ISSN 0370-5404

Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán
Tomo 91 (2): 17-24; 2014

Estudios de sobrevivencia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en frutos de limoneros y su dispersión a partir de frutos cosechados y severamente infectados*

Valeria Martínez**, Eugenia Acosta**, Alejandro Rojas**, Beatriz Stein***
y C. Jacqueline Ramallo****

RESUMEN

En Tucumán, R. Argentina, se evaluó la sobrevivencia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* en frutos de limonero (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), luego de la aplicación de tratamientos convencionales de empaque y almacenamiento. Para realizar los estudios, frutos sin síntomas de cancrosis fueron cosechados de lotes con presencia de la enfermedad, procesados en línea de empaque y almacenados a 6°C. Periódicamente se tomaron muestras y se evaluaron las poblaciones de bacterias presentes sobre la epidermis de los frutos, por cultivo en medio semiselectivo (agar nutritivo) y pruebas biológicas en plantines de pomelo Duncan (*Citrus paradisi* Macf.). Los ensayos fueron realizados a inicio, mediado y fin de las campañas de exportación 2006 y 2007, correspondiendo a los meses de abril, junio y agosto, respectivamente. Los resultados indicaron que el tratamiento comercial de empaque eliminó la población de bacterias de la superficie de los frutos asintomáticos. La época de cosecha fue un factor importante, ya que determinó la cantidad inicial de bacterias naturalmente presentes sobre la epidermis. Los tratamientos de post-cosecha convencionales y el tiempo de conservación a 6°C constituyen medidas efectivas para la eliminación de bacterias y brindan garantías fitosanitarias al comercio internacional. También se estudió la dispersión natural de la enfermedad a partir de frutos de limoneros severamente infectados con cancrosis como fuente de inóculo, alrededor de los cuales se colocaron plantines de pomelos Duncan (*Citrus paradisi* Macf.) altamente susceptibles a la bacteriosis. Estas plantas se observaron durante 14 meses, no detectándose en ningún caso la formación de cancros en sus hojas. Estos trabajos fueron realizados en el marco de un proyecto internacional, bajo un mismo protocolo previamente consensuado.

Palabras clave: Cancrosis, inocuidad, tratamiento de empaque, sobrevivencia, dispersión.

ABSTRACT

Studies of survival and dispersal of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on lemon fruit

Experiments were conducted in Tucumán, Argentina, to study *Xanthomonas citri* subsp *citri* potential for survival in lemon fruit (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) after conventional packing and storage treatments. In order to conduct these studies, canker free fruit was picked from infected plots, processed in the packing line and stored at 6°C. Samples were taken periodically and bacteria populations present on the fruit surface were evaluated in a selective medium (nutrient agar) and biological testing on Duncan grapefruit leaves. These trials were conducted at three different moments of the export seasons 2006 and 2007: at the beginning in April, in June, and finally in August. The results showed that commercial packing treatment eliminated bacteria population from the surface of asymptomatic fruit. Harvesting date was an important factor, as it determined the initial amount of bacteria naturally present on the epidermis of the fruit. Conventional post harvest treatments and a 6°C storage temperature are effective measures for fruit inocuity and provide phytosanitary guarantees for international trade. Natural dispersal of the disease from fruits severely infected with citrus canker as inoculum source was also studied, by placing discarded canker-infected fruit in cull piles near highly susceptible Duncan grapefruit (*Citrus paradisi*, Macf.) seedlings. These plants were observed for 14 months, and in no case was canker detected on the leaves. This study was conducted as part of an international project, with a unique protocol previously agreed.

Key words: citrus canker, innocuity, packinghouse treatments, bacterial survival, disease spread.

**Parte de los datos que se presentan en este trabajo fueron publicados en la revista Crop Protection 2: 508-524 (2009).*

***Sección Fitopatología, EEAOC.*
****Sección Fruticultura, EEAOC.*
*****Ex integrante de la Sección Fitopatología, EEAOC .jramallo@sa-sanmiguel.com*

INTRODUCCIÓN

La cancrosis de los citrus *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), enfermedad originaria de Asia, fue detectada en la Argentina en el año 1928, en las provincias del Noreste Argentino (NEA). El patotipo presente fue identificado como "B" y debido a su baja agresividad y limitado rango de hospederos, se mantuvo restringido en la mencionada región, sin causar daños de importancia durante casi 50 años. En 1975, se reportó una nueva introducción de la enfermedad, caracterizada como tipo "A", que resultó más agresiva y desplazó definitivamente a la primera (Canteros *et al*., 1985; Canteros, 2004).

