles*	ppm estreptomina				
		10	25	50	100	200
200	36	54	53	44	35	23
300	31	54	53	44	35	23
400	3	29	28	23	18	15

* no crecieron a la mínima dosis utilizada

No se encontró asociación entre la resistencia de los aislados a Cu y a estreptomina según la prueba de Chi-cuadrado.

Cuadro 5. Porcentaje de aislados de *Xanthomonas* spp. resistentes a distintas dosis de kasugamicina y que fueron sensibles/resistentes a distintas dosis de estreptomina

ppm kasugamicina	sensibles*	ppm estreptomina				
		10	25	50	100	200
150	4	4	4	4	3	3
200	10	13	13	8	6	6
300	3	29	28	23	18	15

* no crecieron a la mínima dosis utilizada

No se encontró asociación entre la resistencia de los aislados a kasugamicina y a estreptomina según la prueba de Chi-cuadrado.

Cuadro 6. Porcentaje de aislados de *Xanthomonas* spp. resistentes a distintas dosis de Cu y kasugamicina fueron sensibles/resistentes a distintas dosis de estreptomina

ppm Cu/ ppm kasugamicina	sensibles*	ppm estreptomina					
		0	10	25	50	100	200
200/150	5	44	19	19	14	12	10
200/200	5	22	8	8	5	4	4
200/300	2	41	2	2	2	2	2
300/150	2	36	19	19	14	12	10
300/200	2	17	8	8	5	4	4
300/300	2	8	2	2	2	2	2
400/150	0	24	15	15	12	9	8
400/200	0	9	5	5	2	2	2
400/300	0	4	2	2	2	2	2

* no crecieron a la mínima dosis utilizada

Según la prueba de Chi-cuadrado no se encontró asociación entre la zona de origen de los aislados con la sensibilidad a las distintas concentraciones de productos los productos evaluados (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de aislados de *Xanthomonas* spp. resistentes a distintas concentraciones de Cu, kasugamicina y estreptomina, según origen.

Origen	ppm de Cu			ppm de kasugamicina			ppm de estreptomina					
	200	300	400	150	200	300	sensibles	10	25	50	100	200
Sur	90	80	28	56	36	18	44	56	56	48	42	30
Norte	96	96	38	31	15	4	50	50	46	35	19	12

2.4. Discusión

Esta es la primera prospección de *Xanthomonas* spp. causantes de la mancha bacteriana del tomate en Uruguay, por lo cual no existen referencias anteriores acerca de la composición de la población del patógeno en cuanto a la razas y si ésta ha variado con el tiempo como se ha reportado en otros países.

Según los resultados obtenidos, las razas presentes en el cultivo de tomate a campo son T2, T3 y T4, predominando la raza 3 al igual que en Brasil (Araújo *et al.*, 2011; Quezad-Duval y López, 2010). Esta raza también fue la más importante en Estados Unidos de América hasta que en el año 2006 se comprobó que la raza predominante era la T4 (Jones y Stall, citados por Stall *et al.*, 2009).

La predominancia de la raza T3 puede ser en gran parte explicada por su producción de compuestos similares a bacteriocinas que inhibe el desarrollo de otras razas. Según Jones *et al.* (1998) antes de 1991 la única raza presente en Florida, Estados Unidos de América era la T1, luego de que en el año 1991 se encontró la raza T3, ésta se convirtió en la raza predominante. Jones *et al.* (1998) demostraron que la raza T3 es antagonista de la raza T1 *in vitro*, que la raza T3 redujo la población de la raza T1 en la superficie de las hojas de tomate en plantas inoculadas con ambas razas y que la raza T3 fue más competitiva que la raza T1 en ensayos realizados a campo. Tudor-Nelson *et al.*, 2003 descubrieron que la raza T3 produce tres compuestos similares a bacteriocinas que inhiben a la raza T1 pero no inhiben su propio crecimiento y el crecimiento de la raza T2 fue inhibido por una de estos compuestos.

La similitud en la composición de razas con lo reportado en otras regiones puede deberse a varios factores. Uno de ellos puede ser el origen de la semilla utilizada para plantación en nuestro país. En Uruguay generalmente la mayoría de la semilla de tomate que

se utiliza es importada de diversos orígenes (Brasil, México, Tailandia, Japón, India, Estados Unidos de América, entre otros) algunos de los cuales poseen una composición similar de razas del patógeno (Jones *et al.*, 2004). Este patógeno puede ser diseminado a largas distancias en semillas infectadas o infestadas (Quezado-Duval y Lopes, 2010) y, debido a que la mancha bacteriana no se trata de una enfermedad cuarentenaria, a nivel nacional no existen requisitos fitosanitarios en cuanto a ella para la importación de semilla de tomate.

El control químico de la mancha bacteriana del tomate en Uruguay se realiza en base a aplicaciones de productos cúpricos y antibióticos. En los últimos años la producción local de tomate para industria se ha integrado a los planes de promoción del cultivo del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Una de las condiciones para ello es el seguimiento de las normas utilizadas en los programas de producción integrada de Uruguay en las cuales se prohíbe el uso de de antibióticos (Banchero *et al.*, 2002). Por lo tanto se puede suponer que el producto más usado es el cobre y eso puede explicar el alto porcentaje de aislados resistentes al mismo. Martin *et al.* (2004) encontraron que los aislados tolerantes a cobre aumentaron luego de aplicaciones reiteradas de este producto. Por lo tanto la resistencia encontrada en los aislados a estos productos podría deberse al su uso reiterado. A su vez, los aislados correspondientes a la raza T3 fueron los que presentaron mayores niveles de resistencia a las dosis de 400 ppm de cobre *in vitro*, lo cual podría explicar la predominancia de esta raza en el país por una ventaja comparativa frente a las demás razas.

El uso de antibióticos también ha resultado en el desarrollo de poblaciones resistentes a los mismos (Ritchie y Dittapongpitch, 1991; Minsavage *et al.*, 1990; Stall y Thayer, 1962). Al respecto, de acuerdo a nuestros resultados el comportamiento de los aislados frente a los dos antibióticos estudiados fue diferente, lo cual también puede atribuirse a su frecuencia de uso. La estreptomina desde hace algunos años ha sido poco utilizada por los productores y esta podría ser la razón por la cual aun existen aislados sensibles al mismo, no ocurriendo lo mismo con kasugamicina la cual ha sido empleada en cultivos realizados fuera de los planes de promoción estatal.

La relación entre las respuestas de los aislados encontradas frente a las diferentes concentraciones de cobre, estreptomina y kasugamicina ha sido variable. Se observó relación entre la sensibilidad a las distintas concentraciones de cobre y de kasugamicina. Estos productos tienen diferentes sitios de acción: el cobre actúa uniéndose a los grupos

sulfridrilos (Momol *et al.*, 2008) y la kasugamicina previene la unión del fMet-tRNA^f con el mRNA-30S cuando se forma el complejo de iniciación durante la síntesis proteica (Wade y Kurtz, 2006; United States, 2005). Por lo tanto, no sería explicable la existencia de resistencia cruzada entre ellos. Sin embargo, ambos productos han sido utilizados conjuntamente por los productores para el control de esta enfermedad y por ello el patógeno pudo haber desarrollado simultáneamente resistencia a ambos.

No se encontró relación entre la sensibilidad de los aislados a estreptomicina y kasugamicina. Si bien estos antibióticos pertenecen al grupo de los aminoglucósidos, que inhiben la síntesis de proteínas, la kasugamicina tiene un sitio de acción específico (previene la unión del fMet-tRNA^f con el mRNA-30S durante la formación del complejo de iniciación durante la síntesis proteica) que difiere del sitio de acción de la estreptomicina (Wade y Kurtz, 2006; United States, 2005).

Como se mencionó en la introducción el control de esta enfermedad no es del todo eficaz señalándose como causas la resistencia del patógeno a los productos utilizados, la frecuencia de condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad en los momentos que se realiza el cultivo y la utilización de cultivares susceptibles. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que parte de los problemas observados con las actuales estrategias de control pueden ser explicados por predominancia de bacterias con resistencia a los productos utilizados. Por lo que sería deseable principalmente para el cultivo de tomate industria donde los costos deben ser bajos, el uso de otras medidas de manejo, entre ellas, la resistencia varietal.

De acuerdo a los resultados de este trabajo los cultivares de tomate para industria a desarrollar con resistencia a mancha bacteriana en el programa de mejoramiento local deberán incluir resistencia a la raza T3 del patógeno. Por último dado que la prevalencia de las razas puede cambiar con el tiempo, sería deseable que este tipo de relevamientos con caracterización del patógeno sean repetidos cada determinado número de años para complementar los avances en mejoramiento.

2.5. Bibliografía

- Adaskaveg J, Forster H, Wade L.** 2010. Re-discovery of kasugamycin for managing fire blight and other bacterial diseases of plants in the United States. En: 2010 APS Annual Meeting (2010, Charlotte, North Carolina). Abstracts of Special Session Presentations. Vol. 100, No. 6 (Supplement). p. 166.
- Adaskaveg JE, Hine RB.** 1985. Copper tolerante and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 69: 993-996.
- Araújo ER, Costa JR, Pontes NC, Mazutti J, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM.** 2011. Prevalence of *Xanthomonas perforans* associated with bacterial spot in processing tomato crops in Brazil. En: Congresso Brasileiro de Fitopatologia (XLIV, 2011, Bento Gonçalves RS). *Tropical Plant Pathology* 36 (Suplemento). Brazil. Brazilian Phytopathological Society. p. 130.
- Banchero L, Campelo E, Giménez G, González P, Maeso D, Paullier J.** 2002. Programa de producción integrada. Directivas y Normas. Tomate a campo. [En línea]. Consultado 15 setiembre 2011. Disponible en: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/PI/Index.html>
- Bouzar H, Jones JB, Stall FJ, Louws FJ, Schneider M, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Jackson LE.** 1999. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology*, 89(4): 328-335.
- Bouzar H, Jones JB, Stall RE, Hodge NC, Minsavage GV, Benedict AA, Alvarez AM.** 1994. Physiological, chemical, serological and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology*, 84: 663-671.
- Buonauro R, Stravato VM, Scortichini M.** 1994. Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annuum* L. in Italy. *Plant Disease*, 78: 296-299.
- CAB International.** 2007. Crop protection compendium; 2007 edition. Wallingford, UK. 1 disco compacto, 8mm.

- Ignjatov M, Gašić K, Ivanović M, Šević M, Obradović A, Milošević M.** 2010. Characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* Strains Pathogens of Pepper in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine*, 25(2): 139-149.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW.** 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755-762.
- Jones JB, Bouzar H, Somodi GC, Stall RE, Pernezny K, El-Morsy G, Scott JW.** 1998. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. *Phytopathology*, 88: 33-38.
- Jones JB, Stall RE, Scott JW, Somodi CG, Bouzar H, Hodge NC.** 1995. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease*, 79: 395-398.
- Jones JB, Stall RE, Scott JW, Somodi CG, Bouzar H, Hodge NC.** 1995. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease*, 79: 395-398.
- Jones JB, Kelly RO.** 1995. Applications of antibiotics or a copper mancozeb spray to control bacterial spot of tomato and pepper. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 108: 196-197
- Jones JB.** 1991. Bacterial spot. En: Jones JB, Jones JP, Stall RE. (Eds.). *Compendium of tomato diseases*. St. Paul, Minnesota: APS Press. p. 27.
- Jones JB, Jones JP.** 1985. The effect of bactericides, tank mixing time and spray schedule on bacterial leaf spot of tomato. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 98: 244-247.
- Lelliott RA, Stead DE.** 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants; methods in plant pathology*. Oxford, Blackwell. v. 2, 216 p.
- Marco GM, Stall RE.** 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease*, 67: 779-781.
- Martin HL, Hamilton VA, Kopittke RA.** 2004. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 88: 921-924.
- Minsavage GV, Canteros BI, Stall RE.** 1990. Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 80: 719-723.

