



RIDAA

Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Marangi, María Julia

Estudio del complejo microbiano involucrado en la necrosis apical marrón y la caída prematura de frutos de nogal en el Valle Medio del río Negro



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.

Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Marangi, M. J. (2024). *Estudio del complejo microbiano involucrado en la necrosis apical marrón y la caída prematura de frutos de nogal en el Valle Medio del río Negro. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4511>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudio del complejo microbiano involucrado en la Necrosis Apical Marrón y la caída prematura de frutos de nogal en el Valle Medio del río Negro

TESIS DOCTORAL

María Julia Marangi

mjmarangi@gmail.com

Resumen

El nogal -*Juglans regia*- puede ser afectado por varias patologías, entre ellas, la bacteriosis del nogal, causada por la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, y la necrosis apical marrón (NAM), una enfermedad compleja en la que, además de *X. arboricola* pv. *juglandis*, también estarían involucrados los géneros fúngicos *Fusarium* y *Alternaria*. Ambas patologías causan la caída prematura de los frutos. En Argentina, NAM se detectó por primera vez durante la temporada 2013-2014 en cultivos de la región productora del Valle Medio del río Negro, Patagonia Norte, registrándose pérdidas de hasta un 40 % en la producción local de nuez. En temporadas anteriores, los porcentajes de pérdidas registrados por casos de bacteriosis fueron inferiores a lo observado durante 2013-2014. Considerando que NAM fue reportada en la zona y que se extiende rápidamente, el objetivo general del presente trabajo consistió en estudiar el complejo microbiano involucrado en la caída prematura de los frutos del nogal en el Valle Medio del río Negro, a fin de aportar conocimientos que contribuyan a elucidar la etiología y epidemiología de NAM, y a optimizar el diseño de nuevas estrategias para su control. El mismo consiste en la aplicación reiterada de productos cúpricos y reviste carácter netamente preventivo.

En primer lugar, se determinó la ocurrencia de *X. arboricola* pv. *juglandis* y de grupos-especies de *Alternaria* en diferentes estados fenológicos del nogal. La bacteria se detectó en 9 de los 11 estados fenológicos estudiados y *Alternaria spp.* en todos ellos, destacándose el grupo-especies *Alternaria tenuissima*. No se detectaron aislamientos de *Fusarium* en ningún momento. Las yemas fueron el principal sitio de hibernación de la bacteria. Si bien el hongo se halló en todos los estados fenológicos analizados, en frutos sintomáticos sólo se aisló esporádicamente, mientras que la bacteria fue predominante. La población de *X. arboricola* pv. *juglandis* fue caracterizada, resultando Gram negativa, catalasa positiva y oxidasa negativa. Las bacterias no produjeron pigmentos en agar F, crecieron débilmente en agar Nutritivo a 35 °C y toleraron NaCl al 3 %. Mostraron actividad lipolítica y capacidad

para hidrolizar almidón y esculina, digerir gelatina y caseína. No presentaron actividad ureasa, producción de indol ni reducción de nitratos.

Por otra parte, se estudió el comportamiento de tres importantes cultivares comerciales empleados en la región (Chandler, Tulare y Franquette) frente a la infección causada por *X. arboricola* pv. *juglandis* y *A. tenuissima*. Para ello, se realizaron inoculaciones artificiales sobre frutos sanos e inmaduros. Las nueces de los cultivares Chandler y Tulare fueron más sensibles a los microorganismos que las correspondientes a Franquette.

Teniendo en cuenta que los productos cúpricos constituyen la base del control en las patologías del nogal causadas por *X. arboricola* pv. *juglandis*, y que un problema generalizado, a partir de la frecuente aplicación de estos compuestos, es el desarrollo de cepas patógenas resistentes al cobre y, por ende, la reducción en el control de la enfermedad, se determinó la sensibilidad al cobre de aislamientos bacterianos mediante análisis fenotípicos y genotípicos. Se observaron diferentes niveles de tolerancia al cobre en la población bacteriana, sin detectarse la presencia del grupo de genes *copLAB*, uno de los determinantes más comunes de resistencia al cobre en *X. arboricola* pv. *juglandis*. Asimismo, se procedió a la evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de diferentes productos cúpricos utilizados en la región. Se observaron diferentes capacidades de inhibición sobre los aislamientos bacterianos. La combinación cobre-mancozeb, en general, ejerció un mayor control sobre el crecimiento de la bacteria, comparado con el uso individual de cada producto cúprico. Los tratamientos más efectivos consistieron en las combinaciones sulfato de cobre pentahidratado-mancozeb, hidróxido cúprico-mancozeb y sulfato tetra amino-cúprico-mancozeb.

Por otra parte, se ha demostrado que ciertas enfermedades causadas por microorganismos están fuertemente influenciadas por las condiciones climáticas, por lo tanto, las infecciones podrían predecirse en función de ciertos parámetros ambientales. En este aspecto, resultó interesante analizar los efectos que los principales factores ambientales (temperatura y a_w) tienen sobre la germinación de conidios y el crecimiento de aislamientos de *A. tenuissima*, considerando la influencia del hongo en la severidad de la enfermedad. El ensayo se realizó sobre un medio de cultivo estándar y luego, sobre un medio análogo al sustrato natural a base de pulpa de nuez sin modificación de la a_w . La interacción entre los factores temperatura, actividad acuosa y nivel de agresividad del hongo afectó significativamente las velocidades de crecimiento fúngico sobre el medio de cultivo estándar. Asimismo, la interacción entre los factores temperatura y nivel de agresividad afectó el crecimiento sobre el medio análogo al sustrato natural. En el caso de *X. arboricola* pv. *juglandis*, se determinaron los parámetros limitantes que la temperatura y la actividad de agua tienen sobre el crecimiento de la bacteria, generando información básica que permitirá a futuro ampliar los estudios sobre la ecofisiología de la bacteria.



Estudio del complejo microbiano involucrado en la Necrosis Apical Marrón y la caída prematura de frutos de nogal en el Valle Medio del río Negro

**DOCTORADO EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
QUILMES**

Ing. María Julia Marangi

Directora: Dra. Graciela N. Pose

Codirector: Dr. Alejandro G. Pardo

***Bernal, provincia de Buenos Aires,
Argentina, 2024***

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el marco de la carrera de Doctorado en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, bajo la dirección de la Dra. Pose, Graciela Noemí y el Dr. Pardo, Alejandro Guillermo, y el otorgamiento de una beca doctoral CONICET (2016-2022), bajo la dirección de la Dra. Pose, Graciela Noemí y el Dr. Uthurry Weinberger, Carlos Aníbal. Las actividades experimentales se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones y Transferencia de Río Negro, en las instalaciones de laboratorios de la Universidad Nacional de Río Negro, sede AVVM, subsede Villa Regina y, en colaboración con la Agencia de Extensión Rural AER INTA Valle Medio y el Cluster de Frutos Secos de la Norpatagonia. El financiamiento para su desarrollo fue obtenido a partir de los siguientes proyectos de investigación:

- PI UNRN 40-A-410 (2015-2017). Directora: Dra. Pose, G.N.
- PDTs CIN CONICET 583 (2016-2018). Directora: Dra. Pose, G.N.
- PI UNRN 40-A-627 (2018-2021). Directora: Dra. Alzamora, S.M.
- Programa de I+D Res. 990/2019 (UNQ) (2019-2023). Directora: Dra. Semorile, L.C.
Codirector: Dr. Pardo, A.G.

Quiero extender un profundo agradecimiento a quienes, de una u otra manera, me acompañaron durante esta etapa, haciendo posible la realización de este trabajo.

A mis directores, Graciela Pose y Alejandro Pardo, por darme la oportunidad de embarcar en el camino de la investigación. Su acompañamiento profesional, sus críticas y sugerencias han sido fundamentales.

A Carolina Temperini, por su acompañamiento a lo largo de estos años, por la dedicación y el tiempo invertido en este proyecto. A María José Susca, por estar siempre dispuesta a ayudarnos, por tan valiosas palabras de aliento. A Carlos Uthurry, por acompañarme desde la codirección de beca, por su ayuda y orientación en la aplicación de análisis estadísticos. Agradezco la hermosa amistad que nació a partir de tantos momentos compartidos, por toda la ayuda en el laboratorio, por estar siempre presentes.

A la Agencia de Extensión Rural AER INTA Valle Medio, por su acompañamiento y colaboración. Especialmente a la Ing. Diana Fernández, cuyo apoyo técnico y coordinación de las etapas de muestreo fueron fundamentales, además de su disposición ante cualquier consulta. A los productores nogaleros de Luis Beltrán, por su colaboración e interés en este trabajo, especialmente a Charlie y Kuky, por el amable recibimiento en sus establecimientos productivos.

A Aluminé Tudela, compañera de viajes, ensayos y cursos de posgrado. A Mariana Greco, por su colaboración en los análisis estadísticos y en los ensayos de ecofisiología. A la Dra. Blanca Canteros (EEA INTA Bella Vista), por el aporte de una cepa bacteriana utilizada como control en ensayos de sensibilidad al cobre.

Al Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) (Villa Regina), por facilitarnos el uso de sus instalaciones durante unos días. Especialmente a Analiz Alfonso y Adrián Pessoa, por su agradable recibimiento.

A Juan, Graciela, Fede, Magui, Nico, Nona, Mamá y Papá, por su compañía en los viajes a Luis Beltrán, durante las diferentes etapas de muestreo. A Umma, Teo y Milo, que sin entenderlo fueron una compañía incondicional durante largas horas de escritura.

A mi familia, por apoyarme en mis proyectos, por haber comprendido varias veces mis ausencias. Especialmente a mis padres, por siempre desear lo mejor para mi vida, por escucharme, por guiarme. A mis hermanas, por acompañarme siempre. A Fausto, que llegó en esta última etapa y llenó nuestras vidas de alegría.

A mis Seres de Luz, Julio y María, que tantas veces me preguntaron por "*las nueces*". Gracias por tan infinito e inolvidable amor.

CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 El nogal: origen y descripción general	2
1.1.1 El árbol	3
1.1.2 Floración y polinización	4
1.1.3 El fruto	7
1.1.4 Estados fenológicos	8
1.2 Producción y comercio de la nuez	12
1.2.1 Contexto mundial	12
1.2.2 Situación en Argentina	14
1.2.3 Situación en el Valle Medio del río Negro	18
1.3 <i>Xanthomonas</i> y <i>Alternaria</i>: géneros asociados a patologías del nogal	21
1.3.1 Breve descripción del género <i>Xanthomonas</i>	21
1.3.1.1 <i>Xanthomonas arboricola</i>	23
1.3.1.2 <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	24
1.3.2 Breve descripción del género <i>Alternaria</i>	25
1.4 Bacteriosis del nogal	28
1.4.1 Síntomas de la patología	28
1.4.2 Epidemiología	31
1.4.2.1 Ciclo de la enfermedad	32
1.4.2.2 Condiciones predisponentes	34
1.4.3 Manejo de la patología	35
1.4.3.1 Limitaciones de los tratamientos a base de cobre	38
1.5 Necrosis apical marrón	41
1.5.1 Síntomas de la patología	41
1.5.2 Etiología	42
1.5.3 Epidemiología	43
1.5.3.1 Condiciones predisponentes	44

2. OBJETIVOS	46
3. DISTRIBUCIÓN DE LAS POBLACIONES DE MICROORGANISMOS ASOCIADAS A BACTERIOSIS Y NAM EN DIFERENTES ESTADOS FENOLÓGICOS DEL NOGAL	
3.1 Introducción	49
3.2 Materiales y métodos	49
3.2.1 Muestreo	49
3.2.2 Aislamiento de los microorganismos	55
3.2.3 Identificación de los microorganismos	56
3.2.4 Cálculo de la frecuencia de aislamiento y abundancia de los patógenos. Análisis estadístico de datos	60
3.2.5 Conservación de los aislamientos	61
3.3 Resultados	61
3.3.1 Identificación de los microorganismos	61
3.3.2 Frecuencias de aislamiento y abundancia de los microorganismos en diferentes estados fenológicos del nogal	63
3.3.3 Frecuencias de aislamiento de los microorganismos en frutos lesionados	79
3.4 Discusión	80
4. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA RESPONSABLE DE LA BACTERIOSIS Y NAM EN NOGALES DEL VALLE MEDIO DEL RÍO NEGRO	
4.1 Introducción	86
4.2 Materiales y métodos	86
4.3 Resultados	93
4.4 Discusión	97
5. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE CULTIVARES COMERCIALES DE NOGAL A LA INFECCIÓN POR LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS	
5.1 Introducción	100
5.2 Materiales y métodos	101
5.3 Resultados	103
5.4 Discusión	107

6. DETERMINACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA SENSIBILIDAD AL COBRE DE AISLAMIENTOS DE *X. arboricola* pv. *juglandis*

6.1 Introducción	110
6.2 Materiales y métodos	111
6.2.1. Determinación fenotípica	111
6.2.2. Determinación genotípica	115
6.3 Resultados	116
6.3.1. Determinación fenotípica	116
6.3.2. Determinación genotípica	119
6.4 Discusión	119

7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DIFERENTES COMPUESTOS QUÍMICOS DE USO TRADICIONAL PARA EL CONTROL DE LAS PATOLOGÍAS DEL NOGAL CAUSADAS POR *X. arboricola* pv. *juglandis*

7.1 Introducción	123
7.2 Materiales y métodos	123
7.3 Resultados	128
7.4 Discusión	137

8. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE PARÁMETROS AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE *A. tenuissima*

8.1 Introducción	141
8.2 Materiales y métodos	142
8.2.1. Ecofisiología sobre medio de cultivo estándar	142
8.2.2. Ecofisiología sobre agar Nuez	145
8.3 Resultados	147
8.3.1. Ecofisiología sobre medio de cultivo estándar	147
8.3.2. Ecofisiología sobre agar Nuez	166
8.4 Discusión	173

9. PARÁMETROS AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE *X. arboricola* pv. *juglandis*: DETERMINACIÓN DE LAS BASES DE SU INFLUENCIA

9.1 Introducción	177
9.2 Materiales y métodos	178
9.3 Resultados	179
9.4 Discusión	181
10. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	184
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	189
ANEXOS	
Anexo 1: Composición y preparación de medios de cultivos y soluciones	210
Anexo 2: Identificación de aislamientos de <i>Alternaria</i> a nivel grupos-especies	217
Anexo 3: Frecuencia de aislamiento y abundancia de <i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> en diferentes estados fenológicos del nogal	218
Anexo 4: Frecuencia de aislamiento y abundancia de <i>Alternaria</i> spp. en diferentes estados fenológicos del nogal	221
Anexo 5: Evaluación de la respuesta de cultivares comerciales de nogal a la infección por los microorganismos patógenos	224
Anexo 6: Determinación de la sensibilidad al cobre de aislamientos de <i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	226
Anexo 7: Publicación de resultados	227

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 EL NOGAL: ORIGEN Y DESCRIPCIÓN GENERAL

El nogal -*Juglans regia*- es un frutal antiguo, cuyo origen es incierto. La hipótesis más probable considera su origen en Asia, en una amplia región extendida entre Turquía y la cadena de Himalaya, con probable centro en el actual Irán (Persia) (Iannamico, 2009). Se trata de un frutal perteneciente al género *Juglans*, nombre que se originó a partir de los Romanos, quienes llamaron a su fruto “*Jovis glans*” (la bellota de Júpiter). La especie *J. regia*, conocida vulgarmente como nogal común, persa o inglés, comenzó su domesticación en Persia y de ahí se llevó a Grecia, donde se la denominó “nuez persa” o “real”, dado que fueron los reyes los que la introdujeron al imperio, y así se diferenció de algunos tipos silvestres (Lemus y col., 2010).

Botánicamente, el nogal pertenece a la familia de las Juglandáceas, dentro de la cual se encuentran 3 géneros:

- *Juglans*: nogales de fruto comestible y/o aprovechamiento forestal
- *Carya*: pecanes de fruto comestible y/o madera forestal
- *Pterocarya*: árboles de aprovechamiento forestal

Dentro del género *Juglans* existen 17 especies, conocidas vulgarmente como nogales blancos, negros y grises. Estas especies se agrupan en las siguientes secciones:

- *Dioscaryon*, vulgarmente nogales persas: *J. regia*, *J. sigillata*
- *Cardiocaryon*, vulgarmente nogales asiáticos: *J. ailantifolia*, *J. cathayensis*, *J. mandshurica*, *J. hopeiensis*
- *Trachycaryon*: *J. cinérea*
- *Rhysocaryon*: *J. australis*, *J. californica*, *J. microcarpa*, *J. mollis*, *J. neotropica*, *J. nigra*, *J. olanchana*, *J. guatemalensis*, *J. hindsii*, *J. major*

Los nogales blancos o nogales persa –sección *Dioscaryon*– pertenecientes a la especie *J. regia*, son los más conocidos y típicamente identificados por su fruto como alimento. Algunos nogales negros –sección *Rhysocaryon*– son originarios de América y se utilizan mayormente como portainjertos, principalmente *J. hindsii* y *J. nigra*. Los nogales grises comprenden las restantes secciones –*Cardiocaryon*, *Trachycaryon*– (Iannamico, 2009).

1.1.1 El árbol

El nogal de *J. regia* es un árbol de gran tamaño que puede sobrepasar los 25-30 metros de altura, por lo general de porte globoso, ramificado, con tronco de corteza grisácea y lisa, que se vuelve agrietada y más oscura en árboles adultos. Ha sido y es cultivado como especie forestal debido a su madera de excelente calidad (Iannamico, 2009).

Las raíces forman un sistema de gran desarrollo, mayormente de crecimiento vertical. La raíz es pivotante y puede llegar a superar los 6 metros de profundidad, pero en los viveros se produce la rotura de la raíz principal, a fin de obtener un sistema radical más ramificado y equilibrado, alcanzando menores profundidades (2 a 4 metros, dependiendo del suelo). El crecimiento horizontal de las raíces sobrepasa la extensión de la copa del árbol (Iannamico, 2009).

Las hojas poseen 7 o 9 folíolos de forma oval u oval-lanceolados, dispuestos de forma opuesta o casi opuesta, que al ser jóvenes presentan color rojo parduzco y son muy tiernos. A medida que van creciendo, endurecen y toman tonalidades verdes, siendo más oscuras en el haz que en el envés, donde pueden observarse nerviaciones muy marcadas (Fig. 1) (Muncharaz Pou, 2012).



Fig. 1: Hojas de nogal. Izquierda: folíolos jóvenes. Centro: haz. Derecha: envés

El número de folíolos, así como su tamaño diferencian a *J. regia* de otras especies. El nogal es un árbol de hoja caduca, produciéndose su caída entre inicio y mediados de otoño, y su aparición en primavera.

Las ramas poseen dos tipos de yemas: de madera o vegetativas y de fruta o fructíferas, estas últimas son más globosas. Las de madera son pequeñas, de forma

oval y están cubiertas de escamas color gris oscuro. Aquellas yemas que al año siguiente producirán flores, tanto femeninas (pistiladas) como masculinas (amentos) desarrollarán un proceso de inducción floral al inicio del verano (Iannamico, 2009).

Las yemas de flores masculinas se diferencian de un año para el otro y su brotación da origen a un amento, sin brotes ni hojas (Fig. 2). En el caso de las flores femeninas, las yemas fructíferas producen un brote con hojas que porta las flores pistiladas diferenciadas en la temporada anterior.

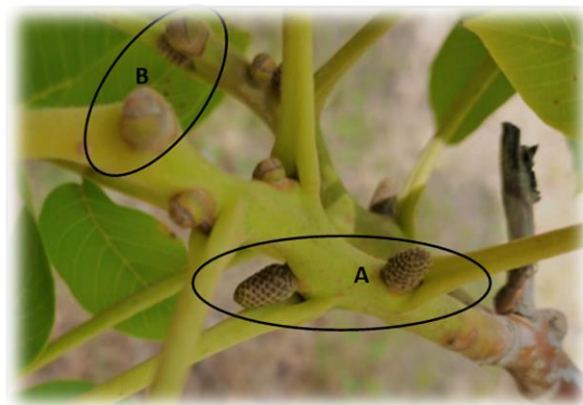


Fig. 2: Yemas del nogal. A: yemas diferenciadas en amentos. B: yemas fructíferas

La ubicación de las yemas fructíferas puede ser lateral o terminal. La fructificación lateral es una característica de interés agronómico dado que se incrementa el número de yemas fructíferas por brote, aumentando la producción. A partir de ello, se han desarrollado numerosos trabajos de mejora genética a fin de introducir esta característica a nuevas variedades (Iannamico, 2009).

1.1.2 Floración y polinización

El nogal es una especie monoica, es decir, las flores masculinas o amentos, y las flores femeninas o pistiladas, están presentes de manera separada en una misma planta. A diferencia de los nogales, otras especies son dioicas, existiendo árboles con flores femeninas y otros con flores masculinas (Lemus y col., 2010).

Las flores masculinas nacen lateralmente en brotes del año anterior, se agrupan en inflorescencias denominadas amentos, de 6 a 12 cm de longitud (Fig. 3). Cada uno de ellos posee entre 100 y 160 flores apétalas, con 30-40 estambres que pueden liberar entre 1,5 y 2 millones de granos de polen (Iannamico, 2009; Lemus y col., 2010).



Fig. 3: Amentos conteniendo las flores masculinas

Las flores femeninas, generalmente están presentes de a dos o tres, aunque pueden ser solitarias (Fig. 4). Nacen sobre brotes de la temporada actual, no poseen pétalos, y tienen un ovario unilocular y bicarpelado, con 2 estigmas bien desarrollados de forma plumosa. Los estigmas están adaptados para capturar el polen, reconociendo el proveniente del nogal, y rechazando el de otras especies. Si las condiciones son ideales, el periodo de receptividad puede durar hasta 7 días, sin embargo, días calurosos y secos tienden a acortar este periodo (Iannamico, 2009; Lemus y col., 2010).