En el año 2002 se detectaron dos focos de cancrosis en el Noroeste Argentino (NOA) (Ramallo *et al*., 2005), lo que significó un cambio en el estatus fitosanitario de la región lo que obligó a modificar las pautas de producción, especialmente respecto a la exportación de fruta fresca a la Comunidad Económica Europea y otros mercados importantes (Canteros, 2004; Stein *et al*., 2007). Esto se debió a que, a nivel mundial, el movimiento de fruta fresca desde áreas con presencia de cancrosis a zonas libres fue históricamente prohibido, sobre la presunción de que el inóculo fuese transportado sobre la superficie de fruta asintomática, sobreviva el proceso de empaque y transporte y que en destino, encuentre condiciones favorables y establezca la enfermedad (Schubert *et at*., 2001; Gottwald *et al*., 2002).

Aun cuando no se encontraron antecedentes en la bibliografía que indicaran que un fruto asintomático (e incluso sintomático) pueda establecer y difundir la enfermedad, solamente un estudio sistemático y exhaustivo del patosistema podría demostrar la inocuidad de la fruta como vehículo de cancrosis y permitiría brindar garantías fitosanitarias a los mercados compradores. Con este objetivo, durante los años 2006 al 2008 y en el marco de un proyecto internacional coordinado por el Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) del United States Departament of Agriculture (USDA), en el que participaron investigadores de los Estados Unidos (del USDA, de la Universidad de Florida y de la empresa Southern Garden Citrus), España (Instituto de Valenciano de Investigaciones Agrarias, IVIA), Brasil (Instituto Agronómico de Parana, IAPAR) y la Argentina (Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, EEAOC), se realizaron estudios destinados a evaluar la sobrevivencia de *X. citri* subsp. *citri* en frutos cítricos, luego de tratamientos convencionales de empaque y almacenamiento.

En el presente trabajo se presentan los resultados de las evaluaciones realizadas sobre frutos de limonero (*Citrus limon* (L.) Burn f.) en Tucumán (26-28° latitud sur y 64-65° longitud oeste), siguiendo el protocolo elaborado y consensuado en el marco del mencionado proyecto. Parte de los datos que se presentan fueron publicados anteriormente (Gottwald *et al*., 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología de la EEAOC, Tucumán, R. Argentina. Durante el año 2006, se hicieron estudios preliminares destinados a ajustar la metodología para detectar la bacteria (Martínez y Ramallo, 2007, 2008) y en el año 2007 se realizaron los ensayos de inocuidad propiamente dichos, en empaque comercial.

Para determinar la presencia de Xcc, se cosecharon frutos de limoneros de la variedad Lisboa Frost con y sin síntomas de cancrosis de un lote sin aplicación de productos fungicidas durante los últimos dos años y frutos sin síntomas de la enfermedad de plantas aparentemente sanas, que habían recibido los tratamientos fitosanitarios recomendados para el control de cancrosis. Los frutos se cosecharon en los meses de abril, junio y agosto, que representaban tres momentos de la temporada de exportación: inicio, medio y finalización. Los frutos con síntomas de la enfermedad se emplearon como controles positivos de la presencia de bacterias en la superficie de los limones.

Tres grupos de 200 frutos cada uno fueron cosechados en los meses indicados. Cien limones de cada grupo fueron procesados en un empaque comercial, recibiendo la aplicación sucesiva de los siguientes tratamientos: inmersión en hipoclorito de sodio (NaOCl) a 200 ppm de cloro activo, durante 2 minutos, seguido de un lavado con detergente neutro al 2% durante 20 segundos y posterior enjuague con agua aplicada a presión. Finalmente, la fruta fue cubierta con cera tipo carnaúba (Teycer C21 GLP, Tecnidex S.A., Valencia España) más imazalil 0,2% de producto comercial al 50% de i.a. (Janssen Pharmaceutica) y se secó durante 1 minuto 40 segundos en túnel a 40°C. Los 100 frutos restantes de cada grupo no recibieron ningún tratamiento.

Luego, los frutos con y sin tratamiento de empaque fueron colocados en sendas bolsas plásticas cerradas y almacenados en cámara a 6ºC para su conservación. Para evaluar la sobreviviencia de la bacteria, se tomaron muestras a los 2, 5, 8 y 22 días. Este último es el tiempo promedio de viaje requerido para que la fruta producida en Tucumán llegue al mercado europeo. Cada muestra estaba constituida por tres repeticiones de cinco frutos cada una para cada tratamiento y época de cosecha.