- Mirik M, Aysan Y, Cinar O.** 2007. Copper-Resistant Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 89(1): 153-154.
- Momol T, Jones J, Olson S, Obradovic A, Balogh B, King P.** 2008. Integrated Management of Bacterial Spot on Tomato in Florida [En línea]. Consultado 15 setiembre 2011. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP11000.pdf>
- Obradovic A, Jones JB, Balogh B, Momol MT.** 2008 Integrated Management of Tomato Bacterial Spot. En: Ciancio A, Mukerji KG. (Eds.) *Integrated Management of Plant Pests and Diseases*. Springer. (Volume 3, Section 2) pp. 211-223.
- Pernezny K, Nagata R, Havranek N, Sanchez J.** 2008. Comparison of two culture media for determination of the copper resistance of *Xanthomonas* strains and their usefulness for prediction of control with copper bactericides. *Crop Protection*, 27: 256-262.
- Quezado-Duval AM, Lopes CA.** 2010. Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. Circular Técnica 84. Embrapa Hortaliças. 28 p.
- Quezado-Duval AM.** 2008. Mancha-bacteriana do tomateiro: agentes causais e perspectivas de controle. En: Congresso Brasileiro de tomate industrial (II, 2008, Goiânia, Brasil). Apresentação oral.
- Quezado-Duval AM, Camargo LEA.** 2004. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. *Horticultura Brasileira*, 22(1): 80-86.
- Quezado-Duval AM, Gazzoto Filho A, Leite Júnior RP, Camargo LEA.** 2003. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*, 21(4): 670-675.
- Ritchie DF, Dittapongpitch V.** 1991. Copper- and streptomycin- resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Disease*, 75: 733-736.
- Romeiro RS.** 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, UFV. 279 p.
- Sahin F, Miller SA.** 1996. Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 80: 773-778.

- Schaad NW, Jones JB, Lacy GH.** 2001. Gram negative bacteria, *Xanthomonas*. En: Schaad NW, Jones JB, Chun W. (Eds.). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Minnesota, USA: APS Press. St. Paul. pp. 175-193.
- Silva-Lobo VL, Lopes CA, Giordano LB.** 2005. Componentes da resistência à mancha bacteriana e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, raça T2, em genótipos de tomateiro. Fitopatologia Brasileira, 30: 17-20.
- Stall RE, Jones JB, Minsavage GV.** 2009. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. Annual Review of Phytopathology 47:265-284.
- Stall RE, Thayer PL.** 1962. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. Plant Disease Report, 45: 389-392.
- Suslow TV, Schroth MN, Isaka M.** 1982. Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. Phytopathology, 72: 917-918.
- Thayer PL, Stall RE.** 1962. A survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 75: 163-165.
- Thayer PL, Stall RE.** 1961. Effect of variation in the bacterial spot pathogen of pepper and tomato on control with streptomycin. Phytopathology, 51: 568-572.
- United States Environmental Protection Agency.** 2005. Kasugamycin. Human Health Risk Assessment for Proposed Food Uses of the Fungicide Kasugamycin on Imported Fruiting Vegetables (Group 8) [En línea]. Consultado 2 octubre 2011. Disponible en: http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/kasugamycin_hh_riskassess.pdf
- Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Estadísticas Agropecuarias.** 2010. Encuestas hortícolas 2009. Zonas Sur y Litoral Norte. [En línea]. Consultado 2 octubre 2011. Disponible en: <http://www.google.com.uy/url?sa=t&rct=j&q=encuesta%20horticola%202009&source=web&cd=1&ved=0CBoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.mgap.gub.uy%2Fportal%2Fagxppdwn.aspx%3F7%2C5%2C71%2C0%2C5%2C0%2C1691%253BS%253B2%253B120%2C&ei=ycXeTpOOCOKgwececmxCA&usg=AFQjCNEe2DIkrIQuR2PSZx5zrqreQBcMIQ>
- Vallad GE, Pernezny KL, Balogh B, Wen A, Figueiredo JFL, Jones JB, Momol T, Muchovej RM, Havranek N, Abdallah N, Olson S, Roberts PD.** 2010. Comparison

of Kasugamycin to Traditional Bactericides for the Management of Bacterial Spot on Tomato. HortScience, 45: 1834-1840.

Wade L, Kurtz A. 2006. Kasugamycin – Vegetable Trial Data Review of a New Antibiotic. En: Annual Tomato Disease Workshop (22nd, 2006, North Carolina State University, United States). Proceedings. Mountain Horticultural Crops Research & Extension Center Fletcher, NC. 27-28 pp.

Waksman A. 1952. Streptomycin: Background, Isolation, Properties, and Utilization [En línea]. Consultado 2 octubre 2011. Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1952/waksman-lecture.pdf

3.

Evaluación de agresividad de aislados de *Xanthomonas* spp., causantes de la mancha bacteriana del tomate en Uruguay

Resumen

La mancha bacteriana es una de las enfermedades más importantes en el cultivo de tomate a campo en Uruguay. Es causada por cuatro especies de *Xanthomonas*. Se han definido cinco razas de acuerdo a su relación patogénica con determinadas plantas indicadoras. La raza T1 corresponde a *X. euvesicatoria*; T2 a *X. vesicatoria* y *X. gardneri* y las razas T3, T4 y T5 corresponden a *X. perforans*. El control está basado en aplicaciones de productos cúpricos, mancozeb y antibióticos, sin embargo no se logra un control satisfactorio. Se ha iniciado un programa de mejoramiento basado en algunos genotipos de tomate identificados con cierta resistencia cuantitativa a esta enfermedad. Para realizar el tamizado de materiales según su tolerancia es necesario ajustar un protocolo adaptado a condiciones locales, incluyendo el uso de cepas con diferente agresividad. La agresividad de aislados locales de *Xanthomonas* spp. se evaluó mediante la inoculación por aspersion de suspensión bacteriana de 5×10^8 ufc.ml⁻¹, en plantas de tomate bajo condiciones controladas. Se evaluó el número de lesiones y se midió la severidad en las hojas 5, 6 y 7 (número de hoja verdadera, siendo la 7 la hoja más nueva), a los 9, 13 y 15 días después de la inoculación. Se utilizó una escala diagramática y un programa de procesamiento de imagen (ImageJ). La evaluación de la severidad fue más apropiada para detectar diferencias significativas de agresividad entre aislados. Para detectar diferencias en la agresividad entre los aislados la evaluación se deben realizar en las hojas 5 y 6 y entre 9 y 13 días después de la inoculación.

Palabras clave: Mancha bacteriana del tomate, inoculación, agresividad

Aggressiveness assessment of *Xanthomonas* spp. isolates causing tomato bacterial spot in Uruguay

Abstract

Bacterial leaf spot is one of the main diseases in open field tomato crops in Uruguay. It is caused by four species of *Xanthomonas*. Five races have been defined according to their pathogenic relationship with certain indicator plants. Race T1 corresponds to *X. euvesicatoria*, T2 to *X. vesicatoria* and *X. gardneri* and races T3, T4 and T5 to *X. perforans*. Management is based on copper, mancozeb and antibiotic applications, however satisfactory control is not achieved. A breeding program has started based on some tomato genotypes identified with quantitative resistance to this disease. To perform the screening of materials according to their tolerance it is necessary to adjust a protocol adapted to local conditions, including the use of strains with different aggressiveness. Local *Xanthomonas* spp. isolates aggressiveness was evaluated by spray inoculation of tomato plants under controlled conditions with a bacterial suspension of 5×10^8 ufc.ml⁻¹. Number of lesions was evaluated and severity was measured on leaves 5, 6 and 7 (number of true leaf, 7 being the newest leaf), 9, 13 and 15 days after inoculation. A diagrammatic scale and an image processing program (ImageJ) were used. The severity assessment was appropriate to detect differences in isolate aggressiveness. To detect differences in aggressiveness among isolates, evaluation should be performed on leaves 5 and 6 and between 9 and 13 days after inoculation.

Keywords: tomato bacterial spot, inoculation, aggressiveness

3.1. Introducción

En Uruguay, el cultivo de tomate ocupó una superficie de 574 ha en la zafra 2008/2009, de las cuales el 66% se realizó a campo. (Uruguay, 2010).

La mancha bacteriana que afecta a cultivos de tomate y pimiento, es causada por cuatro bacterias del género *Xanthomonas*: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri*. Las bacterias que afectan tomate se han clasificado en cinco razas de acuerdo a su relación patogénica con determinados cultivares indicadores. La raza T1 corresponde a *X. euvesicatoria*; T2 a *X. vesicatoria* y *X. gardneri* y las razas T3, T4 y T5 corresponden a *X. perforans* (Quezado- Duval y Lopes, 2010; Jones *et al.* 2004). Esta enfermedad está ampliamente distribuida a nivel mundial siendo una de las más importantes del cultivo a campo. Si las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo (temperaturas entre 20 y 30 °C, alta humedad y lluvias asociadas a vientos fuertes), los ataques progresan rápidamente.

Esta bacteria se transmite a través de la semilla y sobrevive en restos de cultivos o en plantas espontáneas. Afecta los órganos aéreos, causando pérdidas económicas directas por disminución en la cantidad y calidad de frutos (CAB International, 2007; Jones y Stall, 1998). En Brasil en condiciones experimentales de campo, se reportan pérdidas de rendimiento del 52% en tomate rastrojero (Quezado-Soares *et al.*, 1998).

Xanthomonas spp. es capaz de sobrevivir epifíticamente en la superficie de las hojas y otros órganos de plantas de tomate. Las bacterias ingresan al tejido vegetal a través de aberturas naturales como estomas, hidátides, lenticelas y nectarios o a través de heridas. Las condiciones que favorecen la apertura estomática, facilitan el ingreso de las bacterias a los tejidos (Ramos y Volin, 1987).

Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad son muy frecuentes durante el ciclo del cultivo de tomate de campo en Uruguay, por lo cual la mancha bacteriana es un problema sanitario importante y prevalente de ese cultivo.

El control se basa en aplicaciones de productos cúpricos, mancozeb y antibióticos (estreptomina y kasugamicina) y a pesar de la importante intervención química, éste muchas veces no es efectivo, ya sea por el modo de acción de los productos, por el

desarrollo de cepas resistentes de la bacteria, o por la permanencia de condiciones ambientales muy favorables para el desarrollo de la enfermedad.

Hasta el momento no existen cultivares con resistencia satisfactoria y la eficiencia en el control químico es variable (Quezado-Duval y Lopes, 2010). Por ello es muy importante realizar un manejo integrado de esta enfermedad, aplicando medidas culturales, tales como el uso de semillas libres de la bacteria o desinfectadas, eliminación de fuentes de inóculo o reducción del inóculo inicial y evitar la diseminación del patógeno; todo lo cual se puede complementar con el empleo de control biológico, la inducción de resistencia de las plantas, el uso de variedades resistentes y control químico (Quezado- Duval y Lopes, 2010; CAB International, 2007).

La resistencia genética es una medida de control muy conveniente, sin embargo, si bien se han identificado algunos genotipos con cierta resistencia cuantitativa a esta enfermedad, los cultivares comerciales que se utilizan actualmente son susceptibles (Silva-Lobo *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1994; Scott y Jones, 1989).

Se ha trabajado en la búsqueda de genes de resistencia identificándose resistencia específica a las diferentes razas en algunos cultivares de tomate (Robbins *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1994). La misma está proporcionada por grupos de genes de efecto aditivo, los que deben ser combinados para obtener variedades con resistencia a las diferentes razas (Robbins *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2005).

El Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), ha comenzado un programa de mejoramiento con la finalidad de desarrollar cultivares locales con un grado de resistencia durable a la mancha bacteriana, para lo cual es necesario ajustar un método de inoculación que permita comparar el comportamiento de distintos materiales frente a esta enfermedad. Los objetivos de este trabajo fueron ajustar una metodología de inoculación adecuada para la comparación de la agresividad de los aislados de *Xanthomonas* spp. y que también pueda utilizarse para la comparación del comportamiento de distintos cultivares de tomate frente a la mancha bacteriana.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Aislados y material vegetal utilizados

Se utilizaron 8 aislados (4, 13, 19, 20, 29, 32, 36 y 37), representativos de la diversidad encontrada, en la colección de *Xanthomonas* spp. obtenida a partir de muestras de tomate, con síntomas atribuibles a la mancha bacteriana, colectadas durante las zafras 2007-2008, 2008-2009 y 2009-2010, en predios ubicados en las principales zonas de producción de Uruguay (Canelones, Colonia, Montevideo, San José y Salto) y de las estaciones experimentales de INIA Las Brujas (Canelones) y Salto Grande (Salto). Las características de los aislados utilizados se presentan en el Cuadro 1.

Se inocularon plantas de tomate del cultivar Loica, el cual presenta baja susceptibilidad a la enfermedad. Las semillas fueron sembradas en almacigueras de espuma plast de 104 celdas, de 50 cc, con sustrato (Bioland, Finlandia) estéril. Luego de 15-20 días los plantines fueron transplantados a macetas de 250 cc, conteniendo una mezcla estéril 1:1 de suelo:sustrato.

Cuadro 1. Detalles de los aislados de *Xanthomonas* spp. utilizados en el experimento (órgano del cual fueron aislados, zafra de la colecta, lugar de origen y raza).

Aislado	Órgano *	Año	Origen	Raza
4	F	07/08	Canelones	3
13	H	07/08	Canelones	4
19	F	07/08	San José	2
20	F	08/09	Canelones	4
29	F	07/08	Colonia	3
32	H	07/08	Canelones	4
36	F	08/09	Canelones	4
37	H	07/08	Salto	3

* H hoja, F fruto

3.2.2. Metodología de inoculación y evaluación

Se recuperaron células viables de los aislados almacenados en glicerol al 10%, a -20 °C, sembrando por estriado en Nutriente Agar Dextrosa (NAD, Oxoid Ltd., Inglaterra), e incubando durante 48-72 horas. Para la multiplicación, se partió de una colonia aislada la cual fue sembrada en Nutriente Agar (NA, Oxoid Ltd., Inglaterra). Se incubó a 28 °C y luego de 48 horas se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril al 0,85% p/v de NaCl, en agua destilada. Se ajustó la concentración de la suspensión bacteriana a 5×10^8 ufc.ml⁻¹, mediante espectrofotómetro $Ab_{S550nm} = 0.1$ utilizando celdas de cuarzo (Romeiro, 2001), la que fue confirmada en pruebas previas mediante recuento en placa en medio NAD.

Se inocularon tres plantas con cada aislado (tratamiento), mediante aspersion hasta punto de goteo, a 7-8 hojas totalmente expandidas (30-40 días de edad). Como testigo se utilizó solución salina estéril al 0,85% p/v de NaCl, en agua destilada. Luego de la inoculación, las plantas fueron mantenidas en cámara húmeda durante 48 horas, utilizando bolsas plásticas y luego transferidas a cámara de crecimiento (SANYO, 2,3 x 1,8 x 1,8 m, con control de temperatura 2-45°C y luz suplementaria) a 26-28 °C, con 14 h de luz/10 h oscuridad durante todo el período de evaluación.



Figura 1. Metodología de inoculación

La severidad de los distintos aislados de *Xanthomonas* spp. se evaluó a través de la estimación del porcentaje de área foliar afectada, en las hojas 5, 6 y 7 (siendo la hoja 7 la más joven) en tres plantas a los 9, 13 y 15 días después de la inoculación (ddi). En cada momento de evaluación se fotografió cada hoja con una referencia de tamaño (hoja centimetrada). El área foliar afectada fue evaluada de dos formas: 1) mediante la escala diagramática desarrollada por Mello *et al.*, (1997) (Anexo 1) y 2) con el programa de procesamiento de imagen ImageJ (software libre, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), para lo cual las imágenes fueron previamente editadas con el programa Corel DRAW (Corel Corporation, Ottawa, Canadá). Previamente se verificó que el uso de esta metodología era adecuado, comparando los datos obtenidos con el programa ImageJ con el conteo y la medición manual, mediante el uso de cuadrícula milimetrada en 5 hojas sintomáticas (*datos no publicados*) (Figura 2). Con el programa ImageJ se calculó el área total de la hoja, el área afectada por la enfermedad y el número de lesiones.

Se consideraron como síntomas de la enfermedad a las manchas características y el tejido necrótico resultante.

Con la información colectada de los tres momentos de evaluación se calculó el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE) mediante una adaptación del método de integración trapezoidal (Campbell y Madden, 1990). Dicha variable integra cada uno de los momentos, desde el día de inoculación hasta el momento de evaluación.

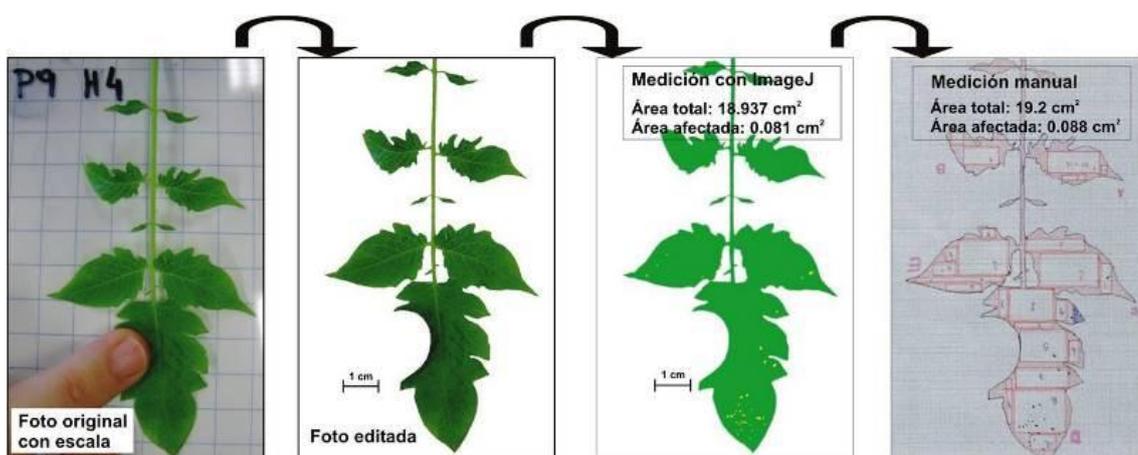


Figura 2. Ajuste de metodología de evaluación con el programa ImageJ.

Se calculó la correlación entre los resultados obtenidos con ambos métodos de estimación de la severidad de los síntomas en hojas utilizando el PROC CORR del programa SAS System versión 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EEUU).

3.2.3. Análisis estadístico

Para diferenciar la agresividad de los aislados y su evolución se utilizaron los valores del número de lesiones y del ADCPE de la severidad. Los datos fueron analizados por ANOVA, utilizando el PROC GLM del programa SAS System versión 9.2, de acuerdo a un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones (plantas) en cada bloque, considerando el número de hoja como el bloque. Las medias de los tratamientos (aislados de *Xanthomonas* spp.) fueron separadas por mínima diferencia significativa (MDS), mediante la prueba de Fisher protegido con $p = 0.05$.

Se calculó la correlación entre el N° de lesiones y el tejido foliar afectado y entre el N° de lesiones y el área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE) a los 9, 13 y 15 días, utilizando el PROC CORR del programa SAS System versión 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, EEUU).

3.3. Resultados

3.3.1. Diferencias entre agresividad de aislados

En el Cuadro 2 se presentan los resultados del análisis de varianza para la variable número de lesiones a los 9, 13 y 15 ddi. En los tres casos el efecto de los aislados es significativo y no lo es la interacción entre los aislados y las hojas en las que se midió.

Cuadro 2. Resumen de los resultados de los ANOVA del número de lesiones a los 9, 13 y 15 días después de la inoculación (ddi).

Fuente	9 ddi			13 ddi.			15 ddi.		
	g.l.*	CM**	Pr > F***	g.l.	CM	Pr > F	g.l.	CM	Pr > F
Hoja	2	1952,4306		2	10872,2200		2	12042,3533	
Aislado	7	7224,6488	<,0001	7	6294,4237	0,0321	7	9481,9885	0,0107
Aislado*Hoja	14	271,3988	0,9981	14	1703,2578	0,7991	14	2441,9680	0,6892
Error	48	1208,2500		47	2577,2766		47	3149,5035	
Total	71			70			70		

*g.l. grados de libertad, ** CM Cuadrado Medio; *** Pr> F nivel de significancia

En la Figura 3 se presenta el número promedio de lesiones a los 9, 13 y 15 ddi de los diferentes aislados.

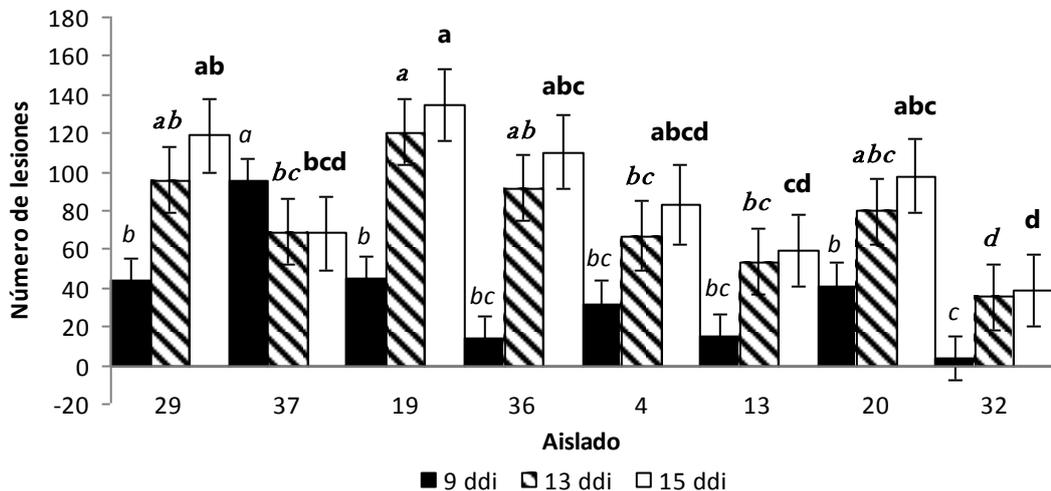


Figura 3. Promedio del número de lesiones 9, 13 y 15 días después de la inoculación (ddi), según aislado. Las líneas verticales indican el error estándar del experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

A excepción del aislado 37, en todos los casos el número de lesiones aumentó entre 9 y 13 ddi. Entre 13 y 15 ddi el aumento del número de lesiones fue de menor magnitud sin presentar diferencias significativas. El aislado 37 se destacó del resto presentando el mayor número de lesiones a los 9 ddi; a los 13 ddi el número de lesiones registrado disminuyó y prácticamente se mantuvo constante hasta los 15 ddi. La disminución del número de lesiones se debió a que a medida que las lesiones aumentaron su tamaño y coalescieron lo cual dificultó la estimación de su número.

En los Cuadros 3 y 4 se presentan los resultados de los análisis de varianza para la variable ADCPE medida con la escala diagramática y con el programa ImageJ respectivamente, en los tres momentos en que se midió. Nuevamente se puede observar que en todos los casos el efecto de los aislados es significativo y no lo es la interacción entre los aislados y las hojas en las que se midió, con la misma consecuencia que para el número de lesiones.

Cuadro 3. Resumen de los resultados de los ANOVA del ADCPE medida con la escala diagramática a los 9, 13 y 15 días después de la inoculación (ddi).