Fig. 4: Flores femeninas del nogal

Una característica particular de los nogales es que su polen, extremadamente liviano, es transportado por el viento (polinización anemófila), a diferencia de la mayoría de frutales en que la polinización es efectuada por insectos (entomófila), principalmente abejas. El nogal es genéticamente autofértil y con compatibilidad cruzada, no existe

incompatibilidad polínica. Sin embargo, generalmente, el periodo de liberación de polen no coincide completamente con el periodo de receptividad de las flores femeninas. Este fenómeno se conoce como dicogamia y existen dos tipos:

- Protandría: las flores masculinas liberan el polen antes que las femeninas estén receptivas. Esto ocurre en la mayoría de las variedades.
- Protoginia: la receptividad femenina precede a la liberación del polen.

En el caso de coincidencia de fechas existe homogamia (Iannamico, 2009; Lemus y col., 2010). En la figura 5 pueden apreciarse las diferencias de floración masculina y femenina en diferentes variedades en el Alto Valle del río Negro.



Fig. 5: Períodos de brotación y floración de diferentes variedades de nogal
(Fuente: Iannamico, 2009)

Debido a la dicogamia presente en casi todas las variedades cultivadas, y teniendo en cuenta el corto periodo de vida del grano de polen y la receptividad de los estigmas, para lograr un buen nivel de productividad es importante que, durante la floración femenina y cuando los estigmas estén más receptivos, haya una buena emisión de polen, de manera que todas las flores puedan ser fecundadas. Es por ello que, en un monte de nogal, debe asegurarse que la principal variedad cultivada tenga una adecuada variedad polinizadora, de manera tal que coincidan la madurez de los amentos de la polinizadora con la receptividad de los estigmas correspondientes a la floración femenina de la variedad de interés productivo (Iannamico, 2009).

1.1.3 El fruto

El fruto del nogal se define botánicamente como una drupa globosa indehisciente y en él se pueden distinguir tres partes (Iannamico, 2009; Lemus y col., 2010):

- *Pericarpio, vulgarmente conocido como capote*: Consiste en la parte exterior y carnosa del fruto y está compuesto por el exocarpio (o epicarpio) y el mesocarpio (Fig. 6). El capote es de color verde, rico en agua y compuestos fenólicos, con un espesor variable entre 5 y 20 mm. Es parcialmente dehiscente, ya que se abre poco después de adquirida la madurez de la semilla. Se origina a partir del involucro que rodea a la flor pistilada.
- *Endocarpio, vulgarmente denominado nuez*: Consiste en la cáscara leñosa, debido a su contenido en lignina, ubicada en la parte interior del fruto (Fig. 6). Está formado por dos mitades o valvas selladas. La superficie exterior de la cáscara puede ser variable pero generalmente es lisa a surcada y en algunos casos abollada. El interior está dividido en cuatro partes por tabiques membranosos, dos muy desarrollados, y otros menos perceptibles. El endocarpio se origina a partir del ovario desarrollado luego de la fecundación.
- *Semilla*: Se encuentra dentro de la nuez, es la parte comestible del frutal y tiene su origen en el óvulo fertilizado. Está formada por dos cotiledones, denominados vulgarmente mariposas en virtud de su forma.

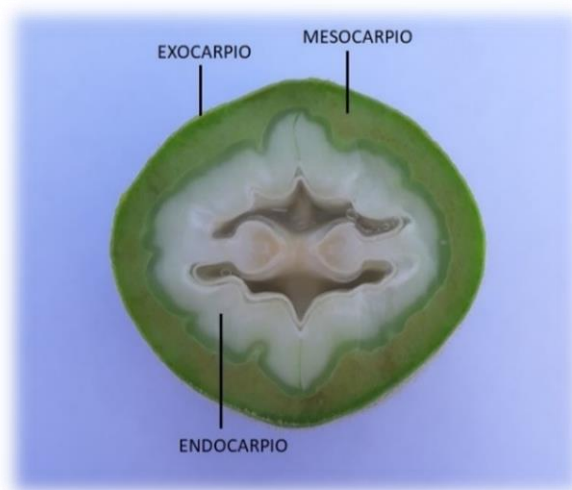


Fig. 6: Corte transversal del fruto inmaduro de nogal

Según la Resolución 1352/1967 de la Secretaría de Agricultura y Ganadería, se define a la nuez como el fruto del nogal (*J. regia*), al cual se le ha eliminado, una vez maduro,

el epicarpio y mesocarpio. Es decir, se trata del endocarpio lignificado, que contiene la semilla comestible. Para el comercio de nueces, se establecen los siguientes tipos:

- *Nueces con cáscara*: Se designan con este nombre las nueces enteras, o sea el endocarpio lignificado conteniendo la semilla comestible (Fig. 7).
- *Nueces sin cáscara*: Nueces a las cuales se les ha eliminado la cáscara y los tabiques internos, o sea que se trata de la semilla comestible, sin el endocarpio lignificado (Fig. 7).



Fig. 7: Izquierda: nueces con cáscara. Derecha: nueces sin cáscara

1.1.4 Estados fenológicos

Algunos autores definen fenología como el estudio de los eventos periódicos naturales involucrados en la vida de las plantas (Volpe, 1992; Villalpando y Ruiz, 1993; Schwartz, 1999 citados en Brenes y Sánchez, 2017). Fournier, señala que la fenología es el estudio de los fenómenos biológicos como la brotación, la floración, la maduración de los frutos y otros, acomodados a ciertos ritmos periódicos (Fournier, 1978 citado en Brenes y Sánchez, 2017).

La fenología estudia las manifestaciones de las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo de los organismos vivos y su relación con el medio que los rodea. Esta herramienta proporciona datos sobre el ritmo periódico de fenómenos biológicos, los cuales dependen de las características propias de la especie y están relacionados estrechamente con el clima local, en particular con la temperatura ambiental. Esta información es vital para el manejo de los huertos y proporciona valiosos antecedentes para la incorporación de una especie determinada, en nuevas áreas en desarrollo o susceptibles de ser utilizadas para la producción frutícola (Donoso y col., 2007).

A continuación, las tablas 1 y 2 detallan los estados fenológicos del nogal correspondientes a la floración femenina y masculina, respectivamente (Germain y

col., 1999 citado en Iannamico, 2009), siendo muy común encontrar en una misma planta diversos estados fenológicos coexistiendo.

BROTACIÓN Y FLORACIÓN FEMENINA

Af



Yemas en reposo invernal

Durante el periodo invernal, la yema recubierta de escamas está en estado de “dormancia”

Af2



Caída de escamas externas

En Julio/Agosto, las escamas duras exteriores caen. La yema queda envuelta por otras escamas pero diferenciadas y semi-membranosas

Bf



Yema hinchada

La yema se hincha, se abren las envolturas externas y aparece una pelusa blanquecina de las brácteas subyacentes. Es el estado de “yema blanca”

Cf



Brotación

La yema se alarga, se puede distinguir la extremidad de los folíolos terminales de las hojas exteriores. Es el estado de “brotación”

Cf2



Individualización de hojas externas

Las escamas y brácteas caen y se individualizan las primeras hojas

Df



Individualización de folíolos

La yema está abierta, las primeras hojas se separan y se individualizan bien sus folíolos

Df2



Hojas desplegadas

Las primeras hojas están completamente desplegadas, toman un porte oblicuo y dejan aparecer en el centro las flores femeninas

Ef



Aparición de inflorescencia

Aparición de las flores femeninas

Ff

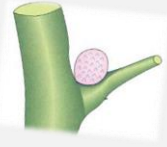
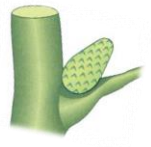
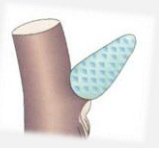
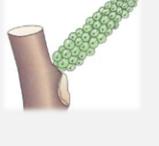
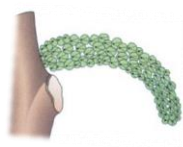


Aparición de estigmas

Ff1		<i>Divergencia de estigmas</i> Los estigmas de color amarillo-anaranjado son divergentes. Su receptividad al polen es óptima. Es el estado de “plena floración femenina”
Ff2		<i>Estigmas completamente curvados</i> Los estigmas toman un color verde-amarillento pálido y se curvan completamente
Ff3		<i>Inicio de oscurecimiento de estigmas</i> Las papilas de los estigmas comienzan a necrosarse
Gf		<i>Estigmas secos</i> Los estigmas se ennegrecen y se secan

Tabla 1: Estados fenológicos del nogal correspondientes a la brotación y floración femenina (Fuente: Iannamico, 2009)

BROTACIÓN Y FLORACIÓN MASCULINA

Amr		<i>Amento en fase de diferenciación</i> A principios del verano, el amento ya diferenciado, de forma globosa, toma un color rosado, mientras que el resto de las yemas permanecen verdes
Amv		<i>Amento a fin del verano</i> Durante el verano, el amento crece levemente y toma una forma cónica
Amg		<i>Amento en reposo invernal</i> En abril, el amento cesa su crecimiento midiendo de 5 a 8 mm y toma una coloración gris que conservará durante todo el invierno
Bm		<i>Inicio de crecimiento</i> Aproximadamente 3 semanas antes de la brotación, el amento se hincha y alarga alcanzando de 13 a 20 mm de largo
Cm		<i>Individualización de flores masculinas</i> El amento alcanza el grosor de un lápiz y mide de 30 a 40 mm. Su color pasa progresivamente del verde oscuro al verde claro. Se distinguen bien los glomérulos de las flores masculinas
Dm		<i>Separación de flores masculinas</i> El amento pierde la rigidez, se torna semi-erecto y los glomérulos comienzan a separarse

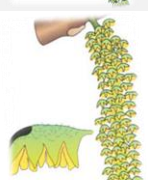
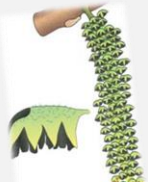
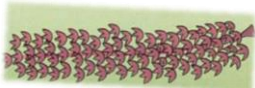
Dm2		<i>Apertura de flores masculinas</i> Los glomérulos se separan y comienzan a abrirse, mientras el amento ya es péndulo
Em		<i>Separación de anteras</i> Se abren completamente los glomérulos y se separan las anteras que comienzan a amarillear
Fm		<i>Inicio de dehiscencia de anteras</i> Comienza la dehiscencia de las anteras a partir de la base del amento
Fm2		<i>Dehiscencia total de anteras</i> Existe plena emisión del polen
Gm		<i>Anteras vacías de polen</i> Las anteras vacías de polen comienzan a ennegrecer
Hm		<i>Caída de amento</i>

Tabla 2: Estados fenológicos del nogal correspondientes a la brotación y floración masculina (Fuente: Iannamico, 2009)

1.2 PRODUCCIÓN Y COMERCIO DE LA NUEZ

1.2.1 Contexto mundial

El nogal se encuentra entre los cultivos económicamente más importantes. Los mayores productores de nueces a nivel mundial son China (1.100.000 t) y Estados Unidos (657.710 t), que concentran más del 60 % de la producción global. Otros países productores importantes son Irán (386.976,51 t), Turquía (325.000 t), Chile (148.000 t), Burkina Faso (137.267,92 t), México (135.946,76 t) y Ucrania (115.420 t) (Fig. 8). Argentina se posiciona en el 14º puesto del ranking por producción, con un total de 21.582,4 t de nueces con cáscara (datos FAO, 2023).