En el laboratorio, los frutos fueron separados en los tratamientos que se describen en el Tabla 1:

Recuperación de la bacteria en la superficie de los frutos

Para determinar la presencia de Xcc se siguió la siguiente marcha de análisis: cada fruto se lavó individualmente con 50 ml de buffer fosfato salino (BFS, 40 mM Na_2HPO_4 + 25 nM KH_2PO_4) mediante agitación mecánica a 100 rpm, durante 20 minutos. Se descartó el

Tabla 1. Descripción de tratamientos realizados en los ensayos de laboratorio.

Tratamientos	Tratamiento empaque	Frutos	Plantas
T1a	No	Con síntomas	Enferma
T1b	Sí	Con síntomas	Enferma
T2a	No	Asintomático	Enferma
T2b	Sí	Asintomático	Enferma
T3a	No	Asintomático	Sana
T3b	Sí	Asintomático	Sana

fruto y el BFS recuperado fue centrifugado (12000 g) durante 10 minutos para obtener un pellet, que se re-suspendió en 5 ml del mismo buffer. A partir de esta suspensión se realizaron dos diluciones: 1/10 y 1/100, que se utilizaron para detectar la presencia de la bacteria.

Detección de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

La detección de Xcc se realizó por a) cultivo en medio axénico, agar nutritivo (AN) y b) prueba biológica de patogenicidad por infiltración del buffer de lavado de fruto en hojas de plantines de pomelo Duncan (Citrus paradisi). Para el primero, se sembraron 50 µl de la resuspensión concentrada en sus dos diluciones (1/10 y 1/100), en medio axénico (AN + antibióticos) y posterior incubación a 28ºC durante siete días. Para la prueba biológica, se trabajó solo con la resuspensión concentrada. Para ello, se inocularon hojas inmaduras (expandidas entre un 50% y 70%) con 1 ml de la resuspensión concentrada con jeringas de tuberculina sin aguja, apoyando su extremo e infiltrando por presión en la cara abaxial de las hojas, hasta la formación de un área húmeda de 5 mm de diámetro aproximadamente (Gottwald and Graham, 1992; Graham *et al*., 2000; Francis *et al*., 2010). Se realizaron cuatro infiltraciones a cada lado de la nervadura principal y se emplearon dos hojas por repetición. Las plantas inoculadas se cubrieron con una bolsa de polietileno durante 24 h para mantener una humedad relativa próxima al 100% y favorecer el crecimiento de la bacteria. A los 14 días, se cuantificaron los cancros típicos de la enfermedad formados en las hojas inoculadas. No se emplearon métodos serológicos ni moleculares debido a la necesidad de valorar la condición de viabilidad de la bacteria.

Dispersión de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* a partir de frutos con síntomas

Para evaluar la importancia epidemiológica de los frutos de limoneros con síntomas, en la dispersión e inicio de la enfermedad se realizó un ensayo en el campo experimental de la EEAOC en la localidad de El Colmenar, Tucumán. Para ello, en un lote cubierto por pasturas naturales, se agruparon limones con síntomas severos de cancrosis cosechados directamente de un lote sin tratamientos con fungicida en los últimos tres años, ni tratamientos de empaque. A su alrededor, se colocaron plantines de pomelo Duncan ubicados en forma de tres círculos concéntricos, a 1 m (ocho platines), 5 m (ocho plantines) y 10 m (16 plantines) de los frutos enfermos, respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Limones con síntomas de cancrosis rodeados por plantines de pomelo Duncan altamente susceptibles a cancrosis, ubicados a 1, 5 y 10 metros de distancia. Campo experimental de la EEAOC, El Colmenar, 2007.

Las evaluaciones se realizaron visualmente a campo y en laboratorio. En campo, se efectuaron cada 21 días, observándose cada plantín para detectar síntomas

de cancrosis. Para las evaluaciones en laboratorio, mensualmente se recolectaron 30 hojas de los plantines que conformaban cada círculo y se agruparon en seis muestras compuestas de cinco hojas cada una. Se agregaron 50 ml de buffer BFS y se agitaron 20 min en agitador mecánico. El buffer de lavado se centrifugó a 8000 g por 12 min y el pellet obtenido se re-suspendió en 5 ml de agua destilada estéril. La detección de Xcc se realizó por: a) cultivo en medio axénico (AN); b) técnica serológica: inmunofluorescencia indirecta (IFI) y c) prueba biológica: infiltración en plantines de pomelo Duncan.