Fuente	9 ddi			13 ddi.			15 ddi.		
	g.l.	CM	Pr > F	g.l.	CM	Pr > F	g.l.	CM	Pr > F
Hoja	2	200,8018		2	18035,5926		2	66964,2503	
Aislado	7	605,1826	0,0248	7	10401,8983	0,0183	7	28362,5366	0,0277
Aislado*Hoja	14	40,7453	0,9996	14	1682,1336	0,9515	14	5587,7238	0,9237
Error	48	235,6514		47	3808,8940		47	11267,1306	
Total	71			70			70		

*g.l. grados de libertad, ** CM Cuadrado Medio; *** Pr>F nivel de significancia

Cuadro 4. Resumen de los resultados de los ANOVA del ADCPE medida con el programa ImageJ a los 9, 13 y 15 días después de la inoculación (ddi).

Fuente	9 ddi.			13 ddi.			15 ddi.		
	g.l.	CM	Pr > F	g.l.	CM	Pr > F	g.l.	CM	Pr > F
Hoja	2	356,4175		2	8532,4282		2	28099,2380	
Aislado	7	433,9794	0,0121	7	6072,9908	0,0076	7	16248,2479	0,0254
Aislado*Hoja	14	211,3089	0,1759	14	2124,9898	0,3695	14	5295,4177	0,6291
Error	48	147,6890		47	1903,9563		47	6340,7218	
Total	71			70			70		

*g.l. grados de libertad, ** CM Cuadrado Medio; *** Pr>F nivel de significancia

En las Figuras 4 y 5 se presentan los resultados del ADCPE promedio de todas las hojas evaluadas, utilizando los valores de severidad de la escala diagramática y el área calculada según el programa ImageJ, respectivamente. Si bien la variabilidad de los resultados fue alta, se encontraron diferencias significativas en la agresividad de los aislados, encontrándose un ordenamiento y agrupamiento similar independientemente del método que se utilizó.

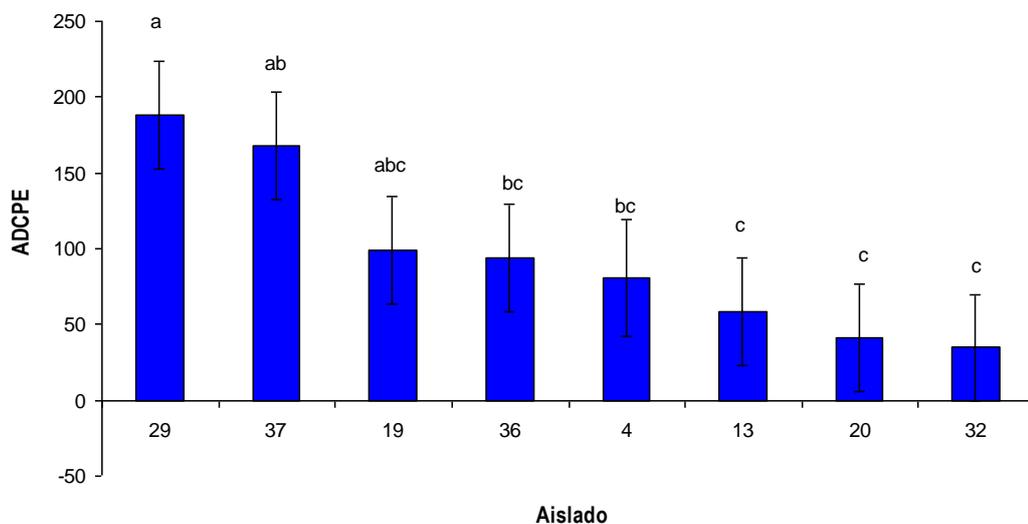


Figura 4. Promedio del área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE) de las hojas 5, 6 y 7 en conjunto, a los 15 días después de la inoculación, según aislado, utilizando la escala diagramática para estimar la severidad. Las líneas verticales indican el error estándar del experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

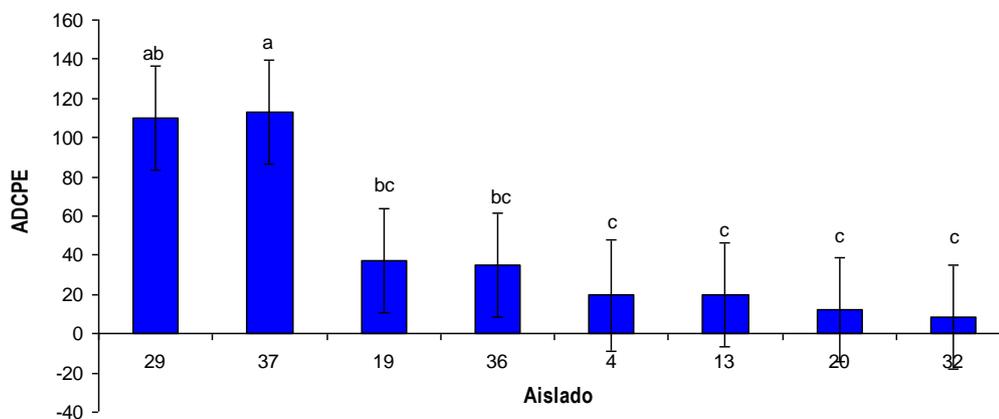


Figura 5. Promedio del área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE) de las hojas 5, 6 y 7 en conjunto, a los 15 días después de la inoculación según aislado utilizando el programa ImageJ para estimar la severidad. Las líneas verticales indican el error estándar del experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los aislados 29, y 37 presentaron valores de mayor agresividad, en un segundo grupo intermedio se encontraron los aislados 19 y 36 y finalmente los aislados 4, 13, 20 y 32 fueron los que presentaron valores menores.

El número de lesiones únicamente a los 9 ddi estuvo correlacionado con el porcentaje de tejido afectado y el ADCPE, aunque el grado de esta correlación no es muy alta (Cuadro 5). Si bien el número de lesiones aumentó con los ddi, el aumento de la severidad y del ADCPE con ella calculada, fue mayor y no estuvieron correlacionadas. Por esa razón el número de lesiones únicamente puede considerarse un buen indicador del desarrollo de la enfermedad en sus etapas iniciales. Por ese motivo el análisis de la agresividad de los aislados fue realizado en base la ADCPE.

Cuadro 5. Coeficiente de correlación entre N° de lesiones y tejido foliar afectado y entre N° de lesiones y área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE).

	Coeficiente de correlación	
	N° de lesiones/tejido afectado	N° de lesiones/ADCPE
9 ddi	0,528*	0,528*
13ddi	-0,145 NS	-0,081 NS
15ddi	-0,187 NS	-0,163 NS

* P<0.0001

NS No significativo

Al comparar los métodos utilizados para evaluar la severidad de los síntomas en las hojas, si bien los valores de la severidad obtenidos con ambos métodos no son iguales (los valores obtenidos con la escala diagramática fueron mayores que los obtenidos con el ImageJ), se encontró una correlación alta y muy significativa entre el ADCPE calculada con ambos, especialmente en las evaluaciones realizadas a los 13 y 15 ddi (Cuadro 6).

Cuadro 6. Coeficiente de correlación entre los resultados de ADCPE obtenidos utilizando la escala diagramática y el programa ImageJ para estimar la severidad.

Variable	Coeficiente de correlación escala diagramática/ImageJ
ADCPE 9 ddi	0,731*
ADCPE 13 ddi	0,938*
ADCPE 15 ddi	0,936*

*P < 0,0001

Debido a la alta correlación entre los resultados obtenidos con ambos métodos de evaluación de la severidad, se presentan únicamente los resultados obtenidos con el programa ImageJ.

En la Figura 6 se presentan los valores del ADCPE promedio a los 13 ddi, obtenidos con cada aislado en cada hoja por separado, utilizando el programa ImageJ para estimar el área foliar afectada. La variabilidad de los resultados fue alta y no se encontraron diferencias significativas en agresividad entre los aislados analizando cada tipo de hoja por separado.

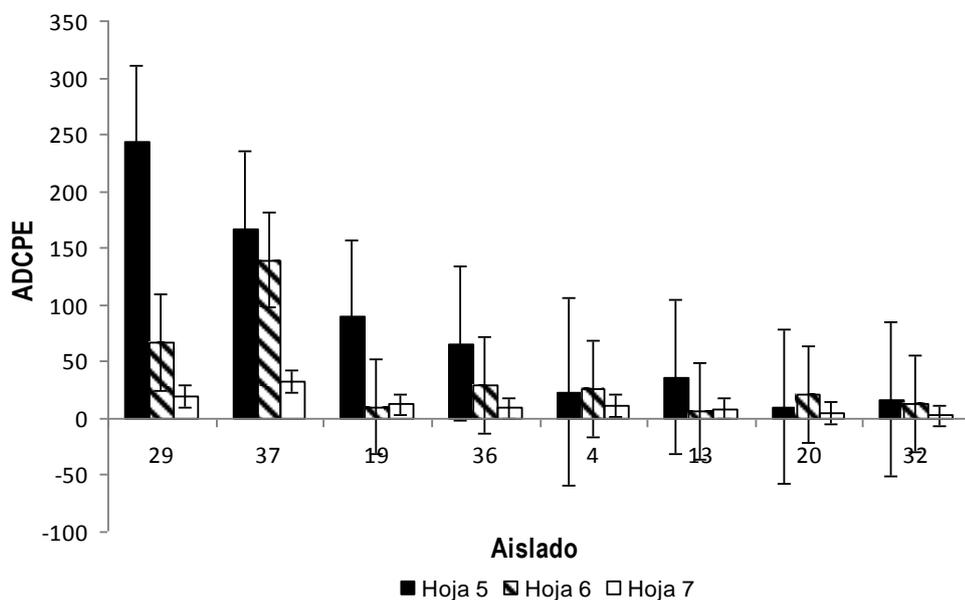


Figura 6. Promedio del área debajo de la curva del progreso de la enfermedad (ADCPE) de las hojas 5, 6 y 7 (siendo la hoja 7 la hoja más joven), a los 15 días después de la inoculación, según aislado utilizando el programa ImageJ para estimar la severidad. Las líneas verticales indican el error estándar del experimento.

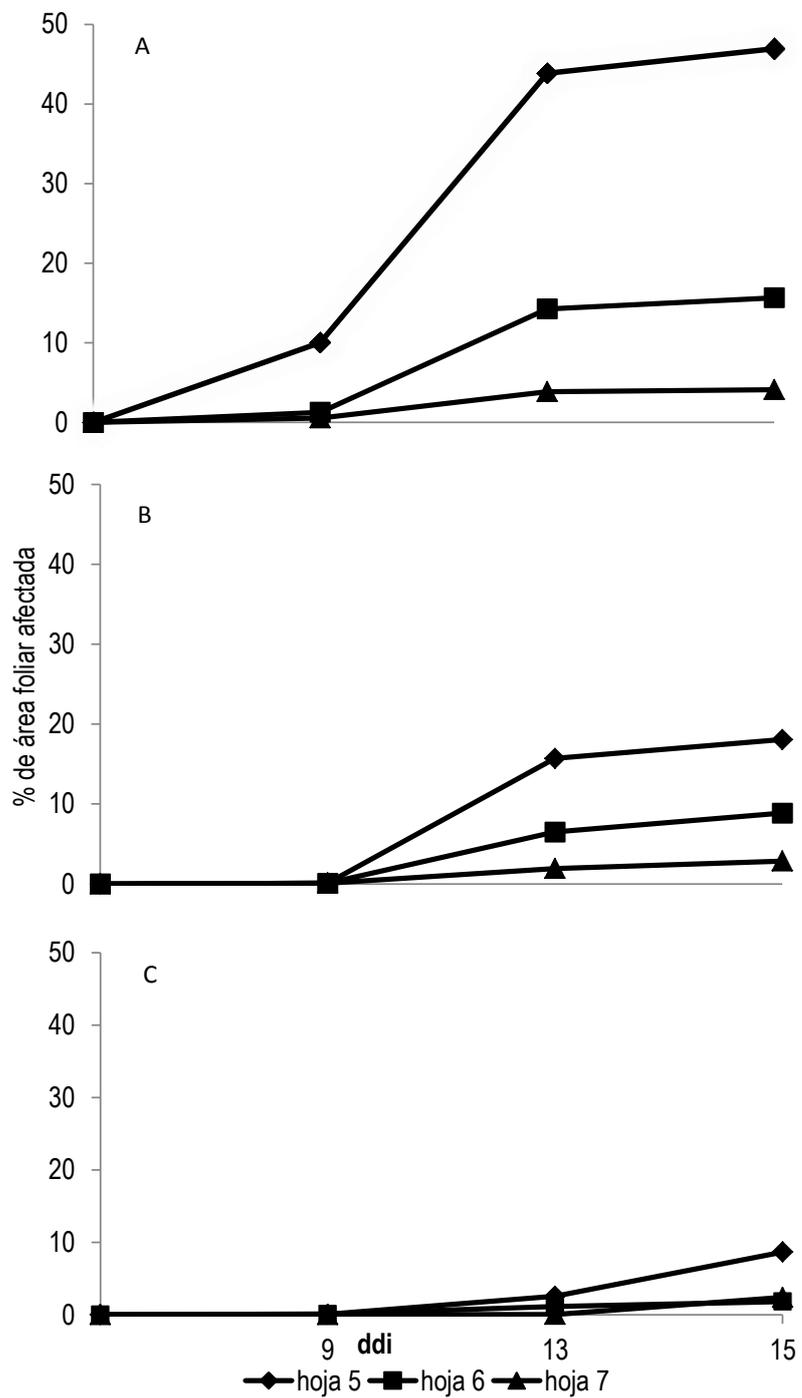


Figura 7. Porcentaje promedio del área foliar afectada según hoja (5, 6 o 7), a los 9, 13 y 15 días después de la inoculación (ddi), para A) aislado 29, B) aislado 36 y C) aislado 32, utilizando el programa ImageJ para su estimación.

