



**EL CANCRO BACTERIANO  
DEL TOMATE: APORTES  
EXPERIMENTALES PARA  
SU MANEJO INTEGRADO**

Julio, 2020

SERIE  
TÉCNICA

**254**

INIA

---

# EL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE: APORTES EXPERIMENTALES PARA SU MANEJO INTEGRADO

**Autor:** Diego César Maeso Tozzi<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Ing. Agr. (M.Sc.) Programa Nacional de Investigación Producción Frutícola (INIA Las Brujas).

**Título:** El cancro bacteriano del tomate: aportes experimentales para su manejo integrado

**Autor:** Diego César Maeso Tozzi

**Fotos de tapa:** D. Maeso y J. Buenahora

Serie Técnica N° 254

© 2020, INIA

**doi:** <http://doi.org/10.35676/INIA/ST.254>

**e-ISBN:** 978-9974-38-444-6

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA  
Avda. Italia 6201, Edificio Los Guayabos, Parque Tecnológico del LATU, Montevideo,  
Uruguay.  
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

# Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

---

## Integración de la Junta Directiva

**Ing. Agr. José Bonica** - Presidente

**Ing. Agr. Walter Baethgen** - Vicepresidente



Ministerio  
**de Ganadería,  
Agricultura y Pesca**

**Ing. Agr. Rafael Secco**

**Ing. Agr. Martín Gortari**



**Ing. Agr. Alberto Bozzo**

**Ing. Agr. Alejandro Henry**



# CONTENIDO

	Página
PRÓLOGO .....	i
INTRODUCCIÓN .....	1
IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN MUNDIAL .....	2
SÍNTOMAS.....	3
ORGANISMO CAUSAL .....	15
MÉTODOS DE DETECCIÓN .....	18
DIVERSIDAD DE AISLADOS DE <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	20
PATOGÉNESIS .....	20
FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO E INTENSIDAD DE SÍNTOMAS.....	22
HUÉSPEDES .....	23
CICLO DE LA ENFERMEDAD Y EPIDEMIOLOGÍA.....	23
<i>TRANSMISIÓN POR SEMILLA</i> .....	23
<i>INFECCIÓN LATENTE DE PLANTAS</i> .....	25
<i>INFECCIÓN DE FRUTOS: MANCHA EN OJO DE PÁJARO</i> .....	26
<i>PERMANENCIA EN SUELO Y RASTROJOS</i> .....	27
<i>PERMANENCIA EN INERTES</i> .....	31
<i>TRANSMISIÓN POR AGUA DE RIEGO</i> .....	34
<i>TRANSMISIÓN POR LABORES</i> .....	37
<i>CICLO RESUMIDO DE LA ENFERMEDAD</i> .....	40
MANEJO .....	41
<i>DISMINUCIÓN DE LA PERMANENCIA EN RESTOS EN EL SUELO</i> .....	41
Rotación de cultivos y abonos verdes.....	41
Solarización.....	42
Bio fumigación y otras técnicas relacionadas .....	43
<i>DESINFECCIÓN DE SEMILLAS</i> .....	43
<i>DESINFECCIÓN DE HERRAMIENTAS Y OTROS INERTES</i> .....	46

<b>APLICACIONES DESINFECTANTES EN RIEGO Y MANEJO DEL AGUA ..</b>	<b>53</b>
Evaluación a campo .....	<b>53</b>
Evaluación en maceta .....	<b>55</b>
Experimentos <i>in vitro</i> .....	<b>56</b>
<b>APLICACIÓN DE INDUCTORES DE RESISTENCIA.....</b>	<b>58</b>
Evaluación de inductores en aplicación foliar.....	<b>61</b>
Evaluación en aplicación en riego.....	<b>64</b>
Estudios a nivel bioquímico de la respuesta a la aplicación de inductores..	<b>67</b>
Consideraciones respecto al uso de productos inductores de resistencia en el manejo de cancro bacteriano .....	<b>67</b>
<b>APLICACIONES FOLIARES CON PRODUCTOS CÚPRICOS Y A BASE DE ZINC .....</b>	<b>67</b>
<b>ANTIBIÓTICOS .....</b>	<b>68</b>
<b>ACEITES ESENCIALES Y PRODUCTOS NATURALES .....</b>	<b>68</b>
<b>CONTROL BIOLÓGICO.....</b>	<b>69</b>
<b>RESISTENCIA VARIETAL.....</b>	<b>70</b>
<b>RECOMENDACIONES PARA EL MANEJO INTEGRADO DE CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE .....</b>	<b>70</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Desarrollo de síntomas de cancro bacteriano en experimentos con inoculación artificial llevados a cabo en INIA Las Brujas (información promedio) .....	14
Cuadro 2. Permanencia de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm) en trozos de rafia y caña .....	32
Cuadro 3. Estimación de la eficiencia de fuentes de inóculo en la transmisión de Cmm mediante agua de riego.....	35
Cuadro 4. Incidencia y severidad de cancro bacteriano de acuerdo con volúmenes de riego (experimento a campo 2010-2011).....	36
Cuadro 5. Efecto de los métodos de desinfección sobre el poder germinativo y vigor de la semilla.....	46
Cuadro 6. Porcentaje de detección de Cmm DAS-ELISA en plantines provenientes de semilla sometida a cuatro tratamientos de desinfección.....	46
Cuadro 7. Evaluación de desinfectantes para la prevención de la transmisión de Cmm mediante tijeras infectadas con una suspensión bacteriana.....	49
Cuadro 8. Evaluación de desinfectantes para la prevención de la transmisión de Cmm mediante tijeras infectadas a partir de plantas enfermas.....	50
Cuadro 9. Algunas características de los desinfectantes mencionados en esta sección según Howard <i>et al.</i> , 2007.....	53
Cuadro 10. Evaluación de productos aplicados al agua de riego en la prevención de cancro bacteriano. Valores de área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE).....	55
Cuadro 11. Evaluación de productos desinfectantes de agua de riego, porcentaje de plantas con lesiones vasculares.....	56
Cuadro 12. Porcentaje de control respecto al testigo obtenido al incubar suspensiones de Cmm con el agregado de desinfectantes.....	56

Cuadro 13. Algunos compuestos naturales o sintéticos usados como elicitores de resistencia frente a patógenos vegetales.....	<b>58</b>
Cuadro 14. Tratamientos evaluados como aplicaciones foliares en los experimentos 2011-2014.....	<b>61</b>
Cuadro 15. Evaluación del uso de aplicaciones foliares de inductores de resistencia en tomate (temporadas 2011-12 y 2012-13) en el manejo de cancro bacteriano del tomate.....	<b>62</b>
Cuadro 16. Tratamientos evaluados como aplicaciones foliares de inductores de resistencia en tomate (2014-2016) para el manejo de cancro bacteriano del tomate.....	<b>62</b>
Cuadro 17. Evaluación del uso de aplicaciones foliares de inductores de resistencia en tomate (temporadas 2014-15 y 2015-16) en el manejo de cancro bacteriano del tomate, valores de $\pm$ rea Debajo de la Curva de Progreso de la Enfermedad (severidad).....	<b>63</b>
Cuadro 18. Evaluación de compuestos inductores de resistencia aplicados en riego en cámara de crecimiento en 2015.....	<b>65</b>
Cuadro 19. Evaluación de compuestos inductores de resistencia aplicados en riego en invernadero climatizado en 2015.....	<b>65</b>
Cuadro 20. Evaluación de productos aplicados en riego a la raíz en macrotúneles, INIA LB 2016.....	<b>66</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

### Página

Figura 1.	Distribución mundial del cancro bacteriano del tomate (fuente EPPO PQR 2019 versión 05 04 2019, <a href="https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution">https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution</a> ).....	2
Figura 2.	Amarillamiento y marchitez de hojas basales producido por cancro bacteriano.....	3
Figura 3.	Necrosis de bordes de folíolos asociada a infección interna.....	4
Figura 4.	Manchas y sectores de hoja necrosadas en plantas de invernáculo.....	4
Figura 5.	Marchitamiento unilateral de hojas causado por cancro bacteriano.....	4
Figura 6.	Marchitamiento sistémico incluyendo parte apical de la planta.....	5
Figura 7.	Plantas en etapa final de ataque de cancro bacteriano.....	5
Figura 8.	Cultivos con ataques severos de cancro bacteriano.....	6
Figura 9.	Cancros en tallos y pecíolos en plantas afectadas por cancro bacteriano.....	6
Figura 10.	Presencia de raíces adventicias en plantas afectadas con cancro.....	7
Figura 11.	Síntomas internos de cancro en tallos. Secciones longitudinales.....	8
Figura 12.	Degradación de vasos en plantas con cancro bacteriano (corte transversal).....	9
Figura 13.	Afección interna de tallos asociada con heridas de des brotado o punto inoculación artificial.....	9
Figura 14.	Flujo bacteriano en secciones de tallos de plantas con cancro bacteriano.....	10

Figura 15. Follaje y fruto mojado que contribuyen al desarrollo de síntomas secundarios de la enfermedad .....	<b>10</b>
Figura 16. Condensación en techos de invernáculos con formación de goteras que promueven la dispersión secundaria de cancro bacteriano.....	<b>11</b>
Figura 17. Síntomas secundarios de cancro bacteriano: mancha de frutos en fojo de pájaro≈.....	<b>11</b>
Figura 18. Necrosis de los bordes de los folíolos derivada de la infección secundaria por cancro bacteriano.....	<b>12</b>
Figura 19. Exudado bacteriano seco en tallo de planta inoculada.....	<b>12</b>
Figura 20. Manchas foliares provocadas por cancro bacteriano en hojas inoculadas por aspersion.....	<b>13</b>
Figura 21. Apariencia de Cmm cultivada en agar nutritivo dextrosa (cepa LB 17).....	<b>16</b>
Figura 22. Prueba en hojas de <i>M. jalapa</i> .....	<b>16</b>
Figura 23. Diferentes métodos de inoculación utilizados en los experimentos .....	<b>17</b>
Figura 24. Procedimientos de cámara húmeda pre y post inoculación (embolsado grupal, cámara de inoculación y embolsado individual).....	<b>18</b>
Figura 25. Ejemplo de resultado de prueba serológica DAS-ELISA para la detección de Cmm en plantas de tomate usada en nuestros experimentos .....	<b>19</b>
Figura 26. Estimación de infección por Cmm en semilla cosechada de plantas enfermas.....	<b>24</b>
Figura 27. Gutación en plantas de tomate en cámara 100% de humedad, nótese las gotas de agua en los lugares donde se localizan los hidátodos .....	<b>26</b>
Figura 28. Restos de cultivos dentro y fuera de invernáculos entre estaciones.....	<b>27</b>

Figura 29. Disposición de las parcelas en las que se evaluó el efecto de rotaciones con cultivos de maíz dulce en el manejo del cancro bacteriano .....	<b>28</b>
Figura 30. Incidencia y severidad de ataques de cancro bacteriano en cultivos de tomate con rotaciones con maíz dulce .....	<b>29</b>
Figura 31. Experimento de estimación de permanencia de Cmm en restos vegetales en suelo. INIA Las Brujas 2009-2011. A) Fuentes de inóculo mantenidas a campo, B) Experimentos en maceta para determinar potencial infectivo (100 plantas por tratamiento).....	<b>30</b>
Figura 32. Resultados en experimentos de permanencia de Cmm en restos y/o suelo. A) Porcentaje de plantas con síntomas de cancro bacteriano, B) Porcentaje de plantas en las que se aislaron bacterias gram positivas y C) Porcentaje de plantas en las que se detectó Cmm mediante la técnica de DAS-ELISA .....	<b>31</b>
Figura 33. Colonias de Cmm aisladas a partir de trozos de caña castilla (arriba) y rafia (abajo) embebidos en suspensión bacteriana y almacenados por períodos de hasta un año.....	<b>33</b>
Figura 34. Ejemplo de colecta de rafia para ser reutilizada en los siguientes cultivos.....	<b>33</b>
Figura 35. Experimentos de estimación de la transmisión por agua de riego proveniente de diferentes fuentes de inóculo .....	<b>35</b>
Figura 36. Vista de distribución de tratamientos de niveles de riego, alimentación de riego diferencial entre tratamientos. Ensayo a campo 2010 .....	<b>36</b>
Figura 37. Plantas inoculadas en extremos de parcelas experimentales en ensayos en INIA Las Brujas .....	<b>37</b>
Figura 38. Formas de contaminación de tijeras utilizadas en experimentos...	<b>38</b>
Figura 39. Vista de grupos de plantas inoculadas con tijeras infectadas que no recibieron ningún tratamiento de desinfección y estado del sistema vascular al final del experimento .....	<b>39</b>

Figura 40. Ciclo epidemiológico de cancro bacteriano.....	<b>40</b>
Figura 41. Plantación de abonos verdes que cubren únicamente el cantero cultivado y permiten la permanencia de restos vegetales en superficie entre canteros .....	<b>42</b>
Figura 42. Solarización en invernáculos.....	<b>43</b>
Figura 43. Diferentes etapas en los trabajos de evaluación de métodos para la desinfección de semillas en INIA .....	<b>45</b>
Figura 44. Ejemplo de mal desbrotado con heridas imperfectas y tamaño excesivo de brote.....	<b>48</b>
Figura 45. Evaluación de desinfectantes de tijeras, procedimientos.....	<b>51</b>
Figura 46. Evaluación de desinfectantes de tijeras. Arriba izquierda vista general de uno de los experimentos, derecha detalle de los síntomas observados. Abajo vista de los tratamientos en el experimento a los 28 días de la inoculación con suspensión bacteriana (derecha) y con planta enferma (izquierda).....	<b>51</b>
Figura 47. Evaluación de desinfectantes de tijeras. Síntomas observados en cortes longitudinales de tallos.....	<b>52</b>
Figura 48. Vista del experimento de desinfección de agua de riego para la prevención de cancro bacteriano .....	<b>54</b>
Figura 49. Escala de severidad de síntomas de cancro bacteriano de tomate utilizada en los ensayos de INIA LB .....	<b>54</b>
Figura 50. Vista del crecimiento de Cmm en placas de cultivo con y sin el agregado de desinfectantes (testigo). Experimentos de evaluación <i>in vitro</i> de productos desinfectantes.....	<b>57</b>
Figura 51. Esquema simplificado de funcionamiento de la inducción de resistencia (ampliado y modificado de Pieterse <i>et al.</i> , 2009) ....	<b>59</b>
Figura 52. Vista general de experimentos para la evaluación de inductores de resistencia en INIA Las Brujas.....	<b>60</b>
Figura 53. Vista general de los experimentos de evaluación de inductores de resistencia aplicados por riego en el manejo de cancro bacteriano .....	<b>64</b>

## Listado de abreviaturas utilizadas en el texto

Cmm: *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*

OEPP/EPPO: Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal/European and Mediterranean Plant Protection Organization.

±m: Micrómetro, micrón o micra, una unidad de longitud equivalente a una milésima parte de un milímetro.

°C: Grados Celsius.

ISHI: International Seed Health Initiative, Iniciativa Internacional para la Sanidad de Semillas.

CMM1T: Cmm Tris Buffered semiselective medium, Medio semiselectivo para Cmm estabilizado con Tris.

SCM y SCMF: Medios semiselectivos para *Clavibacter*

ELISA/DAS-ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Prueba Inmunoabsorbente ligado a enzimas. DAS: Double antibody sandwich. Doble sandwich de anticuerpo.

PCR: Polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa

ADN: ácido desoxiribonucleico.

ufc = unidades formadoras de colonias, asimilable a células bacterianas vivas

EPS: Azúcares viscosos de alto peso molecular

NAD: Nutrient agar dextrose médium. Medio agar dextrosa nutritivo.

m<sup>2</sup>: Metros cuadrados

cm: Centímetros

nm: Nanómetro. Equivale a una mil millonésima parte de un metro.

PBS: Phosphate Buffer Saline, Buffer fosfato salino,

pH: Antilogaritmo de la concentración de hidrogeniones. Medida de acidez.

VBNC: Viable but non-culturable. Viables, pero no cultivables.

dpi = Días pos-inoculación.

ADCPE: área debajo de la curva de progreso de la enfermedad. Se calcula de acuerdo a la fórmula:  $ADCPE = \sum [(x_i + x_{i+1}) / 2] (t_{i+1} - t_i)$  donde  $x$  es el registro de la enfermedad y  $(t_{i+1} - t_i)$  es el intervalo entre dos evaluaciones consecutivas.

SAR: Systemic Acquired resistance. Resistencia sistémica adquirida

SA: ácido salicílico

ISR: Induced Systemic Resistance. Resistencia sistémica inducida.

ASM: Metil S acibenzolar producto inductor de resistencia disponible comercialmente en algunos países con el nombre de Actigard® o Bion®.

PGPR: Rizo bacteria baciliforme, gram positiva, aeróbica promotoras del crecimiento vegetal, Plant growth promoting rhizobacteria.

EM: Tecnología de los microorganismos efectivos. Effective Microorganisms. Desarrollada en Japón y se basa en una mezcla de microorganismos predominantemente anaeróbicos en un sustrato líquido rico en carbohidratos (melaza).

## PRÓLOGO

La presente publicación pretende, como lo dice su título, difundir información generada en trabajos experimentales de una línea de investigación con varias décadas de continuidad en INIA Las Brujas. La información es complementada con datos relevantes de bibliografía y apreciaciones del autor que permiten explicar muchas de las observaciones registradas, tanto en experimentos como en cultivos comerciales, durante casi cuarenta años.

Muchos de los resultados que se incluyen han sido presentado en jornadas, congresos, charlas, días de campo y están disponibles en publicaciones de INIA tales como Series Actividades de Difusión, sin embargo, estimamos conveniente su publicación en forma resumida y compendiada en un texto único de fácil consulta.

Esperamos que la misma sea de utilidad para productores, extensionistas, asesores técnicos, investigadores, estudiantes, y todos aquellos interesados en profundizar en el conocimiento de esta enfermedad y que contribuya a mejorar su manejo.

Por último, quiero mencionar la invaluable contribución de muchos colaboradores, colegas y estudiantes que durante todos estos años no solo permitieron la realización de los trabajos experimentales, sino que también los enriquecieron con sus aportes. En ese sentido quiero agradecer a Wilma Walasek, Ana Lucía Goncálvez, Alfredo Fernández, Gonzalo Vázquez, Jorge Secco, Gastón Tejera, Jonathan Macchi y a los Ing. Agrs. Jorge Arboleya y Eduardo Campelo. También deseo destacar el apoyo que siempre se recibió desde el Programa de Investigación en Producción Hortícola incluyendo al manejo integrado de esta enfermedad entre sus prioridades. A todos ellos y, a los que seguramente me olvidé de mencionar, muchas gracias!

# EL CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE: APORTES EXPERIMENTALES PARA SU MANEJO INTEGRADO

Diego César Maeso Tozzi

## INTRODUCCIÓN

El cancro bacteriano se ha convertido en la actualidad en uno de los problemas sanitarios más importantes del tomate debido a las pérdidas que ocasiona, por su difusión y la ausencia de medidas de manejo totalmente efectivas (Strider, 1969; Gleason *et al.*, 1993; Gartemann *et al.*, 2003; De León *et al.*, 2011).

La primera referencia a esta enfermedad data de 1909 en el estado de Michigan, EE. UU. y fue realizada por uno de los padres de la bacteriología vegetal, el Dr. Erwin Smith. Smith la denominó cancro bacteriano por lo notorio de ese síntoma en el momento que realizó su determinación, a pesar de que no es uno de los más comunes. Él también eligió el nombre de ese estado americano para el nombre científico de la especie del agente causal, lo cual, a pesar de haber cambiado varias veces la denominación del género que lo antecede, se mantiene hasta nuestros días (Smith, 1910; Strider, 1969).

Su primera mención en Uruguay data de los años 80 (Lasa *et al.*, 1981) pero seguramente ya haya estado presente mucho antes y fuera confundida con otros desórdenes.

Dos hechos han contribuido para que esta enfermedad cobrara la notoriedad que tiene hoy día en nuestro país: la incorporación de la resistencia a marchitamientos fúngicos en casi la totalidad de los cultivares comerciales y la difusión del cultivo de tomate en invernáculo.

La persistencia de marchitamientos en cultivares resistentes a fusariosis y verticilosis puso en evidencia la existencia de otras causas que finalmente resultaron ser de origen bacteriano.

Por otra parte, el desarrollo del cultivo de tomate bajo invernáculo trajo aparejado la introducción y uso de variedades híbridas importadas de alta productividad. Esto hizo que se abandonara la producción local de semilla de polinización abierta que era desinfectada por fermentación con la pulpa de sus frutos, lo cual es muy efectivo para eliminar patógenos. De esa forma, se pasó a utilizar semilla importada, la cual, a pesar de haber sido sometida a desinfección en origen, se produce en regiones donde esta enfermedad es endémica y es reconocido como uno de los principales medios para la diseminación de esta enfermedad entre regiones (Burokiene *et al.*, 2005; Baysal *et al.*, 2011; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012; Jacques *et al.*, 2012; Wassermann *et al.*; Zaluga *et al.*, 2013; Tancos *et al.*, 2015; Croce *et al.*, 2016; Ialaccia *et al.*, 2016).

Sumado a lo anterior, la producción en invernáculo incluyó mayor manipulación del cultivo (poda, deshoje), el cultivo reiterado en un mismo suelo para amortizar la estructura y otros factores más que contribuyeron con la enfermedad e iremos analizando en esta publicación.

A todo esto, se deben agregar que recientemente en nuestro país ha aumentado el comercio de plantines y cambió la estacionalidad del cultivo, coexistiendo plantas de tomate en diferentes etapas prácticamente durante casi todo el año.

De esa forma, en el día de hoy el cancro se transformó en un problema importante para los productores de tomate y, frente al cual, como ya adelantamos, no existe una única solución, sino que dependemos de un manejo integrado orientado a la prevención.



Los trabajos de investigación cuyos resultados se incluyen en esta publicación tendieron fundamentalmente a la búsqueda de medidas de manejo para disminuir los perjuicios, pero, durante su desarrollo fue necesario estudiar algunos aspectos básicos de esta enfermedad para entender sus características, ajustar la metodología de trabajo y mejorar la eficacia de las medidas propuestas.

## IMPORTANCIA Y DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

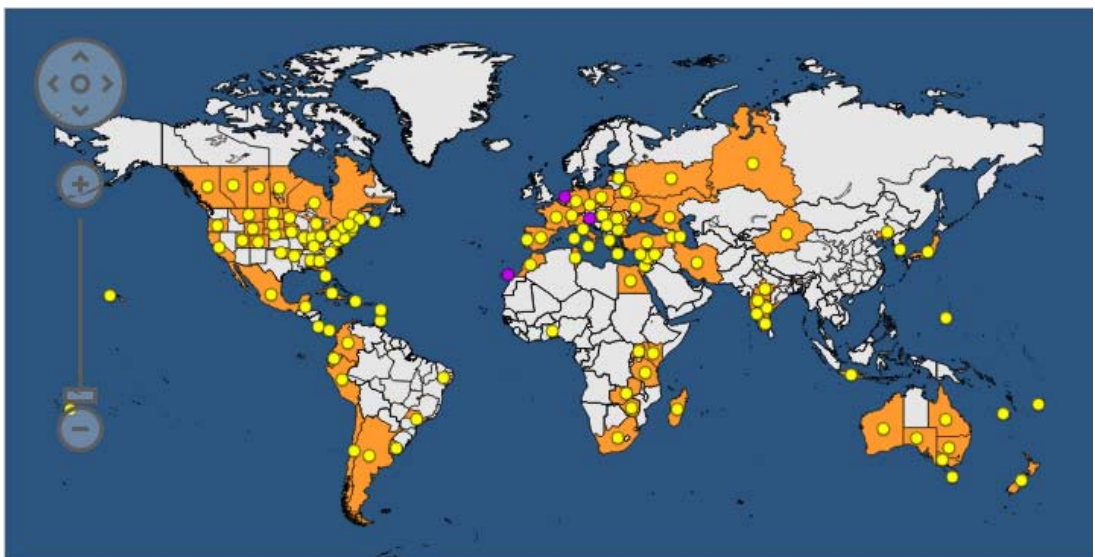
Como ya se mencionó, el cancro bacteriano es una de las principales enfermedades del tomate a nivel mundial. Reduce drásticamente el rendimiento y la calidad de la producción en cultivos tanto a campo como en invernáculo (Gitaitis *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992; Sen *et al.*, 2015), habiéndose reportado pérdidas de hasta 80% (Strider, 1969; Jahr *et al.*, 1999; Eichenlaub *et al.*, 2011; Sen *et al.*, 2015).

A lo anterior se deben agregar perjuicios derivados del incremento en el control estatutario, erradicación de plantas, medidas preventivas adicionales, análisis y control de materiales de propagación, demandas, y demás daños indirectos relacionados con esta enfermedad (EFSA, 2014; Sen *et al.*, 2015).

Luego de su aparición a comienzos del siglo pasado se diseminó rápidamente en EE. UU. y Canadá, provocando severas epidemias (Strider, 1969). En Europa fue reportada, dependiendo de los países, durante el período 1922-1965 y en África en 1942 (Strider, 1969; Gleason *et al.*, 1993) estando actualmente distribuida prácticamente en todas las zonas de producción del cultivo (EPPO, 2013; 2018).

Una característica que se resalta en la bibliografía es que, si bien sus ataques revisten gran importancia, la incidencia a lo largo de los años ha sido irregular, alternándose períodos de gran impacto con otros en los que su presencia ha sido esporádica, lo cual coincide con ciclos en la oferta de información científica (Gleason *et al.*, 1993; De León *et al.*, 2011; Eichenlaub y Gartemann, 2011; OEPP/EPPO, 2013)

El primer reporte formal en Uruguay es de 1981 (Lasa *et al.* 1981) pero, seguramente su presencia es de larga data, existiendo referencias de 1957 en Argentina (Fernández Valiela, 1975) y de 1956 en Brasil (Maffia *et al.*, 1980). Actualmente ocurre en todas las zonas de cultivo variando su importancia entre años y países (Figura 1).



**Figura 1.** Distribución mundial del cancro bacteriano del tomate (fuente EPPO PQR 2019 versión 05 04 2019, <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution>). Círculos amarillos = presente,

Para prevenir su introducción a zonas libres, esta enfermedad ha sido incorporada a listas cuarentenarias de la Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO, 2018) y de varios países, fundamentalmente en lo referente al traslado de materiales propagativos (EFSA, 2014). En Uruguay, al estar presente y difundida, no es considerada como una plaga cuarentenaria y por lo tanto no se limita su presencia en semillas o materiales de propagación.

## SÍNTOMAS

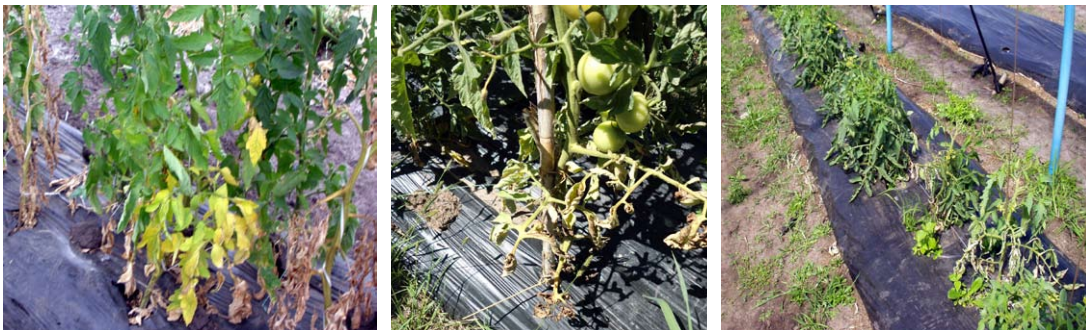
La intensidad de los síntomas y su evolución depende de varios factores, entre otros: cepa bacteriana, huésped (edad, estado nutricional, heridas y stress derivados del manejo, etc.), y condiciones ambientales (lluvia, temperatura, humedad).

Uno de los aspectos más peligrosos del cancro bacteriano es que las plantas infectadas pueden permanecer un tiempo prolongado sin mostrar síntomas, pero son fuente de transmisión.

De acuerdo con nuestra experiencia, luego de haber llevado a cabo múltiples experimentos con inoculación artificial utilizando cepas agresivas, la evolución de los síntomas externos de una planta resultado de una infección sistémica es la siguiente:

- 1) al comienzo las hojas basales se vuelven amarillas, marchitan y luego se secan,
- 2) los bordes de algunas de las hojas restantes se necrosan,
- 3) se produce un marchitamiento unilateral de hojas (muy característico) que finaliza en
- 4) un marchitamiento total que lleva a la muerte de la planta,
- 5) eventualmente, en cierto porcentaje de las plantas se producen canchros en tallos, pecíolos y/o raquis.

El síntoma de amarillamiento y marchitez de hojas basales (Figura 2) muchas veces pasa desapercibido, ya sea porque se atribuye a otras causas o, como ocurre generalmente en cultivos protegidos, esas hojas son eliminadas en las labores de manejo.



**Figura 2.** Amarillamiento y marchitez de hojas basales producido por cancro bacteriano. (Fotos D. Maeso)



**Figura 3.** Necrosis de bordes de folíolos asociada a infección interna. (Fotos D. Maeso)



**Figura 4.** Manchas y sectores de hoja necrosadas en plantas de invernáculo. (Foto D. Maeso)

Un síntoma más específico de esta enfermedad es la necrosis de los bordes de los folíolos (Figura 3) provocada por la distorsión del suministro de agua derivado de alteraciones en los vasos del xilema.

En plantas de invernáculo a veces pueden aparecer manchas y/o sectores de hoja de una apariencia peculiar (Figura 4).

Los primeros síntomas de marchitamiento aparecen localizados en algunas hojas aisladas, generalmente afectando solo la parte de la lámina en correspondencia con el tejido vascular afectado y, como se mencionó, es uno de los síntomas característicos de la enfermedad (Figura 5).



**Figura 5.** Marchitamiento unilateral de hojas causado por cancro bacteriano. (Fotos D. Maeso)



**Figura 6.** Marchitamiento sistémico incluyendo parte apical de la planta. (Foto D. Maeso)



**Figura 7.** Plantas en etapa final de ataque de cancro bacteriano. (Fotos D. Maeso)

A medida que la enfermedad avanza el marchitamiento se generaliza a toda la planta llegando al ápice (Figura 6) y terminando generalmente con la muerte de esta (Figura 7).

Dependiendo del momento, de cómo ocurrió la infección y de las condiciones posteriores, el ataque puede permanecer en plantas aisladas o abarcar la totalidad del cultivo, pudiendo ser su avance lento o explosivo (Figura 8).

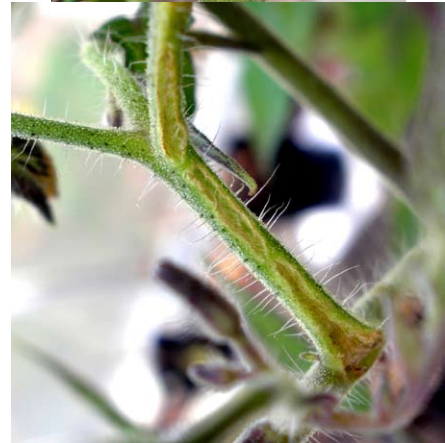


**Figura 8.** Cultivos con ataques severos de cancro bacteriano. (Fotos D. Maeso)

A diferencia de lo que ocurre con otras enfermedades, el tejido marchito o muerto permanece adherido a la planta y ésta erguida hasta su muerte.