Los frutos con síntomas y los plantines se reemplazaron mensualmente, a fin de mantener condiciones similares de inóculo disponible y tejido susceptible a lo largo del año. Este ensayo se realizó desde octubre de 2006 hasta noviembre de 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación y cuantificación de las colonias de Xcc en AN en las diluciones realizadas resultó muy dificultosa, debido al crecimiento de numerosas colonias amarillas, mucosas, similares morfológicamente a las de Xcc, pero su identificación por técnicas serológicas específicas resultaron negativas para *X. citri* subsp. *citri*. Esto muestra que sobre la fruta existen diversas poblaciones de bacterias factibles de recuperar, pero que no se corresponden necesariamente con Xcc. Las poblaciones de bacterias contaminantes pueden exceder a las de Xcc e incluso podrían estar presentes en ausencia de Xcc detectables (Shiotani *et al*., 2009). Por lo tanto, esta metodología fue descartada para las determinaciones requeridas en este estudio y se optó por la prueba biológica de patogenicidad, como la metodología más adecuada para la detección y cuantificación de la bacteria. Los resultados obtenidos con esta metodología se presentan en la Tabla 2, expresados como número promedio de cancros formados en hojas de pomelo Duncan por mililitro infiltrado:

Frutos con síntomas (T1)

Se infiltraron hojas de pomelo Duncan con la solución de lavado de frutos con síntomas que no recibieron tratamiento de empaque (T1a). Estos frutos con síntomas fueron considerados controles positivos de la presencia de la bacteria sobre la superficie de la fruta. Todas las infiltraciones desarrollaron cancros en número variable a excepción de la que se realizó a partir de la fruta cosechada en junio y mantenida 22 días en cámara de conservación.

Al comparar las distintas fechas de cosecha, pudo observarse que las bacterias recuperadas, expresadas como número de cancros promedio, disminuyeron a medida que avanzó la temporada de cosecha desde abril a agosto. Si consideramos estos valores en porcentajes y si al número promedio de cancros formados por mililitro infiltrado en el mes de abril le adjudicamos un valor de 100%, los porcentajes de recuperación se redujeron en un 95% y 98% en junio y agosto, respectivamente.

Por otro lado, la disminución fue directamente proporcional al tiempo de conservación de la fruta en cámara a 6°C, observándose un incremento inesperado en el número de cancros a los ocho días de conservación en las tres fechas de cosecha. A los 22 días de conservación, sólo se formaron cancros a partir de la fruta cosechada en abril (6) y agosto (5) (Tabla 3) (Stall *et al*., 1980).

Tabla 2. Número promedio de cancros formados en hojas de pomelo Duncan por mililitro infiltrado, luego de 2, 5, 8 y 22 días de conservación. Todos los ensayos se realizaron en el laboratorio de Fitopatología de la EEAOC. El Colmenar, Tucuman, 2007.

Días de conservación	2			5			8			22		
Meses de cosecha	Abr	Jun	Agos	Abr	Jun	Agos	Abr	Jun	Agos	Abr	Jun	Agos
	Número promedio de cancros formados en hojas de pomelo Duncan por mililitro infiltrado											
T1a	107, 0	5,0	1,8	22,0	4,2	0,5	34,0	6,0	2,8	6,0	0,0	5,0
T1b	55,0	3,7	0,3	1,0	0,5	0,0	9,0	1,8	0,0	2,0	0,0	0,0
T2a	8,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	5,0	0,0	0,0
T2b	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T3a	1,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T3b	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

T1: frutos con síntomas, cosechados de planta enferma. T2: frutos asintomáticos, cosechados de plantas enfermas T3: frutos asintomáticos de planta sana.
a): sin tratamiento de empaque; b) con tratamiento de empaque.

En todos los casos, el tratamiento de empaque (T1b) redujo la cantidad de bacterias viables recuperadas en comparación a los frutos que no recibieron el tratamiento (T1a) (Tabla 2).

A los dos días de conservación, el mayor número de bacterias se obtuvo a partir del "buffer" de lavado de frutos cosechados en abril. El tratamiento de empaque redujo el número de cancros formados aproximadamente en un 50% con respecto a los frutos que no fueron procesados en empaque (T1a). Este porcentaje de reducción no fue constante en los distintos meses evaluados, siendo solo del 26% en la fruta cosechada en junio y del 84% en la cosechada en agosto.