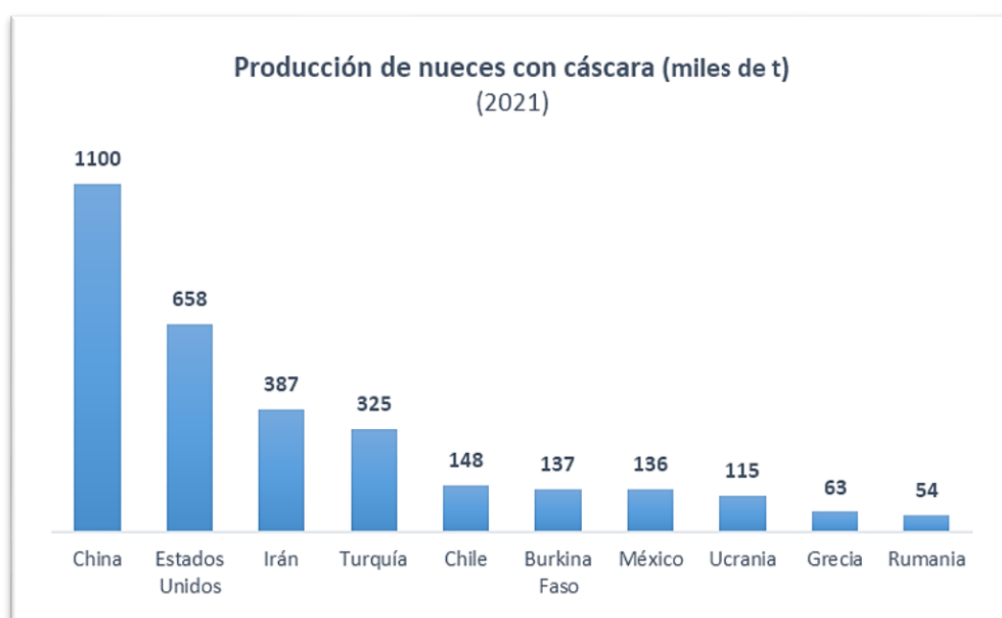


Fig. 8: Producción de nueces con cáscara (Elaboración propia en base a datos de FAO, 2023)

En el mercado internacional, el consumo de nuez ha estado relacionado con las fiestas religiosas, principalmente Navidad, siendo un ingrediente de platos tradicionales, consumiéndose como confitura, o simplemente pelada (Juri, 2017). En la actualidad, el consumo de frutos secos se encuentra experimentando un crecimiento sostenido a nivel mundial, dado su reconocimiento como productos naturales con amplios beneficios para la salud. Las nueces poseen una elevada cantidad de antioxidantes, son ricas en fibras y grasas insaturadas. Su consumo tiene un efecto favorable sobre el perfil lipídico y preventivo sobre los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (Vinson y Cai, 2012; MAGyP, 2019). A continuación, en la tabla 3 se detalla la composición nutricional, por porción de 100 gramos de nueces peladas:

INFORMACIÓN NUTRICIONAL

Cantidades por porción (100 g)

		% VD*
Valor Energético (kcal)	654	33 %
Carbohidratos (g)	13,7	5 %
de los cuales:		
azúcares (g)	2	
Proteínas (g)	15,2	20 %
Grasas Totales (g)	65,2	119 %
de las cuales:		
grasas saturadas (g)	6,13	28 %
grasas monoinsaturadas (g)	8,93	
grasas poliinsaturadas (g)	47,17	
de las cuales:		
ácidos grasos ω 3 (g)	9,1	
ácidos grasos ω 6 (g)	38,1	
grasas trans (g)	0	
colesterol (mg)	0	
Fibra (g)	6,7	27 %
Sodio (mg)	2	0 %
Vitamina A (μ g)	0	
Vitamina D (μ g)	0	
Vitamina C (mg)	1,3	3 %
Vitamina E (mg)	0,7	7 %
Tiamina (B1) (mg)	0,341	28 %
Rivoflavina (B2) (mg)	0,15	12 %
Niacina (B3) (mg)	1,13	7 %
Piridoxina (B6) (mg)	0,54	42 %
Ácido Fólico (B9) (μ g)	98	25 %
Cianocobalamina (B12) (μ g)	0	
Colina (mg)	39	7 %
Vitamina K (μ g)	2,7	4 %
Potasio (mg)	441	15 %
Calcio (mg)	98	10 %
Hierro (mg)	2,91	21 %
Magnesio (mg)	158	61 %
Zinc (mg)	3,09	44 %
Fósforo (mg)	346	49 %
Cobre (μ g)	1	
Selenio (μ g)	4,9	14 %

* %Valores Diarios en base a una dieta de 2.000 kcal u 8.400 kJ. Los valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de las necesidades energéticas.

Tabla 3: Información nutricional de la nuez (Fuente: Nutrinfo, 2020)

Los antioxidantes contenidos en las nueces pueden reducir el estrés oxidativo y, por lo tanto, enfermedades relacionadas con el mismo, como la inflamación. Además de prevenir enfermedades cardiovasculares, la compleja y rica mezcla de los

componentes de la nuez podría prevenir otras enfermedades crónicas (Blomhoff y col., 2006).

En los últimos años, el número de países productores se ha incrementado y tanto la producción como la exportación de nueces han experimentado grandes aumentos (Lamichhane, 2014; MAGyP, 2019). Entre los principales países exportadores de nueces con cáscara se encuentran Estados Unidos, China, Chile y Emiratos Árabes Unidos, cuyas participaciones, en el volumen total de exportaciones, pueden observarse en la figura 9. Si bien China es el principal productor de nueces, su participación en las exportaciones es baja, la mayor parte de su producción se destina al mercado interno, siendo el mayor consumidor de nueces a nivel mundial.

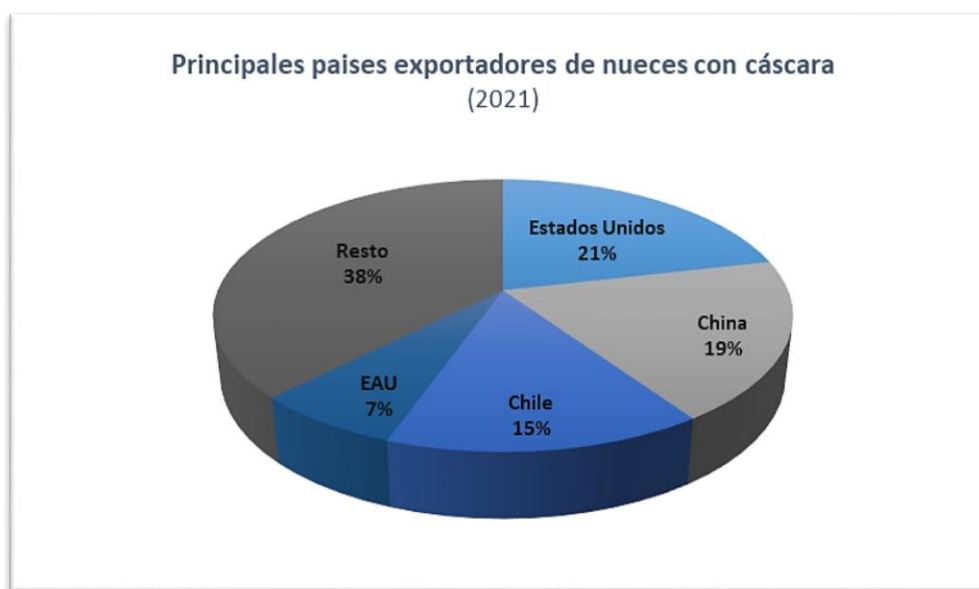


Fig. 9: Participación de los principales países exportadores de nueces con cáscara
(Elaboración propia en base a datos de FAO, 2023)

1.2.2 Situación en Argentina

En Argentina, el cultivo del nogal se inició alrededor del año 1600 (Siglo XVII) con la llegada de los españoles, implantándose principalmente en los valles de altura, para reunir condiciones agroclimáticas más adecuadas (Fernández Górgolas, 2012). La nuez portuguesa, también conocida como “nuez criolla”, fue la base de la nogalicultura argentina, un cultivo local proveedor de un alimento de alto valor nutritivo y de fácil conservación invernal (Argumedo, 2014).

Fue a mediados de la década del 90, cuando el sector nogalero emprendió un marcado proceso de reconversión orientado a reemplazar las variedades criollas por

las denominadas finas o del tipo californiano y/o de origen europeo. De esta manera, la tecnología de producción de nueces fue progresando y en la actualidad existen montes de alta densidad con rápida entrada en producción (Juri, 2017).

En los últimos años, la superficie implantada con nogal ha estado en constante crecimiento. A medida que el mercado se torna más exigente en cuanto a variedades y calidad, se van reconvirtiendo las plantaciones, obteniéndose rendimientos que oscilan en torno a los 3500 kg/ha, pudiendo ser mayores cuando se aplica un paquete tecnológico que incluye variedad (californianas o europeas), uso de porta-injertos, densidad de plantación (mayor cantidad de plantas por hectárea), sistema de riego, etc. Sin embargo, existen plantaciones con variedad criolla que poseen bajos rendimientos (700-800 kg/ha) (Juri, 2017).

Durante el año 2021, la superficie implantada en Argentina alcanzó las 18.235 hectáreas, que produjeron alrededor de 21.582 toneladas de nueces con cáscara (datos FAO, 2023). La figura 10 presenta la superficie implantada en las principales provincias productoras del país: Catamarca, Mendoza, La Rioja, Río Negro, San Juan y Neuquén (Sánchez, 2020).

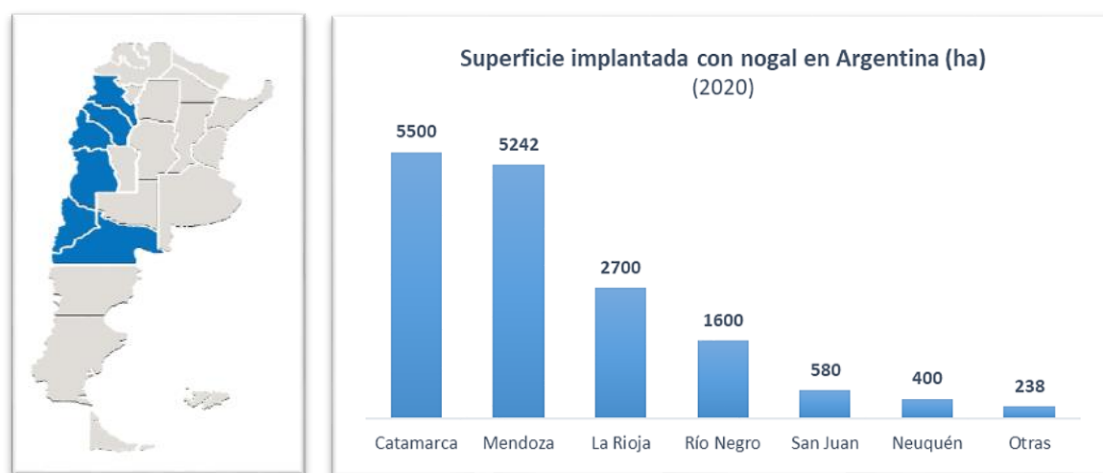


Fig. 10: Principales provincias productoras de nueces (Fuente: MAGyP, 2019) y superficie implantada con nogal en Argentina (Elaboración propia en base a datos obtenidos de Sánchez, 2020)

A pesar de que Argentina no es considerado un productor destacado a nivel mundial, el elevado valor que poseen las nueces en el mercado interno convierten al nogal en una alternativa productiva interesante (Bouhier y col., 2018). La mayor parte de la producción, más del 80 %, tiene como destino final el mercado interno. El producto se consume todo el año, pero la temporada de mayor demanda es durante el periodo navideño.

