

USO DE DESINFECTANTES PARA EL CONTROL DE *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* EN AGUA DE RIEGO.

Responsables: Diego Maeso, Wilma Walasek y Alfredo Fernández.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como “cancro bacteriano del tomate” es causada por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) y es uno de los problemas sanitarios más importantes del cultivo tanto a campo como en invernadero. El control de este problema es sumamente difícil ya que combina dos características importantes: la capacidad de supervivencia del patógeno en semillas, restos del cultivo, suelo, materiales inertes (rafias, cañas, herramientas, etc.) y la facilidad de diseminación ya sea a través de agua o heridas (desbrote, deshoje, riegos, etc.). Desde hace algunas temporadas en INIA LB hemos comenzado trabajos experimentales acerca de la epidemiología de esta enfermedad en nuestras condiciones de forma de obtener información que pueda ser utilizada en su manejo integrado. De esa forma se confirmó la capacidad de transmisión por semilla y la eficiencia de algunos métodos de desinfección de la misma, la capacidad de sobrevivir entre cultivos (aún por más de dos años) y la importancia del agua en la transmisión vía raíces. Buscando limitar esa capacidad de transmisión se realizaron experimentos a campo en los que se comparó la efectividad de algunos productos desinfectantes sin llegarse a resultados concretos. Es por ello que se comenzaron trabajos de investigación para realizar esa evaluación en condiciones más controladas disminuyendo la influencia de agentes externos.

I. EXPERIMENTOS EN INVERNADERO EN MACETA

Temporada: 2009.

Localización: Invernadero de INIA Las Brujas.

Variación: Los experimentos se realizaron con semilla del cultivar Loica la cual fue desinfectada previamente en baño a 50°C por 25 minutos.

Enfermedad: Cancro bacteriano del tomate (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Cmm).

METODOLOGÍA:

La semilla se plantó en macetas (12 cm de diámetro, 1000 cc capacidad). El trabajo se realizó hasta el momento en dos oportunidades por limitación de espacio (4/09/09 y 5/11/09) y se piensa continuar repitiéndolo hasta alcanzar un número representativo de plantas.

En cada experimento se formaron dos grupos de 12 plantas, uno en un nivel superior en el cual se realizaban los tratamientos y otro en un nivel inferior que recogía el agua de riego 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). 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 (1×10^8 UFC/ml).

Los tratamientos comparados fueron:

1. Testigo sin inocular.
2. Testigo inoculado.
3. Riego con solución de iodo jabonosa (1 cc/l de agua de riego) (Perrin SA. Cno. Mendoza 7052).
4. Riego con permanganato de potasio (0.06 g/l de agua de riego).
5. Riego con sulfato de cobre (0.1 g/l de agua de riego). (Fanaproqui).

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 macetas.

Al finalizar cada experimento los tallos de todas las plantas fueron cortados longitudinalmente para observar lesiones en el sistema vascular y analizados por serología mediante DAS ELISA (7/10 y 23/12/2009). Los resultados se muestran en los cuadros 1, 2 y 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Cuadro 1. Porcentaje de plantas con lesiones en el sistema vascular.

Tratamiento	Primer Experimento (4/9/09)		Segundo Experimento (5/11/09)	
	Plantas superiores (inoculadas)	Plantas inferiores	Plantas superiores (inoculadas)	Plantas inferiores
1. Testigo sin inocular.	0	0	0	0
2. Testigo inoculado.	100	83	100	92
3. Riego con solución de yodo jabonosa (1 cc/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

Cuadro 2. Porcentaje de plantas con reacción positiva en la prueba DAS-ELISA para Cmm.

Tratamiento	Primer Experimento (4/9/09)		Segundo Experimento (5/11/09)	
	Plantas superiores (inoculadas)	Plantas inferiores	Plantas superiores (inoculadas)	Plantas inferiores
1. Testigo sin inocular.	0	0	0	0
2. Testigo inoculado.	100	58	100	100
3. Riego con solución de yodo jabonosa (1 cc/l).	100	75	100	83
4. Riego con permanganato de potasio (0.06 g/l).	100	75	100	75
5. Riego con sulfato de cobre (0.1 g/l).	83	91	91	92

Cuadro 3. Promedio de valores de Absorbancia 405 nm obtenidos en prueba ELISA de todas las plantas superiores e inferiores.