El efecto combinado de las fechas de cosecha, tratamiento de empaque y el mayor tiempo de conservación en cámara se muestra en la Tabla 4.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos con frutos con síntomas de cancrosis, que representan la situación más desfavorable en el comercio de fresco, se demostró la significativa disminución de Xcc viables a medida que avanza la estación de cosecha y progresivamente bajan las temperaturas medias del ambiente y las precipitaciones, en nuestras condiciones otoño-invernales del hemisferio sur (Stall *et al*, 1980). Este efecto se acentúa al aumentar el número de días de conservación de la fruta en cámara a 6ºC y es más marcado y efectivo cuando la fruta recibe un tratamiento de empaque.

Frutos asintomáticos de plantas enfermas (T2)

Sin tratamiento de empaque (T2a): El mayor número de cancros obtenidos a partir de esta categoría de frutos fue ocho, en los frutos cosechados en abril (Tabla 1). Este número se redujo primero a 2 y luego a 0 a medida que aumentó el tiempo de conservación a los cinco y ocho días, respectivamente. Sin embargo en la última observación, a los 22 días, se obtuvieron cinco cancros. Es probable que, en las frutas tomadas en este último muestreo, haya habido síntomas imperceptibles a ojo desnudo. La misma explicación puede aplicarse a la detección de un cancro en frutos cosechados en junio luego de ocho días de conservación (Tabla 5).

Con tratamiento de empaque (T2b): El tratamiento de empaque redujo la cantidad de bacteria recuperada de los frutos asintomáticos, aunque ocurrieron escapes en la cosecha de junio (dos síntomas) y abril (un síntoma), a los 2 y 8 días de conservación, respectivamente, debido probablemente a la presencia de cancros pequeños no detectados en los muestreos (Tabla 2).

Al igual que lo observado en los frutos con síntomas (T1), hubo una marcada influencia de la época de cosecha y del tratamiento de empaque en la recuperación de la bacteria.

Tabla 3. Número promedio de cancros formados en hojas de pomelo Duncan por mililitro de suspensión infiltrada, obtenida a partir de limones con síntomas de cancrosis sin tratamiento de empaque (T1 a), en diferentes meses de cosecha y a distintos tiempos de conservación. El Colmenar, Tucumán, 2007.

Días de conservación	Número promedio de cancros formados en hojas de pomelo Duncan en diferentes meses de cosecha		
	Abril	Junio	Agosto
2	107,0	5,0	1,8
5	22,0	4,2	0,5
8	34,0	6,0	2,8
22	6,0	0,0	5,0

Tabla 4. Número de cancros formados en hojas de pomelo Duncan a los 22 días de conservación en cámara a 6°C, para limones con y sin tratamiento de empaque y para diferentes fechas de cosecha. El Colmenar, Tucumán, 2007.

	Número de cancros formados luego de 22 días de conservación de fruta en cámara (6°C) y en distintos momentos de cosecha		
Tratamientos	Abril	Junio	Agosto
T1a	6	0	5
T1b	2	0	0

T1: frutos con síntomas cosechados de planta enferma.
a: sin tratamiento de empaque, b: con tratamiento de empaque.

Tabla 5. Número promedio de cancros formados por ml de suspensión infiltrada en hoja de pomelo Duncan, obtenida a partir de limones del tratamiento T2, en diferentes meses de cosecha y a distintos tiempos de conservación. El Colmenar, Tucumán, 2007.

T2a	Número de cancros formados en hojas de plantin de pomelo Duncan en diferentes meses de cosecha.		
Días de conservación	Abril	Junio	Agosto
2	8	0	0
5	2	0	0
8	0	1	0
22	5	0	0

T2a: Frutos con síntomas de cancrosis, sin tratamiento en empaque comercial.

Frutos asintomáticos de plantas sanas (T3)

Sin tratamiento de empaque (T3a): A partir del lavado de frutos cosechados en abril y mantenidos en cámara dos y cinco días, se obtuvieron dos lesiones de

cancrosis en hojas de pomelo Duncan, a pesar de que en este tratamiento se trabajó con frutos sin síntomas de la enfermedad de plantas, aparentemente sanas, que habían recibido los tratamientos fitosanitarios recomendados para el control de cancrosis.

En el resto de los tratamientos no se obtuvieron cancros.