Durante años anteriores Chile se ha constituido como el principal importador de nueces, en respuesta a una demanda insatisfecha. Sin embargo, durante la última década, las importaciones han sido ínfimas debido al aumento de la producción nacional (Figs. 11, 12 y 13) (MAGyP, 2019).

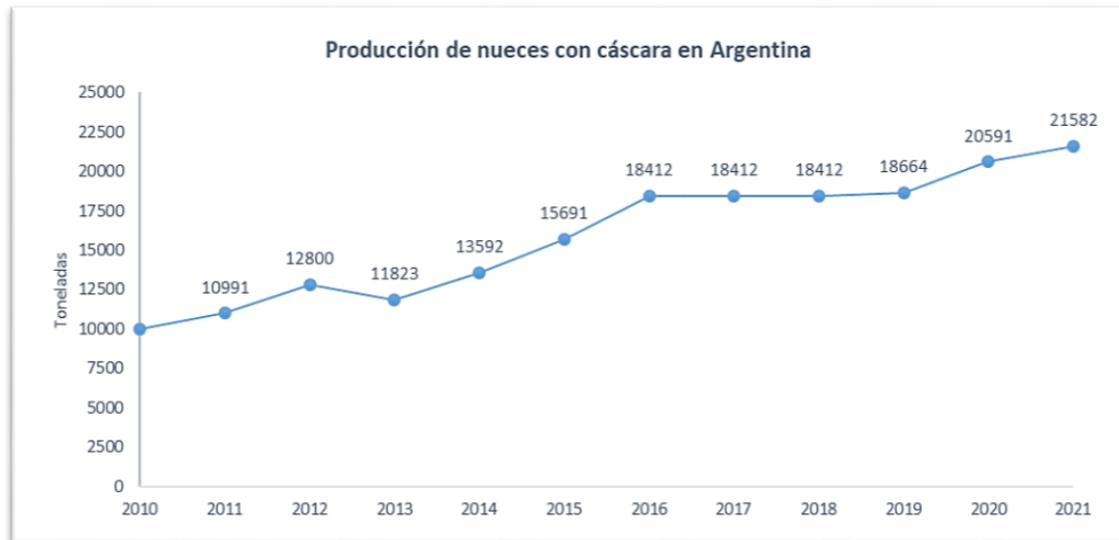


Fig. 11: Producción nacional de nueces con cáscara durante los últimos años
(Elaboración propia en base a datos de FAO, 2023)



Fig. 12: Importaciones argentinas de nueces con cáscara durante los últimos años
Datos no existentes durante el período 2014-2016
(Elaboración propia en base a datos de FAO, 2023)

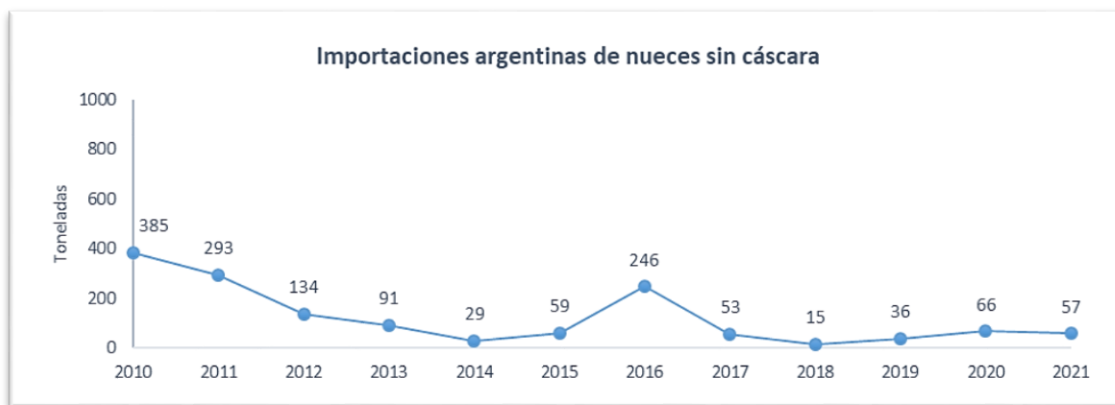


Fig. 13: Importaciones argentinas de nueces sin cáscara durante los últimos años
(Elaboración propia en base a datos de FAO, 2023)

La producción y exportación nacional se realizan en contraestación, respecto a los países del hemisferio norte. Las figuras 14 y 15 presentan la evolución de las exportaciones de nueces con y sin cáscara, respectivamente, durante la última década. Por cuestiones geográficas, se compite con las exportaciones de Chile, un competidor de relevancia debido a que se constituye como un importante productor mundial y cuenta con tratados diferenciales o de libre comercio con varios países importadores, como Italia, España, Alemania y China (MAGyP, 2019). Italia es el principal destino de las exportaciones argentinas de nueces con cáscara, seguido por Turquía, Emiratos Árabes Unidos y Brasil. Aunque en menor medida, también se exportan nueces sin cáscara a Brasil, principalmente, y a Italia (INDEC, 2023).



Fig. 14: Exportaciones argentinas de nueces con cáscara durante los últimos años
(Elaboración propia en base a datos de FAO, 2023)



Fig. 15: Exportaciones argentinas de nueces sin cáscara durante los últimos años

(Elaboración propia en base a datos de FAO, 2023)

1.2.3 Situación en el Valle Medio del río Negro

En los últimos años, la producción de frutos secos se ha convertido en una importante alternativa frutícola en los valles rionegrinos. Estos frutos se posicionan con ventajas frente a la fruticultura tradicional de la región, debido a su alta demanda y rentabilidad, sus menores requerimientos de mano de obra e insumos propios del cultivo, y la prolongada conservación del producto (Bouhier y col., 2018).

El Valle Medio del río Negro, es una región ubicada en la Patagonia Norte, irrigada por el tramo medio del río Negro. Comprende las localidades de Chimpay, Coronel Belisle, Darwin, Luis Beltrán, Choele Choele, Lamarque y Pomona (Fig. 16).

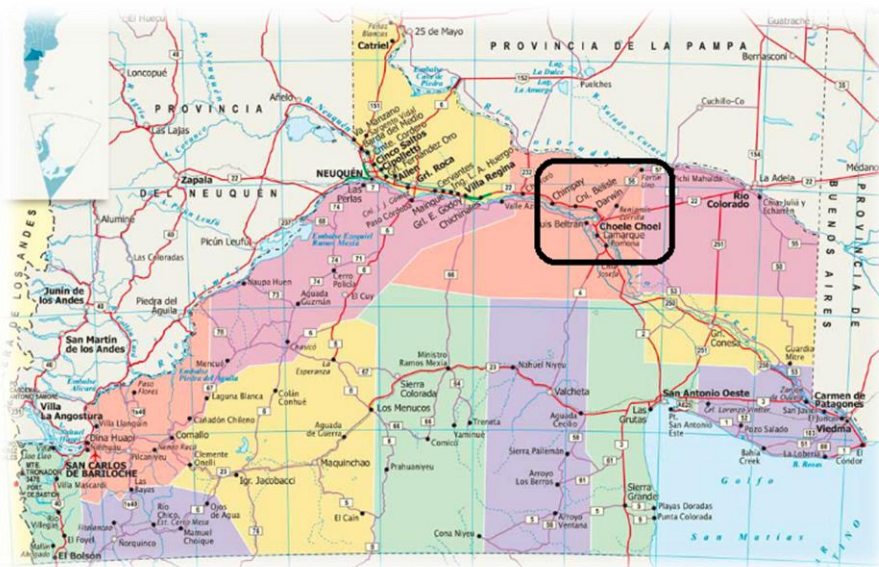


Fig. 16: Región del Valle Medio del río Negro, Patagonia Norte, Argentina (Fuente: GifeX, 2022)

En esta región, se desarrolló una nogalicultura de características innovadoras, con variedades de carga lateral, uso de portainjertos, mayor densidad de plantación y sistemas de conducción modernos. Los nogalicultores de la zona se enmarcan en el tipo social “familiar” (sin trabajadores permanentes) y “familiar capitalizado” (con un trabajador permanente), con superficies cultivadas que abarcan desde 5 a 25 ha (Nievas y col., 2014).

Durante los últimos años, la superficie cultivada con nogales en el Valle Medio del río Negro se incrementó, en consonancia con otras regiones nogaleras del país. La superficie implantada actualmente se estima en 1100 ha (AER INTA Valle Medio, comunicación personal, 2023). El cultivo se adapta bien a las condiciones climáticas de la región, siendo los factores de mayor riesgo las heladas tempranas de otoño que pueden afectar a las plantas jóvenes y las heladas tardías de primavera, que pueden producir mermas en la cosecha (Iannamico, 2015). La temperatura media anual de la zona es de $15,3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los valores de las temperaturas máximas medias se ubican entre $30\text{ y }32\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el trimestre estival, $17\text{ a }27\text{ }^{\circ}\text{C}$ en otoño y entre $19\text{ y }27\text{ }^{\circ}\text{C}$ en primavera. El régimen pluviométrico de la región se caracteriza por concentrar la mayor cantidad de lluvias a fines del verano y en otoño. La ocurrencia de precipitaciones presenta una importante variabilidad interanual y los valores medios mensuales no superan los 50 mm. La humedad relativa oscila entre 36 y 73 % (Rodríguez y Muñoz, 2020).

Además de las condiciones climáticas favorables, las características de los suelos y la cantidad y calidad de agua disponible para el riego le otorgan a la región patagónica un elevado potencial para la producción nogalera. La principal variedad cultivada en la zona es Chandler, y le siguen en importancia Franquette, Cisco, Tulare, Ivarto y Mayette. Los portainjertos más utilizados son *J. regia* y *J. hindsii* (Iannamico, 2009).

Los productores de la región han integrado una iniciativa organizacional de carácter público privada, el *Cluster de Frutos Secos de Río Negro*, reuniendo a agricultores, empresarios, técnicos e instituciones del Valle Medio, Valle Inferior y Alto Valle del río Negro, vinculados a la producción y comercialización de nueces, avellanas y almendras (Nievas y col., 2014). Durante el período 2011-2013, el *Cluster* se expandió considerablemente, incorporando nuevos actores institucionales y nuevas áreas productivas de la provincia de Neuquén, derivando en una nueva denominación, *Cluster de Frutos Secos de la Norpatagonia*, el cual se constituyó formalmente como Asociación Civil.