El síntoma de cancro es uno de los últimos

en aparecer y no se desarrolla en todos los casos. Los canchros se producen en tallos, pecíolos, raquis y/o pedúnculos y en su comienzo se presentan como una línea más clara en la corteza que finalmente raja (Figura 9).



**Figura 9.** Cancros en tallos y pecíolos en plantas afectadas por cancro bacteriano. (Fotos D. Maeso)

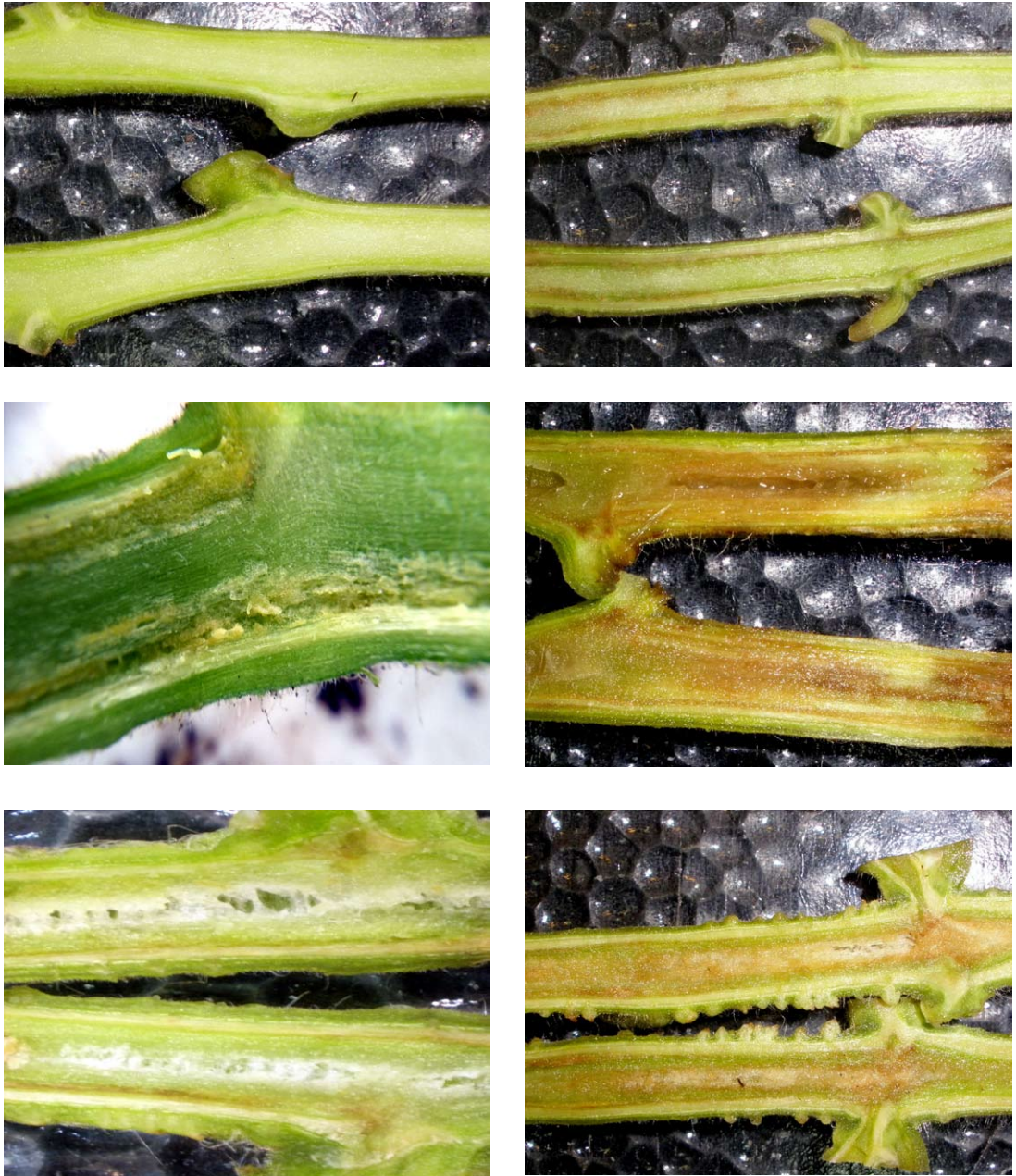


**Figura 10.** Presencia de raíces adventicias en plantas afectadas con cancro. (Fotos D. Maeso)

También es común observar, al igual que con muchas de las enfermedades vasculares, la formación de raíces adventicias como respuesta de la planta buscando solucionar los problemas vasculares (Figura 10).

Simultáneamente a los síntomas externos, dentro de la planta se desarrollan desórdenes fundamentalmente a nivel vascular. Estos comienzan con el aclaramiento de los vasos conductores de agua (xilema) que paulatinamente se van degradando,

toman coloración oscura y la degradación se difunde al resto de los tejidos adyacentes (Figura 11). Es común que parte de la médula tome una consistencia esponjosa, como también ocurre en otros marchitamientos bacterianos (p.ej. tallo hueco). La afección puede observarse en todo el tallo o solo en sectores, lo cual concuerda con los marchitamientos parciales o unilaterales (Figura 12) y puede estar asociado con la vía de entrada del patógeno (Figura 13).



**Figura 11.** Síntomas internos de cancro en tallos. Secciones longitudinales. (Fotos D. Maeso)



Figura 12. Degradación de vasos en plantas con cancro bacteriano (corte transversal). (Fotos D. Maeso)



Figura 13. Afección interna de tallos asociada con heridas de desbrotado o punto inoculación artificial. (Fotos D. Maeso)

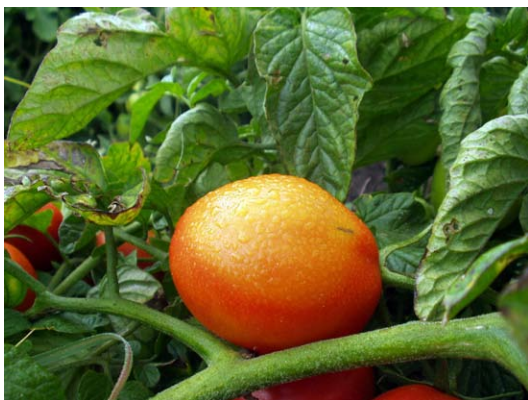




**Figura 14.** Flujo bacteriano en secciones de tallos de plantas con cancro bacteriano.

Una forma rápida de diagnosticar esa enfermedad, y distinguirla de otras que también afectan al sistema vascular, es realizar un corte limpio transversal del tallo y sumergir el extremo inferior en un recipiente con agua limpia manteniendo el otro extremo fuera del líquido y dejarlo unos minutos en reposo. En plantas enfermas de cancro comenzará a salir del sistema vascular un delgado flujo bacteriano blanquecino (Figura 14) no tan espeso como el producido por plantas con marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*).

Los síntomas descritos anteriormente son llamados síntomas primarios o sistémicos, fruto de la infección del sistema vascular. En cultivos al aire libre es común observar también los llamados síntomas secundarios o externos derivados de la dispersión del agente causal por salpicado por agua de lluvia o riego (Figura 15) a partir de exudados externos de bacteria de plantas infectadas. En invernáculos, en general aparecen en focos asociados a imperfecciones, roturas en el techo o goteras por condensación (Figura 16).



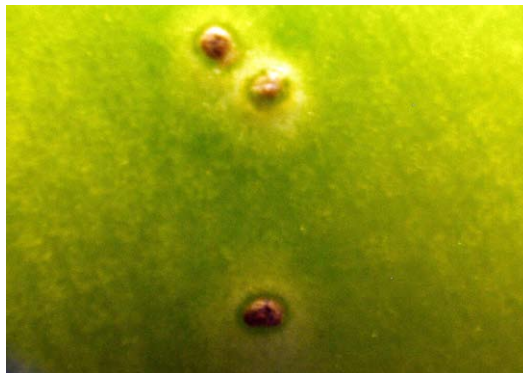
**Figura 15.** Follaje y fruto mojado que contribuyen al desarrollo de síntomas secundarios de la enfermedad (notar la acumulación en el borde de los folíolos y en cierta parte del fruto). (Fotos D. Maeso)



**Figura 16.** Condensación en techos de invernáculos con formación de goteras que promueven la dispersión secundaria de cancro bacteriano. (Foto D. Maeso)

El síntoma externo más notorio e inconfundible es la llamada mancha en fojo de pájaro del fruto (Figura 17). En general se observan en los frutos verdes pequeñas manchas redondeadas (3-5 mm de diámetro) con centros bronceados o castaños, poco elevadas, rodeadas de un halo claro.

Su tamaño, forma, el hecho que no profundizan, pero tampoco son muy elevadas, así como el halo, las diferencian de las provocadas por otras enfermedades bacterianas. Su aparición es casi un diagnóstico seguro de la presencia de la enfermedad en el cultivo.



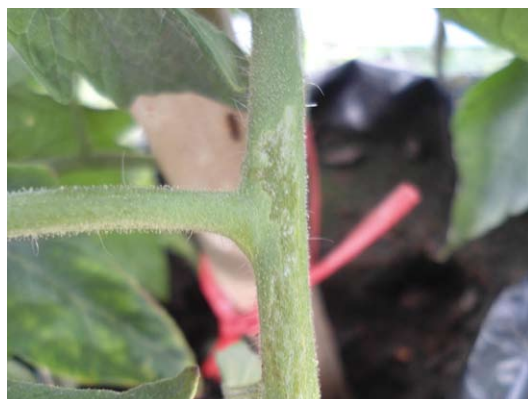
**Figura 17.** Síntomas secundarios de cancro bacteriano: mancha de frutos en fojo de pájaro. (Fotos D. Maeso)

Otro síntoma de este tipo es la necrosis del borde de los folíolos (Figura 18). Esta necrosis, a diferencia de la descrita dentro de los síntomas internos, es más nítida, con límites más definidos. Generalmente se atribuyen a otras causas (toxicidad, enfermedades a

hongos) pero son fruto de la acumulación de bacterias exudadas por la planta, fundamentalmente por los hidátodos. En los tallos en algunas oportunidades ese exudado se seca externamente tomando una apariencia particular (Figura 19).



**Figura 18.** Necrosis de los bordes de los folíolos derivada de la infección secundaria por cancro bacteriano. (Fotos D. Maeso)



**Figura 19.** Exudado bacteriano seco en tallo de planta inoculada. (Foto D. Maeso)



**Figura 20.** Manchas foliares provocadas por cancro bacteriano en hojas inoculadas por aspersión. (Fotos D. Maeso)

Esta enfermedad también puede provocar manchas foliares similares a las de otras bacteriosis del tomate, pero, en este caso no es un síntoma típico ni frecuente (Figura 20).

Si bien la aparición y evolución de los síntomas es variable, en el Cuadro 1 se resumen, a modo de guía, valores promedios registrados en nuestros experimentos usando inoculación artificial. Se presentan valores estimados de: días a la aparición de los síntomas más relevantes y el porcentaje final de plantas inoculadas que desarrollaron cada síntoma. El tiempo a la aparición de síntomas está separado según inicio (primeras plantas), mitad y total de las plantas afectadas. Es de destacar que en estos experimentos no todas las plantas inoculadas mostraron síntomas a pesar de haberse confirmado la infección mediante análisis serológicos. Esto y la rapidez en la evolución de los síntomas estuvo muy vinculado al método de inoculación, lo cual, como veremos más adelante,

debe ser considerado en el manejo previniendo la diseminación por heridas en labores.

Se muestran datos promedios de todos los experimentos, separados según método de inoculación, simplemente como una referencia. La mayoría de los experimentos se llevaron a cabo en cámaras de crecimiento o en invernáculos con control de temperatura buscando favorecer a la enfermedad. Por esa razón los valores en cultivos comerciales seguramente serán diferentes.

Lo relevante en esta información es que confirma la existencia de un período de latencia entre inoculación y aparición de síntomas, en el transcurso del cual la planta puede actuar de fuente de inóculo pasando desapercibida. Además, a esto se agrega que como no todas las plantas infectadas muestran síntomas atenta contra la efectividad de eliminación de plantas enfermas para frenar la dispersión de la enfermedad.

**Cuadro 1.** Desarrollo de síntomas de cancro bacteriano en experimentos con inoculación artificial llevados a cabo en INIA Las Brujas (información promedio).

Síntoma	Días a:	Totalidad de los experimentos	Según método de inoculación		
			Palillo en axila	Corte de raíces	Corte de hojas
Presencia de síntomas (cualquiera)	Aparición <sup>1</sup>	15	18	17	9
	50% <sup>2</sup>	20	25	22	14
	100% <sup>3</sup>	42	33	47	27
	% plantas con síntomas <sup>4</sup>	90	100	100	99
Necrosis de borde de folíolos	Aparición	19	18	20	18 <sup>5</sup>
	50%	31	21	32	--
	100%	66	33	70	--
	% plantas con síntomas	65	96	55	91
Marchitamiento de mitad de hojas	Aparición	21	18	21	22 <sup>5</sup>
	50%	25	21	26	--
	100%	63	33	68	--
	% plantas con síntomas	70	94	65	77
Marchitamiento apical	Aparición	24	18	27	24 <sup>5</sup>
	50%	36	21	41	--
	100%	72	33	82	--
	% plantas con síntomas	42	57	51	29 <sup>5</sup>
Cancro	Aparición	25	21	29	--
	50%	32	25	36	--
	100%	62	33	70	--
	% plantas con síntomas	24	73	28	--
Número de plantas evaluadas		1745	96	1489	160

<sup>1</sup> Días desde inoculación a que las primeras plantas desarrollaron síntomas.<sup>2</sup> Días desde inoculación a que la mitad de las plantas desarrollaron síntomas<sup>3</sup> Días desde la inoculación a que todas las plantas desarrollaron síntomas<sup>4</sup> Porcentaje de plantas infectadas que desarrollaron síntomas al final de los experimentos.<sup>5</sup> La aparición de los síntomas se registró simultáneamente en todas las plantas evaluadas.

## ORGANISMO CAUSAL

En la actualidad el organismo causal del cancro bacteriano del tomate recibe el nombre de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al. (=Cmm). Se trata de una bacteria gram positiva, aerobia, no formadora de esporas, con forma de bacilo, de 0,6-0,7  $\times$  0,7-1,2  $\pm$   $\mu$ m de tamaño, con células que se disponen individualmente, en empalizada o en forma de letras chinas (*fc*-corineforme $\approx$ ), no móvil (Jones et al., 2014), que pertenece al grupo de los Actinomicetos fitopatógenos, familia Microbacteriaceae (Davis et al., 1984; Stackebrandt et al., 1997).

Desde su identificación ha recibido diferentes nombres: *Bacterium michiganense*, *Aplanobacter michiganense*, *Pseudomonas michiganensis*, *Phytomonas michiganensis*, *Erwinia michiganensis*, *Mycobacterium michiganense*. Por cincuenta años fue denominada *Corynebacterium michiganense* cambiando en los años 80 a su denominación actual (Davis et al., 1984; Stackebrandt et al., 1997).

Cmm puede ser aislada de los tejidos afectados en agar nutritivo dextrosa o agar extracto de levadura peptona (Lelliot y Stead, 1987), desarrolla colonias de crecimiento lento, lisas, brillosas, redondas con márgenes enteros, amarillas (Figura 21). La coloración de la colonia puede diferir según las cepas y medios de cultivo (Hayward y Waterstone, 1964).

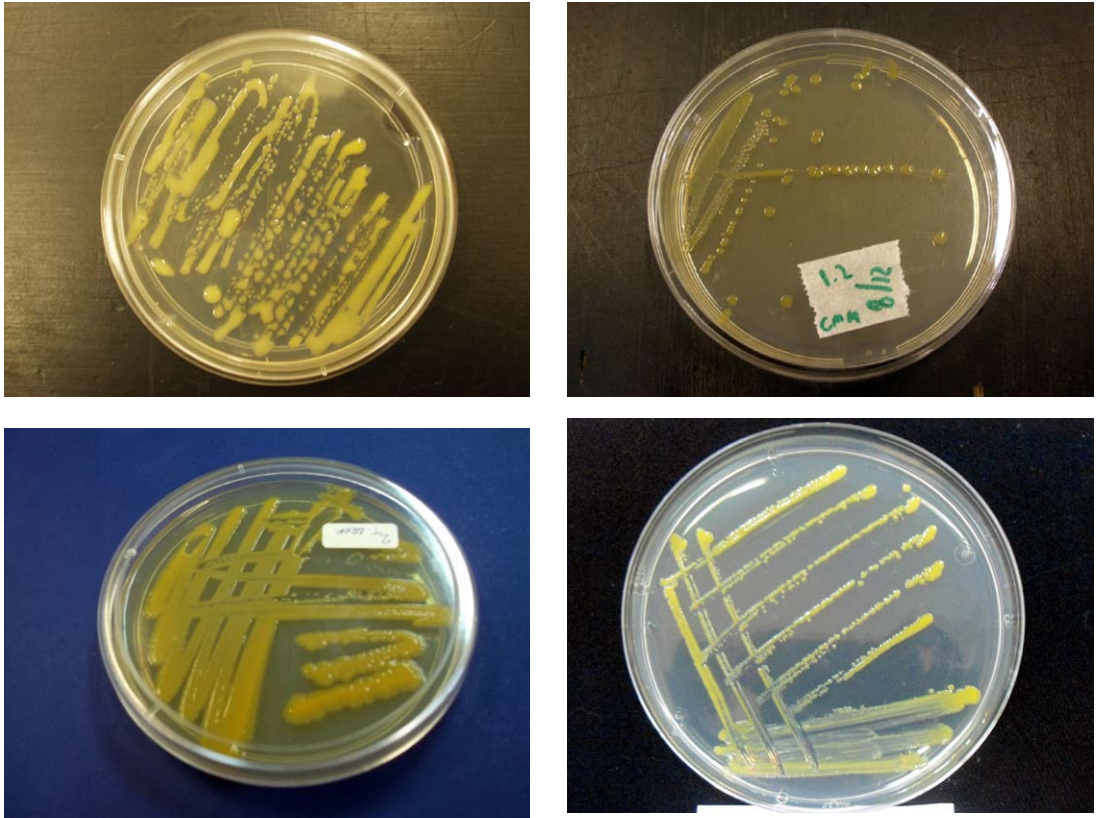
Presenta las siguientes respuestas en pruebas bioquímicas de laboratorio: metabolismo oxidativo de carbohidratos positivo, sin actividad lipolítica, producción de nitrito de nitrato negativo, licuefacción lenta de gelatina, hidrólisis de esculina,

hidrólisis de almidón débil o inexistente, temperatura óptima de crecimiento 24-27°C, máximo 35°C. Necesidad de aminoácidos, biotina, ácido nicotínico y tiamina para crecimiento (Hayward y Waterstone, 1964). Catalasa positiva, oxidasa negativa, producción de ácido aeróbicamente a partir de manosa pero no de manitol, uso de acetato y succinato de sodio como fuente de carbono, crecimiento en 6% NaCl; hidrólisis de almidón de papa y producción de H<sub>2</sub>S a partir de peptona (Hayward y Waterstone, 1964).

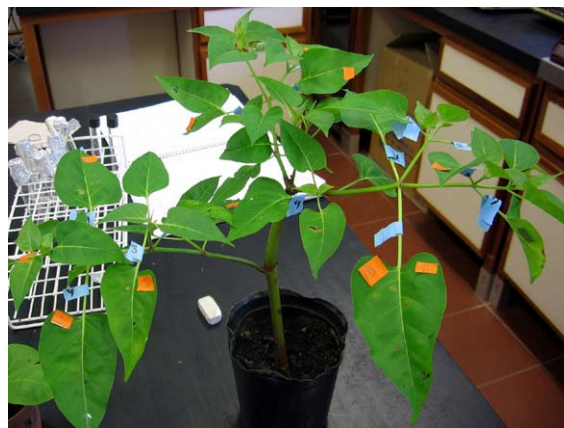
Si bien todas estas respuestas a pruebas de laboratorio son de relevancia para realizar una adecuada caracterización e identificación de este patógeno, en nuestros trabajos hemos aprovechado algunas de sus particularidades para confirmar su identidad en forma rápida y sencilla.

Una característica importante para una identificación rápida es que Cmm es la única bacteria gram positiva patógena de tomate lo cual la diferencia rápidamente de otras bacterias productoras de desórdenes en el cultivo.

El segundo paso que hemos utilizado para la identificación como Cmm de una bacteria aislada de tomate con reacción de gram positiva consistió en probar su fitopatogenicidad. A diferencia de las fitobacterias gram negativas, Cmm no siempre produce reacción de hipersensibilidad en tabaco. Por esa razón, para comprobar rápidamente si un aislamiento es patogénico, esta prueba se debe realizar en hojas de *f*Don Diego de la noche $\approx$  (*Mirabilis jalapa*) en las cuales desarrolla una típica lesión necrótica (Gitaitis, 1990) a las 24-48 horas de la infiltración con la solución bacteriana (Figura 22).



**Figura 21.** Apariencia de Cmm cultivada en agar nutritivo dextrosa (cepa LB 17). (Fotos D. Maeso)



**Figura 22.** Prueba en hojas de *M. jalapa*. Izquierda, planta de *M. jalapa* infiltrada con varios aislamientos. Derecha, reacción de hipersensibilidad a las 24 horas de infiltración con una suspensión de Cmm. (Fotos D. Maeso).

Finalmente, para comprobar si los aislamientos bacterianos en estudio tienen capacidad de reproducir la enfermedad, se deben inocular plantas de tomate.

En nuestros experimentos hemos utilizado cuatro métodos de inoculación: 1) punción en axila de una hoja a través de una gota de suspensión bacteriana, 2) corte de raíces secundarias e inmersión en suspensión bacteriana, 3) corte de pecíolos con tijeras embebidas en suspensión bacteriana y 4) aspersión con suspensión bacteriana (Figura 23).

En todos los casos es conveniente mantener las plantas en una cámara húmeda un día antes y después de la inoculación. Dicho proceso puede ser realizado en una cámara especialmente diseñada para este fin o cubriendo las plantas con bolsas plásticas humedecidas (Figura 24). Como se expresó en el cuadro 1, si se les brindan las condiciones adecuadas, las plantas comienzan a mostrar síntomas a partir de los 15 días de inoculadas.



**Figura 23.** Diferentes métodos de inoculación utilizados en los experimentos (de izquierda a derecha y de arriba a abajo: aspersión, corte de pecíolos, corte de raíces y punción axila de hoja). (Fotos D. Maeso)





**Figura 24.** Procedimientos de cámara húmeda pre y post inoculación (embolsado grupal, cámara de inoculación y embolsado individual). (Fotos D. Maeso)

## MÉTODOS DE DETECCIÓN

Debido a la importancia de la detección del patógeno en materiales de propagación (semillas, plantines) en el manejo preventivo de la enfermedad, mucho es lo que se ha estudiado en cuanto a métodos, buscando sensibilidad, especificidad y facilidad de aplicación.

Al momento existen varios protocolos aceptados internacionalmente orientados principalmente a la detección en semilla (ISHI, 2017; OEPP/EPPO, 2016) y, con los avances tecnológicos continuamente se realizan innovaciones y mejoras en este campo. En esta publicación mencionaremos únicamente los utilizados en nuestros trabajos dejando claro la existencia de múltiples técnicas, algunas de ellas con gran sensibilidad y capacidad.

Entre ellos se puede mencionar el cultivo en medios selectivos o semiselectivos, o sea medios de cultivo los cuales impiden o dificultan el crecimiento de otros organismos, y a la vez ponen en evidencia la presencia de Cmm, ya sea por el color o la apariencia de sus colonias. Los más recomendados son CMM1T (medio semiselectivo pH ajustado con Tris), SCMF o SCM. Su composición y demás detalles pueden ser consultados en la bibliografía (Sen *et al.*, 2015; OEPP/EPPO, 2016; ISHI, 2017).

Existen en el mercado antisueros policlonales y monoclonales específicos para la detección de Cmm (Alvarez *et al.*, 1993; Alvarez, 2004; Kaneshiro *et al.*, 2006; Sen *et al.*, 2015) mediante técnicas serológicas (inmunofluorescencia, ELISA). Algunos de ellos son recomendados debido a sus ventajas comparativas en la detección de Cmm en semillas (Olivier *et al.*, 2010).

En nuestros trabajos hemos utilizado la detección mediante la técnica DAS-ELISA (prueba por inmunoadsorción ligado a enzimas con doble sándwich de antisueros, *double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*) con antisueros monoclonales de AGDIA Inc. (Elkhart, IN 46514, EE. UU., [www.agdia.com](http://www.agdia.com)) la cual nos ha permitido en forma rápida y sencilla confirmar la presencia del patógeno y respaldar las evaluaciones de síntomas realizadas (Figura 25). Estos reactivos en algunos casos pueden reaccionar con otras bacterias presentes en los tejidos a analizar cuando se trabaja con muestras de campo. También se han creado kits para analizar rápidamente muestras de campo (AGDIA Cmm Immunostrip®), los cuales consisten de tirillas con los reactivos ya fijados de forma que en poco tiempo (dos minutos) y en condiciones de campo se puede hacer un diagnóstico rápido de este

patógeno (dos líneas resultado positivo, una línea, negativo).

Recientemente se ha avanzado mucho en la detección de esta bacteria mediante métodos moleculares, especialmente PCR (reacción en cadena de la polimerasa) existiendo diferentes variantes y cebadores según el objetivo deseado (detección o estudios filogenéticos): PCR convencional (Patrik y Rainey, 1999), PCR en tiempo real (Oosterhof y Berendsen, 2011) entre otros (Croce *et al.*, 2015; 2017a; 2017b).

Como se verá más adelante en la sección acerca de la transmisión por semilla, niveles muy bajos de infección pueden generar grandes ataques de la enfermedad por lo que se buscan umbrales de detección muy bajos (1/10000 semillas). En ese sentido, las técnicas moleculares son las más recomendables.



**Figura 25.** Ejemplo de resultado de prueba serológica DAS-ELISA para la detección de Cmm en plantas de tomate usada en nuestros experimentos. La coloración amarilla confirma la presencia de Cmm en la muestra. (Foto D. Maeso)

## DIVERSIDAD DE AISLADOS DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de esta bacteria, específicamente sobre su diversidad genética. Estos estudios muy especializados han contribuido enormemente a explicar aspectos relevantes desde el punto de vista práctico como es la importancia relativa de las diferentes fuentes de inóculo en el desarrollo de epidemias, la composición de los aislados en una región y su procedencia, así como diseñar métodos analíticos eficientes para verificar la sanidad de semillas y materiales de propagación.

En primer lugar, se confirmó la existencia de aislamientos avirulentos (incapaces de producir enfermedad) o atenuados descifrándose los mecanismos involucrados en la patogenicidad y los determinantes que marcan comportamientos diferentes del patógeno en condiciones de campo (Alvarez, 2004; Nazari *et al.*, 2007; Bella *et al.* 2012; Jacques *et al.* 2012; Zaluga *et al.*, 2014).

Luego, mediante estudios de huella genómica, código de barras de ADN y secuenciación de regiones de ADN correspondientes a genes claves en la patogenicidad y otras funciones, se puso en evidencia la diversidad de los aislados y su origen en muchas regiones.

La información disponible para Uruguay indica un alto grado de diversidad en los aislamientos estudiados. Se constató la presencia de diez tipos de secuencias que no se asocian con el lugar o año de colecta del aislamiento, lo cual sugiere que éstos probablemente fueron introducidos en la semilla importada (Croce *et al.*, 2016).

Información similar fue encontrada en Italia, Turquía, Lituania, Serbia, Nueva York EE.UU., La Plata, Argentina entre otros (Burokiene *et al.*, 2005; Baysal *et al.*, 2011; Jacques *et al.*, 2012; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012; Zaluga *et al.*, 2013; Tancos *et al.*, 2015; Ialaccia *et al.*, 2016; Wassermann *et al.*, 2017).

Esto confirma y enfatiza la importancia del movimiento de semillas como fuente de ingreso de aislamientos con características diversas. En ese sentido, algunos autores relacionan el ingreso de nuevos aislados con la repentina aparición de epidemias severas.

En otras regiones, (Islas Canarias, Japón, Israel, Michigan EE.UU.) por el contrario, la homogeneidad y distribución espacial con predominio de cepas, indica que la diseminación se realiza principalmente a partir de fuentes de inóculo locales que persisten en restos vegetales, en suelo o en inertes (Kleitman *et al.*, 2008; De León *et al.*, 2009; Kawaguchi *et al.*, 2010; Quesada-Ocampo *et al.*, 2012; Kawaguchi y Tanina, 2014).

## PATOGÉNESIS

Recientemente se ha avanzado enormemente en el conocimiento del proceso que ocurre desde la introducción de la bacteria en una planta hasta su destrucción, fruto de sofisticados trabajos mediante el empleo de técnicas moleculares.

La enfermedad se desarrolla en dos etapas bien definidas, primero el patógeno coloniza sistémicamente los tejidos vasculares (etapa endofítica) y luego, en determinado momento se inducen los procesos que desembocan en la producción de síntomas. Por lo tanto, externamente existe un período que podemos llamar de *latencia*, en el cual la planta está infectada, multiplica activamente el patógeno, pero no muestra síntomas externos.

Durante la colonización la bacteria se multiplica extensivamente en el xilema (Meletzus *et al.*, 1993) produciendo una masa de células agregadas que llenan el lumen de los vasos (Benhamou, 1991). Cuando se alcanza determinada concentración ( $10^{8-9}$  ufc/g tejido, ufc = unidades formadoras de colonias, asimilable a células bacterianas vivas), comienza la producción de síntomas determinada por un mecanismo común a otros patógenos bacterianos denominado *quorum sensing* (percepción de quorum) por el cual se induce la expresión de los genes encargados

de producir los procesos que desarrollan los síntomas (Meletzus *et al.*, 1993; Dreier *et al.* 1997; Sen *et al.*, 2015).

Poco se conoce acerca del movimiento de Cmm en la planta, ya que sus células no tienen flagelos y no son móviles, se piensa que se produce preferentemente hacia el ápice por el transporte de agua en el xilema y la transpiración (Xu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012; Chalupowicz *et al.*, 2012; Vieira Lelis *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha reportado que, luego de horas después de la infección, Cmm se distribuye en diferentes partes de la planta, alcanzando luego de varios días alta concentración encima y debajo del punto de inoculación (Benhamou, 1991; Gitaitis *et al.* 1991; Chalupowicz *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014)

Durante años se pensó que la acumulación de células bacterianas y los extra polisacáridos producidos (EPS, azúcares viscosos de alto peso molecular) provocaban el marchitamiento alterando el transporte de agua en los vasos del xilema (Van Den Bulk *et al.*, 1989; Chalupowicz *et al.*, 2012).

Sin embargo, estudios posteriores demostraron que los EPS estaban ligados fundamentalmente con otros aspectos en la producción de la enfermedad. Se comprobó que contribuyen con la supervivencia de Cmm en superficies inertes y dentro de la planta, formando un biofilm que evita su deshidratación, facilita su nutrición (principalmente en un medio tan pobre como el xilema) y la protegen de los mecanismos de defensa de la planta, además de intervenir en las etapas tempranas de la infección (reconocimiento del huésped y multiplicación) (Leigh y Coplin, 1992; Jahr *et al.*, 1999; Gartemann *et al.*, 2003).

Actualmente se reconoce que la producción de síntomas está vinculada con la producción de varias enzimas codificadas por genes presentes en el cromosoma y en dos

plásmidos de la célula bacteriana, las cuales son las encargadas de degradar la pared celular y atacar al xilema y al parénquima adyacente. También se ha comprobado que este proceso avanza preferentemente en forma longitudinal lo cual explica el marchitamiento unilateral frecuentemente observado en esta enfermedad (Chalupowicz *et al.*, 2010; 2012; Sen *et al.*, 2015).