En la Figura 7 se presenta la evolución del área foliar afectada en las distintas hojas (5, 6 y 7) para los aislados 29, 36 y 32 como ejemplos de los grados de agresividad encontrados (alta, media y baja, respectivamente), a los 9, 13 y 15 ddi, utilizando el programa ImageJ para su estimación.

El porcentaje de área foliar afectada tiene una evolución mayor en las hojas 5 y 6, a diferencia de la hoja 7 en la cual el área foliar afectada tiene una tasa de desarrollo menor independientemente de la agresividad del aislado (Figura 7).

La hoja 7 desarrolló menos síntomas para casi todos los aislados y como no existió interacción entre los aislados y la hoja en que se midió la severidad, se decidió ver si era posible encontrar diferencias entre los aislados utilizando los datos de las hojas 5 y 6 conjuntamente. Con este análisis si fue posible encontrar diferencias en la agresividad de los aislados (Figura 8).

3.3.2. Influencia del momento de evaluación en la discriminación de la agresividad de los aislados

En la Figura 8 se presentan los valores de ADCPE de las hojas 5 y 6 en conjunto, registrados en los tres momentos de evaluación (9, 13 y 15 ddi), utilizando el programa ImageJ para estimar la severidad.

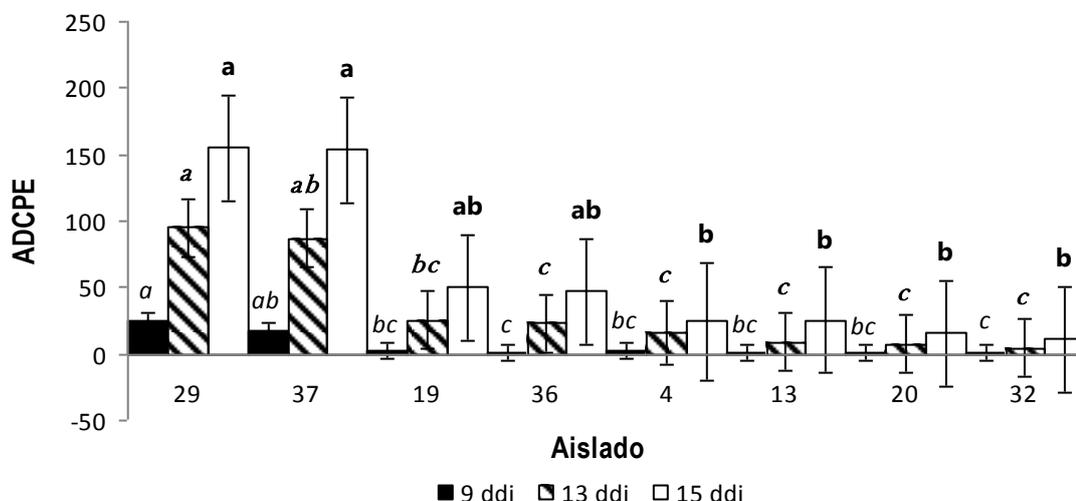


Figura 8. Promedio del área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE) calculada con las hojas 5 y 6 en conjunto según aislado, 9, 13 y 15 días después de la inoculación (ddi), utilizando la severidad estimada con el programa ImageJ. Las líneas verticales indican el error estándar del experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

3.4. Discusión

El número de lesiones estuvo correlacionado con el ADCPE (coeficiente de correlación de 0.573) únicamente a los 9 ddi. La variación en el número de lesiones entre fechas de evaluación no fue un buen estimador del avance de la enfermedad, debido a que el ADCPE aumentó más que el número de lesiones. Esto fue debido a que el tamaño de las lesiones aumentó y en muchos casos éstas se unieron, por lo que con poca variación en el número de lesiones, el aumento en el área foliar afectada fue mayor. Comparando los aislados 29 y 37, a los 13 ddi el número de lesiones no fue estadísticamente diferente, mientras que los valores del ADCPE sí lo fueron, siendo el aislado 29 más agresivo (Figuras 3 y 8). Los aislados 29 y 36 se encontraron en grupos con diferencias significativas en ADCPE pero no se diferenciaron en el número de lesiones.

Al haber sido realizada la inoculación utilizando la misma concentración de la suspensión bacteriana (5×10^8 ufc.ml⁻¹), la evaluación del número de lesiones muestra la diferente capacidad de los aislados de producir lesiones, a los 9 ddi (Figura 3).

Posteriormente la correlación entre el número de lesiones y el ADCPE (13 y 15 ddi), no fue significativa. Por ejemplo, el aislado 37 tuvo el mayor número de lesiones a los 9 ddi pero este número disminuyó en las evaluaciones siguientes mientras que el ADCPE siempre aumentó (Figura 3 y 8). En el caso del aislado 19 ocurrió lo contrario: a los 13 y 15 ddi mostró el mayor número de lesiones que no se correspondió con la mayor área foliar afectada. Esto evidencia que existen diferencias entre la capacidad de generar lesiones y la velocidad del aumento del tamaño entre los aislados y que ambas características pueden mostrar comportamientos diferentes (Figuras 3 y 8).

La evaluación de la agresividad mediante la estimación del porcentaje de área foliar afectada y posterior cálculo del ADCPE, permitió encontrar diferencias entre los aislados, aunque la variabilidad observada en algunos casos fue muy alta. A los 13 y 15 ddi, el porcentaje de área foliar afectada se convirtió en el mejor estimador del progreso de la enfermedad, por lo que el ADCPE calculada con éste permitió caracterizar los aislados tomando en cuenta todas las etapas del desarrollo de la enfermedad (Figura 6).

De acuerdo a los resultados, los aislados estudiados pueden separarse en tres grupos de acuerdo a su agresividad. Los más agresivos (29 y 37) corresponden a las razas 3, (Colonia y Salto). Los aislados 19 y 36, raza 2 y 4 respectivamente, presentaron una agresividad intermedia y los aislados 4 (raza 3), 13 (raza 4), 20 (raza 4) y 32 (raza 4) de Canelones, fueron los que presentaron menor agresividad.

Esta información es de utilidad directa para el programa de mejoramiento en curso. Los aislados estudiados podrán ser utilizados de acuerdo a la estrategia seleccionada. Una opción puede ser realizar las inoculaciones con los aislados más agresivos de forma de determinar los materiales con resistencia adecuada en las etapas iniciales o realizarlas con los aislados menos severos para luego ir avanzando en la mejora y efectuar el desafío con aislados severos en etapas posteriores del programa.

Según Ramos y Volin (1987) la inoculación mediante aspersion es más adecuada que la inoculación mediante infiltración para comparar la resistencia de la planta a la enfermedad ya que también tiene en cuenta la resistencia estructural de la planta. Este

método de inoculación es similar al modo de inoculación que ocurre en las condiciones del cultivo en donde se disemina con el agua de lluvia; además es más simple de hacer y fácil de aplicar a gran escala.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la hoja más joven (hoja 7) no es apropiada para evaluar diferencias en la agresividad de los aislados porque se obtienen valores bajos de área foliar afectada que no contribuyen a evidenciar las diferencias tal como se detectan en las hojas 5 y 6. El mismo criterio puede aplicarse en cuanto a su utilidad para discriminar diferencias entre materiales vegetales en el programa de mejora.

La resistencia de las plantas a las enfermedades varía según la edad de la planta, la madurez del tejido afectado y depende de la interacción planta-patógeno (Develey-Riviere y Galiana, 2007). Si bien la densidad estomática es mayor en las hojas más jóvenes (Ramos y Volin, 1987) y en general los tejidos más jóvenes son más sensibles a las enfermedades (Develey-Riviere y Galiana, 2007), en este trabajo las hojas más jóvenes se mostraron más resistentes a la enfermedad, por lo que otros factores podrían estar afectando el desarrollo de la misma. Zhang y Chen (2009) demostraron que las hojas más jóvenes de tomate emiten más compuestos volátiles los que afectan negativamente la germinación de esporas y el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. Estos volátiles tendrían un rol muy importante en la resistencia relacionada con la edad de las hojas de tomate frente a algunos patógenos. Zeier (2005) encontró que las hojas más jóvenes de *Arabidopsis thaliana* fueron más resistentes a *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Según Mello *et al.* (1997), las hojas más bajas de la planta de tomate, que son las más viejas, normalmente presentan mayor severidad de los síntomas de la mancha bacteriana que las hojas más nuevas. Marcuzzo *et al.* (2009) inocularon *Xanthomonas* spp. en plantas de tomate a campo y obtuvieron síntomas 11 semanas luego de la inoculación. Ellos consideran que las hojas más viejas comienzan a traslocar carbohidratos; estos compuestos se liberan inicialmente en el interior de las células y luego se encuentran en los espacios intercelulares en los tejidos foliares, estando disponibles para las bacterias permitiendo el aumento de la población bacteriana y el desarrollo de síntomas.

Los aislados menos agresivos no causaron síntomas en la hoja 7 a los 9 ddi. Esto podría ser porque tuvieron un mayor período de latencia o porque la bacteria sobrevivió de

forma epifítica sobre la hoja y los síntomas aparecieron cuando la hoja tuvo un desarrollo mayor lo que concuerda con los resultados obtenidos por Ramos y Volin (1987).

Debido a la alta variabilidad observada en los resultados, la evaluación de los registros tomados de las hojas 5, 6 y 7 por separado no arrojó diferencias significativas entre la agresividad de los aislados. Como la hoja 7 desarrolló menos síntomas y no existió interacción entre los aislados y la hoja en que se midió la severidad, fue posible analizar los datos de las hojas 5 y 6 conjuntamente, de esta manera se aumentó la cantidad de datos y fue posible detectar diferencias estadísticas en la agresividad entre los aislados. Probablemente las hojas 5 y 6 tenían un estado de madurez similar entre ellas y mayor a la hoja 7 por lo cual se comportaron de forma similar ante la enfermedad.