En 2014, a través del *Cluster* y la Cooperativa de Nogaleros de Valle Medio, y acompañados por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), los productores iniciaron una experiencia organizacional, lo que les permitió incorporar

una planta de lavado, secado, tamaño y clasificado, logrando así un salto cualitativo a la hora de competir en el plano comercial (Diario Río Negro, 2018).

1.3 *Xanthomonas* Y *Alternaria*: GÉNEROS ASOCIADOS A PATOLOGÍAS DEL NOGAL

1.3.1 Breve descripción del género *Xanthomonas*

El género *Xanthomonas* incluye bacterias Gram-negativas, que infectan a una amplia gama de cultivos y especies de plantas silvestres. Tradicionalmente, *Xanthomonas* spp. se ha descrito como bacterias asociadas a plantas que no se encuentran en otros entornos, siendo capaces de causar enfermedad en al menos 124 especies de monocotiledóneas y 268 especies de dicotiledóneas (Hayward, 1993; Jacques y col., 2016).

Cultivos considerados económicamente importantes, tales como arroz, algodón, tomate, pimiento, cítricos y frutales de carozo, así como también plantas ornamentales de elevado valor económico son afectadas por distintas especies de este género (Cubero y col., 2015). Todos los órganos aéreos de las plantas (tallos, ramas, hojas, flores, brotes, frutos, semillas) pueden ser colonizados y expresar síntomas, entre ellos marchitez, podredumbre, hipertrofia e hiperplasia, que pueden derivar en la muerte de la planta (Jacques y col., 2016).

Las bacterias pertenecientes al género *Xanthomonas* consisten en bacilos Gram-negativos, que miden entre 0,4 a 0,6 μm de ancho y 1,0 a 2,9 μm de largo. Las células suelen ser móviles por medio de un flagelo polar. La mayoría de las cepas forman colonias amarillas, de bordes lisos y consistencia mucosa. El color amarillo se debe a la secreción de un pigmento llamado xanthomonadina, mientras que la consistencia mucosa, o viscosa, es consecuencia de la secreción del expolisacárido xanthano, ambas sustancias son características del género. En cuanto a la actividad enzimática, *Xanthomonas* spp. posee la enzima catalasa, la oxidasa está ausente o es débilmente reactiva. No presenta actividad ureasa, no produce indol y no reduce el nitrato a nitrito. Las bacterias de este género no crecen a pH 4,5 ni a 37 °C (Vauterin y col., 1995).

El género *Xanthomonas* se caracteriza por una alta diversidad fitopatógena, en contraste con una uniformidad fenotípica, lo cual ha obstaculizado la génesis de una clasificación estable durante mucho tiempo, dando lugar a diversas discusiones sobre la clasificación y nomenclatura de sus miembros (Vauterin y col., 2000). Actualmente, el género contiene 29 especies bacterianas y se han descrito más de 140 patovares dentro de ellas (Jacques y col., 2016). El término “*patovar*” hace referencia a una cepa bacteriana, o conjunto de cepas con las mismas características o características similares, diferenciadas a un nivel infraespecífico de otras cepas de la misma especie

en función de la patogenicidad distintiva sobre uno o más hospedadores. Por lo general, se distinguen en términos de diferencias probadas en el rango de hospedador. Sin embargo, claras diferencias en la sintomatología, en la misma especie de planta, puede justificar diferentes designaciones de patovares (ISPP, 2001). Por lo tanto, el concepto no se basa únicamente en el rango de hospedador, sino también en la especificidad del tejido. Por ejemplo, *X. oryzae* pv. *oryzae* es un patógeno vascular del arroz, mientras que *X. oryzae* pv. *oryzicola* infecta al parénquima de la hoja del arroz. El número de patovares, dentro de las especies que han sido subdivididas, pueden variar desde 2 hasta 56 (Jacques y col., 2016).

Desde el punto de vista microbiológico, el género *Xanthomonas* constituye un grupo de bacterias extremadamente interesante debido a su alta especificidad por la planta hospedadora, de tal manera que cepas pertenecientes a una misma especie pueden infectar de forma exclusiva hospedadores diferentes, incluso, como se mencionó anteriormente, pueden exhibir especificidad de tejido, invadiendo el sistema vascular o el tejido mesofílico de la planta (Hayward, 1993; Ryan y col., 2011; Cubero y col., 2015).

La especialización de los patógenos vegetales podría tener sus orígenes en la domesticación de las plantas, evolucionando de forma conjunta al desarrollo de la agricultura. La aparición de cepas agresivas y muy eficientes en la colonización de los cultivos intensivos y genéticamente homogéneos, pero cuya supervivencia estaba restringida a un hospedador, dio lugar a la divergencia en patovares. La globalización y el comercio de plantas, frutos y semillas permitieron que varios de estos grupos entraran en contacto, lo que favoreció el intercambio de material genético y la aparición de nuevos patotipos (Sena Vélez, 2015).

Xanthomonas spp. se ha considerado como un importante género de bacterias fitopatógenas, que por su importancia económica en la agricultura ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, la aparición de cepas no patógenas en varias plantas y tejidos se informó a finales de la década de 1980. Estas poblaciones oportunistas viven en estrecha asociación con las plantas sin causar síntomas aparentes de enfermedad, razón por la cual, en el pasado, su estudio no se ha considerado importante desde un punto de vista económico. De esta manera, tanto la diversidad de *Xanthomonas*, como la diversidad de hospedadores han sido subestimadas. Estudios recientes revelaron que la población de *Xanthomonas* no patógenas es muy heterogénea y no se agrupan con las cepas patógenas de la planta de la que se aislaron (Vauterin y col., 1995; Vauterin y col., 2000; Jacques y col.,

2016). Por ejemplo, la especie *X. maliensis* ha sido propuesta para agrupar las cepas no patógenas aisladas a partir de hojas de arroz (Triplett y col., 2015).

1.3.1.1 *Xanthomonas arboricola*

Xanthomonas arboricola es una especie bacteriana compleja, asociada a plantas. El nombre “*arboricola*”, del latín “*habitante de los árboles*”, fue atribuido por primera vez por Vauterin y justificado al incluir bacterias que viven y causan enfermedades en especies arbóreas (Vauterin y col., 1995; Lamichhane, 2014). Actualmente, la especie abarca 9 patovares, entre ellos se encuentran los descritos originalmente por Vauterin: *X. arboricola* pv. *pruni*, *X. arboricola* pv. *corylina*, *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. arboricola* pv. *celebensis* y *X. arboricola* pv. *populi* (Vauterin y col., 1995). La denominación *X. arboricola* pv. *poinsettiicola* dejó de ser válida (ISPP, 2004). En 2001, se describió un nuevo patovar dentro de la especie responsable del tizón foliar de la frutilla: *X. arboricola* pv. *fragariae* (Janse y col., 2001 citado en Fischer-Le Saux y col., 2015). En 2015, tres antiguos patovares de *X. campestris* fueron reclasificados como *X. arboricola*: *X. arboricola* pv. *arracaciae*, *X. arboricola* pv. *guizotiae* y *X. arboricola* pv. *zantedeschiae* (Fischer-Le Saux y col., 2015).

Los patovares *pruni*, *corylina* y *juglandis* se consideran los más importantes desde un punto de vista económico. Son responsables de la mancha bacteriana de los árboles frutales de carozo (*Prunus* spp.), el tizón bacteriano de la avellana (*Corylus avellana*) y el tizón de la nuez (*Juglans* spp.), respectivamente. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* figura como organismo de cuarentena en la legislación fitosanitaria de la UE (Directiva 2000/29/CE) y junto con *X. arboricola* pv. *corylina*, en las listas de la Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (Lista EPPO A2) (EPPO/OEPP, 2004, 2006). En los últimos años, los brotes causados por *X. arboricola* sobre las especies *Prunus* y *Juglans* han aumentado, y la velocidad a la que ocurren sugiere la posibilidad de futuras epidemias, convirtiéndose en una preocupación mundial (Lamichhane, 2014).

Xanthomonas arboricola pv. *celebensis* causa rayas cloróticas y necróticas en las hojas del banano (*Musa* spp.) y ha sido aislada en Nueva Zelanda, India e Indonesia (Harrison y col., 2016). Existen muy pocos informes sobre esta patología.

Las cepas de los patovares *fragariae* y *populi*, responsables del tizón foliar de la frutilla (*Fragaria ananassa*) y la necrosis de la corteza del álamo (*Populus* spp.), respectivamente se consideran cepas saprófitas o patógenas oportunistas (Fischer-Le Saux y col., 2015).

Respecto a los últimos patovares incorporados a la especie, *X. arboricola* pv. *zantedeschiae*, responsable del tizón foliar del lirio de cala blanca (*Zantedeschia aethiopica*) es un patógeno raramente registrado. Esta patología se reportó por primera vez en Sudáfrica (Joubert y Truter, 1972) y luego, en Taiwán (Lee y col., 2005). El patovar *arracaciae* es el agente causal de la mancha foliar de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) en Brasil, donde fue reportada por primera vez en 1971 (Pereira y col., 1971 citado en Henz, 2002). *Xanthomonas arboricola* pv. *guizotiae* también es un patógeno raramente registrado. Es responsable de la mancha bacteriana de la hoja del Níger (*Guizotia abyssinica*), descrita por primera vez en Etiopía (Fischer-Le Saux y col., 2015).

La especie *X. arboricola* también incluye cepas patógenas que no están clasificadas como patovares y que afectan a *Ziziphus jujuba* (Myung y col., 2010-b), *Capsicum annuum* (Myung y col., 2010-a) y *Vitis vinífera* (Sawada y col., 2011), así como también cepas sin patogenicidad conocida aisladas de diversas plantas hospedantes tales como, *Euphorbia pulcherrima*, *Magnolia* spp., *Chrysanthemum morifolium*, *Syzygium aromaticum*; y cepas de *J. regia* y *Prunus domestica* que no resultaron patógenas en el huésped del que fueron aisladas (Fischer-Le Saux y col., 2015).

1.3.1.2 *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* es el agente causal de la bacteriosis del nogal, la principal patología que afecta al fruto y al follaje del nogal en la mayoría de las regiones productoras del mundo (Moragrega, 2012) y de la necrosis apical marrón (NAM), una nueva y compleja patología en la que también intervendrían los géneros fúngicos *Fusarium* y *Alternaria* (Belisario y col., 2002; Moragrega y Özaktan, 2010; Temperini y col., 2014, 2017).

El patovar *juglandis* se diferencia del resto de los patovares de *X. arboricola* y de otros patógenos de plantas, por su habilidad para producir ácido gálico y sustancias de coloración oscura (Teviotdale y col., 2002 citado en Seta, 2019). A lo largo del tiempo, la bacteria se ha clasificado en diferentes géneros dando lugar a distintas denominaciones (Moragrega, 2012):

- *Pseudomonas juglandis* – Pierce (1901)
- *Bacterium juglandis* (Pierce) – Smith (1905)
- *Phytomonas juglandis* (Pierce) – Bergey y col. (1930)
- *Xanthomonas juglandis* (Pierce) – Dowson (1939)

- *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* (Pierce) – Dye (1978)
- *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Pierce) – Vauterin y col. (1995)

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* posee una alta especificidad afectando únicamente a especies *Juglans*, entre ellas *J. regia*, *J. hindsii*, *J. nigra* y *J. ailantifolia* (Lemus y col., 2010). El patógeno se presenta en prácticamente todos los países donde se cultivan nogales (Fig. 17).