Con tratamiento de empaque (T3b): A partir de los frutos que habían recibido tratamiento de empaque, no se recuperaron bacterias a partir del buffer de lavado, ningún momento de cosecha ni en distintos tiempos de conservación.

Efecto del tratamiento de empaque (b)

El tratamiento de empaque siempre redujo el número de cancros obtenidos. Su efectividad fue diferente y se relacionó directamente con la presencia de síntomas en frutos. El porcentaje de reducción fue del 62% en T1 (frutos con síntomas) y del 100% en T3 (frutos sin síntomas de plantas sin síntomas).

Podemos considerar que el tratamiento de empaque reduce el número de cancros obtenidos en un 81% promedio, si consideramos la media de todos los tratamientos y tiempos de conservación en su conjunto (Tabla 6).

Efecto del tiempo de conservación

En general, el número de cancros formados en hojas de plantin de pomelo Duncan infiltrado, se redujo con el aumento del tiempo de conservación de los frutos a 6°C. Sin embargo, en los ensayos realizados se observó, de manera repetida, un incremento importante en el número de cancros obtenidos en las evaluaciones realizadas el día 8, cuando se trataron frutos con cancros. Esto puede deberse al hecho de que las muestras empleadas en los ensayos fueron destructivas y en cada evaluación se emplearon frutas diferentes. Es probable que, aun cuando toda la fruta fuera estandarizada de manera visual con respecto al número y tamaño promedio de síntomas, algunos cancros puedan haber tenido mayor número de bacterias activas, o que algunos síntomas hayan pasado inadvertidos a ojo desnudo. Otra posibilidad es que, en presencia de cancros, el agua de condensación haya favorecido la actividad de Xcc presentes (Figura 2).

La situación de los frutos con destino de exportación a la Unión Europea (UE) y mercados con similares restricciones está representada por el tratamiento T3b, que corresponde a frutos sin síntomas de cancrosis cosechados de plantas sanas, que recibieron los tratamientos fitosanitarios recomendados para un área con cancrosis. Los resultados que se presentan demuestran la baja probabilidad de recuperar bacterias activas en cantidad suficiente para generar cancros en tejidos foliares altamente susceptibles, a partir de las muestras analizadas en este tratamiento. Estos resultados se repitieron en las evaluaciones realizadas en Florida, EE.UU., en condiciones similares a las descriptas en el presente trabajo, pero empleando pomelos en lugar de limones (Gottwald *et al*., 2009).

Dispersión de la enfermedad

Estas evaluaciones se realizaron a campo y bajo condiciones climáticas naturales, que incluyeron un verano con viento y lluvias, típico del clima subtropical de Tucumán, potencialmente conducente a la dispersión de Xcc. Aun así, no se detectaron cancros en las hojas de los plantines susceptibles de pomelo Duncan que formaban los tres círculos concéntricos alrededor de la fuente de inóculo. Otros autores reportan resultados similares, incluso trabajando en condiciones artificiales extremas de simulación de viento y lluvias (Gottwald et al., 2009; Bock and Gottwald, 2011; Pruvost *et al*., 2002).

Por lo tanto la posibilidad de que Xcc sea diseminada a partir de cáscara infectada a plantas susceptibles es muy baja. Esta posibilidad es aún menor si

Tabla 6. Porcentaje de disminución del número de cancros formados, logrado mediante la aplicación de tratamiento de empaque en las diferentes situaciones evaluadas, independientemente de la época de cosecha y el tiempo de conservación. El Colmenar, Tucumán, 2007.

Tratamientos	Número total de cancros formados en hojas de pomelo Duncan	Disminución (%) del número de cancros formados en hojas de pomelo Duncan
T1a	194,3	62
T1b	73,3	
T2a	16,0	81
T2b	3,0	
T3a	6,0	100
T3b	0,0	
Promedio		81