Los genes de virulencia del cromosoma se encuentran en una región denominada *fisla* de patogenicidad y codifican proteínas relacionadas en el consumo y el metabolismo de azúcares y varias proteasas de serina que son requeridas para la colonización eficiente del huésped.

Los genes de virulencia de los plásmidos se encuentran en los plásmidos pCM1 y pCM2 y juegan un papel importante en la degradación de la pared celular y el ataque al xilema y parénquima adyacentes. El gen *celA* ubicado en el plásmido pCM1 codifica una endo- $\beta$ -1,4-glucanasa (Jahr *et al.*, 2000), y el gen *pat-1* en el pCM2 codifica una proteasa de la serina (Dreier *et al.*, 1997) y varias enzimas que degradan la pared celular (poligalacturonasa, pectato liasas, xilanasas, y endoglucanasas) (Meletzus *et al.*, 1993; Chalupowicz *et al.*, 2010).

También se ha demostrado que Cmm estimula la producción de etileno por el huésped lo cual juega un rol muy importante en el desarrollo del marchitamiento (Balaji *et al.*, 2008).

Por todo lo anterior, podemos decir que el proceso de desarrollo de síntomas de esta enfermedad es complejo. En él participan varios genes y sus reguladores, y está sujeto a múltiples factores externos y del huésped. Por esa razón variaciones en estos se traducen en modificaciones en la virulencia de los aislados de esta bacteria, explicando las variaciones e irregularidad en los ataques de la enfermedad.

## FACTORES QUE INFLUYEN EN EL DESARROLLO E INTENSIDAD DE SÍNTOMAS

Varios son los factores que influyen en el desarrollo e intensidad de los síntomas del cancro bacteriano del tomate. Como ocurre en todas las enfermedades, el proceso está influido por factores del patógeno, ambientales y del huésped. Estos factores inciden tanto en la duración de la etapa de latencia (puede variar entre 5-84 días) como en la velocidad de desarrollo e intensidad de los síntomas. (Basu, 1966; Chang *et al.*, 1992c; Blank *et al.*, 2016).

Entre los factores vinculados al patógeno el primero es el relativo a la presencia y variabilidad de los genes de virulencia ya descritos en los aislamientos, los cuales, como vimos son varios y sus procesos interrelacionados. Dependiendo de ello existen desde aislamientos de Cmm avirulentos, atenuados hasta sumamente agresivos, con mayor o menor facilidad de multiplicación en planta, etc. (Alvarez *et al.*, 2005).

También se puede mencionar todo lo relacionado con el proceso de inoculación como son la concentración de bacterias y la forma en que estas ingresan a la planta. Se ha demostrado que la inoculación a través de heridas, ya sea en la parte aérea o en la raíz, y la alta concentración de inóculo se traducen en un mayor porcentaje de plantas enfermas, aparición más temprana y mayor severidad de los síntomas, así como menor supervivencia de las plantas infectadas (Basu, 1966; Shirakawa *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992c; Kawaguchi *et al.*, 2010; Kawaguchi y Tanina, 2014). Esto, como veremos más adelante, tiene mucha importancia en determinar la evolución de la enfermedad en un cultivo.

Sin embargo, algunos estudios mencionan que cuando el resto de las condiciones son óptimas, la concentración del patógeno no influye en el resultado final (Vieira *et al.*, 2014), bastando un número muy bajo de células bacterianas al inocular el xilema para lograr infección (Thyr, 1968; OEPP/EPPO, 2013).

Entre los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la enfermedad se encuentra la temperatura. Como se mencionó, las condiciones óptimas de temperatura para el desarrollo de Cmm en laboratorio oscilan entre 24-27°C con un máximo de 35°C (Hayward y Waterstone, 1964; Blank *et al.*, 2016). Se han mencionado valores similares para el desarrollo de la enfermedad en condiciones de cultivo (Basu, 1966; Chang *et al.*, 1992c), sin embargo, existen diferencias en cuanto a la influencia de los límites superiores.

Se encontró que la mortalidad causada por la enfermedad es más rápida cuando la inoculación se realiza en primavera (21-24°C) o en otoño (18-23°C) que en invierno (15-18°C) o verano (28-31°C). Esto último estaría explicado por la interferencia de las altas temperaturas sobre la expresión de los genes de virulencia desencadenantes de los síntomas a pesar existir un desarrollo activo de la bacteria dentro de la planta (Sharabani *et al.*, 2014). Las temperaturas inferiores retardan el proceso aumentando el período de incubación, y atenúan la severidad de los síntomas (Sharabani *et al.*, 2014) y, por el contrario, las condiciones óptimas favorecen la aparición e intensidad de éstos (Chang *et al.*, 1992c). Esto ha sido observado repetidas veces en nuestros ensayos y en cultivos comerciales en los que los ataques son más severos y rápidos en primavera y otoño respecto al verano.

Si bien las condiciones de alta humedad relativa favorecen la enfermedad promoviendo el marchitamiento (Basu, 1966; Xu *et al.*, 2012), su efecto está vinculado con los procesos de formación de poblaciones epífitas de bacterias derivada de la gutación y con la diseminación ocasionada por la lluvia. Por esto último es que los ataques de esta enfermedad pueden ser más frecuentes en cultivos al aire libre (Shirakawa *et al.*, 1991). Al respecto, se ha encontrado que no es necesario una gran duración del período de follaje mojado cuando la infección se realiza a partir de poblaciones de Cmm que se fueron acumulando en el exterior de la hoja (Zaluga *et al.*, 2013).

Respecto a los factores relacionados con el huésped, en esta enfermedad se cumple el principio de mayor resistencia de las plantas adultas, por lo que el período de incubación se alarga y la severidad de los síntomas disminuyen con la edad, siendo las plantas jóvenes más sensibles (Chang *et al.*, 1992c; Ricker y Riedel, 1993; Sharabani *et al.*, 2013).

Según algunos trabajos existe una ventana de sensibilidad de la planta de tomate hasta el estado de 17-18 hojas verdaderas, las plantas inoculadas fuera de ese período o no presentan síntomas o la intensidad de estos es menor (no marchitan). Ese período crítico correspondería desde el trasplante a la formación de primer fruto (Sharabani *et al.*, 2013).

La resistencia de las plantas adultas se debe al retardo y a la disminución de la expresión de los genes relacionados con la virulencia, lo cual permite que los mecanismos de defensa superen a la virulencia de Cmm y reduzcan el desarrollo de síntomas severos (Sharabani *et al.*, 2013).

## HUÉSPEDES

Cmm posee un amplio rango de huéspedes, desde especies de solanáceas silvestres (*Solanum mammosum*, *S. douglasii*, *S. nigrum*, *Datura stramonium*), y cultivadas (morrón, *Capsicum* spp., berenjena, *S. melongena*, papa, *S. tuberosum*, tabaco, *Nicotiana tabacum*) así como otros géneros (Thyr *et al.*, 1975; Chang *et al.*, 1992a; Yim *et al.*, 2012; OEPP/EPPO, 2013). Incluso se han infectado artificialmente cereales (trigo, centeno, avena), girasol, sandía y pepino (Stamova y Sotirova, 1987).

Si bien es en tomate, y en menor medida en morrón (Volcani *et al.*, 1970), donde ocasiona importantes pérdidas, la capacidad de sobrevivir en otros vegetales, incluso en forma externa en follaje (Chang *et al.*, 1992a), es relevante como fuente de inóculo para cultivos comerciales y al planear rotaciones.

## CICLO DE LA ENFERMEDAD Y EPIDEMIOLOGÍA

El ciclo de esta enfermedad es complejo y los mecanismos muy eficientes de supervivencia y diseminación hacen muy difícil su control. El patógeno puede sobrevivir en semilla, en restos vegetales en suelo, en materiales inertes usados en cultivos afectados (tutores, bandejas, mesadas, etc.), externamente en plantas de tomate u otros huéspedes alternativos y desde allí diseminarse mediante labores, por agua (salpicado en parte aérea o riegos) o simplemente por contacto entre plantas. Lo cual se agrava por el hecho de tener una fase en que las plantas están infectadas sin mostrar síntomas lo cual facilita enormemente la diseminación durante la producción de tomate.

En los apartados siguientes se presentará información de bibliografía y de trabajos realizados en INIA para finalmente resumirla en un esquema que nos ayude a comprender el ciclo de esta enfermedad y utilizarlo en un manejo preventivo.

## TRANSMISIÓN POR SEMILLA

La capacidad de Cmm de permanecer en las semillas (Tsiantos, 1987; Kaneshiro y Alvarez, 2003; OEPP/EPPO, 2013; Tancos *et al.*, 2013) ha contribuido enormemente con la difusión de esta enfermedad a nivel mundial permitiéndole diseminarse a grandes distancias. Por ello, evitar la contaminación con Cmm se ha convertido en una de las grandes preocupaciones en la producción y comercialización de semillas de tomate estimulando a diferentes regiones a incorporar restricciones en el ingreso, y a las compañías productoras, a refinar sus procesos de producción (Fatmi *et al.*, 1991; Gleason *et al.*, 1993; Munkvold, 2009; De León *et al.*, 2011; OEPP/EPPO, 2013; OEPP/EPPO, 2016). Con esa finalidad se ha creado a nivel europeo el programa *f*Good seed and plant practices≈ (Buenas prácticas para producción de semillas y plantas, <https://www.gspp.eu/>) del que participan importantes firmas productoras de semilla de tomate, mediante el cual

se ejecuta un conjunto de medidas preventivas para evitar la presencia de Cmm en las semillas.

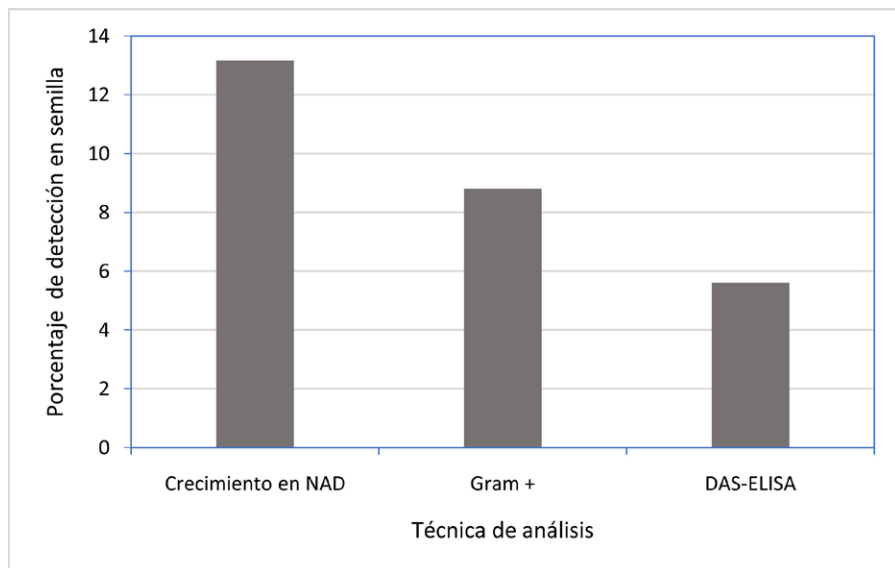
Cmm puede llegar a la semilla a través de la infección sistémica de la flor o de los frutos. La mayor tasa de infección sistémica de la flor se registra en el estado de flor muerta/emergencia de fruto, pero la infección de semillas es mayor si la inoculación de la flor se produce en estados tempranos de floración (Tancos *et al.*, 2013).

En la semilla en sí, Cmm puede encontrarse en la cubierta o en su interior (endospermo, funículo) (Munkvold, 2009; OEPP/EPPO, 2013; Tancos *et al.*, 2013). Aún bajas concentraciones en la semilla (5-25 ufc, unidades formadoras de colonia/semilla) aseguran su transmisión al plantín generado (Kaneshiro y Alvarez, 2003; Kaneshiro *et al.*, 2008).

Se han realizado numerosos trabajos tendientes a estimar los porcentajes de transmisión partiendo de semillas producidas por plantas infectadas. Los porcentajes encontrados varían de 0,25% a 100% dependiendo de las condiciones en que fueron realizados los estudios y los métodos de detección utilizados.

En nuestro caso, en experimentos de evaluación de tratamientos para desinfección utilizando semilla extraída de plantas enfermas, se detectó Cmm mediante DAS-ELISA en 5,6% de los plantines derivados de los lotes sin desinfección (Maeso y Walasek, 2012). La infección de plantines provenientes de semilla colectada de plantas con cancro fue estimada mediante el crecimiento de colonias similares a Cmm en medio NAD, reacción de gram, reacción de hipersensibilidad en *M. jalapa* y serología (DAS-ELISA) en forma secuencial, tal como se explicó en secciones anteriores (Figura 26).

Existen algunas estimaciones de la cantidad del patógeno presentes en la semilla, pero los valores dependen del método de análisis utilizado. Podemos mencionar que en un lote de semillas colectado de plantas infectadas se detectaron aproximadamente  $10^5$  ufc/g de semilla lo cual posteriormente resultó en 0,5% de los plantines infectados (Chang *et al.* 1992a) y que también se determinó que una población de  $10^2$  ufc/semilla era el umbral necesario para producir síntomas en el cultivo posterior (Fatmi *et al.*, 1991; Hadas *et al.*, 2005; Kaneshiro *et al.*, 2008).



**Figura 26.** Estimación de infección por Cmm en semilla cosechada de plantas enfermas. Análisis de 579 plantines.

Algunos estudios reportan que la viabilidad de esas células bacterianas disminuye con el tiempo de almacenamiento de la semilla a temperatura ambiente (Kaneshiro y Alvarez, 2003), sin embargo, también disminuye la viabilidad de esta.

Como se mencionó anteriormente, los plantines infectados a través de semilla no muestran ningún tipo de síntoma y por lo tanto son una vía importante de ingreso y diseminación de la enfermedad en los cultivos. Por esa razón es importante conocer de los plantines a utilizar (Gitaitis *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992; Dhanvantari y Brown, 1993; Hausbeck *et al.*, 2000; Kaneshiro y Alvarez, 2003; Maeso y Walasek, 2012; OEPP/EPPO, 2013).

Según algunos trabajos, una semilla infectada entre 10.000 es capaz de generar grandes ataques derivando teóricamente en 100 focos por hectárea (Gitaitis *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1991; Munkvold, 2009; De León *et al.*, 2011). Unas pocas plantas infectadas sistémicamente (1-5) pueden resultar en poblaciones de Cmm de  $10^7$  -  $10^9$  ufc/g peso fresco en el exterior del follaje de plantas ubicadas a 2,7 m de distancia (Chang *et al.*, 1992a).

Es por ello que se han extremado los esfuerzos en generar tecnología de detección en lotes comerciales de semilla refinando los métodos, buscando, en primer lugar, sensibilidad (deben detectar una semilla infectada en 10.000), no ser destructivos (la semilla comercial posee un alto valor), confiabilidad y especificidad (solo detectar Cmm patógenas), y a la vez mejorar los protocolos aceptados en bacteriología.

La especificidad se ha vuelto relevante en los análisis en semilla de tomate dado que se han reportado bacterias muy similares a Cmm, otras *Clavibacter* spp. (Zaluga *et al.*, 2013; Yashuhara-Bell y Alvarez, 2015), aislados de Cmm poco patógenos, e incluso, estados quiescentes no cultivables de este patógeno (Biggerstaff *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2005; Kaneshiro *et al.*; 2006; Jacques *et al.*; 2012).

Los métodos recomendados actualmente (OEPP/EPPO, 2016; ISHI, 2017) están basados en el plaqueo de extractos de semilla en medios semiselectivos, la selección de colonias en base a su morfología y la posterior confirmación de su identidad con otras herramientas como pruebas de patogenicidad, PCR y sus variantes, métodos serológicos (inmuno fluorescencia, ELISA, separación inmunomagnética (Alvarez *et al.*, 1993; Franken *et al.*, 1993; Dreier *et al.* 1995; Santos *et al.*, 1997; Hadas *et al.*, 2005; De León *et al.*, 2006, 2011; Jacques *et al.*, 2012; Croce *et al.*, 2015).

Sin embargo, la infección de semillas con Cmm por semilla continúa siendo un problema el cual se busca solucionar por tres vías: prevención, desinfección y comprobación de la sanidad del producto final y se continúa trabajando a todo nivel para mejorar los procedimientos.

## **INFECCIÓN LATENTE DE PLANTAS**

Como ya se mencionó, los plantines asintomáticos derivados de semillas infectadas, o de otras fuentes de contaminación que veremos más adelante, juegan un rol primordial en el desarrollo de epidemias de la enfermedad (Gleason *et al.*, 1993; Hausbeck *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2002; OEPP/EPPO, 2013; Sen *et al.*, 2015.). En esos plantines Cmm se vuelve sistémico internamente o permanece en su exterior constituyendo una importante fuente de inóculo capaz de generar grandes ataques (Gitaitis *et al.*, 1991).

Ha sido demostrada la presencia, multiplicación y supervivencia de Cmm en forma epifítica (externa) en follaje de tomate (Chang *et al.*, 1991; 1992a; Carlton *et al.*, 1994; 1998). Esa presencia epifítica en el follaje es fruto de la secreción producida por los hidátodos a través de la gutación, (Figura 27), y de otras vías de comunicación naturales que a la vez son fuente de bacterias y puerta de entrada. Se comprobó que ésta es más eficiente en la diseminación de la enfermedad, incluso, más que el inóculo del interior de la planta (Carlton *et al.*, 1994; 1998; Sharabani *et al.*, 2013a; 2013b).





**Figura 27.** Gutación en plantas de tomate en cámara 100% de humedad, nótese las gotas de agua en los lugares donde se localizan los hidátodos. (Foto D. Maeso)

Una población foliar de Cmm de  $10^6$ - $10^7$  ufc/g de peso fresco vegetal es suficiente para causar síntomas de infección secundaria (necrosis de bordes de hojas, mancha en ojo de pájaro), dependiendo de las condiciones ambientales y del cultivar de tomate (Chang *et al.*, 1992a).

Se ha encontrado que la incidencia de plantas infectadas sistémicamente en cultivos comerciales a la cosecha incrementa 10% cada 0,1% de aumento en la incidencia en plantines en almácigo (Chang *et al.*, 1991; 1992a) mencionándose al riego aéreo, la poda y la mezcla en atados de los plantines para el trasplante como las principales prácticas que favorecen la diseminación a partir de éstos (Chang *et al.*, 1991; 1992a; Frenkel *et al.*, 2016).

Por esa razón no es conveniente realizar labores que impliquen el contacto con las plantas cuando el follaje está mojado. Aún incluso la aplicación de plaguicidas y el riego aéreo, fundamentalmente en almácigos, pueden contribuir a la transmisión (Hausbeck *et al.*,

2000; OEPP/EPPO, 2013; Sharabani *et al.*, 2013b).

Recordemos que ha sido comprobada también la presencia epifítica de Cmm, aunque en menor proporción, en plantas de otras solanáceas y no solanáceas cercanas a plantas con síntomas (Chang *et al.*, 1992a).

### **INFECCIÓN DE FRUTOS: MANCHA EN OJO DE PÁJARO**

Los síntomas en fruto ya descritos como mancha en ojo de pájaro (Figura 17) provienen de infecciones externas a la flor (luego de la anthesis) y a los frutos (al comienzo del viraje de color) favorecidas por la alta humedad, alta concentración de la bacteria, y reiterados eventos de inoculación asociados con la lluvia (Medina-Mora *et al.*, 2001).

Inicialmente se pensó que la infección externa de frutos se limitaba a producir las manchas en ojo de pájaro sin invadir al resto de los tejidos (Bryan, 1930). Sin embargo, utilizando bacterias luminiscentes se demostró

que en la inoculación externa de frutos con Cmm además de producirse la lesión descrita, la bacteria invade los tejidos internos, llega al xilema y a través de éste, alcanza al resto del fruto, y eventualmente se distribuye a la planta (Chang *et al.*, 1991; Medina-Mora *et al.*, 2001). Esto se registra al comienzo de la coloración de frutos suponiéndose que en esa etapa se facilita la diseminación de la bacteria al perderse la capacidad de aislar al patógeno existente en frutos verdes (Chang *et al.*, 1991; Medina-Mora *et al.*, 2001; De León *et al.*, 2011).

### **PERMANENCIA EN SUELO Y RASTROJOS**

Se demostró que Cmm puede permanecer en restos vegetales en el suelo por meses y aún por más de dos años, dependiendo de la región y las condiciones en las que se realizaron los experimentos (Basu, 1966; Gleason *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992a; Fatmi y Schaad, 2002, OEPP/EPPO, 2013).

Este aspecto es muy importante para el manejo preventivo de la enfermedad. El tratamiento de los restos de cultivos es muy variado en nuestras condiciones, pero es muy común dejarlos en superficie dentro del invernáculo o en sus inmediaciones (Figura 28).

La supervivencia es mayor cuando los restos de cultivo permanecen en la superficie que cuando son enterrados (Gleason *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992a; Fatmi y Schaad, 2002). Esto puede deberse a la mayor descomposición de los restos enterrados por parte de los microorganismos de suelo, habiéndose reportado la sensibilidad de Cmm a antibióticos

producidos por bacterias y actinomicetos habitantes normales del suelo (OEPP/EPPO, 2013) y a metabolitos secundarios resultantes de la descomposición microbiana de restos vegetales (Van der Wolf *et al.*, 2008).

La permanencia es mayor en ambientes frescos y secos y cuando hay suficientes restos vegetales del cultivo que provean de nutrientes al patógeno (Basu, 1970) y en los suelos arcillosos frente a los arenosos (Moffet y Wood, 1984).

Estudios realizados en invernaderos de la zona hortícola de La Plata, Argentina mostraron resultados similares, encontrándose mayor supervivencia del patógeno en restos en superficie luego de cultivos de verano (120-260 días) que luego de cultivos de invierno en restos en superficie o en restos de cultivos de verano enterrados (45-75 días) (Vega y Romero, 2016).

Trabajos realizados en INIA Las Brujas aportan información concordante. En un primer experimento, realizado durante 2007-2009, en un sector del campo experimental donde en la estación previa se había registrado un ataque importante de cancro bacteriano, se planteó una secuencia de cultivos en la que se comparó el efecto sobre la enfermedad de la rotación con cultivos de maíz dulce (Maeso *et al.*, 2008). Se compararon las siguientes alternativas durante primavera-verano: a) tres temporadas continuas con tomate (2007, 2008 y 2009), b) una temporada con cultivo de maíz dulce (2007) y luego tomate (2008 y 2009) y c) dos temporadas con maíz dulce (2007 y 2008) y luego tomate (2009). Se tuvo la precaución para impedir la contaminación de los sectores (cada uno



**Figura 28.** Restos de cultivos dentro y fuera de invernáculos entre estaciones. (Fotos D. Maeso)



**Figura 29.** Disposición de las parcelas en las que se evaluó el efecto de rotaciones con cultivos de maíz dulce en el manejo del cancro bacteriano. (Foto D. Maeso)

de 40 m<sup>2</sup>) al ubicarlos por separado y en diferentes posiciones según pendientes (más elevado el tratamiento c, luego b y c respectivamente). Durante el invierno en todos ellos se cultivó avena. En la Figura 29 aparece la disposición de los tratamientos en el predio experimental.

La aparición e intensidad de cancro fue registrada periódicamente en los cultivos de tomate. En la Figura 30 se muestran algunos de los resultados de incidencia (porcentaje de plantas afectadas) y severidad (intensidad de síntomas de la enfermedad) y su evolución en los cultivos de tomate continuo o antecedido de uno o dos cultivos de maíz dulce.

Al cultivar maíz en la estación o estaciones previas se retardó la aparición de la enfermedad. Por ejemplo, los registros de incidencia de la enfermedad en el cultivo 2008 fueron menores en la parcela con cultivo de maíz previo que en aquella que fue cultivada con tomate (Maíz-Tomate 2008 frente a Tomate-Tomate 2008).

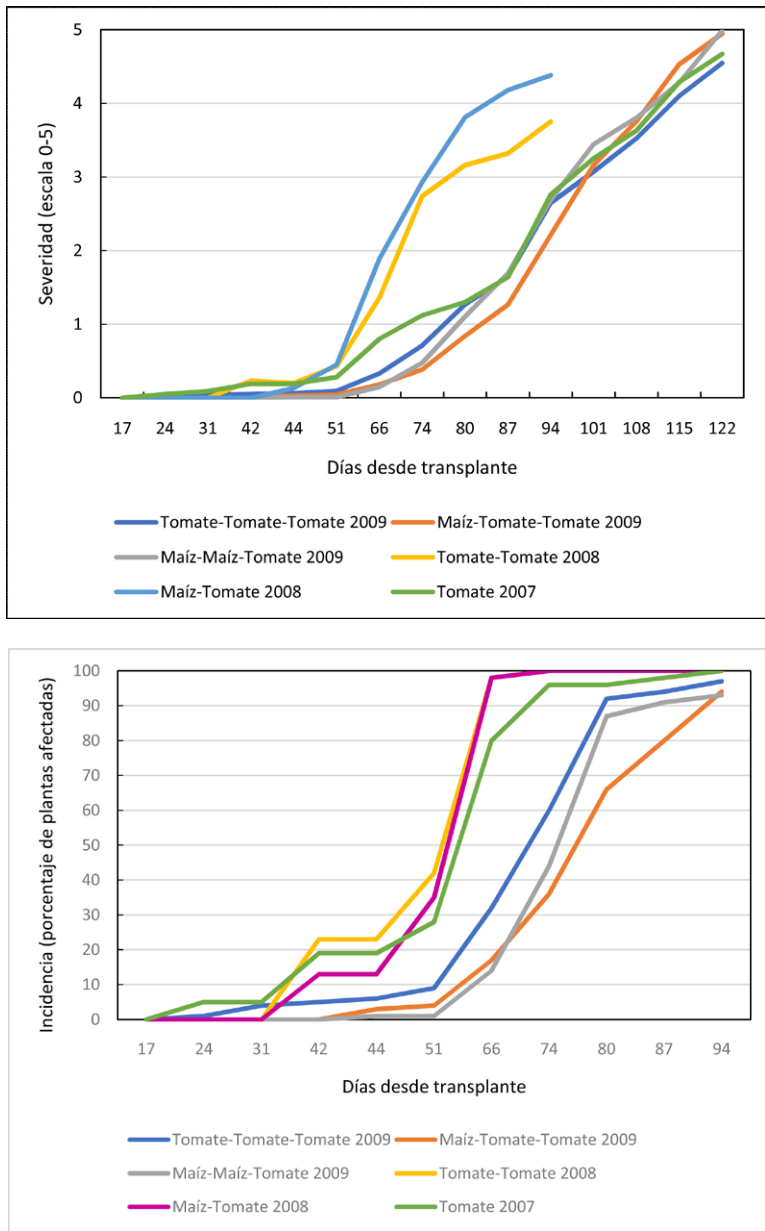
Algo similar ocurrió con los registros de incidencia en el cultivo 2009 entre la parcela que fue cultivada en las dos estaciones precedentes con maíz, frente a la que fue cul-

tivada con tomate (Maíz-Maíz-Tomate 2009 frente a Tomate-Tomate-Tomate 2009).

Sin embargo, una vez que aparece la enfermedad el efecto inicial se pierde, llegando a afectarse prácticamente todo el cultivo sin distinción del manejo previo, y sin efecto sobre la intensidad final de los síntomas (severidad). En nuestra opinión eso se debe a que una vez que aparece la enfermedad sus mecanismos de diseminación son tan eficientes que en poco tiempo se distribuye a todo el cultivo produciendo importantes daños.

Por lo tanto, nos planteamos dos hechos que podrían explicar los resultados: 1) la permanencia de Cmm en restos de cultivos enfermos es superior a dos años y/o 2) los mecanismos de diseminación son tan eficientes que permiten que a partir de unas pocas plantas infectadas por bajos niveles del patógeno que permaneció en restos vegetales en suelo rápidamente se registre un ataque severo y total al cultivo posterior.

Por ello realizamos algunos experimentos tendientes a estimar la duración de la permanencia y el peso relativo de los probables mecanismos de transmisión de la enfermedad que nos ayudaran en el manejo de la enfermedad.



**Figura 30.** Incidencia y severidad de ataques de cancro bacteriano en cultivos de tomate con rotaciones con maíz dulce. Los datos corresponden a los registros de enfermedad en los cultivos de tomate del año considerado luego de cultivos de tomate o maíz en temporadas previas.

Entre 2009 y 2011 se llevó a cabo un experimento en el cual se evaluó la capacidad de permanencia del patógeno en: a) suelo extraído de un cultivo enfermo y conservado en laboratorio, b) restos de plantas enfermas (secciones de tallo de 5 cm) con-

servadas individualmente en sobres de tela malla en condiciones de campo y c) suelo y secciones mantenidas en conjunto en condiciones de campo en celdillas de almáciga (Figura 31) (Maeso *et al.*, 2010; 2012b; 2014a; 2015g).



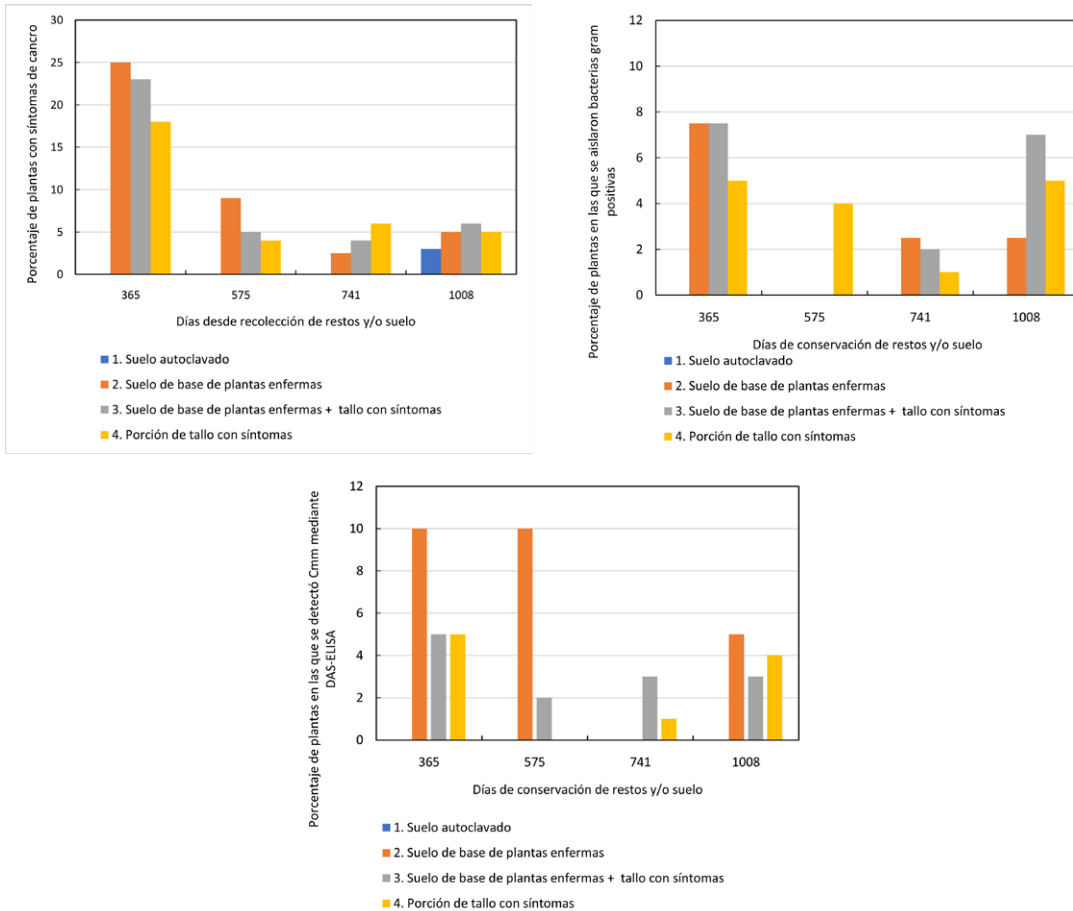
**Figura 31.** Experimento de estimación de permanencia de Cmm en restos vegetales en suelo. INIA Las Brujas 2009-2011. A) Fuentes de inóculo mantenidas a campo, B) Experimentos en maceta para determinar potencial infectivo (100 plantas por tratamiento). (Fotos D. Maeso)

El inóculo perteneciente a las tres alternativas fue agregado a 40 macetas con suelo esterilizado por autoclave (120°C por 20 minutos), luego de 365, 575, 741 y 1008 días desde su colecta, en las cuales se sembró tomate utilizando semilla desinfectada por baño en agua caliente (50°C por 25 minutos). La cantidad de suelo agregada correspondía al volumen de una celdilla de almárga (20 g) y de los restos al remanente de las secciones de tallo conservadas individualmente en sacos de tela malla. También se incluyó un control utilizando únicamente suelo esterilizado.