A los 9 ddi, los niveles de severidad fueron bajos en todas las hojas. El área foliar afectada por los aislados menos agresivos fue muy baja en ese momento de evaluación. Si bien se registraron lesiones, el área cubierta por éstas fue muy baja, comparado con los aislados más agresivos que provocaron la aparición de síntomas evidentes en ese momento. En las evaluaciones realizadas a los 13 y 15 ddi se observaron mayores valores de severidad de la enfermedad en todos los aislados y todas las hojas presentaron síntomas. Sin embargo, a los 15 ddi las hojas más viejas fueron muy afectadas por la enfermedad distorsionando la evaluación de área foliar afectada. Por esa razón las evaluaciones de severidad se deberían efectuar entre los 9 y 13 ddi.

Para la evaluación del área foliar afectada, como era de esperar, los resultados más precisos se obtuvieron utilizando el programa ImageJ, esta metodología de evaluación permite determinar el porcentaje del área real de tejido foliar afectado. Sin embargo es una metodología que insume más trabajo, tiempo y equipo para su realización por lo que debería reservarse para trabajos que requieran mayor precisión como en este caso, la selección de aislados de acuerdo a su agresividad para utilizar en el programa de mejoramiento de tomate y no ser usada en evaluaciones rutinarias de daños. A pesar de que los valores de severidad obtenidos con la escala diagramática fueron mayores a los obtenidos con el programa ImageJ, para este tipo de evaluaciones es seguro utilizar la escala diagramática dado que los valores obtenidos con ambas metodologías estuvieron altamente correlacionados y a los efectos de comparar el comportamiento de los materiales a probar frente a la bacteria tienen la misma utilidad. En los niveles más bajos de severidad la correlación entre ambos fue

menor lo que concuerda con los trabajos de validación de escalas diagramáticas realizados por Angelotti *et al.*, 2008, Godoy *et al.*, 2006 y Andrade *et al.*, 2005, quienes obtuvieron mayores errores de evaluación en los niveles bajos de severidad. Por lo tanto, cuando los niveles de severidad son bajos no debería realizarse su estimación con escalas diagramáticas.

Según lo señalado por Ramos y Violin (1987) la metodología de inoculación utilizada sería apropiada para comparar el comportamiento de distintos cultivares frente a la mancha bacteriana. La evaluación de la severidad a gran escala y/o en condiciones de campo, podría realizarse utilizando la escala diagramática desarrollada por Mello *et al.* (1997), dada su simplicidad y rapidez, sin comprometer la exactitud de los resultados ya que las mediciones realizadas con esta escala tuvieron un alto coeficiente de correlación con las realizadas con el programa ImageJ que es más preciso, a pesar de que los valores no fueron iguales. La evaluación del número de lesiones no sería recomendable para discriminar entre aislados por agresividad, ya este parámetro solamente fue útil en las primeras etapas y no mostró una buena correlación con el ADCPE de todo el período.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, el aislado 29 sería el adecuado para ser utilizado en el programa de mejoramiento de tomate para el desarrollo de cultivares resistentes a la mancha bacteriana ya que fue uno de los que mostró mayor agresividad y además pertenece a la raza T3 que es la más abundante en Uruguay (Montelongo, *datos sin publicar*).

De las hojas estudiadas en este trabajo, las correspondientes a la posición 5 y 6 fueron las más apropiadas para evaluar la agresividad de los aislados. La gran variabilidad de los datos, indica la necesidad de aumentar el número de hojas a evaluar y excluir a las hojas jóvenes. Por esa razón debería aumentarse el número de plantas asignadas a cada tratamiento.

La evaluación de la severidad de los síntomas debería realizarse entre los 9 y 13 ddi porque antes de esa fecha las diferencias en el desarrollo de la enfermedad provocada por los diferentes aislados fueron menores, los valores de severidad registrados fueron muy bajos y los aislados menos agresivos no provocaron síntomas en ese momento. Esta recomendación también sería aplicable a la comparación de la respuesta de distintos cultivares de tomate inoculados con un mismo aislado.

La evaluación temprana (a los 9 ddi) tanto en número de lesiones como en área afectada puede representar un dato accesorio de valor en la discriminación de la respuesta de cultivares a la enfermedad ya que se relacionaría con la capacidad de éstos de diferir o retardar la expresión de síntomas.

3.5. Bibliografía

- Andrade GCG, Alfenas AC, Maffia RG, Maffia LA, Gonçalves RC.** 2005 Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 504-509.
- Angelotti F, Scapin CR, Tessmann DJ, Vida JB, Oliveira RR, Canteri MG.** 2008. Diagrammatic scale for assessment of grapevine rust. *Tropical Plant Pathology*, 33 (6): 439-443.
- CAB INTERNATIONAL.** 2007. Crop protection compendium; 2007 edition. Wallingford, UK. 1 disco compacto, 8mm.
- Campbell CL, Madden LV.** 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley and Sons. USA. 532 pp.
- Develey-Riviere MP, Galiana E.** 2007. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist*, 175: 405-416.
- Godoy CV, Koga LJ, Canteri MG.** 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 063-068.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW.** 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755-762.
- Jones JB, Bouzar H, Somodi GC, Stall RE, Pernezny K, El-Morsy G, Scott JW.** 1998. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. *Phytopathology*, 88: 33-38.
- Marcuzzo LL, Becker WF, Fernandes JMC.** 2009. Some epidemiological aspects of bacterial spot (*Xanthomonas* spp.) of tomato in Caçador/SC, Brazil. *Summa Phytopathologica*, 35 (2): 132-135
- Mello SCM, Takatsu A, Lopes CA.** 1997. Escala diagramática para avaliação da mancha bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 22: 447-448.
- Quezado-Duval AM, Lopes CA.** 2010. Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. Circular Técnica 84. Embrapa Hortaliças. 28 p.

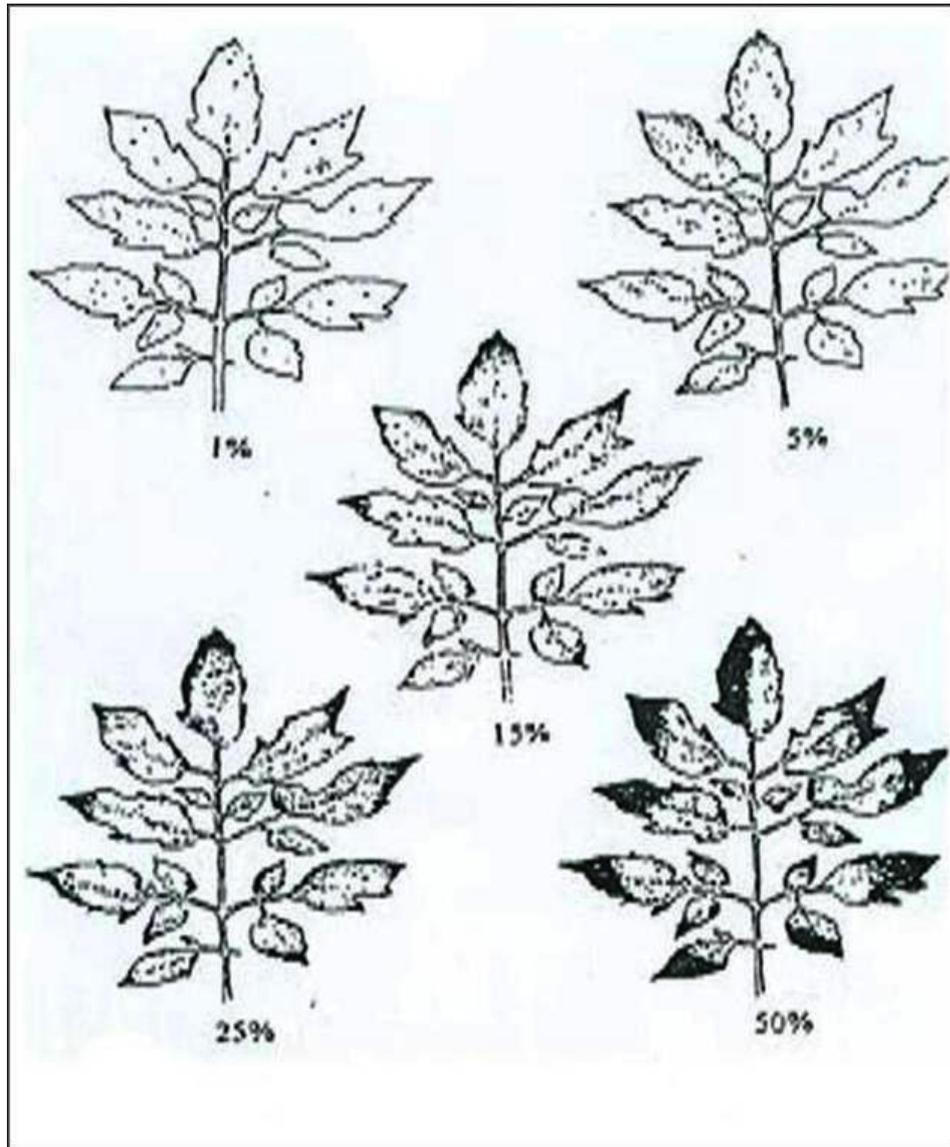
- Quezado-Soares A, Silva V, Giordano L, Lopes C.** 1998. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha bacteriana. Horticultura Brasileira, 16.
- Ramos L, Volin RB.** 1987. Role of stomatal opening and frequency on infection of *Lycopersicon* spp. by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology, 77: 1311-1317.
- Robbins M, Darrigues A, Sim S, Masud M, Francis D.** 2009. Characterization of hypersensitive resistance to bacterial spot race T3 (*Xanthomonas perforans*) from tomato accession PI 128216. Phytopathology, 99:1037-1044.
- Romeiro RS.** 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, UFV. 279 p.
- Scott JW, Francis D M, Miller SA, Somodi GC, Jones JB.** 2003. Tomato bacterial spot resistance derived from PI 114490; inheritance of resistance to race T2 and relationship across three pathogen races. Journal of the American Society Horticultural Science, 128 (5): 698-703.
- Scott JW, Stall RE, Jones JB, Somodi GC.** 1996. A single gene controls the hypersensitivity response of Hawaii 7998 to race 3 (T3) of the bacterial spot pathogen. Tomato genetics Cooperative 46:23.
- Scott JW, Jones JB, Somodi GC, Stall RE.** 1995. Screening tomato accessions for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, race T3. HortScience, 30(3): 579-581.
- Scott JW, Jones JB.** 1989. Inheritance of resistance to foliar bacterial spot of tomato incited by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Journal of the American Society Horticultural Science, 114: 111-114.
- Silva-Lobo VL, Lopes CA, Giordano LB.** 2005. Componentes da resistência à mancha bacteriana e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, raça T2, em genótipos de tomateiro. Fitopatologia Brasileira, 30: 17-20.
- Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Estadísticas Agropecuarias.** 2010. Encuestas hortícolas 2009. Zonas Sur y Litoral Norte. [En línea]. Consultado 2 octubre 2011. Disponible en: <http://www.google.com.uy/url?sa=t&rct=j&q=encuesta%20horticola%202009&source=web&cd=1&ved=0CBoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.mgap.gub.uy%2Fportal%2F>

agxppdwn.aspx%3F7%2C5%2C71%2CO%2CS%2C0%2C1691%253BS%253B2%253B120%2C&ei=ycXeTpOOC0KgweccsemxCA&usg=AFQjCNEe2DIkrIQUR2PSZx5zrqreQBcMIQ

- Wang JF, Joones J., Scott J., Stall, RE.** 1994. Several genes in *Lycopersicon esculentum* control hypersensitivity to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 84: 702-706.
- Yang W, Francis D.** 2005. Marker-assisted selection for combining resistance to bacterial spot and bacterial speck in tomato. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 130 (5): 716-721.
- Zeier J.** 2005. Age-dependent variations of local and systemic defence responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66: 30-39.
- Zhang P, Chen K.** 2009. Age-Dependent Variations of Volatile Emissions and Inhibitory Activity Toward *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* in Tomato Leaves Treated with Chitosan Oligosaccharide. *Journal of Plant Biology*, 52 (4): 332-339.