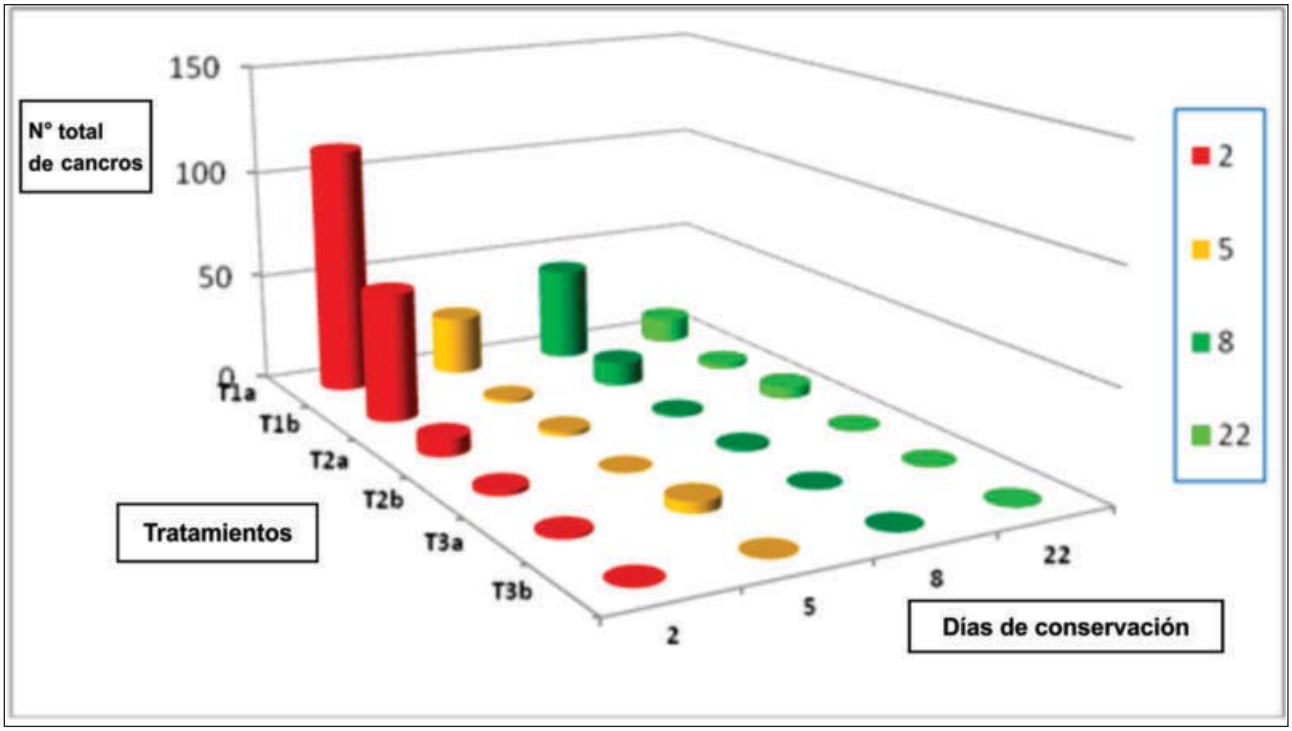

Figura 2. Número total de cancros obtenidos por infiltración en hojas de pomelo Duncan con el "buffer" de lavado de frutos de limón que recibieron diferentes tratamientos y tiempos de conservación. El Colmenar, Tucumán, 2007.
T1: Frutos con síntomas cosechados de planta enferma.
T2: Frutos asintomáticos cosechados de plantas enfermas.
T3: Frutos asintomáticos de planta sana.
a) Sin tratamiento de empaque y b) con tratamiento de empaque

la fruta recibe los tratamientos convencionales de empaque.

Con respecto a las otras técnicas aplicadas para la detección de Xcc, la recuperación de bacterias a partir del lavado de hojas de los plantines susceptibles fue negativa. Solamente en el muestreo realizado en el mes de febrero, se detectaron algunas colonias amarillas y viscosas en AN, con las que se realizó un bio-ensayo que resultó negativo, por lo que se descartó que se tratara de Xcc.

CONCLUSIONES

Las bacterias recuperadas de la superficie de frutos de limonero con y sin síntomas de cancrosis disminuyeron a medida que avanzó la temporada de cosecha desde abril a agosto, cuando progresivamente descienden las temperaturas medias del ambiente y las precipitaciones, bajo nuestras condiciones otoño-invernales. Esta disminución fue directamente proporcional al tiempo de conservación de la fruta en cámara a 6°C. El tratamiento de empaque en todos los casos redujo la cantidad de bacterias viables recuperadas en comparación a los frutos que no recibieron el tratamiento.

Los resultados obtenidos en estos ensayos realizados con frutos de limonero en Tucumán, R. Argentina, área con cancrosis de los cítricos desde el año 2002, demostraron que los tratamientos convencionales de empaque, que incluyen desinfección con hipoclorito de sodio (200 ppm), inmersión en bicarbonato de sodio 3% y fungicida del grupo de los imidazoles, aplicados en agua y cera complementados con la conservación en frío, fueron efectivos para eliminar la población de bacterias de la superficie de los frutos asintomáticos así como de los frutos con síntomas, empleados en estos ensayos como controles positivos. Esto reduce significativamente la probabilidad de que limones producidos en un área con presencia de *X. citri* subsp. *citri*. puedan establecer la enfermedad en una región libre de ella.