Se registró el desarrollo de síntomas de cancro, se realizaron aislamientos en laboratorio de las plantas con síntomas y a las colonias obtenidas se les efectuó la prueba gram y

la prueba de hipersensibilidad en plantas de Don Diego de la noche. Finalmente, todas las plantas fueron analizadas por la prueba DAS-ELISA para detectar infecciones latentes y confirmar la identificación del patógeno.

Si bien existieron diferencias en cuanto a los resultados obtenidos con las técnicas usadas para realizar las estimaciones (Figura 32), estos indican que Cmm sería capaz de permanecer por casi tres años (1008 días) en las fuentes de inóculo evaluadas, produciendo la infección de alrededor del 5% de las plantas expuestas. Eso podría explicar la aparición de la enfermedad en los experimentos descritos anteriormente en cultivos de tomate luego de dos temporadas con maíz dulce.



**Figura 32.** Resultados en experimentos de permanencia de Cmm en restos y/o suelo. A) Porcentaje de plantas con síntomas de cancro bacteriano, B) Porcentaje de plantas en las que se aislaron bacterias gram positivas y C) Porcentaje de plantas en las que se detectó Cmm mediante la técnica de DAS-ELISA.

La importancia relativa epidemiológica del inóculo presente en restos vegetales en el suelo frente a la semilla infectada en el desarrollo de ataques de cancro bacteriano, como ya se ha mencionado, es diferente entre regiones. Se ha comprobado su relevancia en Islas Canarias, Japón, Israel y Michigan ocasionando el predominio de los mismos aislamientos del patógeno entre temporadas (Kleitman *et al.*, 2008; De León *et al.*, 2009; Kawaguchi *et al.*, 2010; Quesada-Ocampo *et al.*, 2012; Kawaguchi *et al.*, 2014). La presencia de diversidad en el patógeno indica la introducción externa ya sea por semilla infectada u otros mecanismos.

**PERMANENCIA EN INERTES**

Cmm posee la capacidad de permanecer por períodos prolongados en materiales inertes agregando otra fuente de inóculo adicional a las ya mencionadas (suelo, restos, plantas espontáneas, malezas, otros cultivos).

Se ha mencionado la permanencia por más de 16 semanas en materiales inertes asociados al cultivo (almácigas, plásticos, bandejas plásticas, cemento, aluminio entre otros) (Ferguson *et al.*, 2008) y en tutores por 100 días (Miguel-Wruck *et al.*, 2001; 2006).

En experimentos realizados entre 2009 y 2010 en INIA Las Brujas se estimó que la permanencia en rafias como las utilizadas en los cultivos en invernáculo era superior a un año, mientras que en caña de castilla no llegó a 7 días (Maeso y Walasek, 2010; Maeso *et al.*, 2012a).

En estos trabajos se sumergieron durante un período de dos horas, 500 trozos estériles de 2 x 0,5 cm de caña castilla y de 2 cm de rafia en una solución de  $2 \times 10^8$  ufc/ml de Cmm (aislamiento LB 17). Los trozos fueron secados en cámara de flujo laminar en papel de filtro estéril y conservados en placas estériles por 0, 1, 7, 14, 30, 60, 90, 180, 240 y 365 días. Luego de esos períodos se sembraron 50 trozos de cada uno de ellos en placas de agar nutriente (cinco trozos por placa, 10

repeticiones). A las 48 horas de sembrados se evaluó el número de trozos que desarrollaban colonias de Cmm cuya identidad fue confirmada por serología (Figura 33). El crecimiento bacteriano de cada placa se recogió en 7 ml de buffer salino y su concentración relativa estimada mediante absorbancia a 590 nm (cuadro 2). Cmm pudo ser recuperado del 60% de los trozos de rafia almacenados por un año, a pesar de que su concentración era menor cuantitativamente (la absorbancia disminuyó de 1,55 a 0,2). La permanencia en caña de castilla, sin embargo, no llegó a la semana (cuadro 2).

Esta información es de relevancia ya que es muy común la reutilización de la rafia sin ningún tipo de tratamiento en los cultivos de tomate en invernáculo (Figura 34).

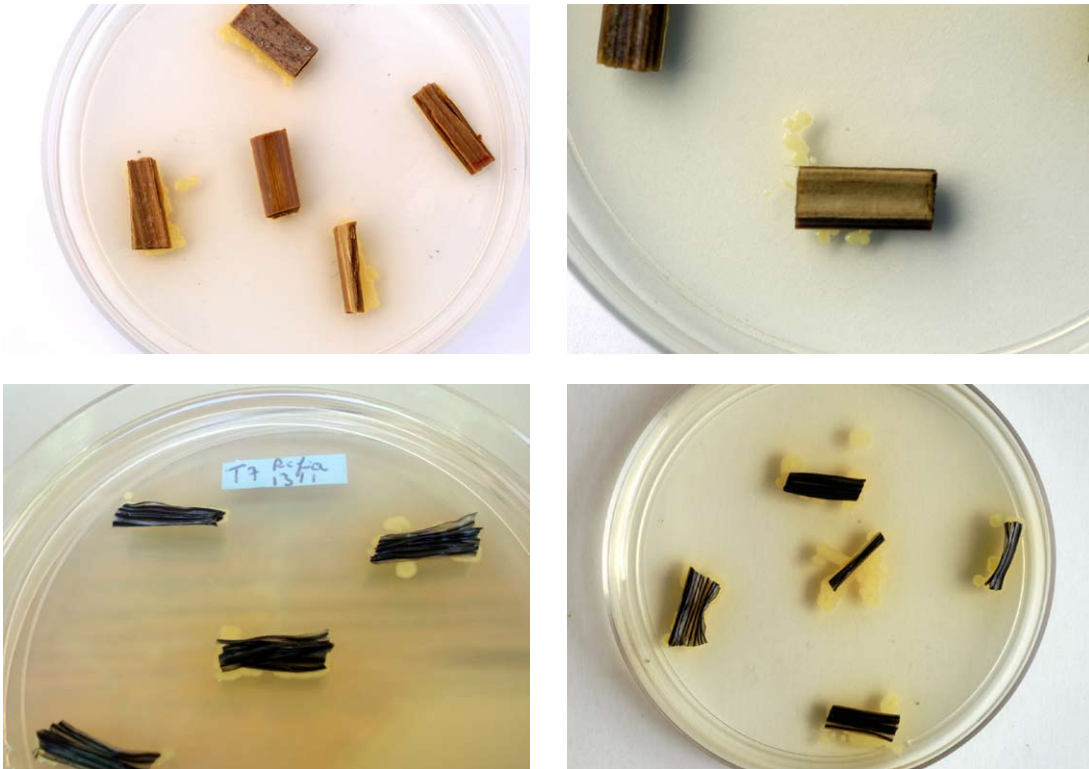
**Cuadro 2.** Permanencia de Cmm en trozos de rafia y caña.

Tiempo pos-inoculación	Caña		Rafia	
	% de trozos con aislamiento de Cmm <sup>1</sup>	Absorbancia 590 nm (en 7 ml PBS) <sup>2</sup>	% de trozos con aislamiento de Cmm <sup>3</sup>	Absorbancia 590 nm (en 7 ml PBS) <sup>2</sup>
0 horas	88	0,9	100	1,55
24 horas	72	0,4	100	1,80
7 días	0	0	100	1,80
14 días	0	0	100	1,80
30 días	0	0	100	1,40
60 días	0	0	100	0,70
90 días	0	0	100	---
180 días	0	0	100	0,36
240 días	0	0	100	---
365 días	0	0	60	0,20

<sup>1</sup> Trozos de caña de Castilla de 2 x 0,5 cm.

<sup>2</sup> Absorbancia 590 nm de una suspensión de las bacterias aisladas en 7 ml de tampón PBS.

<sup>3</sup> Trozos de rafia de dos centímetros de largo.



**Figura 33.** Colonias de Cmm aisladas a partir de trozos de caña castilla (arriba) y rafia (abajo) embebidos en suspensión bacteriana y almacenados por períodos de hasta un año. Cmm pudo ser recuperada de rafia luego de un año, mientras que en caña no alcanzó a siete días. (Fotos D. Maeso)



**Figura 34.** Ejemplo de colecta de rafia para ser reutilizada en los siguientes cultivos. (Fotos D. Maeso).



### TRANSMISIÓN POR AGUA DE RIEGO

Como ya hemos mencionado en párrafos anteriores, el salpicado con agua de la parte aérea de la planta es muy importante en el establecimiento de poblaciones epífitas y en el desarrollo de determinados síntomas (OEPP/EPPO, 2013). Algunos trabajos sostienen que no es necesaria la presencia de agua en el follaje en grandes volúmenes y por períodos prolongados siendo suficiente, por ejemplo, lo realizado en una aplicación de productos fitosanitarios (Frenkel *et al.*, 2016).

Sin embargo, la enfermedad también se transmite a partir de bacterias presentes en raíces por agua de riego o por contacto entre raíces de plantas vecinas. En una primera etapa el patógeno se moviliza desde su punto de ingreso hacia la raíz y de ahí a la rizosfera (Gitaitis *et al.* 1991; Xu *et al.*, 2012). Luego, tal como se ha comprobado en cultivos hidropónicos, puede infectar plantas sanas a partir de exudados volcados a la solución nutritiva desde raíces de plantas infectadas (Vieira Lelis *et al.*, 2014). En inoculaciones realizadas en plantas *in vitro*, Cmm pudo ingresar a la raíz desde el medio de cultivo a través de aberturas naturales de ésta y volverse sistémica en tres horas sin la intervención de heridas (Huang y Tu, 2001). El pH de la solución de riego influye en la eficacia de esta forma de diseminación, siendo menor a pH bajos (Vieira Lelis *et al.*, 2014).

Se ha demostrado la supervivencia en agua de un patógeno relacionado, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, aunque está muy relacionada con la presencia de especies vegetales huéspedes y la temperatura (Van der Wolf y Van Beckhoven, 2004). Este fenómeno también ha

sido reportado para otras bacterias causantes de enfermedades al cultivo como *Ralstonia solanacearum* (Elphinstone *et al.*, 1998). Incluso se ha mencionado el papel de formas celulares *f*viabiles, pero no cultivables≈ (VBNC, viable but non-culturable) de estas bacterias asociadas con esta característica.

Muchos productores de tomate de nuestro país afectados por cancro bacteriano visualizan al riego en superficie (principalmente por goteo) como uno de los principales mecanismos de transmisión de la enfermedad en sus cultivos, e incluso la introducción a partir de fuentes de almacenamiento de agua contaminadas.

Para estudiar ese tema y evaluar medidas para prevenir esta vía de transmisión se realizaron varios experimentos durante 2005-2009 en INIA Las Brujas. En primer lugar, se estimó la eficiencia de la transmisión por riego en superficie a partir de diferentes fuentes de inóculo en seis experimentos en invernáculo con condiciones controladas totalizando 116 plantas por alternativa (Maeso *et al.*, 2008c; 2009). Para ello se construyó una estructura mediante la cual, plantas de tomate sin inocular plantadas en macetas con suelo estéril, recibían el excedente del agua del riego de plantas colocadas en un nivel superior. Las plantas superiores correspondían a tres alternativas (Figura 35): a) plantas sin inocular cultivadas en suelo extraído de plantas enfermas, b) plantas inoculadas mediante punción axilar con una suspensión de Cmm en suelo esterilizado y c) un control con plantas sin inocular cultivadas en suelo esterilizado. Las plantas del nivel superior fueron regadas con agua esterilizada de forma que el excedente cubriera las necesidades de riego del nivel inferior.



**Figura 35.** Experimentos de estimación de la transmisión por agua de riego proveniente de diferentes fuentes de inóculo. (Fotos D. Maeso)

En primer lugar, se encontró que el porcentaje de plantas del nivel superior infectadas (estimado por el aislamiento de bacterias gram positivas y detección por DAS ELISA) fue más alto en aquellas inoculadas con punción axilar (36 y 32%) que en las cultivadas en suelo proveniente de un cultivo enfermo (15 y 16 %). A pesar de las limitaciones que tuvieron esos trabajos (la inoculación por punción axilar con suspensión de bacterias no alcanzó 100% de infección en todos los casos), se puso en evidencia que la capacidad de infección a partir de suelo enfermo (sin mediar heridas) es menor que la inocu-

lación mediante suspensión bacteriana con heridas.

La transmisión por riego a las plantas del nivel inferior también siguió la misma tendencia, sugiriendo que las plantas infectadas con inoculación con heridas son una fuente de inóculo más eficiente para la transmisión por agua de riego (20 y 31%) que las cultivadas en suelo tomado de cultivos enfermos (6 y 8%).

En el cuadro 3 se muestran los resultados promedios de los seis experimentos.

**Cuadro 3.** Estimación de la eficiencia de fuentes de inóculo en la transmisión de Cmm mediante agua de riego<sup>1</sup>.

Fuente de inóculo	Porcentaje de plantas superiores con		Porcentaje de plantas inferiores con	
	Bacterias gram positivas	Detección de Cmm por DAS-ELISA	Bacterias gram positivas	Detección de Cmm por DAS-ELISA
1. Suelo proveniente de cultivo enfermo, planta sin inocular.	15	16	6	8
2. Planta inoculada en suelo esterilizado	36	32	20	31
3. Planta sin inocular en suelo esterilizado	0	0	0	0

<sup>1</sup>Datos promedio de seis experimentos con 116 repeticiones por alternativa.

Otro aspecto relacionado también estudiado en experimentos en INIA Las Brujas fue la influencia del volumen de agua suministrado en riego en la evolución y grado de ataque de cancro bacteriano en tomate entutorado a campo (Figura 36).

En cuatro experimentos (dos bajo cubierta y dos a campo) realizados entre 2010 y 2012 se compararon tres alternativas de riego en las que, en los mismos momentos, se suministraba 50, 100 y 150% del volumen de agua indicado por los balances hídricos (Maeso *et al.*, 2010c; 2012c). Solamente en

uno de estos experimentos se encontró una tendencia estadísticamente significativa a que en los tratamientos que recibieron más volumen de agua mostrarán una mayor dispersión e intensidad de la enfermedad (cuadro 4).

Por lo tanto, no es posible asegurar que el volumen de agua aplicado en cada riego por sí mismo tenga influencia en la transmisión de la enfermedad y en todo caso, su efecto es menor frente a otros factores tal como lo señalan algunos trabajos (Frenkel *et al.*, 2016).

**Cuadro 4.** Incidencia y severidad de cancro bacteriano de acuerdo con volúmenes de riego (experimento a campo 2010-2011).

Régimen de riego	Incidencia de la enfermedad (56 días de trasplante)	Porcentaje de plantas con distorsión del sistema vascular al final del ciclo
50%	11 a1	64 a
100%	32 b	73 ab
150%	25 ab	81 b

<sup>1</sup> Los valores seguidos por la misma letra no son diferentes según la prueba Duncan de rangos múltiples.



**Figura 36.** Vista de distribución de tratamientos de niveles de riego, alimentación de riego diferencial entre tratamientos. Ensayo a campo 2010. (Foto D. Maeso)

### TRANSMISIÓN POR LABORES

La transmisión de Cmm a través de labores que ocasionan heridas ha sido comprobada ya en trabajos de 1930. Actualmente se sabe que estas también facilitan el ingreso al sistema vascular de bacterias presentes en el exterior del follaje en forma epífita (Gleason *et al.*, 1991; 1993; Carlton *et al.*, 1994; Kawaguchi *et al.*, 2010, OEPP/EPPO, 2013, Sharabani *et al.*, 2013; Frenkel *et al.*, 2016).

Se estimó que un 0,1% de aumento de la presencia de Cmm en el almacigo se traduce en 10% de aumento en el cultivo comercial por propagación mediante las heridas producidas en la poda y manipulación de plantines previo y durante el trasplante (Chang *et al.*, 1991; 1992a).

El patrón de distribución de plantas enfermas en los cultivos entutorados es prueba de la importancia de la transmisión de la enferme-

dad mediante el desbrote y deshoje, ya que éstas están agregadas siguiendo el sentido de realización de las labores (Kawaguchi *et al.*, 2010). Estudios realizados en Israel también demuestran la importancia de las labores en cultivo en la diseminación y la de severidad de la enfermedad en predios de diferentes zonas productoras (Blank *et al.*, 2016).

Un procedimiento incorporado en muchos de los trabajos de campo realizados en INIA Las Brujas para evaluar medidas de manejo para prevenir cancro bacteriano consistió en inocular las plantas en los bordes de las parcelas como forma de simular las condiciones de evolución de los ataques en los cultivos comerciales ya sea por riego o por labores. Si bien no se hizo un análisis del avance de la enfermedad a partir de esos puntos de inoculación, en casi todos los casos se logró rápidamente una distribución homogénea de la enfermedad en los experimentos (Figura 37).



**Figura 37.** Plantas inoculadas en extremos de parcelas experimentales en ensayos en INIA Las Brujas. (Foto D. Maeso)

También en trabajos experimentales en INIA Las Brujas durante 2013 - 2014 se demostró la gran eficacia de la transmisión a través heridas provocadas por tijeras, ya sea embebidas en suspensión bacteriana o que previamente habían realizado cortes en plantas con síntomas (Figura 38). En estos trabajos se evaluaron productos desinfectantes de herramientas para prevenir la transmisión de la enfermedad (Maeso *et*

*al.*, 2014b; Maeso y Walasek, 2015; Maeso *et al.*, 2015b; 2015c), la cual fue superior al 87% en el testigo sin desinfección (cuadro 5) ya sea utilizando tijeras contaminadas sumergiéndolas por diez segundos en una solución bacteriana o por haber cortado previamente plantas con síntomas. En la Figura 39 se pueden apreciar vistas de los experimentos y detalles de los síntomas externos e internos observados.



**Figura 38.** Formas de contaminación de tijeras utilizadas en experimentos. Izquierda corte con tijeras previamente sumergidas en suspensión bacteriana, derecha corte de plantas con síntomas. (Fotos D. Maeso)



**Figura 39.** Vista de grupos de plantas inoculadas con tijeras infectadas que no recibieron ningún tratamiento de desinfección y estado del sistema vascular al final del experimento. (Fotos D. Maeso)

**CICLO RESUMIDO DE LA ENFERMEDAD**

Resumiendo, y tomando en cuenta lo expresado en los apartados anteriores, podemos establecer que los ataques de cancro bacteriano a almácigos o cultivos se desarrollan en tres etapas (Figura 40).

En el comienzo, los plantines con infección latente (cuya infección provino de la semilla, por el contacto con almácigos y otros inertes contaminados, por contacto con restos en suelo, etc.) desarrollan una infección sistémica en el xilema y secretan células de Cmm a través de los hidátodos por el fluido de gutación (Figura 27) pero aún no exhiben síntomas (Fase I).

En una segunda etapa se produce la diseminación de la bacteria colonizando externamente el follaje de las plantas adyacentes (Fase II). En la última etapa (Fase III) Cmm invade internamente estas plantas y se multiplica hasta alcanzar un nivel de población bacteriana en el que empieza a producir daños al sistema vascular y desarrollar los síntomas característicos de la enfermedad y así continuar con el ciclo de la enfermedad (Frenkle *et al.*, 2016).

El conocimiento del ciclo de la enfermedad, las fuentes de inóculo, los lugares y potencialidad de permanencia fuera del cultivo y los medios de diseminación es fundamental para realizar un manejo eficiente de esta en forma integrada.



**Figura 40.** Ciclo epidemiológico de cancro bacteriano (versión propia basada en Eichenlaub *et al.*, 2006 y De León *et al.*, 2011). Fotos D. Maeso.

## MANEJO

Como por el momento no existen formas de *curar* las plantas con esta enfermedad ni tampoco hay disponibilidad de variedades comerciales resistentes, la prevención es la única medida de manejo posible. Dado lo expuesto en los apartados anteriores es necesario realizar un manejo integrado buscando eliminar las fuentes de inóculo y evitar su diseminación a partir de éstas y dentro del cultivo. Es inútil enfocarnos solo en uno de los componentes del sistema, sino se hace un manejo integrado total tomando en cuenta todos los factores seguramente la enfermedad seguirá adelante.

A continuación, describiremos las medidas recomendadas en la bibliografía y datos nacionales derivados de ensayos en los que se buscó evaluar algunas de ellas.

### **DISMINUCIÓN DE LA PERMANENCIA EN RESTOS EN EL SUELO**

Como fue descrito, *Cmm* sobrevive en restos de plantas infectadas en suelo por períodos que siempre exceden el momento de trasplante del cultivo siguiente. Por lo tanto, una medida preventiva es evitar o disminuir el nivel de inóculo en el terreno cuando comienza la nueva plantación.

En invernáculos, principalmente en la zona norte, la fumigación y la aplicación de desinfectantes de suelo han sido comúnmente utilizadas, para este y otros problemas sanitarios (nematodos). Algunos fumigantes actualmente no están disponibles o han sido prohibidos (p.ej. bromuro de metilo), mientras otros son desaconsejados por la infinidad de desventajas que tienen (fitotoxicidad, control limitado, problemas ambientales, toxicidad para humanos y fauna, costos, etc.) o su ineficacia, específicamente contra esta enfermedad (Bernal, 2001; 2008; 2010).

Un aspecto por considerar cuando se busca eliminar el inóculo en restos en el suelo es evitar la reinfeción. Por ello las medidas deben ser aplicadas a toda la superficie a estar

en contacto con el nuevo cultivo e impedir la mezcla con suelo no tratado ya sea de capas inferiores o de sectores no tratados o la reintroducción por otras vías.

Entre las estrategias que no involucran el uso de fumigantes o desinfectantes podemos mencionar: a) rotación con cultivos no huéspedes o que liberan productos antagónicos para el patógeno, b) biofumigación (sustancias derivadas de la descomposición de restos vegetales, abonos animales, abonos verdes y otros compuestos orgánicos incorporados al suelo), y c) solarización.

### **Rotación de cultivos y abonos verdes**

La plantación reiterada de cultivos sensibles es uno de los problemas en invernáculos ya que generalmente los cultivos cuya rentabilidad compensa la inversión en estructuras sanitarios. En un apartado anterior se mencionaron los huéspedes en los que *Cmm* puede habitar, aún sin producir síntomas ni pérdidas, por lo que las opciones son reducidas y, si tomamos en cuenta la información de permanencia en restos e inertes disponible, la duración de la rotación excede los plazos admitidos para una explotación comercial.

Sin embargo, para esta y muchas otras enfermedades cuyo inóculo puede permanecer en suelo, es recomendable que las rotaciones y otras medidas complementarias (p. ej. abonos verdes) sean realizadas preventivamente y en forma regular, es decir, antes de que se observen pérdidas de importancia. Eso evita el establecimiento de niveles altos de inóculo además de otras ventajas en cuanto a mejoras en la calidad del suelo.

Los beneficios de la plantación y enterrado de abonos verdes de invierno han sido descritos abundantemente, no solo ayudando a la descomposición de los restos del cultivo sino también contribuyendo en mejorar las propiedades del suelo (Belfry *et al.*, 2017).





**Figura 41.** Plantación de abonos verdes que cubren únicamente el cantero cultivado y permiten la permanencia de restos vegetales en superficie entre canteros. (Fotos D. Maeso)

Varios son los mecanismos propuestos para explicar la forma como actúa la incorporación de abonos verdes sobre los patógenos: a) como plantas no huéspedes, b) por supresión directa mediante exudados radiculares tóxicos, c) por supresión indirecta a través de cambios en la población microbiana de la rizosfera, estimulando microorganismos antagonistas o competitivos, d) por inducción de la resistencia sistémica y e) por efecto biofumigante (Debert *et al.*, 2015).

Un aspecto práctico para considerar es que el cultivo usado como rotación tiene que cubrir toda la superficie de cultivo y debe ser complementado con la eliminación o enterrado de los restos. En la Figura 41 vemos ejemplos de plantación de abonos verdes que no cumplen estas condiciones, dejan espacios sin plantar, no cubren totalmente la superficie y los restos siguen permaneciendo en superficie. Sabemos que esto no es fácil de llevar a la práctica, pero, como se dijo anteriormente bajar la guardia en un aspecto debilita la efectividad de la globalidad de las medidas preventivas.

### Solarización

La solarización, o sea el aumento de temperatura del suelo logrado al cubrirlo con plástico transparente durante el verano, es recomendada para disminuir la permanencia en el suelo y restos de Cmm en invernaderos de tomate luego de cultivos afectados (Antoniou

*et al.*, 1995; Shlevin *et al.*, 2004). Sus efectos sobre la bacteria, que comienzan a las dos semanas de iniciado el procedimiento, se explican por la combinación de las altas temperaturas y la acción de varios microorganismos antagonistas resistentes a estas sobre el patógeno.

En la zona norte (Salto, Bella Unión) se recomienda la realización anualmente de solarización durante por lo menos seis semanas (desde fines de diciembre a fines de enero) en invernáculos afectados, obteniéndose una reducción efectiva de la enfermedad y de otros problemas sanitarios (Bernal 2008; 2010).

Este procedimiento es adecuado tomando en cuenta las fechas de cultivo de la zona norte, sin embargo, para la zona sur, al coincidir con la estación de cultivo, es necesario prescindir del invernadero a tratar durante el periodo estival lo cual no es considerado por el común de los productores. Sin embargo, esto está plenamente justificado en los casos donde los cultivos previos sufrieron fuertes ataques, ya que las pérdidas que sufrirá el cultivo siguiente lo harán económicamente inviable de todas formas. Por lo tanto, es aconsejable como forma preventiva, tanto para este como para otros problemas sanitarios, planificar un esquema rotativo de solarización periódico de los invernaderos del predio y no esperar la ocurrencia de problemas sanitarios para realizarla.



**Figura 42.** Solarización en invernáculos. Derecha solarización total, foto tomada en la zona de Torre Blanca Murcia, España, izquierda solarización de canteros solamente, foto tomada en Salto, Uruguay. (Fotos D. Maeso)

Por supuesto supeditado a las opciones que tenga cada establecimiento individual.

Todo lo referente a la solarización está muy bien explicado en una publicación nacional, que, si bien está dirigida a almácigos de cebolla, los principios son perfectamente aplicables a otros cultivos (Arbolea, 2018). Un detalle para tener en cuenta en el tratamiento de invernáculos es que el plástico debe cubrir toda la superficie del suelo y no solamente los canteros a cultivar para evitar la reinfeción por suelo no tratado (Figura 42).

Como la permanencia de Cmm es menor en restos vegetales enterrados (Gleason *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992a; Fatmi y Schaad, 2002), y la capacidad de infección aumenta con el volumen de material vegetal enfermo remanente (Zanón y Jordá, 2008) y disminuye al aumentar la temperatura y la exposición a esta, algunos autores recomiendan la realización conjunta del enterrado de restos de cultivo o abonos verdes (p.ej. maíz) y la solarización con una duración de por lo menos cuatro semanas (Shlevin *et al.*, 2004, Zanón y Jordá, 2008). Dado lo fluctuante de nuestro clima, debe tenerse en cuenta que es un proceso biológico que se da por acumulación de energía lograda por tiempo de exposición a la temperatura, lo cual dependerá de la insolación recibida. Es por todos conocidos que el efecto de esta técnica no es tan bueno cuando predominan días frescos y nublados en verano.

### **Bio fumigación y otras técnicas relacionadas**

La incorporación de materia orgánica fresca o compostada sola o asociada a solarización ha sido descrita como útil para disminuir el nivel de inóculo en suelo de este y otros patógenos, para prevenir la recolonización de los plantines del cultivo posterior (Bernal, 2001; Yogev *et al.*, 2009, Zanón y Jordá, 2008) y además por sus efectos beneficiosos en las propiedades del suelo del invernáculo.

Si bien se han realizado experiencias prácticas exitosas por parte de algunos productores y en un proyecto internacional (Bernal, 2001) principalmente orientado al manejo de nemátodos, debe tenerse en cuenta la alteración a largo plazo del balance de los elementos en el suelo de los invernáculos que pueden sobrepasar los niveles tolerados por los cultivos (principalmente sodio).

### **DESINFECCIÓN DE SEMILLAS**

Como se mencionó anteriormente, la semilla es una de las principales fuentes de introducción de Cmm a un país, una zona, un predio y a un cultivo en particular.

La semilla de tomate puede ser extraída en dos formas, un artesanal manual y otra industrial. En la manual, los frutos maduros son aplastados y dejados fermentar a temperatura ambiente por 1-3 días y luego la

semilla se separa de los restos por múltiples enjuagues con agua. En la industrial, la semilla se extrae de forma mecánica por máquinas y el mucílago se separa de la semilla mediante tratamiento con diferentes sustancias, preferentemente ácido clorhídrico, las cuales además actúan como desinfectantes de patógenos. En ambos casos, el proceso finaliza con múltiples enjuagues con agua, secado y empaquetado de la semilla.

Como se mencionó, el cambio hacia la plantación de híbridos, producidos masivamente en regiones con condiciones propicias para la enfermedad, ha favorecido la diseminación de la enfermedad. Este cambio, a nivel local, también trajo aparejado el abandono de la producción de semilla propia que incluía la fermentación con la pulpa del fruto, que posee muy buen efecto desinfectante sobre varios patógenos (Pradhanang y Collier, 2009; Maeso y Walasek, 2012; OEPP/EPPO, 2013) y se incorporaron varios tratamientos con desinfectantes.

Se describen numerosos métodos para la desinfección de semilla de tomate (Thyr *et al.*, 1973; Shoemaker y Echandi, 1976; Dhanvantari, 1989; Fatmi *et al.*, 1991; Dhanvantari y Brown, 1993; Pradhanang y Collier, 2009), así como detallados protocolos de prevención que son utilizados por las firmas productoras de semillas específicamente contra esta enfermedad (Good Seed and Plant Practices); sin embargo, como todo proceso biológico existen riesgos de escape (Pradhanang y Collier, 2009).