3.6. Anexos

3.6.1 Anexo 1. Escala diagramática escala diagramática desarrollada por Mello et al.(1997)



4. CONCLUSIONES GENERALES

Según los resultados obtenidos, las razas presentes en el cultivo de tomate a campo son T2, T3 y T4, predominando la raza T3 al igual que en Brasil (Araújo *et al.*, 2011; Quezado-Duval y López, 2010). Esta es la primera prospección de *Xanthomonas* spp. causantes de la mancha bacteriana del tomate en Uruguay, por lo cual no existen referencias anteriores acerca de la composición de la población del patógeno en cuanto a la razas y si ésta ha variado con el tiempo como se ha reportado en otros países.

Se encontraron aislados con resistencia a cobre, estreptomycin y kasugamicina. El control químico de la mancha bacteriana del tomate en Uruguay se realiza en base a aplicaciones de productos cúpricos y antibióticos. Por lo tanto la resistencia encontrada en los aislados a estos productos podría deberse al su uso reiterado.

Los aislados correspondientes a la raza T3 fueron los que presentaron mayores niveles de resistencia a las dosis de 400 ppm de cobre *in vitro*, lo que cual podría explicar la predominancia de esta raza en el país por una ventaja comparativa frente a las demás razas.

Se observó relación entre la sensibilidad a las distintas concentraciones de Cu y de kasugamicina y dado que estos productos han sido utilizados conjuntamente por los productores para el control de esta enfermedad, el patógeno pudo haber desarrollado simultáneamente resistencia a ambos.

No se encontró relación entre la sensibilidad de los aislados a estreptomycin y kasugamicina. Si bien estos antibióticos pertenecen al grupo de los aminoglucósidos, que inhiben la síntesis de proteínas, la kasugamicina tiene un sitio de acción específico que difiere del sitio de acción de la estreptomycin (Wade y Kurtz, 2006; United States, 2005).

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que parte de la falta de eficacia en el control de esta enfermedad pueden ser explicados por predominancia de bacterias con resistencia a los productos utilizados, por lo que sería deseable principalmente para el cultivo de tomate industria donde los costos deben ser bajos, el uso de otras medidas de manejo entre ellas, la resistencia varietal.

La metodología de inoculación utilizada sería apropiada para comparar el comportamiento de distintos cultivares frente a la mancha bacteriana, coincidiendo con lo señalado por Ramos y Violin (1987). La evaluación de la severidad a gran escala y/o en condiciones de campo, podría realizarse utilizando la escala diagramática desarrollada por

Mello *et al.* (1997) dada su simplicidad y rapidez, sin comprometer la exactitud de los resultados ya que las mediciones realizadas con esta escala tuvieron un alto coeficiente de correlación con las realizadas con el programa ImageJ que es más preciso, a pesar de que los valores no fueron iguales. La evaluación del número de lesiones no sería recomendable para discriminar entre aislados por agresividad, ya este parámetro solamente fue útil en las primeras etapas y no mostró una buena correlación con el ADCPE de todo el período.

De las hojas estudiadas en este trabajo, las correspondientes a la posición 5 y 6 fueron las más apropiadas para evaluar la agresividad de los aislados. La gran variabilidad de los datos observada, indica la necesidad de aumentar el número de hojas a evaluar y excluir a las hojas jóvenes. Por esa razón debería aumentarse el número de plantas asignadas a cada tratamiento.

La evaluación de la severidad de los síntomas debería realizarse entre los 9 y 13 ddi porque antes de esa fecha las diferencias en el desarrollo de la enfermedad provocada por los diferentes aislados fueron menores, los valores de severidad registrados fueron muy bajos y los aislados menos agresivos no provocaron síntomas en ese momento. Esta recomendación también sería aplicable a la comparación de la respuesta de distintos cultivares de tomate inoculados con un mismo aislado.

La evaluación temprana (a los 9 ddi) tanto en número de lesiones como en área afectada puede representar un dato accesorio de valor en la discriminación de la respuesta de cultivares a la enfermedad ya que se relacionaría con la capacidad de éstos de diferir o retardar la expresión de síntomas.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, el aislado 29 sería el adecuado para ser utilizado en el programa de mejoramiento de tomate para el desarrollo de cultivares resistentes a la mancha bacteriana ya que fue uno de los que mostró mayor agresividad y además pertenece a la raza T3 que es la más abundante en Uruguay.

Dado que la prevalencia de las razas puede cambiar con el tiempo, sería deseable que este tipo de relevamientos con caracterización del patógeno sean repetidos cada determinado número de años para complementar los avances en mejoramiento.

5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abo-Elyousra K, El-Hendawyb H.** 2008. Integration of *Pseudomonas fluorescens* and acibenzolar-S-methyl to control bacterial spot disease of tomato. *Crop Protection*, 27: 1118–1124.
- Adaskaveg J, Forster H, Wade L.** 2010. Re-discovery of kasugamycin for managing fire blight and other bacterial diseases of plants in the United States. En: 2010 APS Annual Meeting (2010, Charlotte, North Carolina). Abstracts of Special Session Presentations. Vol. 100, No. 6 (Supplement). p. 166.
- Adaskaveg JE, Hine RB.** 1985. Copper tolerante and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 69: 993-996.
- Aldabe L.** 2000. Producción de hortalizas en Uruguay. Montevideo, Epsilon. 269 p.
- Andrade GCG, Alfenas AC, Maffia RG, Maffia LA, Gonçalves RC.** 2005 Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha foliar do eucalipto causada por *Quambalaria eucalypti*. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 504-509.
- Angelotti F, Scapin CR, Tessmann DJ, Vida JB, Oliveira RR, Canteri MG.** 2008. Diagrammatic scale for assessment of grapevine rust. *Tropical Plant Pathology*, 33 (6): 439-443.
- Araújo ER, Costa JR, Pontes NC, Mazutti J, Ferreira MASV, Quezado-Duval AM.** 2011. Prevalence of *Xanthomonas perforans* associated with bacterial spot in processing tomato crops in Brazil. En: Congresso Brasileiro de Fitopatologia (XLIV, 2011, Bento Gonçalves RS). *Tropical Plant Pathology* 36 (Suplemento). Brazil. Brazilian Phytopathological Society. p. 130.
- Banchero L, Campelo E, Giménez G, González P, Maeso D, Paullier J.** 2002. Programa de producción integrada. Directivas y Normas. Tomate a campo. [En línea]. Consultado 15 setiembre 2011. Disponible en: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/PI/Index.html>
- Blancard D.** 1992. Enfermedades del tomate. Observar, identificar, luchar. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 212 p.
- Bouzar H, Jones JB, Stall FJ, Louws FJ, Schneider M, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Jackson LE.** 1999. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot

disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology*, 89(4): 328-335.

Bouzar H, Jones JB, Stall RE, Hodge NC, Minsavage GV, Benedict AA, Alvarez AM. 1994. Physiological, chemical, serological and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology*, 84: 663-671.

Buonaurio R, Stravato VM, Scortichini M. 1994. Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from *Capsicum annuum* L. in Italy. *Plant Disease*, 78: 296-299.

CAB international. 2007. Crop protection compendium; 2007 edition. Wallingford, UK. 1 disco compacto, 8mm.

Campbell CL, Madden LV. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. Wiley and Sons. USA. 532 pp.

Develey-Riviere MP, Galiana E. 2007. Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist*, 175: 405-416.

Dogliotti S. 2007. Bases fisiológicas del crecimiento y desarrollo del cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Montevideo, Facultad de Agronomía. 18 p.

Fontenelle A, Guzzo S, Lucon C, Harakava R. 2011. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection*, 30:1492-1500.

Godoy CV, Koga LJ, Canteri MG. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 063-068.

Ignjatov M, Gašić K, Ivanović M, Šević M, Obradović A, Milošević M. 2010. Characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* Strains Pathogens of Pepper in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine*, 25(2): 139-149.

Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755-762.

- Jones JB, Bouzar H, Somodi GC, Stall RE, Pernezny K, El-Morsy G, Scott JW.** 1998. Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. *Phytopathology*, 88: 33-38.
- Jones JB, Kelly RO.** 1995. Applications of antibiotics or a copper mancozeb spray to control bacterial spot of tomato and pepper. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 108: 196-197
- Jones JB, Stall RE, Scott JW, Somodi CG, Bouzar H, Hodge NC.** 1995. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease*, 79: 395-398.
- Jones J, Woltz S, Jones J, Portier K.** 1991. Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. *Phytopathology*, 81(7):714-719.
- Jones JB.** 1991. Bacterial spot. En: Jones JB, Jones JP, Stall RE. (Eds.). *Compendium of tomato diseases*. St. Paul, Minnesota: APS Press. p. 27.
- Jones JB, Jones JP.** 1985. The effect of bactericides, tank mixing time and spray schedule on bacterial leaf spot of tomato. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 98: 244-247.
- Lelliott RA, Stead DE.** 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants; methods in plant pathology*. Oxford, Blackwell. v. 2, 216 p.
- Louws F, Wilson M, Campbell H, Cuppels D, Jones J, Shoemaker P, Sahin F, Miller S.** 2001. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, 85:481-488.
- Marco GM, Stall RE.** 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease*, 67: 779-781.
- Marcuzzo LL, Becker WF, Fernandes JMC.** 2009. Some epidemiological aspects of bacterial spot (*Xanthomonas* spp.) of tomato in Caçador/SC, Brazil. *Summa Phytopathologica*, 35 (2): 132-135
- Martin HL, Hamilton VA, Kopittke RA.** 2004. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant Disease*, 88: 921-924.

- Mello SCM, Takatsu A, Lopes CA.** 1997. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 22: 447-448.
- Minsavage GV, Canteros BI, Stall RE.** 1990. Plasmid-mediated resistance to streptomycin in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 80: 719-723.
- Mirik M, Aysan Y, Cinar O.** 2007. Copper-Resistant Strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 89(1): 153-154.
- Momol T, Jones J, Olson S, Obradovic A, Balogh B, King P.** 2008. Integrated Management of Bacterial Spot on Tomato in Florida [En línea]. Consultado 15 setiembre 2011. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP11000.pdf>
- Nuez F.** 1995. El cultivo del tomate. Madrid, España, Mundi-Prensa. 793 p.
- Obradovic A, Jones JB, Balogh B, Momol MT.** 2008 Integrated Management of Tomato Bacterial Spot. En: Ciancio A, Mukerji KG. (Eds.) *Integrated Management of Plant Pests and Diseases*. Springer. (Volume 3, Section 2) pp. 211-223 **no dice ciudad**
- Pernezny K, Nagata R, Havranek N, Sanchez J.** 2008. Comparison of two culture media for determination of the copper resistance of *Xanthomonas* strains and their usefulness for prediction of control with copper bactericides. *Crop Protection*, 27: 256-262.
- Quezado-Duval AM, Lopes CA.** 2010. Mancha bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. Circular Técnica 84. Embrapa Hortaliças. 28 p.
- Quezado-Duval AM.** 2008. Mancha-bacteriana do tomateiro: agentes causais e perspectivas de controle. En: Congresso Brasileiro de tomate industrial (II, 2008, Goiânia, Brasil). Apresentação oral.
- Quezado-Duval AM, Camargo LEA.** 2004. Raças de *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana em tomate para processamento industrial no Brasil. *Horticultura Brasileira*, 22(1): 80-86.
- Quezado-Duval AM, Gazzoto Filho A, Leite Júnior RP, Camargo LEA.** 2003. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*, 21(4): 670-675.