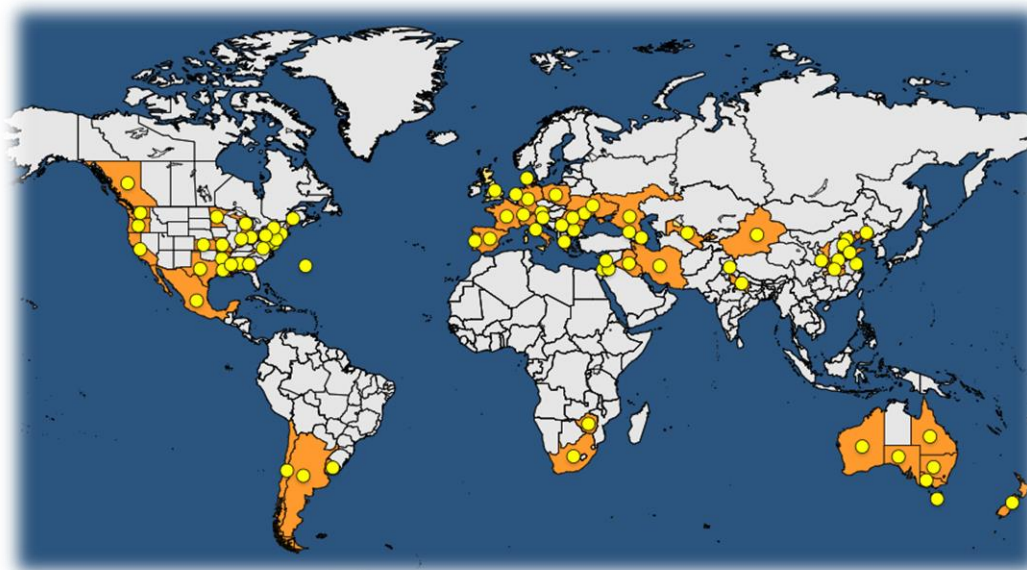


Fig. 17: Distribución geográfica *X. arboricola* pv. *juglandis* (Fuente: EPP0, 2022)

1.3.2 Breve descripción del género *Alternaria*

Alternaria es un género fúngico que incluye especies saprofitas y patógenas, ampliamente distribuido en la naturaleza. Puede infectar un amplio rango de cultivos, ya sea a campo o en poscosecha, causando considerables pérdidas en la producción debido al deterioro de granos de cereales, frutas y vegetales (Escrivá y col., 2017).

La base de datos de hongos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) presenta 4000 asociaciones de *Alternaria* con diferentes hospedadores (Farr y Rossman, 2013), convirtiéndose en uno de los géneros de hongos con más amplio rango de hospedador como patógeno de plantas (Andrew y col., 2009). Solo una especie, *A. alternata*, es responsable de infectar más de 100 especies vegetales (Simmons, 2007).

Las especies del género *Alternaria* pertenecen a la familia *Pleosporaceae* (*Pleosporales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*) y forman parte del grupo de los hongos

dematiáceos, constituido por una gran variedad de organismos que se caracterizan por la presencia de abundante melanina en la pared celular, lo que les otorga la típica coloración oscura (marrón a negra) y, además, contribuye en la patogenicidad (Pappas, 2012; Richardson y Moore, 2017 citados en da Cruz Cabral, 2018). El género *Alternaria* fue descrito por Nees en 1817, con *A. alternata* (originalmente *A. tenuis*) como especie tipo. Hasta la actualidad, se han clasificado más de 250 especies dentro del género (Fernández Pinto y Patriarca, 2017).

Una de las principales características taxonómicas de *Alternaria* es la producción de colonias grises oscuras, pardo negruzcas o negras, con desarrollo de micelio afelpado. Los conidios son grandes, oscuros, poseen septos transversales y longitudinales, y se los conoce como dictiosporas. Estas esporas se caracterizan por ser más anchas en la base, afinándose gradualmente hacia el ápice. Se pueden producir aisladas, o más comúnmente, en cadenas simples o ramificadas, a partir de conidióforos tabicados y erectos (Chelkowski y Visconti, 1992; Ellis, 1971 citados en Pose, 2007; da Cruz Cabral, 2018).

La mayoría de las especies de *Alternaria* posee la habilidad de producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, los cuales juegan un importante rol ya sea en la patología de las plantas, o en la calidad e inocuidad de los productos agrícolas. Las especies de *Alternaria* causan deterioro de productos agrícolas con las consiguientes pérdidas económicas asociadas y la acumulación de micotoxinas en frutas y vegetales. Alternariol (AOH), alternariol monometil eter (AME), ácido tenuazónico (TeA), tentoxina (TEN) y altenueno (ALT) son los principales compuestos que representan un riesgo para la salud. Las micotoxinas de *Alternaria* se determinan con frecuencia en una gran variedad de productos vegetales frescos o procesados. Los alimentos de origen vegetal infectados por *Alternaria* spp. pueden introducir altas cantidades de sus toxinas en la dieta humana si no se aplican adecuadas estrategias de control para disminuir la contaminación y su consecuente acumulación (Fernández Pinto y Patriarca, 2017).

La exposición a las toxinas de *Alternaria* se ha relacionado con la aparición de una gran variedad de efectos adversos en la salud de personas y animales. Estudios toxicológicos *in vitro* con células bacterianas y de mamíferos, han demostrado que AOH y AME son mutagénicos, cancerígenos, citotóxicos y genotóxicos, y han sido relacionadas a un aumento de la incidencia de cáncer de esófago en China. TeA ha causado toxicidad aguda en animales y fue relacionada a Onyalai, un desorden hematológico (Andersen y col., 2015; Myresiotis y col., 2015).

En Argentina, la presencia de *Alternaria* spp. ha sido reportada en diversos cultivos, tales como tomate, pimienta, trigo, maíz, arándanos, duraznos, manzanas, peras,

uvas, sorgo, arroz, soja, cítricos, semillas de amaranto, quínoa, girasol, avena (da Cruz Cabral, 2018). Además, la ocurrencia natural de sus micotoxinas ha sido determinada en puré de tomate, pimiento, granos de trigo, semilla de girasol, soja, jugos de fruta y vino (Patriarca y col., 2019).

Respecto al cultivo del nogal, las especies de *Alternaria* comúnmente aisladas en cultivos italianos afectados por NAM pertenecieron a los grupos-especies *A. arborescens*, *A. tenuissima* y *A. alternata* (Belisario y col., 2004; Hong y col., 2006). En Argentina, *A. tenuissima* (Fig. 18) fue el grupo dominante en frutos afectados por la patología en el Valle Medio del río Negro, aislándose también, aunque en menor medida, *A. alternata* (Temperini y col., 2014, 2017).

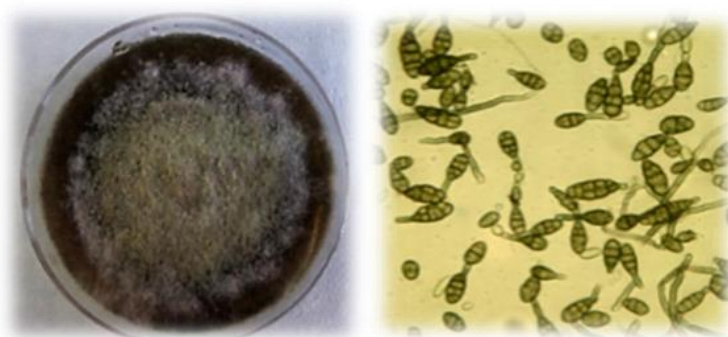


Fig. 18: *Alternaria tenuissima* aislada a partir de nueces sintomáticas. Izquierda: colonia fúngica. Derecha: conidios. (Fuente: Temperini y col., 2014)

1.4 BACTERIOSIS DEL NOGAL

La bacteriosis del nogal, conocida también como tizón, mal seco, peste negra en países de habla hispana; *walnut blight* en países angloparlantes, *batteriosi del noceto* en Italia, o *bactériose du noyer* en Francia, causada por *X. arboricola* pv. *juglandis*, es la principal patología que afecta nogales en, prácticamente, todas las zonas donde se cultivan. Es una enfermedad de importancia económica, que puede afectar hasta el 50 % del rendimiento de un cultivar de nuez, de acuerdo a lo reportado en Francia (Garcin y Duchesne, 2001). El patógeno puede infectar diversos órganos, tales como yemas, amentos, flores, ramas, hojas, brotes y nueces.

En Argentina, fue reportada por primera vez por Marchionatto en 1944, en la provincia de Buenos Aires y desde entonces ha afectado cultivos de Mendoza, La Rioja, Catamarca, Río Negro y Chubut (Temperini y col., 2017).

1.4.1 Síntomas de la patología

Síntomas en yemas: La infección de las yemas generalmente ocurre muy temprano en la temporada de crecimiento, principalmente en las etapas de pre-floración y floración, cuando todavía están verdes y succulentas. La primera evidencia macroscópica de infección consiste en áreas pequeñas, de color verde oscuro, empapadas de agua en las "escamas" o brácteas externas. A medida que se desarrollan las lesiones, las partes infectadas se vuelven de color marrón oscuro. Desde las brácteas externas, la bacteria invade el interior de las yemas. Aquellas que son infectadas al principio de la temporada de crecimiento, generalmente mueren al final de la temporada volviéndose de color marrón oscuro. En los casos en que la infección se localiza solo en las escamas, las yemas perduran y se despliegan durante la primavera próxima, generalmente dando lugar a brotes infectados, ya que la bacteria sobrevive durante la época invernal alojándose en su interior (Miller y Bollen, 1946). Cabe mencionar que, ha sido demostrado que yemas visualmente sanas, sin síntomas de la patología, frecuentemente albergaban al patógeno (Mulrean y Schroth, 1981,1982).

Síntomas en amentos: Las yemas correspondientes a flores masculinas pueden ser infectadas por la bacteria y destruidas en el mismo año en el que se forman, o en la primavera siguiente, cuando ya han finalizado la etapa de latencia y los amentos se encuentran parcialmente o completamente alargados. Los amentos infectados suelen adoptar formas anormales debido al cese del crecimiento en las áreas enfermas, que se vuelven negras y mueren. En la mayoría de los casos, solo se infectan áreas

locales (Fig. 19), aunque ocasionalmente todo el amento puede estar enfermo (Miller y Bollen, 1946). Al igual que en yemas, el patógeno ha sido aislado a partir de amentos que no presentaban síntomas visibles de la patología (Mulrean y Schroth, 1981, 1982).



Fig. 19: Síntomas de bacteriosis en amentos

(Fuente: Fruitex, n.d.)