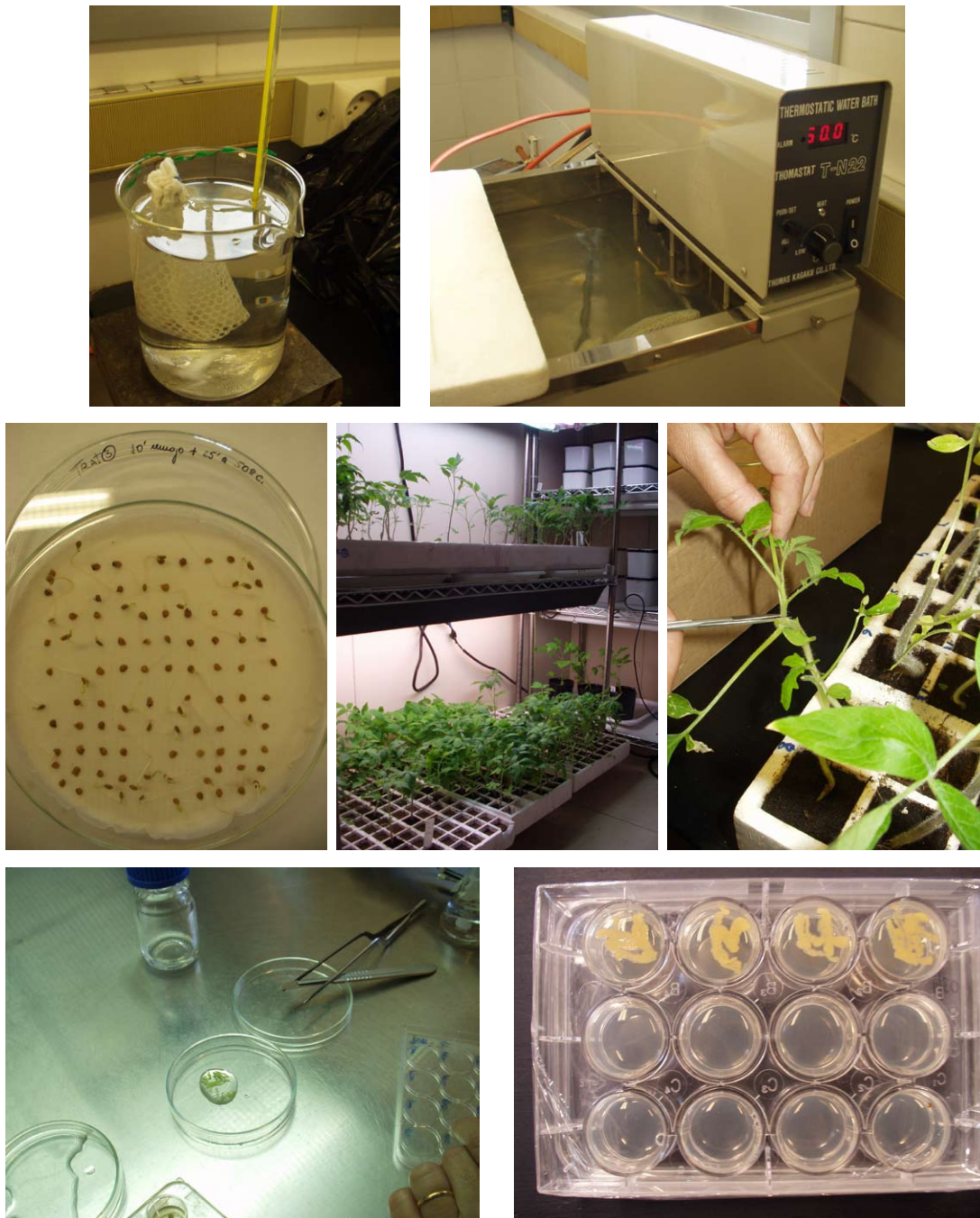
Todos son recomendados como efectivos para disminuir la proporción de semilla infectada por Cmm y evitar las posteriores epidemias a campo. Entre ellos se pueden destacar la inmersión en ácido clorhídrico, en agua caliente (> 50°C) o en hipoclorito de sodio; varias son las concentraciones y tiempos de exposición descritos.

Debe tenerse en cuenta que la efectividad de los tratamientos depende de la duración, la temperatura en que se realiza el proceso y, para el caso de tratamientos con químicos, de la concentración. Es de destacar que existe un balance entre efectividad y la disminución del poder germinativo de la semilla. Por eso es muy importante respetar las recomendaciones de los procedimientos, ajustarlos a las condiciones propias y realizar la desinfección dividiendo el lote de semilla en pequeños grupos. Un detalle no menor es que la exposición al tratamiento debe cesar inmediatamente llegado al tiempo recomendado, por lo que se debe proceder rápidamente a enjuagar la semilla con agua corriente para eliminar restos de químicos o con agua helada para llevar la semilla a la temperatura inicial. De otra forma estaríamos prolongando el tiempo del tratamiento.

En Miller y Lewis Ivey (2005) se describen detalladamente algunos de los procedimientos que fueron evaluados en experimentos realizados en INIA Las Brujas y pueden ser tomados como referencia para ajustarlos a las condiciones de cada productor.

En la Figura 43 se muestran algunos de los procedimientos llevados a cabo para la evaluación de métodos de desinfección de semilla. Resumidamente, se colectó semilla de plantas enfermas, la cual fue sometida a los tratamientos de desinfección, se realizó una evaluación del poder germinativo y vigor de los plantines resultantes y se plantaron en almácigos en suelo esterilizado en cámara de crecimiento. La infección de los plantines fue evaluada de igual forma a la descrita para otros experimentos (aislamiento en medio de cultivo, reacción de gram, infiltración en Don Diego de la Noche y análisis serológico).

Si bien la efectividad lograda no fue total, se debe considerar que se utilizó semilla de plantas enfermas (caso extremo), y que ningún tratamiento afectó el poder germinativo (cuadros 5 y 6) (Maeso y Walasek, 2015).



**Figura 43.** Diferentes etapas en los trabajos de evaluación de métodos para la desinfección de semillas en INIA. A) Pre-acondicionado en baño a 37°C, B) Baño a 50°C, C) evaluación de la germinación, D) extracción de tallos, E) cultivo en medio en placas múltiples y F) apariencia de colonias de las colonias obtenidas. (Fotos D. Maeso)

El tratamiento con agua caliente posee la ventaja sobre el resto de llegar también al interior de la semilla. La temperatura utilizada fue de 50°C durante 25 minutos pudiendo

realizarse un pre-acondicionamiento sumergiendo las semillas a 37°C por 10 minutos (Miller y Lewis Ivey, 2005; Maeso y Walasek, 2012).

**Cuadro 5.** Efecto de los métodos de desinfección sobre el poder germinativo y vigor de la semilla

Tratamiento	Semilla extraída de frutos de plantas con cancro		Semilla del cultivar Loica
	Porcentaje de germinación <sup>1</sup>	Altura de plantín (mm)	Porcentaje de germinación <sup>2</sup>
1. Sin tratamiento	74,6 <sup>3</sup>	16,3 a <sup>4</sup>	99
2. Baño en agua caliente: 50≥C por 25 minutos	70,8	13,1 b	91
3. Ydem a 2 pero con un baño previo de 10 minutos a 37≥C.	70,2	13,9 ab	99
4. Baño en hipoclorito de sodio 1% de cloro activo, 1 minuto	68,4	15,3 ab	100

<sup>1</sup> Promedio de nueve pruebas sobre un total de 760 semillas por tratamiento.

<sup>2</sup> Sobre un total de 100 semillas.

<sup>3</sup> Sin diferencias estadísticamente significativas

<sup>4</sup> Las medias seguidas por igual letra no difieren significativamente en la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5%.

**Cuadro 6.** Porcentaje de detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mediante DAS-ELISA en plantines provenientes de semilla sometida a cuatro tratamientos de desinfección (n=579).

Tratamiento	Porcentaje de detección
1. Sin tratamiento	5,60 a <sup>1</sup>
2. Baño en agua caliente: 50≥C por 25 minutos	2,03 b
3. Ydem a 2 pero con un baño previo de 10 minutos a 37≥C.	1,00 b
4. Baño en hipoclorito de sodio 1% de cloro activo, 1 minuto	0,98 b

<sup>1</sup>Las medias seguidas por igual letra no difieren significativamente en la prueba de rangos múltiples de Duncan al 1%.

El baño con hipoclorito de sodio es el recomendado actualmente en las Normas de Producción Integrada de tomate de Uruguay por su practicidad y seguridad (una parte de lavandina de uso doméstico y tres partes de agua) (González *et al.*, 2018).

### **DESINFECCIÓN DE HERRAMIENTAS Y OTROS INERTES**

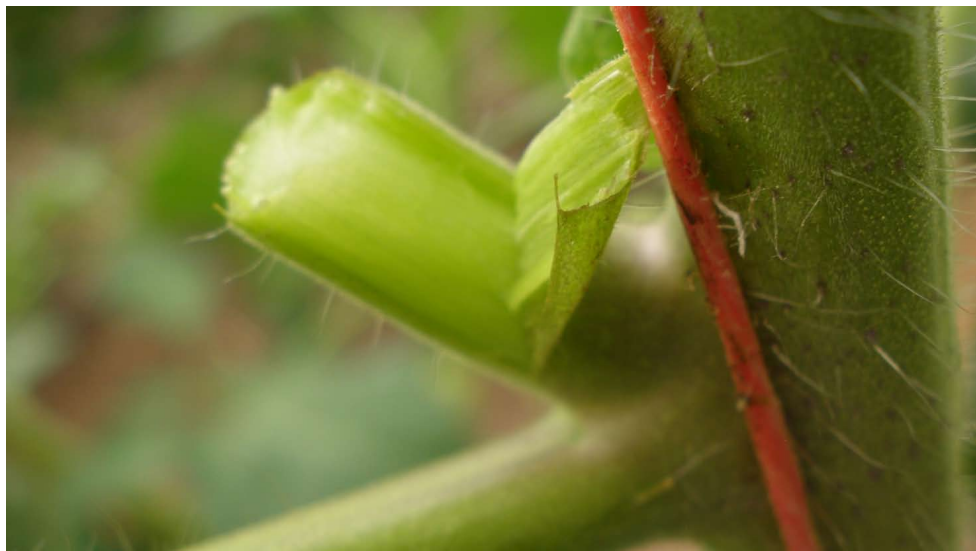
Como se ha mencionado, las labores que implican el contacto entre plantas directamente o a través del uso de herramientas son unas de las vías más eficaces para diseminar la

enfermedad en un cultivo. También, como se describió anteriormente, Cmm puede permanecer en estructuras e inertes (postes, alambres, tutores, rafias, mesadas, almácigas) y desde ellas llegar a los futuros cultivos.

Muchos productos han sido evaluados para la desinfección herramientas, equipos y demás estructuras relacionadas con cultivos (Baysal-Gurel *et al.*, 2009; 2012). Entre ellos se incluyen alcoholes, halógenos (cloro, yodo), amonio cuaternario, hipoclorito de sodio y, últimamente, productos de origen vegetal (aceites esenciales, extractos).

Sin embargo, es común que no se logren resultados aceptables en cuanto a detener o prevenir el avance de esta enfermedad. Por ello, al momento de tomar decisiones en cuanto a productos para desinfección se debe tener en cuenta lo siguiente:

- 1) Es imprescindible realizar previamente una higiene minuciosa del objeto a desinfectar con detergentes y demás para eliminar todo tipo de suciedad. Como al igual que otras bacterias posee la capacidad de sobrevivir como biofilm o sea protegida por extra-polisacáridos, lo cual la hace más resistente a la acción de desinfectantes (Howard *et al.*, 2015).
- 2) Los productos seleccionados deben ser poco tóxicos para el aplicador y se deberán extremar las medidas preventivas para evitar accidentes. Las medidas de protección y manipuleo dependerán del producto utilizado por lo que es fundamental asesorarse al respecto.
- 3) Estos tampoco deberán tener efectos nocivos para el medio ambiente y eso deberá ser contemplado en su deposición final.
- 4) Al igual que con los desinfectantes de semillas, existe un balance que debe ser respetado en cuanto a efectividad/efecto negativo sobre la planta. Muchos productos tienen alto poder oxidativo y pueden ser fitotóxicos si se exceden en sus dosis o entran en contacto con elementos sensibles y, al contrario, si se diluyen mucho, no solo pierden su efecto, sino que se convierten un medio de dispersión de la enfermedad.
- 5) El alto poder oxidativo de algunos productos perjudica todo elemento metálico con el que tengan contacto (tijeras, alambres, etc.), pero, en el caso de inertes las dosis a utilizar pueden ser más altas siempre y cuando no entren en contacto directo inmediato con materiales vegetales.
- 6) Muchos de los desinfectantes pierden efectividad una vez preparados ya sea por la degradación por parte de la luz, por la contaminación con restos vegetales u otras causas. Por eso es imprescindible evaluar el estado de la solución utilizada (turbidez, presencia de contaminantes, etc.) y cambiarla a menudo, especialmente cuando se trabajan en sectores de sanidad dudosa o cultivos de diferente edad.
- 7) Se debe permitir que el desinfectante actúe por un tiempo mínimo lo cual estará supeditado al ritmo de la tarea. En el caso de almácigas, cajones, postes, etc. no existen inconvenientes en dejar actuar al desinfectante por largo tiempo. Sin embargo, cuando se desinfectan tijeras de poda o navajas, para las cuales se aconseja un tiempo mínimo de inmersión de 10 minutos, es necesario contar con varios juegos de ellas para ir desinfectándolas en tandas durante el trabajo.
- 8) Independientemente de la desinfección de herramientas, es importante que las heridas producidas por los cortes sean *flimpias*≈ sin rebabas o flecos (Figura 44). Se deberá tratar de que los desbrotes sean realizados cuando los brotes son pequeños de forma de exponer menos superficie de entrada a patógenos.
- 9) Por último, no todas las opciones de desinfectantes usados en industria y producción animal se ajustan a los costos tolerados por el cultivo.



**Figura 44.** Ejemplo de mal desbrotado con heridas imperfectas y tamaño excesivo de brote. (Foto D. Maeso)

Los productos más usados en nuestro país en el cultivo del tomate y que fueron evaluados en INIA Las Brujas para la desinfección de tijeras (Maeso *et al.*, 2014b; 2015b; 2015c; Maeso y Walasek, 2015) son: amonio cuaternario, hipoclorito de sodio, y la solución de iodo jabonosa. Cada uno de ellos poseen ventajas e inconvenientes.

El hipoclorito de sodio es el preferido por su costo y disponibilidad. Es muy indicado para desinfectar macetas, almácigas, pero se debe tener mucho cuidado pues es muy corrosivo con elementos metálicos y plásticos. El tiempo óptimo de acción es de 30 minutos y requiere siempre de un enjuague posterior. Es importante saber que es poco estable y se degrada por exposición a la luz y por contacto con materia orgánica. La vida media de la solución a la concentración de uso es de dos horas, es decir que a las dos horas tenemos la mitad de la concentración inicial y esta va disminuyendo a la mitad sucesivamente. Por ello es importante preparar la solución de uso a partir del concentrado al momento de utilizarla e irla reemplazando periódicamente. La concentración recomendada para desinfectar tijeras de corte es de 1% de cloro activo lo cual corresponde a una parte de lavandina doméstica y cuatro de agua. En el caso de

utilizar hipoclorito de sodio industrial tener en cuenta que su concentración es de 10%, por lo que la dilución a realizar es de 1 parte de hipoclorito y 9 de agua.

Las sales de amonio cuaternario tienen la ventaja de ser estables y no requerir de enjuague luego de su uso. Al igual que otros desinfectantes son inactivados por la materia orgánica, por lo que la solución también debe reponerse periódicamente. En el mercado existen varias formulaciones con bajo poder fitotóxico, que incluso pueden ser aplicados al follaje (Sporekill, cloruro de dodecil dimetil amonio 12%).

A pesar de que el iodo es muy utilizado como desinfectante en la salud, es importante alertar que para ese fin se prepara diluido en alcohol y por lo tanto estos productos no deben ser usados en agricultura. Existen algunos desinfectantes a base de iodo que pueden ser de uso agrícola preparados en soluciones jabonosas que reducen su fitotoxicidad y se pueden incluso aplicar al follaje. Una de ellas, la solución de iodo jabonosa Perrin, fue evaluada junto a otros desinfectantes en experimentos en INIA Las Brujas en desinfección de agua de riego, de tijeras y en aplicaciones foliares.

Se realizaron dos experimentos para la evaluación de la desinfección de tijeras. Uno consistió en la inoculación de plantas sanas (120 plantas por tratamiento) con Cmm cortando plantas sanas con tijeras que fueron sumergidas en una suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$ ) y luego en las soluciones desinfectantes por 10 segundos. En otro, muy similar, las tijeras fueron contaminadas cortando de tallos de plantas enfermas.

En los cuadros 7 y 8 se presentan resumidamente algunos de los resultados obtenidos. Como se puede observar, ninguno de los tratamientos desinfectantes logró impedir totalmente la transmisión de Cmm, pero la redujeron frente al testigo sin desinfectar. Se debe tener en cuenta que en estos experimentos la inoculación fue hecha con alta concentración de Cmm en inóculo y poco tiempo de acción del desinfectante (10 segundos) lo cual no es común en un cultivo comercial.

**Cuadro 7.** Evaluación de desinfectantes para la prevención de la transmisión de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) mediante tijeras infectadas con una suspensión bacteriana<sup>1</sup>.

Tratamiento y dosis producto comercial (%)	Principio activo	Porcentaje de plantas inoculadas con síntomas		Porcentaje de detección por DAS-ELISA en plantas inoculadas <sup>5</sup>
		Externos <sup>2</sup>	Haces vasculares <sup>3</sup>	
		14 dpi <sup>4</sup>	42 dpi	
1. Sin inoculación	---	0 a <sup>6</sup>	0 a	0 a
2. Sin desinfección	---	87 c	90 d	100 c
3. Hipoclorito de sodio (1% <sup>7</sup> )	Hipoclorito de sodio	0 a	3 ab	45 b
4. Virkon S (1%)	Mono persulfato potásico (sal triple) 50%	57 b	17 bc	0 a
5. Desinfectante a base de iodo Perrin (0,15%)	Agentes tensoactivos en complejo con iodo, 0,8-0,9% de iodo libre o titulable	100 c	97 d	100 c
6. Sporekill (1%)	Cloruro de didecildimetilamonio 120g/l (compuesto de amonio cuaternario)	17 b	27 c	10 a

<sup>1</sup> Todos los datos en porcentajes fueron corregidos por la fórmula  $\text{arc sen } \sqrt{\%}$  para su análisis estadístico.

<sup>2</sup> Síntomas externos asociados con Cmm (marchitamiento, necrosis foliar, raíces aéreas, amarillamiento).

<sup>3</sup> Deterioro de los haces vasculares y/o médula en corte longitudinal.

<sup>4</sup> dpi = días pos-inoculación.

<sup>5</sup> Detección de Cmm mediante la prueba DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) en plantas.

<sup>6</sup> Los valores seguidos por la misma letra en cada columna no difieren significativamente por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 1%.

<sup>7</sup> Porcentaje de cloro activo, corresponde a 1 parte lavandina uso doméstico + 4 de agua o 1 parte de hipoclorito de droguería + 9 de agua.



**Cuadro 8.** Evaluación de desinfectantes para la prevención de la transmisión de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) mediante tijeras infectadas a partir de plantas enfermas<sup>1</sup>.

Tratamiento y dosis producto comercial (%)	Principio activo	Porcentaje de plantas inoculadas con síntomas		Porcentaje de detección por DAS-ELISA en plantas inoculadas <sup>5</sup>
		Externos <sup>2</sup>	Haces vasculares <sup>3</sup>	
		14 dpi <sup>4</sup>	42 dpi	42 dpi
1. Sin inoculación	---	0 a <sup>6</sup>	0 a	0 a
2. Sin desinfección	---	87 c	90 d	100 d
3. Hipoclorito de sodio (1% <sup>7</sup> )	Hipoclorito de sodio	0 a	3 ab	0 a
4. Virkon S (1%)	Mono persulfato potásico (sal triple) 50%	23 b	17 bc	35 c
5. Desinfectante a base de yodo Perrin (0,15%)	Agentes tensoactivos en complejo con yodo, 0,8-0,9% de yodo libre o titulable	100 c	97 d	100 d
6. Sporekill (1%)	Cloruro de didecildimetilamonio 120 g/L (compuesto de amonio cuaternario)	17 b	27 c	15 b

1 Todos los datos en porcentajes fueron corregidos por la fórmula  $\arcsin \sqrt{\%}$  para su análisis estadístico.

2 Síntomas externos asociados con Cmm (marchitamiento, necrosis foliar, raíces aéreas, amarillamiento).

3 Deterioro de los haces vasculares y/o médula en corte longitudinal.

4 dpi = días pos-inoculación.

5 Detección de Cmm mediante la prueba DAS-ELISA (double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay) en las colonias aisladas y en las muestras vegetales.

6 Los valores seguidos por la misma letra en cada columna no difieren significativamente por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 1%.

7 Porcentaje de cloro activo, corresponde a 1 parte lavandina uso doméstico + 4 de agua o 1 parte de hipoclorito de droguería + 9 de agua.

En las Figura 45, 46 y 47 se incluyen algunas imágenes relativas a los experimentos.



**Figura 45.** Evaluación de desinfectantes de tijeras, procedimientos. Arriba izquierda inmersión en suspensión bacteriana, derecha contaminación mediante cortes de plantas enfermas, abajo izquierda inmersión en desinfectante, derecha inoculación de planta sana. (Fotos D. Maeso)



**Figura 46.** Evaluación de desinfectantes de tijeras. Arriba izquierda vista general de uno de los experimentos, derecha detalle de los síntomas observados. Abajo vista de los tratamientos en el experimento a los 28 días de la inoculación con suspensión bacteriana (derecha) y con planta enferma (izquierda). (Fotos D. Maeso)



**Figura 47.** Evaluación de desinfectantes de tijeras. Síntomas observados en cortes longitudinales de tallos. Arriba testigo sin desinfección, centro testigo sin inocular, abajo desinfección con hipoclorito. (Fotos D. Maeso)

**Cuadro 9.** Algunas características de los desinfectantes mencionados en esta sección según (Howard *et al.*, 2007).

Producto comercial (Uruguay)	Principio activo	Efectividad	Potencial corrosivo	Fitotoxicidad
Sporekill	Cloruro de didecildimetilamonio	1 <sup>1</sup>	5	4
Varios	Hipoclorito de sodio	2	1	2
Varios	Amonio cuaternario	3	4	1
Virkon S	Mono persulfato potásico	4	2	3

<sup>1</sup> 1=más alto y 5=menor.

Existen algunos estudios que aportan información útil respecto al uso de desinfectantes para la prevención de enfermedades en invernáculos en general (Howard *et al.*, 2007). En ellos se establecen rankings en cuanto a la facilidad de limpieza de los materiales (de mayor a menor): cobre, acero inoxidable, PVC, aluminio, vidrio, policarbonato, cemento, madera, hierro, goma.

En el cuadro 9 se resume parte de la información publicada por esos autores referente a los desinfectantes mencionados en esta sección.

### **APLICACIONES DESINFECTANTES EN RIEGO Y MANEJO DEL AGUA**

La dispersión de patógenos por el agua de riego es un fenómeno muy estudiado. Si bien existen pocos antecedentes específicos para Cmm los principios generales para impedirla pueden ser aplicados también a esta enfermedad.

En primer lugar, debemos tener en cuenta que, en la transmisión de la enfermedad por esta vía, tal como se mencionara en secciones previas, existen dos elementos: la fuente de inóculo (patógeno en suelo, restos, plantas enfermas) y el vehículo (agua de riego, lluvia).

La transmisión de Cmm entre plantas dentro de un cultivo por agua de riego ha sido estudiada, principalmente en cultivos hidropónicos. Se comprobó que la bacteria puede moverse hacia la solución nutritiva desde las raíces y a través de ella infectar otras plantas

en el cultivo, siempre y cuando el pH de ésta no sea bajo (Huang y Tu, 2001).

En la zona sur del país, la mayoría de los productores utilizan para riego reservorios de agua proveniente de escurrimiento superficial. Existen sospechas de que, en ciertos casos, la enfermedad llegó a los cultivos a través de agua procedente de tajamares que recogieron agua de una cuenca donde había cultivos con ataques de cancro.

Por otra parte, algunos productores han observado que si se realizan riegos abundantes la distribución de la enfermedad es mayor. Esto no pudo ser confirmado en nuestros experimentos (Maeso *et al.*, 2010c; 2012c), sin embargo, sería conveniente realizar el manejo de los volúmenes de agua aplicados en cada riego de forma de no producir excesos que faciliten la dispersión de la enfermedad. Varios son los productos que se utilizan para la desinfección de agua de riego en la prevención de fitopatógenos. Algunos de ellos, de uso frecuente en nuestro medio frente a cancro bacteriano, fueron evaluados en INIA Las Brujas en una serie de trabajos durante 2005-2010.

### **Evaluación a campo**

En una primera etapa la evaluación fue realizada en condiciones de campo en dos experimentos durante 2005-2007 (Maeso *et al.*, 2008b). Los trabajos se realizaron en tomate cultivado en macrotúneles en sectores donde previamente se había constatado la enfermedad. Las soluciones desinfectantes se aplicaron semanalmente mediante un

sistema de riego portátil que consistía en un reservorio (trampa Moericke) donde se colocaban los productos a aplicar conectado a caños de riego por goteo con las dimensiones de las parcelas del ensayo (Figura 48).

La metodología de evaluación utilizada tanto en este como en casi todos los ensayos realizados para esta enfermedad en condiciones de cultivo fue la misma. Se registró semanalmente el porcentaje de plantas con síntomas

(incidencia) y la intensidad de los síntomas (severidad) según una escala 0-5 (Figura 49). Con la información colectada se calculó el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE) parámetro que permite resumir el desempeño de los tratamientos durante todo el experimento. El ADCPE se calcula de acuerdo a la fórmula:  $ADCPE = \sum [(x_i + x_{i+1}) / 2] (t_{i+1} - t_i)$  donde  $x$  es el registro de la enfermedad y  $(t_{i+1} - t_i)$  es el intervalo entre dos evaluaciones consecutivas.



**Figura 48.** Vista del experimento de desinfección de agua de riego para la prevención de cancro bacteriano. (Foto D. Maeso)



**Figura 49.** Escala de severidad de síntomas de cancro bacteriano de tomate utilizada en los ensayos de INIA LB (Grado 1= síntomas leves en hojas inferiores, 2=síntomas moderados hasta mitad de planta, 3= síntomas severos de marchitamiento en toda la planta, 4= con parte de follaje muerto y 5= planta muerta por la enfermedad). (Foto D. Maeso)

En el cuadro 10 se muestran los tratamientos comparados y los resultados obtenidos. Es de destacar que los productos solamente se diferenciaron en las parcelas donde la proporción inicial de plantas afectadas era baja por lo que podemos suponer que esta medida solo es efectiva cuando la proporción de plantas afectadas en un cultivo es baja. Los mejores efectos se obtuvieron con la aplicación de microorganismos efectivos (ambos experimentos), sulfato de cobre (2006) y solución jabonosa de yodo (2007).

### Evaluación en maceta

En dos pruebas realizadas durante 2009 (Maeso *et al.*, 2015f) los productos fueron comparados en condiciones controladas (en maceta, en invernáculo climatizado) utilizando la estructura ya descrita en esta publicación (Figura 35). En esos experimentos se formaron dos grupos de plantas, uno en el nivel superior en el cual se realizaban los riegos con los tratamientos y otro en el nivel inferior que recogía el agua del nivel superior. Todos los riegos fueron realizados de forma que las plantas del nivel inferior recibieran un nivel adecuado de irrigación. Las plantas fueron cultivadas en sustrato esterilizado en autoclave (120≥C 20 minutos).

Los tratamientos comparados fueron: 1) testigo sin inocular, 2) testigo inoculado, 3) rie-

go con solución jabonosa de iodo (1 ml/l de agua de riego), 4) riego con permanganato de potasio (0,06 g/l de agua de riego) y 5) riego con sulfato de cobre (0,1 g/l de agua de riego).

En los tratamientos 2 a 5, la planta superior fue inoculada mediante punción con palillo de dientes en la axila de una hoja madura a través de una solución bacteriana (1 x 10<sup>8</sup> UFC/ml).

La concentración de los productos se calculó en base a lo utilizado en los experimentos de campo previos. La dosis por superficie fue llevada a dosis por planta y disuelta en el volumen utilizado en los ensayos de campo en cada riego (dos litros). Esa fue la concentración usada en el riego de las macetas.

Al finalizar cada experimento (27 y 53 días de inoculación planta superior, dpi) se registró el porcentaje de plantas inferiores con lesiones en el sistema vascular (cuadro 11). Todas las plantas superiores presentaron lesiones en el sistema vascular mientras que el agregado de los productos al agua de riego previno el desarrollo de éstas en las plantas inferiores, principalmente en el segundo experimento. Sin embargo, el desarrollo de síntomas siempre fue superior al 50%.

**Cuadro 10.** Evaluación de productos aplicados al agua de riego en la prevención de cancro bacteriano. Valores de área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE).

Tratamiento	Dosis/1000 m <sup>2</sup>	2006 (otoño)		2007 (primavera-verano)	
		incidencia	severidad	incidencia	severidad
Permanganato de potasio	300 g	4439 a <sup>1</sup>	93 a	6413 a	155 NS
Solución de yodo jabonosa Perrin	5000 ml	4154 a	82 a	6133 b	154
Sulfato de cobre	500 g	2724 b	54 b	6617 a	149
EM (microorganismos efectivos)	2000 ml	2796 b	47 b	5796 b	141

<sup>1</sup> Los valores seguidos por la misma letra en cada columna no difieren significativamente por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 1%.

**Cuadro 11.** Evaluación de productos desinfectantes de agua de riego, porcentaje de plantas con lesiones vasculares.

Tratamiento	Experimento 1 27 dpi		Experimento 2 53 dpi	
	Planta superior <sup>1</sup>	Planta inferior <sup>2</sup>	Planta superior	Planta inferior
1. Testigo sin inocular.	0	0	0	0
2. Testigo inoculado.	100	83	100	92
3. Riego con solución de yodo jabonosa (1 ml/l).	100	75	100	58
4. Riego con permanganato de potasio (0.06 g/l).	100	92	100	67
5. Riego con sulfato de cobre (0.1 g/l).	100	58	100	67

<sup>1</sup> Planta superior inoculada en los tratamientos 2 al 5.

<sup>2</sup> Planta inferior recibe agua de riego desde planta superior.

### Experimentos *in vitro*

Para complementar la información colectada de los trabajos en campo e invernadero, en 2010, los desinfectantes fueron evaluados *in vitro* directamente sobre Cmm (Maeso *et al.*, 2015f). Para ello, éstos se agregaron a una suspensión de Cmm ( $1 \times 10^8$  UFC/ml buffer salino) de forma de obtener las concentraciones utilizadas en las evaluaciones

en planta, se dejaron interactuar por cinco minutos y luego se plaquearon alícuotas diluidas en forma serial en medio agar nutritivo. Las placas fueron incubadas 48 horas a  $23 \geq C$ . Con el número de colonias resultantes se calculó la concentración de Cmm luego del tratamiento y los resultados fueron expresados como porcentaje de control sobre el testigo sin agregado de desinfectante (cuadro 12).

**Cuadro 12.** Porcentaje de control respecto al testigo obtenido al incubar suspensiones de Cmm con el agregado de desinfectantes.