- Quezado-Soares A, Silva V, Giordano L, Lopes C.** 1998. Redução na produtividade de tomateiro para processamento industrial devido à mancha bacteriana. Horticultura Brasileira 16p.
- Ramos L, Volin RB.** 1987. Role of stomatal opening and frequency on infection of *Lycopersicon* spp. by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Phytopathology, 77: 1311-1317.
- Ritchie DF, Dittapongpitch V.** 1991. Copper- and streptomycin- resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. Plant Disease, 75: 733-736.
- Ritchie, DF.** 2000. Bacterial spot of pepper and tomato. The Plant Health Instructor. Actualizado 2007. [En línea]. Consultado 2 octubre 2011. Disponible en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/Bacterialspt.aspx>
- Robbins M, Darrigues A, Sim S, Masud M, Francis D.** 2009. Characterization of hypersensitive resistance to bacterial spot race T3 (*Xanthomonas perforans*) from tomato accession PI 128216. Phytopathology, 99:1037-1044.
- Roberts P, Momol M, Ritchie L, Olson S, Jones J, Balogh B.** 2008. Evaluation of spray programs containing famoxadone plus cymoxanil, acibenzolar-S-methyl, and *Bacillus subtilis* compared to copper sprays for management of bacterial spot on tomato. Crop Protection , 27: 1519–1526.
- Romeiro RS.** 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, UFV. 279 p.
- Romeiro RS.** 1995. Bacterias fitopatogenicas. Viçosa, UFV. 367 p.
- Romero A, Kousik C, Ritchie D.** 2001. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. Plant Disease, 85:189-194.
- Sahin F, Miller SA.** 1996. Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. Plant Disease, 80: 773-778.
- Schaad NW, Jones JB, Lacy GH.** 2001. Gram negative bacteria, *Xanthomonas*. En: Schaad NW, Jones JB, Chun W. (Eds.). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Minnesota, USA: APS Press. St. Paul. pp. 175-193.
- Scott JW, Francis DM, Miller SA, Somodi GC, Jones JB.** 2003. Tomato bacterial spot resistance derived from PI 114490; inheritance of resistance to race T2 and

- relationship across three pathogen races. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 128 (5): 698-703.
- Scott JW, Stall RE, Jones JB, Somodi GC.** 1996. A single gene controls the hypersensitivity response of Hawaii 7998 to race 3 (T3) of the bacterial spot pathogen. *Tomato genetics Cooperative* 46:23.
- Scott JW, Jones JB, Somodi GC, Stall RE.** 1995. Screening tomato accessions for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, race T3. *HortScience*, 30(3): 579-581.
- Scott JW, Jones JB.** 1989. Inheritance of resistance to foliar bacterial spot of tomato incited by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 114:111-114.
- Silva-Lobo VL, Lopes CA, Giordano LB.** 2005. Componentes da resistência à mancha-bacteriana e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, raça T2, em genótipos de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 17-20.
- Stall RE, Jones JB, Minsavage GV.** 2009. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology* 47:265-284.
- Stall, R, Beaulieu C, Egel I, Hodge I, Leite I, Minsavage G, Bouzar I, Jones J, Alvarez A, Benedict A.** 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:47-53.
- Stall RE, Thayer PL.** 1962. Streptomycin resistance of the bacterial spot pathogen and control with streptomycin. *Plant Disease Report*, 45: 389-392.
- Sun X, Nielsen MC, Miller JW.** 2002. Bacterial spot of tomato and pepper. *Plant Pathology*, Circular N° 129 (PAGINAS)
- Suslow TV, Schroth MN, Isaka M.** 1982. Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. *Phytopathology*, 72: 917-918.
- Thayer PL, Stall RE.** 1962. A survey of *Xanthomonas vesicatoria* resistance to streptomycin. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 75: 163-165.
- Thayer PL, Stall RE.** 1961. Effect of variation in the bacterial spot pathogen of pepper and tomato on control with streptomycin *Phytopathology*, 51: 568-572.

- United States Environmental Protection Agency.** 2005. Kasugamycin. Human Health Risk Assessment for Proposed Food Uses of the Fungicide Kasugamycin on Imported Fruiting Vegetables (Group 8) [En línea]. Consultado 2 octubre 2011. Disponible en: http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/kasugamycin_hh_riskassess.pdf
- Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Estadísticas Agropecuarias.** 2010. Encuestas hortícolas 2009. Zonas Sur y Litoral Norte. [En línea]. Consultado 2 octubre 2011. Disponible en: <http://www.google.com.uy/url?sa=t&rct=j&q=encuesta%20horticola%202009&source=web&cd=1&ved=0CBoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.mgap.gub.uy%2Fportal%2Fagxppdwn.aspx%3F7%2C5%2C71%2C0%2CS%2C0%2C1691%253BS%253B2%253B120%2C&ei=ycXeTpOOCOKgweceCA&usg=AFQjCNEe2DIkrlQuR2PSZx5zrqreQBcMIQ>
- Vallad GE, Pernezny KL, Balogh B, Wen A, Figueiredo JFL, Jones JB, Momol T, Muchovej RM, Havranek N, Abdallah N, Olson S, Roberts PD.** 2010. Comparison of Kasugamycin to Traditional Bactericides for the Management of Bacterial Spot on Tomato. *HortScience*, 45: 1834-1840.
- Wade L, Kurtz A.** 2006. Kasugamycin – Vegetable Trial Data Review of a New Antibiotic. En: Annual Tomato Disease Workshop (22nd, 2006, North Carolina State University, United States). Proceedings. Mountain Horticultural Crops Research & Extension Center Fletcher, NC. 27-28 pp.
- Waksman A.** 1952. Streptomycin: Background, Isolation, Properties, and Utilization [En línea]. Consultado 2 octubre 2011. Disponible en: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1952/waksman-lecture.pdf
- Wang JF, Jones JB, Scott JW, Stall RE.** 1994. Several genes in *Lycopersicon esculentum* control hypersensitivity to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 84:702-706.
- Yang W, Francis D.** 2005. Marker-assisted selection for combining resistance to bacterial spot and bacterial speck in tomato. *Journal of the American Society Horticultural Science*, 130(5):716-721.

- Zeier J.** 2005. Age-dependent variations of local and systemic defence responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66: 30-39.
- Zhang P, Chen K.** 2009. Age-Dependent Variations of Volatile Emissions and Inhibitory Activity Toward *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* in Tomato Leaves Treated with Chitosan Oligosaccharide. *Journal of Plant Biology*, 52 (4): 332-339.

6. ANEXO

6.1. INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Los artículos, escritos de acuerdo a las Normas para los Autores, son enviados por el comité editor a dos revisores externos (peer review) para su evaluación. El material publicado se torna propiedad de esta revista y los autores son responsables por los conceptos o informaciones en sus artículos. Se autoriza la reproducción total o parcial del material que aparece en Agrocien Uruguay, con la obligación de citar la fuente. La mención de marcas comerciales no representa recomendación preferente por parte de la Facultad de Agronomía ni de INIA Uruguay.

Remisión y categorías de los artículos Los trabajos deben ser inéditos, y se enviarán como archivos MSWord® a los editores a: agrocien@fagro.edu.uy. El archivo se designará con el apellido y nombre del primer autor. Los trabajos pueden corresponder a las siguientes categorías: Artículo de investigación: presenta resultados de investigación original. Pueden ir bajo la forma de Comunicación breve.

Revisión: corresponde al análisis y sistematización de resultados de investigaciones sobre un campo en el que el o los autores tienen comprobada trayectoria.

Nota técnica: incluye los resultados de investigación desde una perspectiva interpretativa y crítica sobre un tema específico, a partir de fuentes originales. Algunos ejemplos pueden ser la descripción de alguna región, una problemática socioeconómica rural o la situación de rubros de producción agropecuaria.

El artículo de investigación puede tener hasta 6.500 palabras en total, la comunicación breve y la nota técnica hasta 3.500 y la revisión hasta 8.500.

Presentación. Los trabajos se enviarán a doble espacio, con fuente Arial Narrow de 12 puntos. Las hojas se numerarán en el margen inferior derecho, y los renglones en el margen izquierdo.

Carátula. Figurará el título del trabajo, el apellido y nombre del autor/es (ej. Rodríguez Alvaro 1,...), el lugar de trabajo (identificado con el superíndice), la dirección postal y el correo electrónico del autor con el que se mantendrá la correspondencia. No deben figurar títulos académicos ni cargos laborales. Al pie de la carátula debe aparecer el título abreviado del artículo para el encabezamiento de las páginas.

Título y subtítulos. De no más de 15 palabras, el título del artículo va en minúscula y negrita, cuerpo 14, los subtítulos (Resumen, Introducción, etc.) en negrita con cuerpo de letra 12 y los títulos de tercer orden en cursiva sin negrita.

Resumen, Summary y palabras clave, key words. El resumen en español y el summary en inglés, de hasta 250 palabras, irán precedidos del título del trabajo en el idioma respectivo, y seguidos de las palabras clave o key words. Las palabras clave, hasta cinco, van en minúscula y separadas por comas. Las abreviaturas deben definirse cuanto se mencionan por primera vez.

Idiomas y unidades. Los idiomas de la revista son el español y el inglés. Se utiliza el Sistema Internacional de Unidades (SI) y sus abreviaturas, además de unidades derivadas de éste de uso frecuente en el área en cuestión. Entre la cifra y la abreviatura de la unidad va un espacio (Ej. 89 kg, 37° C).

Estructura del artículo. El texto del trabajo se organiza en: Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos, Bibliografía. Se podrán unificar Resultados y Discusión, e incorporar Conclusiones si se considera necesario.

Las citas bibliográficas en el texto deberán contener: si es un autor (Autor, año); si son dos autores (Autor y autor, año); si son más de dos autores (Autor et al., año). Cuando se citan más de una obra en un mismo paréntesis se colocará (Autor, año; Autor, año). En el texto se debe sugerir el lugar de ubicación del cuadro o figura como: intercalar Cuadro o Figura X.

Cuadros y figuras. Los cuadros y figuras deben presentarse en formato MS-Excel®, en hojas independientes con numeración consecutiva (Cuadro 1, Cuadro n; Figura 1, Figura n), en Arial Narrow cuerpo 10 sin negritas y de no más de 17 cm de ancho. Figuras, tales como fotos y mapas, en blanco y negro, se presentarán en formato digital comprimido JPG (JPEG) o GIF con resolución mínima 600 dp y 10 cm de ancho. Los diagramas deben ir en tramas de negro, no en color. El encabezado del cuadro va sobre éste en la misma hoja, y el texto correspondiente a los pie de figura irán en hoja aparte, sin salto de página entre cada uno.

En el encabezado de cuadros y pie de figuras aparecerán las abreviaturas usadas, aunque ya hayan sido definidas en el texto. Bibliografía. Las referencias bibliográficas van al final del artículo.

Los autores se ordenan alfabéticamente, y cuando se cita más de una publicación del mismo autor se ordenan cronológicamente a partir de la más nueva. Los títulos de las revistas deben ir en extenso.

A continuación se detalla la forma de citar distintas fuentes.

Artículos de revistas: Apellido NN, Apellido NN. Año. Título del artículo. Título extendido de la revista, vol (nº): pp - pp. Ejemplo: Rouse MN, Wanyera R, Njau P, Jin Y. 2011. Sources of resistance to stem rust race Ug99 in spring wheat germplasm. *Plant disease*, 95(6): 762 – 766.

Capítulos de libros: Apellido NN, Apellido NN. Año. Título del capítulo. En: Apellido NN, Apellido NN. (Eds.). Título. Ciudad de publicación: editorial. (Serie; nº). Páginas. Ejemplo: Kendall SJ, Hollomon DW. 1998. Fungicide resistance. En: Hutson D, Miyamoto J. (Eds.). *Fungicidal activity: Chemical and biological approaches to plant protection*. Chichester : Wiley. (Wiley series in agrochemicals and plant protection). pp. 87 – 108.

Internet. Se debe agregar junto al título: [En línea], y al final de la referencia: Consultado día mes año. Disponible en: www. Ejemplo: Oregon State University. 2010. Potato variety identification table [En línea]. Consultado 3 setiembre 2010. Disponible en: <http://oregonstate.edu/potatoes/Rating%20Key%20-%20Public%2007.pdf>.

Corrección para la publicación. Las pruebas de imprenta se enviarán por vía electrónica a los autores para su corrección, y deberán ser devueltas dentro del plazo que se indique.