Lo anterior implica que, trabajando dentro de un sistema de mitigación de riesgo y cumpliendo con los tratamientos convencionales de empaque aceptados internacionalmente, el comercio de fruta fresca de áreas con cancrosis no pone en riesgo el estatus fitosanitario de países libres de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Bock, C. H. and T. R. Gottwald. 2011. Processes involved in the dispersal of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from canker-infected citrus canopies, and in the infection of citrus foliage. En: Workshop on *Xanthomonas citri*/ Citrus canker, Riberao Preto, Brasil, 2011.

Canteros, B. I. 2004. Management of citrus canker in Argentina. A review. Proc. Int. Soc. Citriculture 2: 696-704.

Canteros, B. I.; E. Zagory and R. E. Stall. 1985. A medium for cultivation of B-strain of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, cause of cancrosis B in Argentina and Uruguay. Plant Dis. 69: 122-123.

Francis, M. I.; A. Peña and J. H. Graham. 2010. Detached leaf inoculation of germplasm for rapid screening of resistance to citrus canker and citrus bacterial spot. Eur. J. Plant Pathol. 127 (4): 91-100.

Gottwald, T. R. and J. H. Graham. 1992. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. Phytopathol. 82: 930-935.

Gottwald, T.; J. Graham; C. Bock; G. Bonn; E. Civerolo; M. Irey; R. Leite; G. McCollum; P. Parker; J. Ramallo; T. Riley; T. Schubert; B. Stein and E. Taylor. 2009. The epidemiological significance of post-packinghouse survival of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. Crop Protection 28: 508–524.

Gottwald, T. R.; J. Graham and T. Schubert. 2002. Citrus canker: the pathogen and its impact. Plant Health Prog. [En línea] DOI 10.1094/php-2002-0812-01-RV. Disponible en www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/ (consultado 10 mayo 2011).

Graham, J. H.; T. R. Gottwald; T. D. Riley; J. Cubero and D. L. Drouillard. 2000. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Xcc) on various surfaces and chemical control of Asiatic citrus canker (ACC). En: Proc. Int. Citrus Canker Res. Workshop, 1, Ft. Pierce, Florida, USA, p.7.

Martínez, V. y J. Ramallo. 2007. Diferentes alternativas de pruebas de patogenicidad para el diagnóstico de la cancrosis de los citrus. Avance Agroind. 28: 38-41.

Martínez, V. y J. Ramallo. 2008. Aplicación de un método rápido de dignóstico para *Xanthomonas citri* subsp *citri*. En: Proc. Congreso Argentino de Fitopatología, 1, Córdoba, R. Argentina, p. 312.

Pruvost, O.; B. Boher; C. Brocherieux; M. Nicole and F. Chiroleu. 2002. Survival of *Xanthomas axonopodis* pv. *citri* in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculums. Phytopathol. 92: 336-346.

Ramallo, J.; N. Vazquez de Ramallo y D. Ploper. 2005. Identificación y caracterización del agente causal de la cancrosis de los citrus (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) en limoneros (*Citrus limon*) en Tucumán, Argentina. En: Proc. Congreso Latinoamericano de Fitopatología, 13, Córdoba, R. Argentina, p. 240.

Schubert, T. S.; S. A. Rizivi; X. Sun; T. R. Gottwald; J. H. Graham and W. N. Dixon. 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker again in Florida. Plant Dis. 85: 340-356.

Shiotani, H.; H. Uematsu; T. Tsukamoto; Y. Shimizu; A. Mizuno and S. Sato. 2009. Survival and dispersal of *Xanthomonas citri* from infected Satsuma mandarin fruit. Crop Protection 28: 19-23.

Stall, R.E.; Miller, J.W.; Marco, G.M.; Canteros de Echenique, B.I. 1980. Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing cancrosis of citrus in Argentina. Proceedings of Florida Horticultural Society 93:10-14.

Stein, B.; J. Ramallo; L. Foguet and J. Graham. 2007. Citrus leafminer control and copper sprays for management of citrus canker on lemon in Tucumán, Argentina. Proc. Fla. State Hort. Soc. 120: 127–131.