Tratamiento	Concentración Producto en suspensión bacteriana	Experimento 1		Experimento 2 <sup>3</sup>	
		Porcentaje de control frente al testigo <sup>1</sup>	Concentración de bacterias luego del tratamiento (UFC/ml) <sup>2</sup>	Porcentaje de control frente al testigo <sup>1</sup>	Concentración de bacterias luego del tratamiento (UFC/ml) <sup>2</sup>
Sulfato de cobre	0.10 g/l	99.99	$5.5 \times 10^1$	99	$3.5 \times 10^4$
Permanganato de potasio	0.06 g/l	99.99	$1.0 \times 10^1$	100	0
Solución de yodo	1 ml/l	99.99	$2.2 \times 10^2$	94	$4.9 \times 10^3$
Testigo sin tratar	0	0	$8.5 \times 10^7$	0	$3.7 \times 10^6$ (vs. permanganato) $8.7 \times 10^4$ (vs. sol. de yodo) $1.3 \times 10^7$ (vs. sulfato de cobre)

<sup>1</sup> Porcentaje de control =  $[(n \geq \text{de colonias en el testigo} - n \geq \text{de colonias en solución desinfectante}) * 100 / (n \geq \text{de colonias en el testigo})]$ .

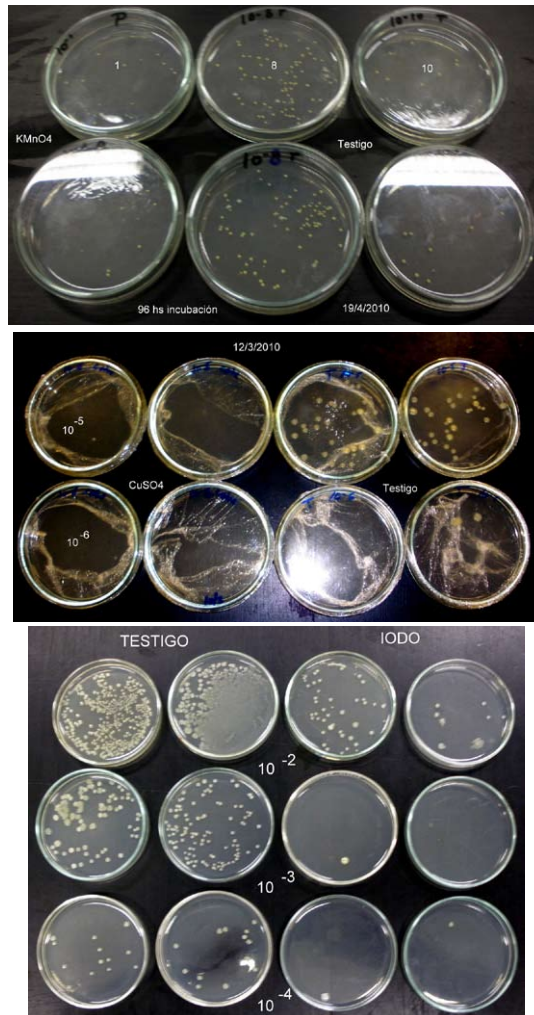
<sup>2</sup> UFC/ml = unidades formadoras de colonias por mililitro.

<sup>3</sup> Experimento 2, realizado en forma fraccionada, cada tratamiento contra el testigo.

Todos los productos mostraron un control *in vitro* superior al 94% (referido a la concentración de Cmm en el testigo sin tratar) cuando se aplicaron a una suspensión del patógeno. Sin embargo, debemos tener en cuenta que un 1% de falta de control puede significar niveles de 35000 o 4900 ufc/ml, los cuales, tratándose de una bacteria, rápidamente aumentarán exponencialmente. Por lo tanto, si bien los desinfectantes utilizados tienen acción sobre el patógeno, el inóculo que sobrevive al tratamiento continúa siendo un riesgo, lo cual explicaría los problemas en la prevención de la enfermedad en condiciones de campo por esta vía. Al no eliminar totalmente las bacterias en suspensión, los desinfectantes únicamente actuarían

enlenteciendo el desarrollo de la enfermedad y su performance dependerá de la cantidad de inóculo presente en el cultivo.

Por estos motivos el uso de desinfectantes en el agua de riego debe ser incluido en un paquete de manejo integrado de la enfermedad teniendo bien claro que, al igual que en la desinfección de inertes, existe un balance entre su capacidad de desinfección y sus efectos fitotóxicos. Además, se deberá tener en cuenta que muchos de estos productos pueden ser nocivos para el medio ambiente tanto por su capacidad de acumulación en el suelo como por su efecto en los organismos vivos en este y en el agua.



**Figura 50.** Vista del crecimiento de Cmm en placas de cultivo con y sin el agregado de desinfectantes (testigo). Experimentos de evaluación *in vitro* de productos desinfectantes. Arriba permanganato de potasio, centro sulfato de cobre y abajo solución de yodo jabonosa. (Fotos D. Maeso)



## APLICACIÓN DE INDUCTORES DE RESISTENCIA

Recientemente se han incorporado otras alternativas para el manejo de enfermedades, incluyendo al cancro bacteriano del tomate, como lo es la aplicación de sustancias que estimulan el sistema de defensa de las plantas (Walters *et al.*, 2005).

Brevemente, esta estrategia se basa en la inducción, por agentes externos (bióticos o abióticos), de mecanismos de defensa a patógenos u otros agentes extraños y se denomina genéricamente *resistencia inducida*. La resistencia inducida tiene las siguientes características:

- A) No involucra alteraciones genéticas de la planta, se trata de estimular un proceso latente o ya presente en el vegetal.
- B) Es de amplio espectro, si bien es inducida por un agente puede tener efecto sobre varios problemas sanitarios.
- C) Es sistémica, la inducción aplicada a una parte de la planta logra activar todo el vegetal.
- D) Necesita tiempo para desarrollarse, es un proceso por lo que la inducción debe ser realizada previo a la infección con el patógeno a controlar.
- E) Es de efecto prolongado, ello permite en

algunos casos su aplicación en semillas o etapas muy tempranas del cultivo.

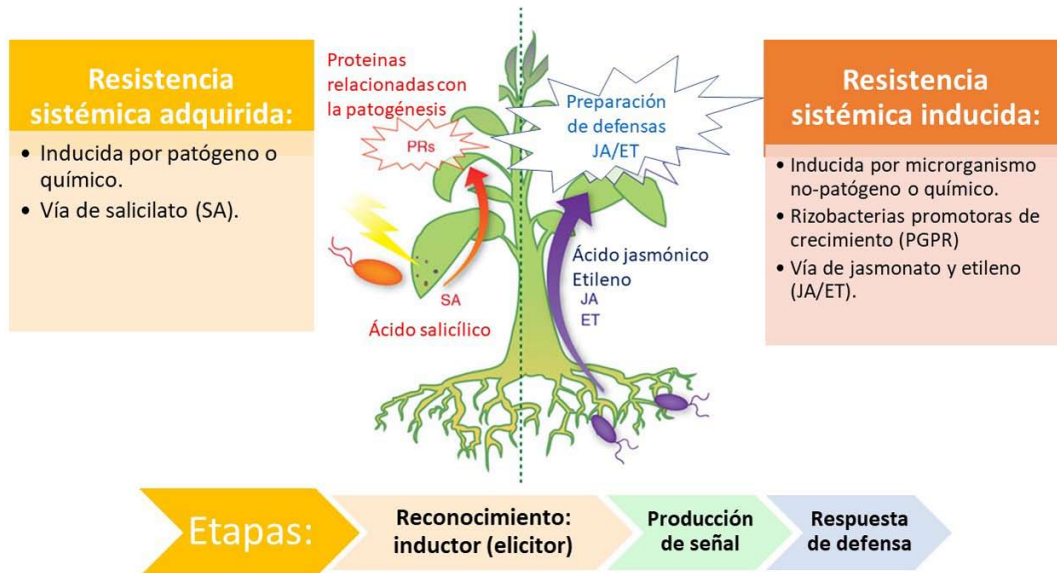
El agente inductor no es en sí mismo antimicrobiano, solamente activa el proceso, es la respuesta inducida en la planta la que actúa sobre el patógeno.

Consta de tres etapas: reconocimiento del inductor, producción de una señal y producción de la respuesta de defensa (Figura 43). Se describen dos mecanismos según sea la señal derivada del reconocimiento del inductor: 1) Resistencia sistémica adquirida, o SAR por su sigla en inglés (*systemic acquired resistance*), que implica la producción de ácido salicílico (SA) y 2) Resistencia sistémica inducida, o ISR por su sigla en inglés (*induced systemic resistance*), que implica la producción de ácido jasmónico o etileno (Figura 43).

En la SAR el inductor generalmente es un patógeno y en la ISR, microorganismos no patógenos o rizobacterias promotoras de crecimiento. El mayor conocimiento de estos procesos ha permitido el descubrimiento de compuestos naturales o sintéticos (denominados *felicitores*) que producen las mismas respuestas, en el cuadro 13 se listan algunos ejemplos de elicitores bióticos o abióticos con efecto probado de inducción de resistencia frente a patógenos vegetales.

**Cuadro 13.** Algunos compuestos naturales o sintéticos usados como elicitores de resistencia frente a patógenos vegetales (en negrita se marcan los evaluados en INIA para Cmm).

Bióticos	Abióticos
Extractos de plantas, levaduras, algas	Silicio
Extra polisacáridos de bacterias	±cido salicílico
<b>Rizobacterias u hongos promotores de crecimiento (<i>B. subtilis</i>).</b>	±cido DL-β-aminobutírico (BABA)
Cepas avirulentas	<b>Quitosano</b>
Patógenos inactivados	Cloruro férrico
	Fosfito de K dibásico,
	<b>Acibenzolar-S-metilo (ASM)</b>
	±cido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA)
	±cido jasmónico (AJ)
	<b>Ácidos grasos, hidrácidos.</b>



**Figura 51.** Esquema simplificado de funcionamiento de la inducción de resistencia (ampliado y modificado de Pieterse *et al.*, 2009).

La respuesta de defensa puede ser la producción de especies activas de oxígeno (involucradas en la producción de reacciones de hipersensibilidad), fitoalexinas (sustancias antimicrobianas que ayudan a limitar la dispersión del patógeno), reforzamiento de la pared celular, síntesis de enzimas de defensa y/o la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, las cuales sí tienen propiedades antimicrobianas. (Lamb y Dixon, 1997; Mehdy *et al.*, 1996; Ryals *et al.*, 1996).

El metil S acibenzolar (ASM, disponible comercialmente en algunos países con el nombre de Actigard® o Bion®), el quitosano (Bio-rend® y otros), los fosfitos y los hidrácidos cítricos (Bio-D®) han sido evaluados específicamente para cancro bacteriano del tomate (Werner *et al.*, 2002; Soyly *et al.*, 2003a; 2003b; Baysal *et al.*, 2003; 2005; Huang *et al.*, 2012; Scortichini, 2016).

Entre los inductores bióticos se encuentran: *Bacillus subtilis*, rizobacteria baciliforme, gram positiva, aeróbica promotora del crecimiento vegetal (PGPR, plant growth promoting rhizobacteria) y de la resistencia

sistémica inducida, que, además actúa directamente sobre el patógeno compitiendo por nutrientes y espacio y produciendo sustancias antimicrobianas (antibióticos, sideróforos), (Scortichini, 2016). Se ha demostrado que *B. subtilis* produce además un biofilm en las raíces de tomate que es activo en la defensa frente a fitopatógenos (Pal Bais *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2012; 2013).

Varios son los productos formulados en base a esta rizobacteria (Serenade®, Kodiak®, Nacillus®, Baktillis®, entre otros) comercializados internacionalmente, principalmente para control de enfermedades causadas por hongos.

Buscando incorporar esta estrategia al manejo integrado del cancro bacteriano del tomate en Uruguay durante varios años se realizaron ensayos en INIA Las Brujas cuyos resultados se describirán resumidamente. En ellos se estudió su eficiencia en el control según la forma de aplicación (foliar o riego), la interacción con la vía de inoculación del patógeno, y el tiempo entre aplicación e inoculación con el patógeno.

Los experimentos fueron conducidos en plantas cultivadas en macrotúneles (16 m x 3,3 m, en suelo o en bolsas-maceta), al aire libre o en cámara de crecimiento (Figura 52). En todos se utilizó un diseño de bloques al azar con un mínimo de cuatro repeticiones (dependiendo del ensayo) y diez plantas por lo menos cada una. La semilla utilizada fue sometida a tratamiento térmico, y, dependiendo del experimento, se utilizó suelo con historia previa de la enfermedad e inoculación de todas las plantas o sólo de aquellas en las cabeceras de las filas. Los cultivos en general evolucionaron entre setiembre y marzo y correspondían a variedades híbridas para mercado de uso corriente en nuestra zona (Cetia, Michele).

La evolución de la enfermedad fue evaluada periódicamente registrando incidencia (porcentaje de plantas con síntomas) y severidad (intensidad de los síntomas según una escala 0-5, Figura 49). Con la información registrada en los experimentos de larga duración se calculó el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ADCPE, ya descrita en secciones anteriores).

Al fin de los cultivos los tallos de las plantas fueron cortados longitudinalmente para evaluar la presencia de alteraciones en los vasos (incidencia), y en algunos casos, su intensidad. La infección por Cmm fue confirmada mediante pruebas serológicas.



**Figura 52.** Vista general de experimentos para la evaluación de inductores de resistencia en INIA Las Brujas: arriba derecha en macrotúneles (derecha) y al descubierto (izquierda) en suelo, arriba izquierda en macrotúneles en macetas bolsa y abajo en cámara de crecimiento. (Foto D. Maeso)

### Evaluación de inductores en aplicación foliar

La eficacia de los inductores en aplicaciones foliares fue evaluada en varios experimentos durante 2011-2016 (Maeso *et al.*, 2012d; 2013; 2015e; 2015f; 2017a; 2017b). En los extremos de cada fila de cada parcela se colocaron plantas infectadas artificialmente las cuales oficiaron de fuente de inóculo para la diseminación de la enfermedad.

En un primer grupo de ensayos, se evaluaron: ASM (Bion), fosfito de cobre (Afital Cu), y quitosano con sulfato de cobre pentahidratado (Biorend Cu) en cultivos al aire libre (2012-13 y 2013-14) y bajo cubierta (2011-12) (cuadro 14). Las aplicaciones se realizaron cada 10 días (6-7 veces) comenzando 10-15 días después del trasplante.

En el cuadro 15 se muestran los resultados más destacados obtenidos en las temporadas 2011-12 y 2012-13.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para la incidencia (datos no presentados) lo cual indicaría que la aplicación foliar de estos productos no previene la infección con Cmm.

Sí se encontraron diferencias en severidad (cuadro 15) por lo cual se puede suponer que atenúan la evolución de la enfermedad enlenteciendo el desarrollo de los síntomas. La menor severidad de la enfermedad se observó en las plantas tratadas con Biorend Cu, Bion y los fungicidas cúpricos (tratamiento estándar para prevención de bacteriosis en tomate) tendencia que también se encontró en las lesiones en los vasos.

A diferencia de lo encontrado en la aplicación por el agua de riego (ver sección sobre desinfección de agua de riego), los EM (microorganismos efectivos) no mostraron diferencias con el testigo sin tratar, por lo que, a pesar de algunos testimonios recogidos por parte de productores, esa no sería la forma indicada de aplicación de este producto para el manejo de cancro bacteriano.

**Cuadro 14.** Tratamientos evaluados como aplicaciones foliares en los experimentos 2011-2014.

Nombre Comercial	Principio Activo	Dosis/100 l
1. Bion 500 WG	Metil acibenzolar S	5 g
2. Afital Cobre	Anhídrido fosfórico (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ): 25 % Cobre (Cu): 5%	250 ml
3. Biorend Cobre	Quitosano (1,9 % p/v) y Sulfato de Cobre Penta hidratado (30,5% p/v)	150 ml
4. EM	Microrganismos efectivos (mezcla de levaduras y lactobacillus, bacterias fotosintéticas o fototrópicas.	2 l
5. Biorend cobre	Quitosano (1,9 % p/v) y Sulfato de Cobre Penta hidratado (30,5% p/v)	250 ml
6. Kop-hidróxido/ Fanavid	Hidróxido de cobre/ oxiclورو de cobre	300 g
7. Testigo sin tratar.	---	---

**Cuadro 15.** Evaluación del uso de aplicaciones foliares de inductores de resistencia en tomate (temporadas 2011-12 y 2012-13) en el manejo de cancro bacteriano del tomate.

Nombre Comercial	ADCPE severidad <sup>1</sup>		Incidencia. Porcentaje de plantas con distorsión en vasos <sup>2</sup>	
	2011-12	2012-13	2011-12	2012-13
1. Bion 500 WG	165 ab <sup>2</sup>	982 ab	68 ab	30 b
2. Afital Cobre	130 a	1535 b	70 ab	20 ab
3. Biorend Cobre	122 a	715 a	63 a	0 a
4. EM	198 bc	1599 b	92 b	13 ab
6. Kop-hidróxido/	138 ab	1119 ab	75 ab	13 ab
7. Testigo sin tratar.	222 c	1727 b	69 ab	25 b

<sup>1</sup> ADCPE = +rea debajo de la curva de progreso de la enfermedad, severidad. Suma de los productos entre grados de severidad por intervalo de tiempo entre evaluaciones.

<sup>2</sup> Los valores seguidos por la misma letra en cada columna no difieren significativamente por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 1%.

<sup>3</sup> Porcentaje de plantas que presentaban vasos distorsionados a fin del ensayo.

En un segundo grupo de experimentos, se incluyeron productos a base de *Bacillus subtilis*, hidrácido de ácido cítrico (Bio D), y alginato de cobre (Tixan) junto a algunos de los tratamientos evaluados en los experimentos previos (cuadro 16). Se realizaron en total tres ensayos, dos en 2014-15, (en INIA Las Brujas y en un invernáculo comercial) y uno en 2015-16 (en INIA Las Brujas). Las aplicaciones fueron efectuadas cada

7-10 días comenzando 10-15 días pos trasplante (preventivas) y a la semana de la inoculación (pos-inoculación). El número de aplicaciones de los tratamientos preventivos fue de 14, 7, 9 (experimentos 2014-15 LB, productor, 2015-26 LB, respectivamente) y de 7, 3, 5 en los pos-inoculación (pero previo al desarrollo de síntomas, experimentos 2014-15 LB, productor, 2015-26 LB, respectivamente).

**Cuadro 16.** Tratamientos evaluados como aplicaciones foliares de inductores de resistencia en tomate (2014-2016) para el manejo de cancro bacteriano del tomate.

Tratamiento	Principio activo	Dosis/100 l
1. Nacillus	<i>Bacillus subtilis</i> y otros	Preventiva 300 g
2. Nacillus	<i>Bacillus subtilis</i> y otros	Pos inoculación 500 g
3. Baktillis	<i>Bacillus subtilis</i>	Preventiva 300 ml
4. Baktillis	<i>Bacillus subtilis</i>	Pos inoculación 500 ml
5. HidroCup 77%	Hidróxido de cobre	300 g
6. Biorend cobre	Quitosano y Sulfato de Cobre Penta hidratado	150 ml
7. Bion	Acibenzolar S metil	5 g
8. Tixan <sup>1</sup>	Alginato de cobre	200 ml
8. Bio D <sup>2</sup>	Quelato de hidrácidos de ácido cítrico	500 ml
9. Testigo sin tratar		

<sup>1</sup> Solo en INIA Las Brujas 2014-2015

<sup>2</sup> Solo en invernáculo comercial 2014-2015 e INIA Las Brujas 2015-2016

En el cuadro 17 se muestran los resultados obtenidos. Al igual que en la etapa anterior, únicamente se pudo disminuir la severidad de los síntomas frente al testigo sin tratar, destacándose los tratamientos a base de *Bacillus* spp. luego de la inoculación (mayor dosis), quisosano + sulfato de cobre, metil acibenzolar S e hidróxido de cobre.

Un aspecto observado en los experimentos, y para considerar en el empleo de sustancias inductoras de resistencia a nivel comercial, es el potencial efecto negativo sobre los

rendimientos. Se reconoce que la inducción de resistencia es un proceso que consume energía de la planta (Pal Bais *et al.*, 2004), existiendo información específica de disminución de rendimientos provocada por aplicaciones de metil acibenzolar S en tomate (Louws *et al.*, 2001).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que el número de aplicaciones realizadas en nuestros trabajos experimentales fue excesivo ya que el objetivo principal fue conocer si estos productos realmente podían ser considerados en el manejo de la enfermedad.

**Cuadro 17.** Evaluación del uso de aplicaciones foliares de inductores de resistencia en tomate (temporadas 2014-15 y 2015-16) en el manejo de cancro bacteriano del tomate, valores de +rea Debajo de la Curva de Progreso de la Enfermedad (severidad)<sup>1</sup>.

Tratamiento	Modalidad de cultivo, ubicación y temporada		
	Aire libre INIA LB (2014-2015)	Invernáculo Comercial (2014-2015)	Aire Libre INIA LB (2015-2016)
Nacillus (preventivo)	1139 bcd <sup>2</sup>	295 abc	1589 bc
Nacillus 2 (pos-inoculación)	897 b	180 a	1590 bc
Baktillis (preventivo)	1038 bc	297 abc	1560 bc
Baktillis (pos-inoculación)	897 b	189 ab	1745 c
Hidróxido de cobre	529 a	409 c	1128 a
Biorend Cu	921 b	258 abc	1462 bc
Bion	923 b	204 ab	1307 ab
Tixan	1252 cd	--	--
Bio D	---	385 bc	1583 bc
Testigo sin tartar	1349 d	429 c	1543 bc

<sup>1</sup> ADCPE = +rea debajo de la curva de progreso de la enfermedad, severidad. Suma de los productos entre grados de severidad por intervalo de tiempo entre evaluaciones.

<sup>2</sup> Los valores seguidos por la misma letra en cada columna no difieren significativamente por la prueba de rangos múltiples de Duncan al 1%.

### Evaluación en aplicación en riego

Para evaluar el efecto de los inductores de resistencia sobre cancro bacteriano realizando la aplicación en riego a la zona radicular se llevaron a cabo cuatro experimentos (Maeso *et al.*, 2015a; 2015d; 2017c): dos en 2015 en cámara de crecimiento (26 °C, 16 horas luz/8 horas de oscuridad) y en invernáculo climatizado (18-24 °C) en macetas de 1000 ml, y dos en 2016 en macrotúneles en macetas-bolsas de 20 l (Figura 53).

Las plantas fueron inoculadas al trasplante mediante corte de raíces e inmersión en 5 ml de una suspensión de  $10^8$  UFC/ml de Cmm en agua estéril (cepa LB17 de Cmm de la colección de INIA Las Brujas, Figura 23). Las plantas se cubrieron con bolsas plásticas individualmente en las 24 horas posteriores a la inoculación.

Se usó un diseño de bloques al azar con tres (2015) o cuatro repeticiones (2016), evaluándose periódicamente el porcentaje de plantas enfermas, y, al final de los experimentos, el estado de los vasos y médula en corte longitudinal de tallos.

Las aplicaciones fueron realizadas mediante riego usando un volumen de 10 ml de la solución del producto/planta en las almácigas y macetas de 1000 ml, y de 50 ml en las macetas de 20 l.

En los cuadros 18 y 19 se muestran los tratamientos evaluados (ver composición de los productos en cuadro 16) en los experimentos en 2015 y algunos de los resultados obtenidos. En esta oportunidad se utilizó la formulación de Biorend que contenía solamente quitosano, y se realizaron tres aplicaciones pre y tres pos-inoculación de todos los productos.



**Figura 53.** Vista general de los experimentos de evaluación de inductores de resistencia aplicados por riego en el manejo de cancro bacteriano (de izquierda a derecha: cámara de crecimiento, invernáculo climatizado y macrotúneles). (Fotos D. Maeso)

**Cuadro 18.** Evaluación de compuestos inductores de resistencia aplicados en riego en cámara de crecimiento en 2015.

Tratamientos y dosis por litro de agua	Síntomas externos		Síntomas internos	
	Días entre inoculación-aparición <sup>1</sup>	Incidencia 17 dpi <sup>2</sup>	Incidencia 28 dpi <sup>3</sup>	Severidad <sup>4</sup>
Testigo inoculado	15 a <sup>5</sup>	100 c	75 cd	2,3 b
Sin inocular	---	0 a	0 a	0,0 a
Nacillus 10g	19 ab	58 bc	42 bc	1,3 ab
Baktillis 10 ml	18 ab	42 ab	58 cd	1,3 ab
EM 80 ml	20 b	25 ab	83 d	1,7 ab
Biorend 20 ml	20 b	42 ab	17 ab	0,3 a
Bio-D 20 ml	19 ab	25 ab	42 bc	1,0 ab
Sulfato de cobre 0,1 g	17 ab	75 bc	75 cd	2,3 b

<sup>1</sup> Promedio de días desde inoculación a comienzo de síntomas.

<sup>2</sup> Porcentaje de plantas enfermas (incidencia) a 29 dpi (días pos inoculación).

<sup>3</sup> Porcentaje de plantas con vasos amarrados en cortes longitudinales al final del experimento.

<sup>4</sup> Severidad de la distorsión, intensidad en una escala 0 = sin síntomas, 1= leves, 2= moderados y 3= fuertes.

<sup>5</sup> Los datos seguidos por igual letra no difieren significativamente al 1% según prueba de rangos múltiples de Duncan

**Cuadro 19.** Evaluación de compuestos inductores de resistencia aplicados en riego en invernadero climatizado en 2015.

Tratamientos y dosis por litro de agua	Síntomas externos		Síntomas internos	
	Días entre inoculación-aparición <sup>1</sup>	Incidencia 29 dpi <sup>2</sup>	Incidencia 38 dpi <sup>3</sup>	Severidad <sup>4</sup>
Testigo inoculado	22 a <sup>5</sup>	92 c	92 c	2,1 b
Sin inocular	--	0 a	0 a	0,0 a
Nacillus 10g	27 ab	91 c	100 c	1,4 b
Baktillis 10 ml	24 ab	100 c	100 c	2,2 b
EM 80 ml	23 ab	89 bc	89 c	1,6 b
Biorend 20 ml	26 ab	89 bc	89 c	1,2 b
Bio-D 20 ml	28 b	53 b	44 b	1,3 b
Sulfato de cobre 0,1 g	22 a	81 bc	92 c	1,9 b

<sup>1</sup> Promedio de días desde inoculación a comienzo de síntomas.

<sup>2</sup> Porcentaje de plantas enfermas (incidencia) a 29 dpi (días pos inoculación).

<sup>3</sup> Porcentaje de plantas con vasos amarrados en cortes longitudinales a 38 dpi.

<sup>4</sup> Severidad de la distorsión, intensidad en una escala 0 = sin síntomas, 1= leves, 2= moderados y 3= fuertes.

<sup>5</sup> Los datos seguidos por igual letra no difieren significativamente al 1% según prueba de rangos múltiples de Duncan



En el cuadro 20 se muestran los resultados obtenidos en los dos experimentos en macro túneles en 2016 (diciembre 2015-febrero 2016 y febrero-abril 2016). Los tratamientos evaluados fueron los mencionados anteriormente con igual metodología, habiéndose realizado tres y dos aplicaciones semanales pre-inoculación y tres y tres pos-inoculación (ensayos 1 y 2 respectivamente). Como se puede apreciar ninguno de los tratamientos logró disminuir la proporción de plantas enfermas frente al testigo sin tratar. Solamente Nacillus y Biorend en el ensayo 1 y Bio D en ensayo 2 se diferenciaron estadísticamente del resto de los tratamientos en algunas de las evaluaciones.

Considerando los resultados de todos los experimentos en su conjunto la aplicación de inductores de resistencia en riego no mostró un gran efecto sobre el desarrollo de la enfermedad derivado de la inoculación mediante el corte de raíces.

Sin embargo, dado que estos fueron realizados en condiciones extremadamente favorables para la enfermedad (inoculación de todas las plantas) podemos pensar que el riego con productos como Bio D, EM y Biorend podría tener potencial para integrarse al manejo de esta enfermedad frente a situaciones no tan extremas.

Algo similar se encontró en experimentos posteriores (trabajo de tesis de grado de L. Goncalvez), en los cuales tampoco ninguno de los productos evaluados (Bio-D, Biorend y fungicidas cúpricos) en dos formas de aplicación (al follaje o en riego) y frente a dos métodos de inoculación (por corte de raíces o de hojas), se diferenciaron del testigo inoculado sin tratar cuando se generaron fuertes ataques. Sin embargo, cuando el método de inoculación generó ataques no muy severos, los productos previnieron mejor la enfermedad cuando eran aplicados en la misma parte de la planta en que se realizaba la inoculación (información no publicada, L. Goncalvez com. pers.).

**Cuadro 20.** Evaluación de productos aplicados en riego a la raíz en macrotúneles, INIA LB 2016.

Tratamiento	Ensayo 1 dic 2015-feb 2016		Ensayo 2 feb-abril 2016	
	Incidencia <sup>1</sup>		Días a síntomas <sup>2</sup>	Incidencia
	20 dpi	25 dpi		
Testigo inoculado	57 b <sup>3</sup>	77 b	24 bc	84 bc
Testigo sin inocular	0 a	0 a	---	0 a
Nacillus	35 ab	75 b	19 a	100 c
Baktillis	58 b	83 b	20 a	98 c
EM	53 b	88 b	19 a	95 c
Biorend	33 ab	88 b	19 a	95 c
Bio D	74 b	100 b	27 c	70 b
Sulfato de cobre	70 b	100 b	20 a	98 c

<sup>1</sup> Porcentaje de plantas enfermas (incidencia) a 20 y 25 dpi (días pos inoculación).

<sup>2</sup> Promedio de días desde inoculación a comienzo de síntomas.

<sup>3</sup> Los datos seguidos por igual letra no difieren significativamente al 1% según prueba de rangos múltiples de Duncan

Esto último nos sugeriría que sería conveniente realizar la aplicación de estos productos durante el almácigo y la primera etapa a las raíces por riego y luego pasar a la aplicación foliar. Pensando en cual sería la forma más probable que se registre la infección, daños a las raíces al trasplante y al follaje en labores posteriores.

### **Estudios a nivel bioquímico de la respuesta a la aplicación de inductores**

Dados los resultados obtenidos con el uso de inductores de resistencia frente a Cmm estimamos necesario aportar información adicional en cuanto a los procesos involucrados de forma de integrarlos al manejo práctico en condiciones de cultivo.

Para ello gracias a la cooperación de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Química se buscó evaluar la evolución de la actividad de algunas enzimas vinculadas con el proceso, específicamente con algunos de los productos evaluados (quitosano y acibenzolar-S-metil) y relacionarla con la evolución de la enfermedad.

En un primera etapa en determinaciones en muestras de campo se determinó que la aplicación de quitosano y acibenzolar-S-metil aumentó la actividad de glucanasa y quitinasa, las cuales no fueron influenciadas por la inoculación con el patógeno (se tomaron muestras en plantas inoculadas y sin inocular) (Menafrá *et al.*, 2019).

En un segundo grupo de experimentos se buscó conocer los efectos sobre esas enzimas y la enfermedad realizando la inoculación por corte de hoja luego de 1, 4 y 9 días luego de la aplicación, esta vez específicamente de quitosano.

De igual forma a lo encontrado en el experimento de campo se observó un aumento en la actividad de quitinasa a las 24 horas de la aplicación de quitosano al follaje. Si bien no se encontraron diferencias en las mediciones de las actividades enzimáticas al variar el tiempo entre aplicación-inoculación, se re-

gistró menor intensidad de ataque cuando se realizó la inoculación nueve días después de la aplicación (Menafrá *et al.*, 2019).

A pesar de que estos resultados no explican totalmente qué enzimas están involucradas en el proceso, refuerzan la idea que para que la aplicación de estos productos sea efectiva debe ser realizada con antelación a la infección (en este caso nueve días). Será necesario realizar pruebas con períodos más extendidos entre aplicación e inoculación para conocer si es necesario y cada cuánto se deberá repetir la aplicación de estos productos.