Tratamiento	Primer Experimento (4/9/09)		Segundo Experimento (5/11/09)	
	Plantas superiores	Plantas inferiores	Plantas superiores	Plantas inferiores
1. Testigo sin inocular.	0.085	0.078	0.075	0.068
2. Testigo inoculado.	0.641	0.213	1.328	0.385
3. Riego con solución de yodo jabonosa (1 cc/l).	0.611	0.198	1.281	0.307
4. Riego con permanganato de potasio (0.06 g/l).	0.590	0.206	1.221	0.230
5. Riego con sulfato de cobre (0.1 g/l).	0.541	0.311	1.001	0.339

De acuerdo a estos resultados se puede establecer que:

- Las sustancias empleadas no tuvieron ningún efecto sobre las plantas ya infectadas ya que todas las plantas superiores exhibieron daños en su sistema vascular.
- En cuanto a la presencia de la enfermedad o detección de su agente en las plantas inferiores (potencialmente infectadas vía riego), se observó algún efecto preventivo de los productos aplicados a la transmisión.
- Si bien se encontraron algunas diferencias entre los resultados de ambos experimentos, los tres desinfectantes evaluados redujeron el número de plantas inferiores afectadas frente al testigo sin tratar, sobre todo en el segundo experimento. Destacándose el tratamiento con sulfato de cobre por la repetitibilidad de su efecto.
- En cuanto a los resultados de detección de Cmm en las plantas inferiores, se encontraron diferencias entre éstos y la presencia de síntomas en el sistema vascular. Lo esperado era que, dada la sensibilidad de la técnica, se detectaran plantas infectadas antes de expresión de síntomas por su baja concentración o por su poca patogenicidad. Sin embargo, se registraron casos en que no se detectó a Cmm serológicamente en plantas con síntomas lo cual estaría marcando una limitación de la técnica serológica para la detección en planta.

- Sin embargo, la técnica serológica mostró diferencias en la concentración del patógeno en los tejidos: los valores de absorbancia obtenidos en las plantas inferiores siempre fueron sensiblemente menores a los exhibidos por las plantas inoculadas (cuadro 3). Esto podría indicar la diferente capacidad de ambos métodos de inoculación (herida y riego) en el posterior desarrollo de la enfermedad.
- Este trabajo se repetirá en la próxima temporada de forma de aumentar el número de repeticiones.

II. EXPERIMENTOS *IN VITRO*.

Para complementar los trabajos en campo e invernadero se estudió el efecto de los desinfectantes sobre la bacteria *in vitro*.

METODOLOGÍA:

Se prepararon alícuotas de 500 ml de una solución de Cmm con una concentración 1×10^8 UFC/ml en buffer salino. A esas soluciones se les agregaron los diferentes tratamientos a evaluar: testigo, sulfato de cobre, permanganato de potasio y solución de yodo jabonosa de forma de llegar a una concentración final de los desinfectantes igual a la empleada en los riegos de los experimentos de maceta y campo.

Se dejó interactuar la bacteria con los tratamientos y luego se realizaron plaqueos en medio agar nutriente. Para ese plaqueo se realizaron diez diluciones sucesivas de uno en diez, de las cuales se distribuyó 0,1 ml por placa. Se hicieron dos repeticiones por dilución.

Las placas fueron incubadas 48 hs. a 23°C y se contó el número de bacterias. Para calcular el número de bacterias por mililitro de cada una de las soluciones se usó el promedio de las dos repeticiones y lo estimado por cada dilución. El número de bacterias observado fue multiplicado por 10 y por la relación de cada dilución.

Se efectuó un experimento con todos los tratamientos a la vez (29/1/2010) y tres en los que se incluía un tratamiento y el testigo sin desinfectante (12/3, 14/4 y 3/9/2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos referidos a porcentaje de control sobre el testigo $[(n^{\circ} \text{ de colonias en el testigo} - n^{\circ} \text{ de colonias en solución desinfectante}) / (n^{\circ} \text{ de colonias en el testigo})]$.

Cuadro 1. Porcentaje de control respecto al testigo obtenido al incubar Cmm en soluciones de desinfectantes.

Tratamiento	Concentración producto	Exp. 1 29/1/2010		Exp. fraccionado (varias fechas)	
		% de control frente al testigo	Concentración de bacterias (UFC/ml) ¹	% de control frente al testigo	Concentración de bacterias (UFC/ml) ¹
Sulfato de cobre	0.10 g/l	99.99	5.5×10^1	99	3.5×10^4
Permanganato de potasio	0.06 g/l	99.99	1.0×10^1	100	0
Solución de yodo	1 cc/l	99.99	2.2×10^2	94	4.9×10^3
Testigo sin tratar	0	0	8.5×10^7	0	3.7×10^6 (14/4, vs. permanganato) 8.7×10^4 (3/9, vs. sol. de yodo) 1.3×10^7 (12/3, vs. sulfato de cobre)

¹UFC/ml = unidades formadoras de colonias por mililitro.

- Estos experimentos serán repetidos para confirmar la información
- Se observó un control superior al 94% de las bacterias en solución.
- Sin embargo un 1% de falta de control puede significar niveles de 35000 o 4900 UFC/ml, los cuales, tratándose de una bacteria, rápidamente aumentarán exponencialmente.
- La disminución de los niveles iniciales de inóculo pueden resultar en un enlentecimiento del desarrollo de la enfermedad tal como se observó en el ensayo en macetas (menor expresión de síntomas).