### **Consideraciones respecto al uso de productos inductores de resistencia en el manejo de cancro bacteriano**

De acuerdo con la información experimental colectada durante estos años se puede concluir que los productos inductores de la resistencia son una herramienta útil que puede contribuir con el manejo integrado de la enfermedad. Su eficacia dependerá entre otras cosas de:

- a) tiempo mínimo entre aplicación e inoculación. Es importante prever la aplicación por lo menos nueve días previo a la entrada del patógeno que puede ser foliar (desbrotes, deshojes, salpicado) o por raíces (daños en trasplante, riego)
- b) intensidad de ataque, si la evolución de este es rápida y muy severa, estos productos han demostrado no ser efectivos por lo que deberán formar parte de un manejo integrado preventivo con otras medidas de respaldo.

### **APLICACIONES FOLIARES CON PRODUCTOS CÚPRICOS Y A BASE DE ZINC**

La aplicación foliar de productos a base de cobre (caldo bordelés, oxiclورو, hidróxido) es de uso frecuente y tradicional para la prevención de enfermedades bacterianas en la producción de tomate en nuestro país, fundamentalmente al aire libre.

Su eficiencia en el manejo de cancro bacteriano ha sido reportada en múltiples trabajos (Gleason *et al.*, 1993; Hausbeck *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2002; De León *et al.*, 2008; Milijašević *et al.*, 2009), los cuales sostienen que, si bien no impiden el avance de la enfermedad, la enlentecen y atenúan su intensidad, siempre dependiendo de cómo ocurre la infección. Si esta ocurre mediante heridas de desbrote o deshoje, las cuales rápidamente introducen al patógeno en el sistema vascular, su efecto es menor o nulo (De León *et al.*, 2008; Theodoro y Maringoni, 2000). Por esa razón estas aplicaciones serían más efectivas en cultivos para industria donde no se realizan labores en follaje.

La recomendación para cultivos de mercado es que estas aplicaciones se realicen temprano en la estación y así evitar la formación de altas concentraciones del patógeno sobre el follaje y luego sean realizadas antes de labores que impliquen heridas.

Se ha comprobado que la mezcla de estos productos con fungicidas del grupo de ditiocarbamatos (mancozeb) y otros compuestos (hidroxiquinolina) mejoran su performance al formar quelatos que impiden su pérdida de actividad al combinarse con sustancias orgánicas presentes en el follaje (Hausbeck *et al.*, 2000; De León *et al.*, 2008; Milijašević *et al.*, 2009).

En la actualidad el uso de cúpricos para el manejo de enfermedades en vegetales está siendo cuestionado debido a su fitotoxicidad (visible o encubierta enlenteciendo el desarrollo), impacto ambiental (derivado de la acumulación en suelo) y al desarrollo de resistencia en bacterias fitopatógenas por lo que se plantean diversas alternativas.

### **ANTIBIÓTICOS**

La aplicación de antibióticos para el control de enfermedades bacterianas en vegetales comenzó en los años 50 y tuvo su auge en los 80 con la difusión de productos a base de estreptomina, tetraciclina y terramicina. Actualmente está prohibida (Unión Europea)

o limitada a las primeras etapas del cultivo (EE. UU.) en muchas partes del mundo principalmente para evitar el desarrollo de resistencia bacteriana (las bacterias intercambian información genética a través de plásmidos y allí se encuentran los genes de resistencia a antibióticos).

Otras limitantes de este tipo de productos es su inestabilidad en caldo, mucho menor que la de fungicidas, muy dependiente de la calidad del agua (pH, presencia de materia orgánica, calcáreo, etc.) y la poca estabilidad sobre follaje (si bien tienen capacidad sistémica).

El efecto *in vitro* o *in vivo* de antibióticos frente a Cmm ha sido evaluado en múltiples trabajos (Theodoro y Maringoni, 2000; Hausbeck *et al.*, 2000; De León *et al.*, 2008; Milijašević *et al.*, 2009,) obteniéndose el mejor control con aplicaciones de sulfato de estreptomina, solo o en mezcla con cúpricos.

En Uruguay al momento los productos en base antibióticos registrados son Kasumin (clorhidrato de kasugamicina) y Foliomicina (sulfato de estreptomina) pero su uso está prohibido para los cultivos destinados a la producción integrada (González *et al.*, 2018).

### **ACEITES ESENCIALES Y PRODUCTOS NATURALES**

La aplicación foliar de antibióticos y de cúpricos está siendo cuestionada, prohibida o limitada actualmente por múltiples razones (resistencia, fitotoxicidad, acumulación en suelo, necesidad de aplicaciones periódicas reiteradas) además de que su efectividad no es alta. Como alternativas, principalmente para los cultivos orgánicos, se han evaluado sustancias naturales como propóleo (Basim *et al.*, 2006; González Rabellino *et al.*, 2009, Zignago Paulos *et al.*, 2010), extractos vegetales y aceites esenciales de orégano, tomillo, mayorana, eneldo, entre otros. La mayor parte de la información es resultado de pruebas *in vitro* (Daferera *et al.*, 2003; Borboa-Flores *et al.*, 2010) y solo en algunos casos

los productos fueron evaluados en planta o como desinfección de semillas.

Se han publicado resultados promisorios de aplicaciones foliares con extractos de dientes de ajo (1%) y de frutos de *Ficus carica* (una especie de higuera, 30%), principalmente el primero, a pesar de que su permanencia en follaje y efecto es menor a la de los compuestos cúpricos (Quatrucci y Ballesstra, 2006; Balestra *et al.*, 2009).

Varios extractos vegetales (orégano, tomillo, cítricos, canela, eneldo, entre otros) también han sido evaluados como desinfectantes de semillas, pero algunos han mostrado efectos fitotóxicos disminuyendo el poder germinativo (Van der Wolf *et al.*, 2008; Soylu *et al.*, 2009; Kotan *et al.*, 2013; 2014).

Por el momento no se cuentan con productos comerciales de este tipo para uso a nivel de cultivo, pero seguramente, dado el volumen de investigación en el tema, surjan al corto plazo.

## CONTROL BIOLÓGICO

Existen numerosos trabajos que reportan experiencias exitosas en la prevención de cancro bacteriano utilizando controladores biológicos, muchas veces los procesos no corresponden a un solo modo de acción y se entremezclan antagonismo, producción de compuestos antimicrobianos (antibióticos, ácido cianhídrico, y otros metabolitos) y otros mecanismos como la inducción de resistencia sistémica de la planta.

Tal es el caso de microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Trichoderma herzianum*, vermicompuestos, y rizobacterias promotoras de crecimiento como *Pseudomonas* sp. (conocidas por su sigla en inglés, PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria) cuyos efectos sobre Cmm han sido probados en aplicaciones foliares previo a la inoculación por asperjado y como baño de semillas o raíces. (Boudyach *et al.*, 2001; Utkhede y Koch,

2004; Jacobsen *et al.*, 2004; Amkraz *et al.*, 2010; Takishita *et al.*, 2018).

También dentro del control biológico de Cmm se pueden mencionar los llamados *fbacteriófagos* que son virus que específicamente atacan a bacterias (Jones *et al.*, 2007; Wittmann *et al.*, 2010). Si bien esta estrategia fue descubierta a comienzos del siglo, no prosperó debido a limitaciones frente a otras alternativas (antibióticos), entre ellas poca estabilidad en follaje, alta especificidad cepa dependiente, cambios en los fagos y en el patógeno. Sin embargo, recientemente se ha recobrado el interés en el tema ya que los avances en la tecnología permiten superar algunas de sus restricciones y al desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de las bacterias fitopatógenas. Actualmente existen en los EE. UU. algunos productos comerciales formulados a base de fagos (Agriphage) y es mucho lo que se está investigando en el tema (formulaciones compuestas por varios fagos o de la enzima que actúa sobre la bacteria purificada). Por el momento no es algo de uso corriente pero seguramente se verán novedades al corto plazo.

Otra técnica que puede ser considerada dentro del control biológico es la tecnología de los microorganismos efectivos (EM o Effective Microorganisms) que fue desarrollada en Japón y se basa en una mezcla de microorganismos predominantemente anaeróbicos en un sustrato líquido rico en carbohidratos (melaza). Desafortunadamente son pocos los trabajos científicos que estudien y expliquen su acción benéfica, ya sea vía planta o suprimiendo fitopatógenos, en el 70% de las referencias se han logrado efectos positivos reduciendo la incidencia de problemas sanitarios (Olle y Williams, 2015). En Uruguay se encuentra registrado como agente de Control Biológico Microbiano, Bacteriostático, antifúngico (Registro MGAP N° 3748) y muchos agricultores lo utilizan en el cultivo del tomate en aplicaciones foliares o en riego para el manejo de cancro bacteriano, entre otros. En nuestros trabajos solamente se obtuvieron buenos resultados frente al testigo sin tratar aplicado como riego en parcelas con baja incidencia de la enfermedad.

## RESISTENCIA VARIETAL

La resistencia genética es una de las mejores medidas para el manejo de las enfermedades en tomate, sin embargo, hasta el momento no existen cultivares comerciales con resistencia a cancro bacteriano (Gleason *et al.*, 1991). La falta de información acerca del patógeno y de los mecanismos básicos de resistencia, barreras entre el tomate y las especies silvestres y la eliminación de caracteres indeseables enlentecieron el proceso.

Se han identificado fuentes de tolerancia a la enfermedad en *Solanum pimpinellifolium*, *S. habrochaites* (= *Lycopersicon hirsutum*), *S. lycopersicum* y *S. peruvianum*. En todos los casos la tolerancia es parcial permitiendo el crecimiento sistémico del patógeno en elevado título, aunque menor que en los materiales susceptibles (Thyr, 1971; Emmatty y John, 1973; 1976; Sotirova *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 2001; Sen *et al.*, 2013). Por lo tanto, se supone que la tolerancia exhibida es al desarrollo de síntomas, aún con la presencia del patógeno.

No se han encontrado genes simples R de resistencia cualitativa asociados, pero sí genes de resistencia cuantitativa en dos orígenes: *S. peruvianum* y *L. hirsutum*.

En *S. peruvianum* (acceso LA 2157) se mencionan 3-5 loci situados en los cromosomas 1, 6, 7, 8 y 10 (Sandbrink *et al.*, 1995; VanHeusden *et al.*, 1999). La utilización de esta fuente de resistencia se ha visto dificultada por los problemas en la supervivencia de los híbridos con *S. lycopersicum* lo cual obliga al uso de sofisticadas técnicas de laboratorio.

En *L. hirsutum* (acceso LA407) se han caracterizado dos genes que brindan resistencia parcial y están situados en los cromosomas 2 y 5: Rcm 2.0 y Rcm 5.1 (Francis *et al.*, 2001; Kabelka *et al.*, 2002; Bae *et al.*, 2015). Rcm2 está ubicado en la misma región que los genes involucrados en la madurez y morfología del tejido vascular y está relacionado con menor succulencia del tallo y madurez temprana del tejido vascular (Coaker *et*

*al.*, 2002). Esto explicaría algunos aspectos vinculados al desarrollo de la enfermedad, como, que la evolución y la severidad de los síntomas es menor en plantas maduras (Chang *et al.*, 1992b; Sharabani *et al.*, 2013). Rcm 5.1 se encuentra en el cromosoma 5 y si bien en un principio se pensó que era similar al gen Pto, que confiere resistencia a peca bacteriana y que actuaba a través del mecanismo clásico de respuestas de defensa (Coaker *et al.*, 2002), esto ha sido rechazado (Coaker y Francis, 2004).

De todas formas, al tratarse de una herencia compleja poligénica, aditiva, parcial y asociada con caracteres indeseables, la obtención de variedades comerciales de *S. lycopersicum* continúa siendo difícil.

Recientemente se ha reportado el buen desempeño de plantas genéticamente modificadas frente a bacterias fitopatógenas principalmente gram negativas. En INIA hemos realizado algunas pruebas con materiales modificados del cultivar Milongón desafiándolos con Cmm pero por el momento no se han obtenido resultados concluyentes para este patógeno, sí con otras bacterias fitopatógenas de tomate y papa (Dalla Rizza *et al.*, 2015; Perdomo Ferrando *et al.*, 2017).

## RECOMENDACIONES PARA EL MANEJO INTEGRADO DE CANCRO BACTERIANO DEL TOMATE

En base a lo que hemos estado desarrollando en las secciones anteriores y al estado del conocimiento actual podemos proponer resumidamente las siguientes recomendaciones para realizar un manejo integrado de esta enfermedad.

Es muy importante que tengamos en cuenta que el manejo será siempre buscando la prevención, en primer lugar, evitando que ingrese al cultivo, luego evitando la diseminación, atenuando pérdidas económicas y por último evitando su diseminación a cultivos futuros. Siguiendo ese razonamiento y en base a la

disponibilidad en nuestro medio sugerimos las siguientes medidas, cuyos detalles ya fueron desarrolladas en esta publicación respetando las recomendaciones de forma de evitar inconvenientes:

- 1) asegurar la sanidad de la semilla a utilizar y en lo posible someterla a una desinfección ya sea con hipoclorito de sodio o baño en agua caliente.
- 2) desinfección de equipos, herramientas y demás materiales inertes con solución de hipoclorito de sodio o amonio cuaternario.
- 3) disminuir el riesgo de permanencia del patógeno en restos, inertes y suelo, retirando restos, enterrándolos para su degradación, rotando el lugar de cultivo, realizando abonos verdes y solarizando cuando sea posible.
- 4) prevenir la diseminación por agua de riego, comprobando su calidad, ajustando su pH, no excediéndose en los volúmenes de agua en cada riego y si fuera necesario desinfectarla con los productos mencionados.
- 5) prevenir la diseminación por labores que impliquen heridas a las plantas realizándolas en forma correcta y en tiempo y con una adecuada desinfección de las herramientas de corte.
- 6) aplicación preventiva de inductores de resistencia y otros, tomando en cuenta los momentos y forma en la que puede realizarse la infección al cultivo en la selección de los productos, momento y forma de aplicación. En el caso de los inductores es recomendable realizarla al menos nueve días previo al trasplante y a la realización de labores que impliquen heridas.
- 7) la aplicación de cúpricos al follaje, a pesar de sus desventajas, por el momento continúa siendo una de las medidas a considerar, por lo menos en almácigo y en las primeras etapas del cultivo trasplantado.
- 8) eliminación diaria de plantas afectadas en sus etapas iniciales. Es importante que sea realizada de manera de evitar contagios y, tener en cuenta que, como se mencionó en el texto, las plantas asintomáticas también pueden ser fuente de bacterias.

Finalmente volvemos a enfatizar que estas medidas sólo son efectivas si son realizadas en conjunto y prestando atención a todos los detalles explicados.

Seguramente en el futuro surjan nuevas alternativas que faciliten el manejo, pero estimamos que la forma de implementarlas deberá ser en el conjunto de un manejo integrado.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALVAREZ, A.M.; DERIE, M.; BENEDICT, A.; GABRIELSON, R.** 1993. Characteristics of a monoclonal antibody to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 83(12): 1405
- ALVAREZ, A.M.** 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial disease. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 339-366
- ALVAREZ, A.M.; KANESHIRO, W.S.; VINE, B.G.** 2005. Diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in tomato seed: What is the significance? *Acta Horticulturae*, 695:205-214
- AMKRAZ, N.; BOUDYACH, E.H.; BOUBAKER, H.; BOUIZGARNE, B.; AIT BEN AOUMAR, A.** 2010. Screening for fluorescent pseudomonades from the rhizosphere of tomato, for antagonistic activity toward *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26:1059-1065
- ANTONIOU, P.P.; TJAMOS, E.C.; PANAGOPOULOS, G.,** 1995. Use of soil solarization for controlling bacterial canker of tomato in plastic houses in Greece. *Plant Pathology*, 44: 438-447
- ARBOLEYA, J.** 2018. Solarización: Una técnica de manejo integrado de malezas y plagas en horticultura. Montevideo: INIA. 84 p. (Serie Técnica; 245)
- BAE, C.; HAN, S.W.; SONG, Y.R.; KIM, B.Y.; LEE, H.J.; LEE, J.M.; YEAM, I.; HEU, S.; OH, C.S.** 2015. Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theoretical Applied Genetics*, 128:1219-1229
- BALAJI, V.; MAYROSE, M.; SHERF, O.; JACOB-HIRSCH, J.; EICHENLAUB, R.; IRAKI, N.; MANULIS-SASSON, S.; REHAVI, G.; BARASH, I.; SESSA, G.** 2008. Tomato Transcriptional Changes in Response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Reveal a Role for Ethylene in Disease Development. *Plant Physiology*, 146:1797-1809
- BALESTRA, G.M.; HEYDARI, A.; CECARELLI, C.; OVIDI, E.; QUATRUCCI, A.** 2009. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. *Crop Protection*, 28: 807-811
- BASIM, E.; BASIM, H.; ÖZCAN, M.** 2006. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77: 992-996
- BASU, P.K.** 1966. Conditions for symptomatological differentiation of bacterial canker, spot and speck on tomato seedlings. *Canadian Journal of Plant Science*, 46:525-530
- BASU, P.K.** 1970. Temperature, an important factor determining survival of *Corynebacterium michiganense* in soil. *Phytopathology*, 60:825-827
- BAYSAL, O.; SOYLU, E.M.; SOYLU, S.** 2003. Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, 52:747-753
- BAYSAL, O.; ZIYA GÜRSOY, Y.; HAKAN, O.; DURU, A.** 2005. Enhanced tomato resistance to bacterial canker by application of turtle oil. *Journal of General Plant Pathology*, 71:204-210
- BAYSAL-GUREL, F.; TIFFT, K.; MILLER, S.** 2009. Sensitivity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* to different disinfectants. *Phytopathology*, 99(6):S9.

- BAYSAL, O.; MERCATI, F.; IKTEN, H.; YILDIZ, R.C.; CARIMI, F.; AYSAN, Y.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A.** 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75:113-119.
- BAYSAL-GUREL, F.; LI, R.; LING, K.S.; HENDERSON, D.R.; KUROWSKI, C.; MILLER, S.** 2012. Sensitivity to mechanical transmitted pathogens to different disinfectants. Proceedings of the 27th Annual tomato diseases workshop. Ohio State University.
- BELFRY, K.D.; TRUEMAN, C.; VYN, R.J.; LOEWEN, S.A.; VAN EERD, L.L.** 2017. Winter cover crops on processing tomato yield, quality, pest pressure, nitrogen availability, and profit margins. *PLoS ONE*, 12(7): e0180500.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180500>
- BELLA, P.; IALACCI, G.; LICCIARDELLO, G.; LA ROSA, R.; CATARA, V.** 2012. Characterization of atypical *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomatoes in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 94 (3):635-642
- BENHAMOU, N.** 1991. Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*: localization of some polysaccharides and hydroxyproline-rich glycoproteins in infected host leaf tissues. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 38:15-38
- BERNAL, R.** 2001. Taller final de evaluación de alternativas al bromuro de metilo en el sector hortícola de Uruguay. Montevideo: INIA. 101 p. (Serie actividades de difusión, 267)
- BERNAL, R.** 2008. Cancro bacteriano del tomate. *Revista INIA*, 16: 19-20
- BERNAL, R.** 2010. Enfermedades del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero de las zonas de Salto y Bella Unión. Montevideo: INIA. 71p. (Serie Técnica, 181)
- BIGGERSTAFF, C.M.; GLEASON, M.L.; BRAUN, E.J.** 2000. Refinement of a nondestructive tomato seed assay for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using seed fiber. *Seed Science and Technology*, 28:261-269
- BLANK, L.; COHEN, Y.; BORENSTEIN, M.; SHULHANI, R.; LOFTHOUSE, M.; SOFER, M.; SHTIENBERG, D.** 2016. Variables associated with severity of bacterial canker and wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Phytopathology*, 106:254-261
- BORBOA-FLORES, J.; RUEDA-PUENTE, E.O.; ACEDO-FÉLIX, E.; PONCE, J.F.; CRUZ-VILLEGAS, M.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J.L.; ORTEGA-NIEBLAS, M.M.** 2010. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*, 12: 539 - 547
- BOUDYACH, E.H.; FATMI, M.; AKHAYAT, O.; BENIZRI, E.; AIT BEN AOUMAR, A.** 2001. Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol Science and Technology*, 11:141-149
- BRYAN, M.K.** 1930. Studies on bacterial canker of tomato. *Journal of Agricultural Research*, 41:825-851
- BUROKIENE, D.; PULAWSKA, J.; SOBICZEWSKI, P.** 2005. Genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from Lithuania. *Phytopatologia Polonica*, 38:79-90
- CARLTON, W.M.; GLEASON, M.L.; BRAUN, E.J.** 1994. Effects of pruning on tomato plants supporting epiphytic populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 78(7):742-745



**CARLTON, W.M.; BRAUN, E.J.; GLEASON, M.L.** 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*, 88(6):525-529

**CHALUPOWICZ, L.; COHEN-KANDLI, M.; DROR, O.; EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K.H.; SESSA, G.; BARASH, I.; MANULIS-SASSON, S.** 2010. Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 100(3):252-261.

**CHALUPOWICZ, L.; ZELLERMANN, E.-M.; FLUEGEL, M.; DROR, O.; EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K.H.; SAVIDOR, A.; SESSA, G.; IRAKI, N.; BARASH, I.; MANULIS-SASSON, S.** 2012. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology*, 102(1):23-31

**CHANG, R.; RIES, S.M.; PATAKY, J.** 1991. Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81(10):1276-1281

**CHANG, R.J.; RIES, S.M.; PATAKY, J.K.** 1992a. Local sources of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology*, 82(5):553-560

**CHANG, R.J.; RIES, S.M.; PATAKY, J.K.** 1992b. Reductions in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial canker. *Plant Disease*, 76(8):804-809

**CHANG, R.J.; RIES, S.M.; PATAKY, J.K.** 1992c. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Disease*, 76(11):1150-1155

**CHEN, Y.; CAO, S.; CHAI, Y.; CLARDY, J.; KOLTER, R.; GUO, J.; LOSICK, R.** 2012. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Molecular Microbiology*, 85(3):418-430

**CHEN, Y.; YAN, F.; CHAI, Y.; LIU, H.; KOLTER, R.; LOSICK, R.; GUO, J.** 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 15(3): 848-864

**COAKER, G.L.; MEULIA, T.; KABELKA, E.A.; JONES, A.K.; FRANCIS, D.M.** 2002. A QTL controlling stem morphology and vascular development in *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon hirsutum* (Solanaceae) crosses is located on chromosome 2. *American Journal of Botany*, 89(12):1859-1866

**COAKER, G.L.; FRANCIS, D.M.** 2004. Mapping, genetic effects, and epistatic interaction of two bacterial canker resistance QTLs from *Lycopersicon hirsutum*. *Theoretical Applied Genetics*, 108:1047-1055

**CROCE, V.; BOSCHI, F.; MAESO, D.; PIANZZOLA, M.J.; SIRI, M.I.** 2015. Diagnóstico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas y plántulas de tomate por q-PCR. En: JORNADA NACIONAL DE FITOPATOLOGÍA, 3º; JORNADA NACIONAL DE PROTECCIÓN VEGETAL, 1º(2015, Montevideo, Uruguay). Libro de Resúmenes. Montevideo (Uruguay) SUFIT. p. 52.

**CROCE, V.; PIANZZOLA, M.J.; DURAND, K.; GONZÁLEZ-ARCOS, M.; JACQUES, M.A.; SIRI, M.I.** 2016. Multilocus Sequence Typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 144:1-13

- CROCE, V.; DE LEÓN, L.; MAESO, D.; PIANZZOLA, M.J.; SIRI, M.I.** 2017a. Comparación de metodologías de detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas de tomate. En: Libro de resúmenes de la IV Jornada Uruguaya de Fitopatología. II Jornada Uruguaya de Protección Vegetal. p 19. Montevideo (Uruguay)
- CROCE, V.; DE LEÓN, L.; MAESO, D.; PIANZZOLA, M.J.; SIRI, M.I.** 2017b. Comparación de metodologías de detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas de tomate. En: Libro de Resúmenes: 4° Congreso Argentino de Fitopatología. p 173. Mendoza (Argentina).
- DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.A.; POLISSIOU, M.G.** 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection, 22:39-44
- DALLA RIZZA, M.; MURCHIO, S.; WALASEK, W.; BOSCHI, F.; MAIDANA, M.; SCHVATZMAN, C.; GIMÉNEZ, G.; MAESO, D.** 2015. Buscando nuevas herramientas para controlar un viejo enemigo: empleo del receptor EFR en tomate para el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. En: Jornada de divulgación de resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p17-23 (Serie de Actividades de Difusión; 756)
- DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; VIDAVER, A.K.; HARRIS, R.W.** 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. International Journal of Systematic Bacteriology, 34:107-117
- DEBERT, P.; GOZÉ, E.; CORANSON-BEAUDU, R.; PERRIN, B.; FERNANDES, P.; LUCAS, P.; RATNADASS, A.** 2015. *Crotalaria spectabilis* and *Raphanus sativus* as Previous Crops Show Promise for the Control of Bacterial Wilt of Tomato Without Reducing Bacterial Populations. Journal of Phytopathology, 163:377-385
- DE LEÓN, L.; SIVERIO, F.; RODRIGUEZ, A.** 2006. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. Journal of Microbiological Methods, 67:141-149
- DE LEÓN, L.; SIVERIO, F.; LÓPEZ, M.M.; RODRÍGUEZ, A.** 2008. Comparative efficiency of chemical compounds for *in vitro* and *in vivo* activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. Crop Protection, 27:1277-1283.
- DE LEÓN, L.; RODRÍGUEZ, A.; LLOP, P.; LÓPEZ, M.M.; SIVERIO, F.** 2009. Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. Plant Pathology, 58: 862-871
- DE LEÓN, L.; SIVERIO, F.; LÓPEZ, M.M.; RODRÍGUEZ, A.** 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a seed born tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. Plant Disease, 95 (11):1328-1339
- DHANVANTARI, B.N.** 1989. Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. Canadian Journal of Plant Pathology, 11:400-418
- DHANVANTARI, B.N.; BROWN, R.J.** 1993. Improved seed treatments for control of bacterial canker of tomato. Canadian Journal of Plant Pathology, 15:201-205
- DREIER, J.; BERMPHOHL, A.; EICHENLAUB, R.** 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Phytopathology, 85(4):462-468

- DREIER, J.; MELETZUS, D.; EICHENLAUB, R.** 1997. Characterization of the plasmid-encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10:195-206
- EFSA PANEL ON PLANT HEALTH.** 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* *EFSA Journal*, 12(6):1-29
- EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K.H.; BURGER, A.** 2006 *Clavibacter michiganensis* a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. 385-421. En Gnanamanickam, S.S. (ed.), *Plant-Associated Bacteria*, Netherlands.
- EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K.H.** 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 445-464
- ELPHINSTONE, J. G.; STANFORD, H.; STEAD, D.** 1998. Survival and transmission of *Ralstonia solanacearum* in aquatic plants of *Solanum dulcamara* and associated surface water in England. *Bulletin OEPP* 28, 93-94
- EMMATTY, D.A.; JOHN, C.A.** 1973. Evaluation of resistance to bacterial canker of H2990, a new tomato variety. *Plant Disease Reporter*, 57(7):584-586
- FATMI, M.; SCHAAD, N. W.; BOLKAN, H. A.** 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Disease*, 75(4):383-385
- FATMI, M.; SCHAAD, N.W.** 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology*, 51:149-154
- FERGUSON, G.; HARWOOD, B.; TU, M.** 2008. Survival of bacteria that cause bacterial canker in greenhouse tomato. Consultado el 12/8/2019 de <http://omaf.gov.on.ca/english/crops/hort/news/grower/2008/06gn08a1.htm>
- FERNANDEZ VALIELA, M. V.** 1975. Introducción a la Fitopatología. Vol. II: Bacterias, fisiogénicas, fungicidas, nematodos. Buenos Aires: Colección Científica INTA. 821 p.
- FRANCIS, D.M.; KABELKA, E.; BELL, J.; FRANCHINO, B.; CLAIR, D.S.** 2001. Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease*, 85(11):1171-1176
- FRANKEN, A.A.J.M.; KAMMINGA, G.C.; SNYDERS W.; VAN DER ZOUWEN, P.S.; BIRNBAUM, Y.E.** 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds by immunofluorescence microscopy and dilution plating. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99:125-137
- FRENKEL, O.; BORNESTEIN, M.; SHULHANI, R.; SHARABANI, G.; SOFER, M.; ABO-MOCH, F.; LOFTHOUSE, M.; MANULIS-SASSON, S.; SHTIENBERG, D.** 2016. Secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in nurseries and the conditions leading to infection of tomato seedlings. *European Journal of Plant Pathology*, 144:569-579
- GARTEMANN, K.H.; KIRCHNER, O.; ENGEMANN, J.; GRÄFEN, I.; EICHENLAUB, R.; BRUGER, A.** 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106:179-191

- GARTEMANN, K.H.; ABT, B.; BEKEL, T.; BURGER, A.; ENGEMANN, J.; FLÜGEL, M.; GAIGALAT, L.; GOESMANN, A.; GRÄFEN, I.; KALINOWSKI, J.; KAUP, O.; KIRCHNER, O.; KRAUSE, L.; LINKE, B.; MCHARDY, A.; MEYER, F.; POHLE, S.; RÜCKERT, C.; SCHNEIKER, S.; ZELLER-MANN, E.M.; PÜHLER, A.; EICHENLAUB, R.; KAISER, O.; BARTELS, D.** 2008. The Genome Sequence of the Tomato-Pathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 Reveals a Large Island Involved in Pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 190 (6): 2138-2149
- GITAITIS, R.D.** 1990. Induction of an hypersensitive-like reaction in four o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 74(1):58-60
- GITAITIS, R.; BEAVER, R. W.; VOLOUDAKIS, A. E.** 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, 75(8):834-838
- GLEASON, M.L.; BRAUN, E.J.; CARLTON, W.M.; PETERSON, R.H.** 1991. Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81(12):1519-1523
- GLEASON, M.L.; GITAITIS, R.D.; RICKER, M.D.** 1993. Recent Progress in Understanding and Controlling Bacterial Canker of Tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, 77(11):1069-1076
- GONZÁLEZ RABELINO, P.; ZIGNAGO, A.; SILVERA-PÉREZ, E.** 2009. Caracterización *in vitro* de bacterias fitopatógenas en dos extractos de propóleos de diferentes orígenes fitogeográficos. *Centro Agrícola*, 36(4): 43-48.
- GONZÁLEZ, P.; BAO, L.; GALVÁN, G.; GRILLE, G.; MAESO, D.; CAMPELO, E.; BANCHERO, L.; CARREGA, E.** 2018. Normas de producción integrada tomate bajo invernáculo. Zona Sur Uruguay. Actualización 2018. 24 p. Consultado 21 nov.2019 de: [http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/norma\\_pi\\_tomate\\_invernaculo\\_sur\\_actualizacion\\_2018.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/norma_pi_tomate_invernaculo_sur_actualizacion_2018.pdf)
- HADAS, R.; KRITZMAN, G.; KLIETMAN, F.; GEFEN, T.; MANULIS, S.** 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology*, 54: 643-649
- HAUSBECK, M. K.; BELL, J.; MEDINA-MORA, C.; PODOLSKY, R.; FULBRIGHT, D. W.** 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90(1):38-44
- HAYWARD, A.C.; WATERSTONE, J.M.** 1964. *Corynebacterium michiganense*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 19. CAB International, Wallingford, UK.
- HOWARD, R.; HARDING, M.; SAVIDOV, N.; LISOWSKI, L.; BURKE, D.; PUGH, S.** 2007. Identifying Effective Chemical Disinfectants for Use in Sanitizing Greenhouses. Interim research progress II. Alberta Professional Horticultural Growers Congress and Foundation Society. 19 p. Consultado 26 nov. 2019 de [http://www.calseed.org/documents/disinfectants\[1\].pdf](http://www.calseed.org/documents/disinfectants[1].pdf)
- HOWARD, R.J.; HARDING, M.W.; DANIELS, G.C.; MOBBS, S.L.; LISOWSKI, S.L.Y.; DE BOER, S.H.** 2015. Efficacy of agricultural disinfectants on biofilms of the bacterial ring rot pathogen, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(3):273-284

**HUANG, R.; TU, J.C.** 2001. Effects on nutrient solution pH on the survival and transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in hydroponically grown tomatoes. *Plant Pathology*, 50:503-508

**HUANG, C.H.; VALLAD, G. E.; ZHANG, S.; WEN, A.; BALOGH, B.; FIGUEIREDO, J. F. L.; BEHLAU, F.; JONES, J. B.; MOMOL, M. T.; OLSON, S. M.** 2012. Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato. *Plant Disease*, 96(2):221-227

**IALACCIA, G.M.; BELLA, P.; LICCIARDELLO, G.; STRANO, C.P.; EICHENLAUB, R.; GARTEMANN, K.H.; LA ROSA, R.; CATTARA, V.** 2016. Clonal populations of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* are responsible for the outbreaks of bacterial canker in greenhouse tomatoes in Italy. *Plant Pathology*, 65: 484-495

**ISHI.** 2017. Method for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato seed. International Seed Health Initiative. Consultado 26 nov. 2019 de: [https://www.worldseed.org/wpcontent/uploads/2017/07/Tomato\\_Cmm\\_July2017.pdf](https://www.worldseed.org/wpcontent/uploads/2017/07/Tomato_Cmm_July2017.pdf)

**JACOBSEN, B. J.; ZIDACK, N. K.; LARSON, B. J.** 2004. The role of Bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology*, 94(11):1272-1275

**JACQUES, M.A.; DURAND, K.; ORGEUR, G.; BALIDAS, S.; FRICOT, C.; BONNEAU, S.; QUILLÉVÉRÉ, A.; AUDUSSEAU, C.; OLIVIER, V.; GRIMAUULT, V.; MATHIS, R.** 2012. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (23):8388-8402

**JAHN, H.; BAHRO, R.; BRUGER, A.; AHLEMEYER, J.; EICHENLAUB, R.** 1999. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology*, 1(2):113-118

**JAHN, H.; DREIER, J.; MELETZUS, D.; BAHRO, R.; EICHENLAUB, R.** 2000. The endo-1,4-glucanase of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for the induction of bacterial wilt of tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(7):703-714

**JONES, J.; JACKSON, L.; BALOGH, B.; OBRADOVIC, A.; IRIARTE, F.; MOMOL, M.** 2007. Bacteriophages for Plant Disease Control. *Annual Review of Phytopathology*, 45:245-262

**JONES, J.J.; ZITTER, T.A.; MOMOL, T.M.; MILLER, S.A.** 2014. Compendium of tomato diseases and pests. Second Edition. St. Paul Minnesota: APS Press. 168 p.

**KABELKA, E.; FRANCHINO, B.; FRANCIS, D. M.** 2002. Two loci from *Lycopersicon hirsutum* LA407 confer resistance to strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 92(5):504-510

**KANESHIRO, W. S.; ALVAREZ, A. M.** 2003. Variability and survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in seed. (Abstr.) *Phytopathology*, 93(6):S43.

**KANESHIRO, W.S.; MIZUMOTO, C.Y.; ALVAREZ, A.** 2006. Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *European Journal of Plant Pathology*, 116:45-56

**KANESHIRO, W. S.; INGRAM, D. M.; ALVAREZ, A. M.** 2008. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* threshold levels required for transmission by naturally-infested tomato seed. (Abstr.) *Phytopathology*, 98(6):S78

- KAWAGUCHI, A.; TANINA, K.; INOUE, K.** 2010. Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathology*, 59:76-83
- KAWAGUCHI, A.; TANINA, K.** 2014. Genetic groups of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* identified by DNA fingerprinting and the effects of inoculation methods on disease development. *European Journal of Plant Pathology*, 140:399-406
- KLEITMAN, F.; BARASH, I.; BURGER, A.; IRAKI, N.; FALAH, Y.; SESSA, G.; WEINTHAL, D.; CHALUPOWICZ, L.; GARTEMANN, K.H.; EICHENLAUB, R.; MANULISSASSON, S.** 2008. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 121:463-475
- KOTAN, R.; DADASOGLU, F.; KARAGOZ, K.; CAKIR, A.; OZER, H.; KORDALI, S.; CAKMAKCI, R.; DIKBAS, N.** 2013. Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Scientia Horticulturae*, 153: 34-41
- KOTAN, R.; CAKIR, A.; OZER, H.; KORDALI, S.; CAKMAKCI, R.; DADASOGLU, F.; DIKBAS, N.; AYDIN, T.; KAZAZ, C.** 2014. Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae*, 172: 210-220
- LAMB, C.; DIXON, R.A.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1):251-275
- LASA, C.; ABIKO, K.; TEZUKA, N.; INABA, T.; GARCÍA, S.** 1981. Algunas enfermedades que afectan actualmente los cultivos hortícolas en Uruguay. *CIAAB Investigaciones Agronómicas*, 2(1):97-100
- LEIGH, J.A.; COPLIN, D.L.** 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology*, 46:307-346
- LELLIOT, R.A.; STEAD, D.E.** 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Oxford: U.K. Blackwell Scientific Publications. 216 pp.
- LEWIS IVEY, M.L.; MILLER, S.** 2005. Evaluation of Hot Water Seed Treatment for the Control of Bacterial Leaf Spot and Bacterial Canker on Fresh Market and Processing Tomatoes. *Acta Horticulturae*, 695:197-204
- LOUWS, F. J.; WILSON, M.; CAMPBELL, H. L.; CUPPELS, D. A.; JONES, J. B.; SHOEMAKER, P. B.; SAHIN, F.; MILLER, S. A.** 2001. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Disease*, 85(5):481-488
- MAESO, D., ARBOLEYA, J., FERNÁNDEZ, A. Y WALASEK, W.** 2008. Uso de rotaciones con maíz dulce para disminuir la incidencia de cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). En: Resultados experimentales en tomate. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p 82-89 (Serie de Actividades de Difusión, 537)
- MAESO, D., FERNÁNDEZ, A. Y WALASEK, W.** 2008b. Evaluación de productos aplicados en riego por goteo para la prevención de cancro bacteriano *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). En: Resultados experimentales en tomate. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p 67-77 (Serie de Actividades de Difusión, 537)
- MAESO, D., FERNÁNDEZ, A. Y WALASEK, W.** 2008c. Evaluación de métodos de transmisión de cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) en condiciones de invernadero. En: Resultados experimentales en tomate. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p 78-81 (Serie de Actividades de Difusión, 537)

**MAESO, D.; FERNÁNDEZ, A.; WALASEK, W.** 2009. Evaluación de métodos de transmisión de cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) en condiciones de invernadero. En: Jornada Anual de Resultados Experimentales en el cultivo del tomate. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p111-115 (Serie Actividades de Difusión, 574)

**MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2010. Permanencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal del cancro bacteriano del tomate en suelo y rastrojo. En: Jornada de Divulgación de Resultados Experimentales en Sanidad del Cultivo de Tomate. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p53-56 (Serie Actividades de Difusión, 630)

**MAESO, D.; WALASEK, W.** 2010. Permanencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal del cancro bacteriano del tomate en elementos de entutorado. En: Jornada de Divulgación de Resultados Experimentales en Sanidad del Cultivo de Tomate. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p57-58 (Serie Actividades de Difusión, 630)

**MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2010b. Uso de desinfectantes para el control de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en agua de riego. En: Jornada de Divulgación de Resultados Experimentales en Sanidad del Cultivo de Tomate. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p59-64 (Serie Actividades de Difusión, 630)

**MAESO, D.; ARBOLEYA, J.; GARCÍA, C.; FERNÁNDEZ, C.; WALASEK, W.** 2010c. Influencia de los regímenes de riego en el desarrollo de epidemias de cancro bacteriano en tomate. En: Jornada de Divulgación de Resultados Experimentales en Sanidad del Cultivo de Tomate. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p65-76 (Serie Actividades de Difusión, 630)

**MAESO, D.; WALASEK, W.** 2012. Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Agrociencia (Uruguay), 16 (1):134-141

**MAESO, D.; ARBOLEYA, J.; WALASEK, W.** 2012a. Supervivencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal del cancro bacteriano del tomate en elementos de entutorado. Horticultura Argentina, 31 (75):28 - 31

**MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2012b. Permanencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal del cancro bacteriano del tomate en suelo y rastrojo. En: Resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p69-74 (Serie Actividades Difusión, 694)

**MAESO, D.; ARBOLEYA, J.; GARCÍA, C.; FERNÁNDEZ, C.; WALASEK, W.** 2012c. Influencia de los regímenes de riego en el desarrollo de epidemias de cancro bacteriano del tomate. Temporada 2011-12. En: Resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p77-88 (Serie Actividades de Difusión, 694)

**MAESO, D.; ARBOLEYA, J.; FERNÁNDEZ, A.; WALASEK, W.** 2012d. Evaluación de productos aplicados al follaje para el control del cancro bacteriano del tomate. Temporada 2011-12. En: Resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p89-94 (Serie Actividades de Difusión, 694):89-94

**MAESO, D.; ARBOLEYA, J.; FERNÁNDEZ, A.; WALASEK, W.** 2013. Evaluación de productos aplicados al follaje para el control del cancro bacteriano del tomate. En: Jornada de divulgación sobre resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p81-87 (Serie Actividades de Difusión, 723)

- MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2014a. Permanencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal del cancro bacteriano del tomate, en suelo y rastrojo. Libro de resúmenes del 13er Congreso Nacional de Horti-fruticultura. p 98. Trabajos presentados.
- MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2014b. Evaluación de productos para la prevención de la transmisión de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate mediante elementos de corte. Libro de resúmenes del 13er Congreso Nacional de Horti-fruticultura. Trabajos presentados. p 99.
- MAESO, D.; WALASEK, W.** 2015. Evaluación de desinfectantes para prevenir transmisión de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate mediante tijeras de poda. Agrociencia (Uruguay) 19 (1):77 - 83.
- MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2015a. Eficiencia de productos aplicados en riego en el control de cancro bacteriano de tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). En: Libro de resúmenes de la III Jornada Nacional de Fitopatología I Jornada Nacional de Protección Vegetal. Montevideo, Uruguay. p 20.
- MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2015b. Evaluación de productos para la prevención de la transmisión de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate mediante elementos de corte. Libro de resúmenes de la III Jornada Nacional de Fitopatología I Jornada Nacional de Protección Vegetal. p50.
- MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2015c. Evaluación de desinfectantes para prevenir la transmisión de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate mediante tijeras de poda. En: Jornada de divulgación de resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p24-31 (Serie de Actividades de Difusión, 756)
- MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2015d. Eficiencia de productos aplicados en riego en el control de cancro bacteriano de tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). En: Jornada de divulgación de resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p32-39 (Serie de Actividades de Difusión, 756)
- MAESO, D.; ARBOLEYA, J.; FERNÁNDEZ, A.; WALASEK, W.** 2015e. Evaluación de productos aplicados al follaje para el control de cancro bacteriano de tomate. Temporada 2013-14. En: Jornada de divulgación de resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p40-43 (Serie de Actividades de Difusión, 756)
- MAESO, D.; FERNÁNDEZ, A.; WALASEK, W.** 2015f. Evaluación de productos a base de *Bacillus subtilis*, inductores de resistencia y otros aplicados al follaje para el control del cancro bacteriano del tomate. Temporada 2014-2015. En: Jornada de divulgación de resultados experimentales en sanidad de tomate y morrón. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p44-61 (Serie de Actividades de Difusión, 756)
- MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2015g. Permanencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal del cancro bacteriano del tomate en suelo y rastrojo. En: III Jornada Nacional de Fitopatología I Jornada Nacional de Protección Vegetal. Libro de resúmenes de la III Jornada Nacional de Fitopatología I Jornada Nacional de Protección Vegetal. Montevideo, Uruguay. p 51.
- MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2017a. Evaluación de inductores de resistencia en el manejo del cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). En: Libro de resúmenes de la IV Jornada Uruguaya de Fitopatología. II Jornada Uruguaya de Protección Vegetal. Montevideo, Uruguay. p 62.



**MAESO, D.; FERNÁNDEZ, A.; WALASEK, W.** 2017b. Evaluación de productos de *Bacillus subtilis* inductores de resistencia y otros aplicados a follaje para el control del cancro bacteriano del tomate. Temporada 2015-2016. En: Manejo sanitario en tomate y morrón bajo cubierta. Resultados experimentales 2015-2017. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p3-14 (Serie de Actividades de Difusión, 778).

**MAESO, D.; WALASEK, W.; FERNÁNDEZ, A.** 2017c. Eficiencia de productos aplicados en riego para el control de cancro bacteriano de tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). En: Manejo sanitario de tomate y morrón bajo cubierta. Resultados experimentales 2015-2017. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p 15-22 (Serie de Actividades de Difusión, 778)

**MAFFIA, LA.; MARTINS, M.C. DEL P.; MATSUOKA, K.** 1980. Doencas do tomateiro. Informe Agropecuario, 6:42-60

**MEDINA-MORA, C. M.; HAUSBECK, M. K.; FULBRIGHT, D. W.** 2001. Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Disease, 85(1):88-91

**MEHDY, M.C.; SHARMA, Y.K.; SATHASIVAN, K.; BAYS, N.W.** 1996. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. Plant Physiology, 365-374

**MENAFRA, M.P.; SOSA, L.; MAESO, D.; GALEANO, P.; FRANCO FRAGUAS, L.** 2019. Efecto de inductores de resistencia en la respuesta de defensa de *Solanum lycopersicum* frente a *Clavibacter michiganensis*. En: II Congreso Nacional de Biociencias. Libro de resúmenes. Montevideo, Uruguay. p 137.

**MENAFRA, M.P.; SOSA, L.; MAESO, D.; GALEANO, P.; FRANCO FRAGUAS, L.** 2019. Inducción de resistencia utilizando Biorend en el patosistema *Clavibacter michiganensis*-*Lycopersicon esculentum*. En: 6° Encuentro Nacional de Química. Libro de resúmenes. Montevideo, Uruguay. p 176.

**MILIJAŠEVIĆ, S.; TODOROVIĆ, B.; POTOČNIK, I.; REKANOVIĆ, E.; STEPANOVIĆ, M.** 2009. Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. Pesticides Phytomedicine (Belgrade), 24: 19-27

**MILIJAŠEVIĆ-MARČIĆ, S.; GARTEMANN, K.H.; FROHWITTER, J.; EICHENLAUB, R.; TODOROVIĆ, B.; REKANOVIĆ, E.; POTOČNIK, I.** 2012. Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. European Journal of Plant Pathology, 134:697-711

**MILLER, S.; LEWIS IVEY, M.L.** 2005. Hot water and chlorine treatment of vegetable seeds to eradicate bacterial plant pathogens. Ohio State University Extension Fact Sheet. HYG-3085-05. 3p. Consultado 20 nov. 2019 de <http://u.osu.edu/vegprolab/publications/grafting-publications/hot-water-and-chlorine-treatment-of-vegetable-seeds-to-eradicate-bacterial-plant-pathogens/>

**MELETZUS, D.; BERMPOHL, A; DREIER, J.; EICHENLAUB, R.** 1993. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. Journal of Bacteriology, 175: 2131-2136

**MIGUEL-WRUCK, D.S.; OLIVEIRA, J.R.; ROMEIRO, R. DA S.; DHINGRA, O. D.** 2001. Sobrevivência e transmissão de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* em estacas de bambu infestadas artificialmente para plantas de tomate. Summa Phytopathologica, Jaboticabal, 27:283-287

**MIGUEL-WRUCK, D.S.; OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. DA S.; DHINGRA, O.D.** 2006. Control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in bamboo stakes used for tomato production. Summa Phytopathologica, 32 (4):373-375

- MOFFET, M.L.; WOOD, B.A.** 1984. Survival of *Corynebacterium michiganense* within host debris in soil. *Australasian Plant Pathology*, 13 (1): 1-3
- MUNKVOLD, G. P.** 2009. Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology*, 47:285-311
- NAZARI, F.; NIKNAM, G.R.; GHASEMI, A.; TAGHAVI, S.M.; MOMENI, H.; TORABI, S.** 2007. An Investigation on Strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in North and North West of Iran. *Journal of Phytopathology*, 155:563-569
- OLLE, M.; WILLIAMS, I.** 2015. The Influence of effective microorganisms on the growth and nitrate Content of Vegetable Transplants. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 2 (1):25-28
- OEPP/EPPO** 2013. PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 43(1), 46-67
- OEPP/EPPO.** 2016. EPPO standards PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *OEPP/EPPO Bulletin*, 46 (2):205-225
- OPEP/EPPO.** 2018. A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests -version 2018-09. Consultado 19 mar.2019 de: [https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A2\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list)
- OPEP/EPPO** 2020. EPPO Global data base *Clavibacter michiganensis* CORBMI. Distribution map. Consultado 19 mar.2020 de: <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution>
- OLIVIER, V.; BALOCHE, A.; DROUIN, A.; AUDUSSEAU, C.; PAILLARD, S.; SOUBELLET, H.** 2010. Internal methods comparison study and inter-laboratory study on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 40:248-256
- OOSTERHOF, J.; BERENDSEN, S.** 2011. The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Abstr.). *Phytopathology*, 101(6):S133.
- PAL BAIS, H., FALL, R. & VIVANCO, J. M.** 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of *Arabidopsis* Roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin Production. *Plant Physiology*, 134:307-319
- PASTRIK, K.H.; RAINEY, F.A.** 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction based techniques. *Journal of Phytopathology*, 147:687-693
- PERDOMO FERRANDO, E.; MURCHIO, S.; WALASEK, W.; SCHVARTZMAN, C.; MAESO, D.; DALLA RIZZA, M.** 2017. Evaluación de eventos de tomate con el gen EFR para el control de bacterias patógenas. En: Libro de resúmenes de la IV Jornada Uruguaya de Fitopatología. II Jornada Uruguaya de Protección Vegetal. Montevideo, Uruguay. p 42.
- PIETERSE, C.M.J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEES, S.C.M.** 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5):308-316
- PRADHANANG, P.M.; COLLIER, G.** 2009. How effective is hydrochloric acid treatment to control *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* contamination in tomato seed? *Acta Horticulturae*, 808:81-86
- QUATRUCCI, A.; BALLESTRA, G.M.** 2006. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 408:134-137
- QUESADA-OCAMPO, L. M.; LANDERS, N. A.; LEBEIS, A. C.; FULBRIGHT, D. W.; HAUSBECK, M. K.** 2012. Genetic structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in Michigan commercial tomato fields. *Plant Disease*, 96:788-796

**RICKER, M.D.; RIEDEL, R.M.** 1993. Effect of secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on yield of northern processing tomatoes. *Plant Disease*, 77(4):364-366

**RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M.D.** 1996. Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*, 8(10):1809-1819.

**SANDBRINK, J. M.; VAN OOIJEN, J. W.; PURIMAHUA, C. C.; VRIELINK, M.; VERKERK, R.; ZABEL, P.; LINDHOUT, P.** 1995. Localization of genes for bacterial canker resistance in *Lycopersicon peruvianum* using RFLPs. *Theoretical Applied Genetics*, 90:444-450

**SANTOS, M.S.; CRUZ, L.; NORSKOV, P.; RASMUSSEN, O.F.** 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Science Technology*, 25:581-584

**SCORTICHINI, M.** 2016. Field efficacy of a zinc-copper-hydracid of citric acid biocomplex compound to reduce oozing from winter cankers caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae* to *Actidinia* spp. *Journal of Plant Pathology*, 98 (3):651-655

**SEN, Y.; FENG, Z.; VANDENBROUCKE, H.; VAN DER WOLF, J.; VISSER, R.G.F.; VAN HEUSDEN, A.W.** 2013. Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica*, 190:309-317

**SEN, Y.; VAN DER WOLF, J.; VISSER, R. G. F.; VAN HEUSDEN, S.** 2015. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Disease*, 99(1): 4-13

**SHARABANI, G.; SHTIENBERG, D.; BORENSTEIN, M.; SHULHANI, R.; LOFTHOUSE, M.; SOFER, M.; CHALUPOWICZ, L.; BARELA, V.; MANULIS-SASSON, S.** 2013a. Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathology*, 62:1114-1122

**SHARABANI, G.; MANULIS-SASSON, S.; BORENSTEIN, M.** 2013b. The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathology*, 62:578-586

**SHARABANI, G.; MANULIS-SASSON, S.; CHALUPOWICZ, L.; BORENSTEIN, M.; SHULHANI, R.; LOFTHOUSE, M.; SOFER, M.; FRENKEL, O.; DROR, O.; SHTIENBERG, D.** 2014. Temperature at the early stages of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection affects bacterial canker development and virulence gene expression. *Plant Pathology*, 63(5):1119-1129

**SHIRAKAWA, T.; SASAKI, T.; OZAKI, K.** 1991. Ecology and control of tomato bacterial canker and detection methods of its pathogen. *JARQ*, 25 (1):27-32

**SHLEVIN, E.; MAHRER, Y.; KRITZMAN, G.; KATAN, J.** 2004. Survival of plant pathogens under structural solarization. *Phytoparasitica*, 32(5):470-478

**SHOEMAKER, P.B.; ECHANDI, E.** 1976. Seed and plant bed treatments for bacterial canker of tomato. *Plant Disease Reporter*, 60 (2):163-166

**SMITH, E. F.** 1910. A new tomato disease of economic importance. *Science*, 31:794-796

**SOTIROVA, V.; BOGATSEVSKA, N.; STAMOVA, L.** 1994. Sources of resistance to bacterial diseases in tomato wild species. *Acta Horticulturae*, 376:353-360

- SOYLU, E.M.; SOYLU, S.; BAYSAL, O.** 2003. Induction of disease resistance and antioxidant enzymes by acibenzolar-S-methyl against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato. *Journal of Plant Pathology*, 85 (3): 175-181
- SOYLU, S.; BAYSAL, O.; SOYLU, E.M.** 2003b. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Science*, 165: 1069-1075
- SOYLU, S.; SOYLU, E.M.; EVRENDILEK, G.A.** 2009. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*) and dill (*Anethum graveolens* L.) against the growth of food-borne and seed-borne pathogenic bacteria. *Italian Journal of Food Science*, 3(21):347-355
- STACKEBRANDT, E.; RAINEY, A.F.; WARD-RAINEY, L.N.** 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47:479-491
- STAMOVA, L.; SOTIROVA, V.** 1987. Reaction of different crops to artificial inoculation with *Corynebacterium michiganense*. *Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 23:211-216
- STRIDER, D.L.** 1969. Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*; a literature review and bibliography. *Technical Bulletin North Carolina Agricultural Experiment Station*, No. 193.
- TAKISHITA, Y.; CHARRON, J.B.; SMITH, D.** 2018. Biocontrol *Rhizobacterium Pseudomonas* sp. 23S induces systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) against bacterial canker *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Frontiers in microbiology*, 9:2-19
- TANCOS, M.A.; CHALUPOWICZ, L.; BARRASH, I.; MANULIS-SASSON, S.; SMART, C.D.** 2013. Tomato Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through External and Internal Routes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(2):6948-6957
- TANCOS, M. A.; LANGE, H. W.; SMART, C. D.** 2015. Characterizing the genetic diversity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in New York. *Phytopathology*, 105(2):169-179
- THEODORO, G.F.; MARINGONI, A.C.** 2000. Acao de productos químicos *in vitro* e *in vivo* sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal do cancro bacteriano do tomateiro. *Scientia Agricola*, 57 (3):439-443
- THYR, B. D.** 1968. Bacterial canker of tomato: Inoculation level needed for infection. *Plant Disease Reporter*, 52:741-743
- THYR, B.D.** 1971. Resistance to *Corynebacterium michiganense* measured in six *Lycopersicon* accessions. *Phytopathology*, 61(8):972-974
- THYR, B.D.; WEBB, R.E.; JAWORSKI, C.A.; RATCLIFFE, T.J.** 1973. Tomato bacterial canker: control by seed treatment. *Plant Disease Reporter*, 57(11):974-977
- THYR, B.D.; SAMUEL; M.J.; BROWN, P.G.** 1975. New solanaceous host records for *Corynebacterium michiganense*. *Plant Disease Reporter*, 59:595-598.
- THYR, B.D.** 1976. Inheritance of resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato. *Phytopathology*, 66:1116-1119
- TSIANTOS, J.** 1987. Transmission of *Bacterium Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by seeds. *Journal of Phytopathology*, 119:142-146

**UTKHEDE, R.; KOCH, C.** 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*, 49:305-313.

**VAN DEN BULK, R.W.; LOFFLER, H.J.M.; DONS, J.J.M.** 1989. Effect of phytotoxic compounds produced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on resistant and susceptible tomato plants. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95:107-117

**VAN DER WOLF, J.M.; BIRNBAUM, Y.; VAN DER ZOUWEN, P.S.; GROOT, S.P.C.** 2008. Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts. *Seed Science and Technology*, 36:76-88.

**VAN DER WOLF, J.M.; VAN BECKHOVEN, J.R.C.M.** 2004. Factors affecting survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in water. *Journal of Phytopathology*, 152: 161-168

**VAN HEUSDEN, A. W.; KOORNNEEF, M.; VOORRIPS, R. E.; BRUGGENMANN, W.; PET, G.; VRIELINK-VAN GINKEL, R.; CHEN, X.; LINDHOUT, P.** 1999. Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Theoretical Applied Genetics*, 99: 1068-1074

**VEGA, D.; ROMERO, A.M.** 2016. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato debris under greenhouse conditions. *Plant Pathology*, 65: 545-550

**VIEIRA LELIS, F.M.; CZAJKOWSKI, R.; MAGELA DE SOUZA, R.; RIBEIRO, D.H.; VAN DER WOLF, J.M.** 2014. Studies on the colonization of axenically grown tomato plants by a GFP-tagged strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *European Journal of Plant Pathology*, 139:53-66

**VOLCANI, Z.; ZUTRA, D.; COHN, R.** 1970. A new leaf and fruit spot disease of pepper caused by *Corynebacterium michiganense*. *Plant Disease Reporter*, 54:804-806.

**WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G.** 2005. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*, 95(12):1368-1373

**WASSERMANN, E.; MONTECCHIA, M.S.; CORREA, O.S.; VEGA, D.; ROMERO, A.M.** 2017. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains virulence and genetic diversity. a first study in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 149:35-42

**WERNER, N. A.; FULBRIGHT, D. W.; PODOLSKY, R.; BELL, J.; HAUSBECK, M. K.** 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. *Plant Disease*, 86(5): 535-542

**WITTMANN, C.; EICHENLAUB, R.; DREISEIKELMANN, B.** 2010. The endolysis of bacteriophages CMP1 and CN 77 are specific for the lysis of *Clavibacter michiganensis* strains. *Microbiology*, 156:2366-2673

**XU, X.; MILLER, S.A.; BAYSAL-GUREL, F.; GARTEMANN, K.H.; EICHENLAUB, R.; RAJASHEKARA, G.** 2010. Bioluminescence Imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Applied and environmental microbiology*, 76 (12):3978-3988

**XU, X.; RAJASHEKARA, G.; PAUL, P. A.; MILLER, S. A.** 2012. Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. *Phytopathology* 102(2):177-184.

**YASHUHARA-BELL, J.; ALVAREZ, A.** 2015. Seed-associated subspecies of the genus *Clavibacter* are clearly distinguishable from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65: 811-826

- YIM, K.O.; LEE, H.I.; KIM, J.H.; LEE, S.D.; CHO, J.H.; CHA, J.S.** 2012. Characterization of phenotypic variants of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolated from *Capsicum annuum*. European Journal of Plant Pathology, 133:559-575
- YOGEV, A.; RAVIV, M.; KRITZMAN, G.; HADAR, Y.; COHEN, R.; KIRSHNER, R.; KATAN, J.** 2009. Suppression of bacterial canker of tomato by composts. Crop Protection, 28:97-103
- ZALUGA, J.; STRAGIER, P.; VAN VAERENBERGH, J.; MAES, M.; DE VOS, P.** 2013. Multilocus Variable-Number-Tandem-Repeats Analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. BMC Microbiology, 13:126
- ZALUGA, J.; VAN VAERENBERGH, J.; STRAGIER, P.; MAES, M.; DE VOS, P.** 2013. Genetic diversity of non-pathogenic *Clavibacter* strains isolated from tomato seeds. Systematic and applied microbiology, 36:426-435
- ZALUGA J.; STRAGIER, P.; BAEYEN, P.; HAEGEMAN, A.; VAN VAERENBERGH, J.; MAES, M.; DE VOS, P.** 2014. Comparative genome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Clavibacter* strains reveals adaptations to their lifestyle. BMC Genomics 15:392. Consultado 20 nov. 2019 de: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2164-15-392>
- ZANÓN, M.J.; JORDÁ, C.** 2008. Eradication of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by incorporating fresh crop debris into soil: Preliminary evaluations under controlled conditions. Crop Protection, 27: 1511-1518
- ZIGNAGO PAULOS, A.; SILVERA PÉREZ, E.; GONZÁLEZ RABELINO, P.** 2010. Control biológico de cancro bacteriano del tomate con extracto de propóleo. INIA Las Brujas. Montevideo: INIA. p77-81 (Serie Actividades de Difusión, 630)

Realizado en PRONTOGR+FICA  
Cerro Largo 850 - Tel.: 2902 3172  
Montevideo Uruguay  
E-mail: [pgrafica@adinet.com.uy](mailto:pgrafica@adinet.com.uy)

**INIA Dirección Nacional**

Avda. Italia 6201,  
Ed. Los Guayabos,  
Parque Tecnológico LATU.  
Montevideo  
Tel: 2605 6021  
[inia@inia.org.uy](mailto:inia@inia.org.uy)

**INIA La Estanzuela**

Ruta 50, Km 11  
Colonia  
Tel. 598 4574 8000  
Fax 598 4522 4061  
[iniale@le.inia.org.uy](mailto:iniale@le.inia.org.uy)

**INIA Las Brujas**

Ruta 48, Km 10  
Canelones  
Tel. 598 2367 7641  
Fax 598 2367 7609  
[inia\\_lb@lb.inia.org.uy](mailto:inia_lb@lb.inia.org.uy)

**INIA Salto Grande**

Camino al Terrible  
Salto  
Tel. 598 4733 5156  
Fax 598 4732 9624  
[inia\\_sg@sg.inia.org.uy](mailto:inia_sg@sg.inia.org.uy)

**INIA Tacuarembó**

Ruta 5, Km 386  
Tacuarembó  
Tel. 598 4632 2407  
Fax 598 4632 3969  
[iniatbo@tb.inia.org.uy](mailto:iniatbo@tb.inia.org.uy)

**INIA Treinta y Tres**

Ruta 8, Km 281  
Treinta y Tres  
Tel. 598 4452 2305  
Fax 598 4452 5701  
[iniatt@tyt.inia.org.uy](mailto:iniatt@tyt.inia.org.uy)

[www.inia.uy](http://www.inia.uy)