Síntomas en hojas: Todas las partes de las hojas pueden ser infectadas por el patógeno. Generalmente, los primeros síntomas aparecen en los márgenes de los folíolos como áreas circulares a irregulares, húmedas, de color verde amarillento pálido y translúcidas, que luego se tornan color castaño. Debido a la presencia de lesiones en los márgenes, los folíolos suelen deformarse. La mayoría de las lesiones de este tipo tienen su origen en el año anterior y la infección se produce en las yemas. Las lesiones foliares de origen actual suelen aparecer en primavera y pueden afectar diferentes partes de la hoja: lámina, raquis, peciolo, nervaduras (Fig. 20). En el raquis, peciolo y nervaduras las lesiones son de color marrón oscuro a negras y ligeramente deprimidas. La bacteriosis no suele causar defoliación de los árboles, las hojas infectadas generalmente persisten en los arboles hasta el momento de su caída normal (Miller y Bollen, 1946).



Fig. 20: Síntomas de bacteriosis en hojas. Izquierda: foliolo (Fuente: Fruitex, n.d.).

Derecha: raquis (Fuente: Trapero Casas y Arquero Quílez, 2019)

Síntomas en ramas: Las ramas son infectadas durante su crecimiento, cuando los tejidos son jóvenes y succulentos, la susceptibilidad de las mismas disminuye a medida que se hacen leñosas. El primer síntoma macroscópico de la enfermedad consiste en áreas circulares diminutas, de color verde oscuro, empapadas de agua, de no más de unos pocos milímetros de diámetro. Las lesiones aumentan de tamaño a medida que las bacterias invaden los tejidos y las áreas centrales se tornan marrón oscuras a negras. Cuando las lesiones están completamente desarrolladas, suelen ser irregularmente ovaladas, de color marrón oscuro a negro, deprimidas y con márgenes bien definidos (Fig. 21). El tamaño varía desde unos pocos milímetros hasta varios centímetros de diámetro, pudiendo formar canchros posteriormente (Miller y Bollen, 1946; Flores y col., 2004).



Fig. 21: Síntomas de bacteriosis en ramas (Fuente: Torres Pinto, 2017; Trapero Casas y Arquero Quílez, 2019)

Síntomas en frutos: Cuando las nueces son infectadas por *X. arboricola* pv. *juglandis* durante los periodos de pre-floración o floración, las lesiones se localizan en el extremo apical, y los primeros síntomas macroscópicos consisten en la aparición de

áreas pequeñas, circulares o irregulares y húmedas. Las áreas infectadas se agrandan a medida que las bacterias invaden los tejidos circundantes y se tornan negras. Posteriormente, las lesiones colapsan y se hunden. Cuando la infección ocurre después de la floración, se observan pequeñas lesiones circulares en los costados del fruto, con márgenes bien definidos y un aspecto húmedo y deprimido como las lesiones originadas en el extremo. Si la infección ocurre después de que las nueces han alcanzado la mitad de su tamaño, las lesiones generalmente se limitan a la cáscara carnosa, pero en algunos casos pueden extenderse hasta la cáscara de la nuez generando una mancha marrón que reducirá su comerciabilidad (Miller y Bollen, 1946). Muchas nueces infectadas por *X. arboricola* pv. *juglandis* caen prematuramente, otras alcanzan su tamaño completo, pero su semilla se ennegrece, se seca y se arruga (Frutos, 2010). En la figura 22, pueden observarse lesiones típicas de bacteriosis del nogal sobre un fruto inmaduro del cultivar Chandler.



Fig. 22: Síntomas externos de bacteriosis sobre fruto inmaduro

1.4.2 Epidemiología

En fitopatología, la epidemiología se refiere a la incidencia de la enfermedad en el tiempo, su propagación en el espacio y la supervivencia del patógeno en el medio ambiente. Esta disciplina requiere un enfoque multidisciplinario. Para tener un conocimiento amplio y señalar las causas de una enfermedad, el ciclo de vida del patógeno debe estar vinculado a varios parámetros ambientales que pueden desencadenar su multiplicación y propagación (temperatura, lluvia, humedad, heladas), y a características agronómicas del cultivo hospedante (suelo, esquema de fertilización, riego, etc.). Además, existen varias influencias ecológicas sobre la aparición y gravedad de la enfermedad. Entre ellas, la ocurrencia de especies vegetales silvestres y/o insectos que actúan como reservorios de inóculos de

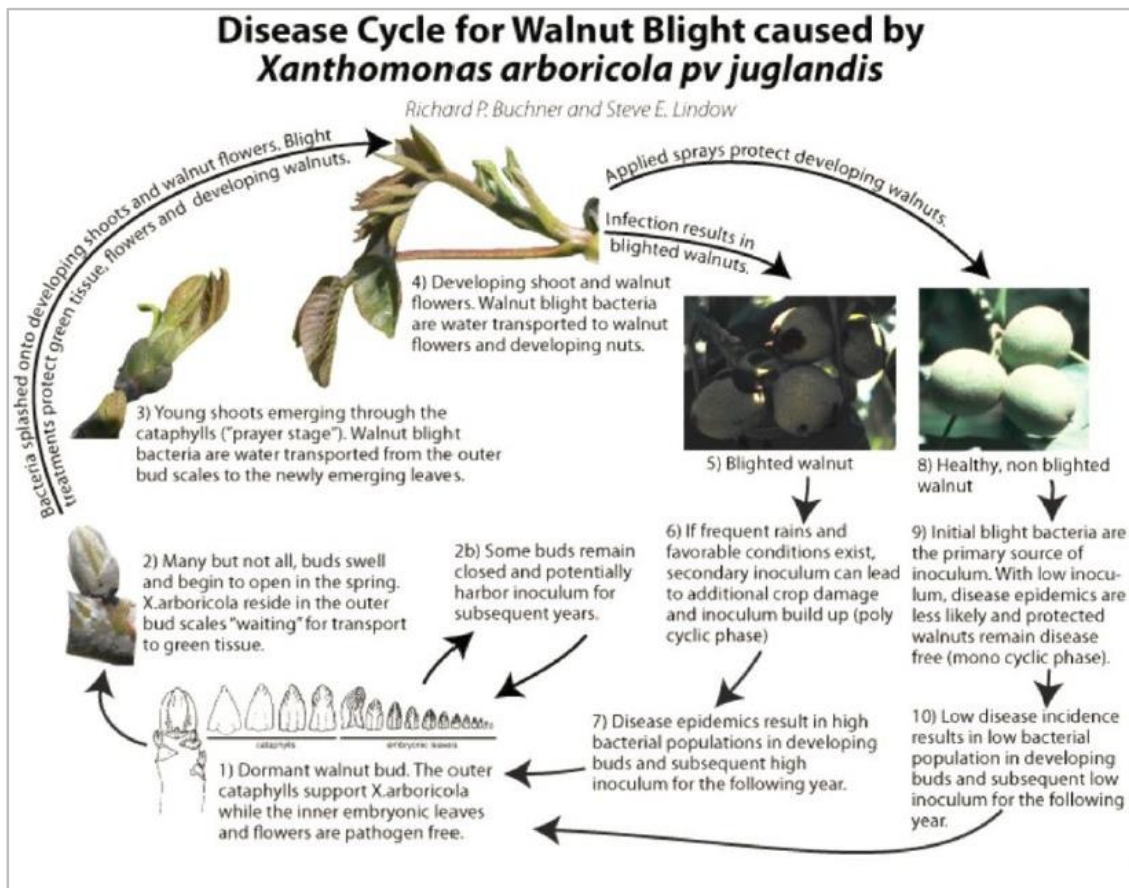
patógenos, suelos marginales que incitan al estrés fisiológico del cultivo, uniformidad genética y susceptibilidad del cultivo que pueden posibilitar la rápida colonización y diseminación del patógeno (Scortichini, 2010).

A lo largo del tiempo, diversos estudios sobre la epidemiología de *X. arboricola* pv. *juglandis*, han presentado diferentes puntos de vista sobre cómo y dónde el patógeno hiberna (Mulrean y Schroth, 1982). Pierce (California, 1901), reportó que los principales sitios de hibernación eran las ramas y las nueces infectadas. Smith (California, 1911) apoyó la suposición de Pierce, sosteniendo que los canchales eran el principal sitio de hibernación de la bacteria. Años más tarde, Miller (Oregon, 1932,1934), sostuvo que las fuentes de inóculo para las infecciones primaverales eran las yemas y los amentos decoloridos y enfermos. Mulrean y Schroth (California, 1981) demostraron que yemas y amentos aparentemente sanos frecuentemente albergaban al patógeno y tras analizar siete variedades de nogal, observaron que la frecuencia de infección de yemas latentes era significativamente mayor que la de amentos, constituyendo el principal sitio de hibernación del patógeno (Mulrean y Schroth, 1982).

1.4.2.1 Ciclo de la enfermedad

La bacteriosis del nogal puede desarrollarse de manera monocíclica o policíclica (Fig. 23). En una enfermedad monocíclica las infecciones que ocurrieron durante la primavera no conducen a un inóculo que pueda diseminarse y causar infecciones secundarias. Lluvias poco frecuentes durante la primavera pueden ser una de las razones por las que puede ocurrir un progreso monocíclico de la patología. Por el contrario, si las infecciones durante la primavera conducen a la producción de inóculo que puede propagarse e infectar nuevos tejidos, la enfermedad es policíclica. En este caso, las lluvias primaverales frecuentes tienden a favorecer tales epidemias (Buchner y col., 2013).

El inóculo inicial para las infecciones por bacteriosis está constituido por las poblaciones de *X. arboricola* pv. *juglandis* que hibernan bajo las escamas de las yemas en reposo invernal. A medida que las yemas se abren en primavera, y emergen los brotes jóvenes, las bacterias pueden trasladarse hacia las flores y nueces en desarrollo, probablemente por salpicaduras de lluvia, causando su infección. Ocasionalmente, bajo condiciones favorables para la enfermedad, como precipitaciones frecuentes, pueden resultar infecciones secundarias adicionales. El ciclo de la enfermedad se completa cuando las bacterias vuelven a hibernar en las yemas latentes (Buchner y col., 2013).



Ciclo de enfermedad de la bacteriosis del nogal causada por *X. arboricola* pv. *juglandis*. 1) Yemas inactivas. Los catafilos externos están infectados por *X. arboricola* mientras que las hojas y flores embrionarias internas están libres del patógeno. 2) Muchas, pero no todas las yemas se hinchan y comienzan a abrirse en primavera. *Xanthomonas arboricola* reside en las escamas exteriores de las yemas esperando ser transportadas hacia tejidos verdes. 2b) Algunas yemas permanecen cerradas y albergan inóculo potencial para los años siguientes. 3) Brotes jóvenes que emergen a través de los catafilos. Las bacterias son transportadas por el agua desde las escamas externas de las yemas hacia las hojas que recién emergen. 4) Brotes en desarrollo y flores del nogal. Las bacterias responsables de la patología son transportadas por el agua hacia las flores y nueces en desarrollo. 5) Nuez dañada. 6) Si existen lluvias frecuentes y condiciones favorables, el inóculo secundario puede provocar daños adicionales en el cultivo y acumulación de inóculo (fase policíclica). 7) La epidemia da como resultado una gran cantidad de bacterias en las yemas en desarrollo y un elevado inóculo posterior para el año siguiente. 8) Nuez sana, sin daño por tizón. 9) Las bacterias iniciales son la principal fuente de inóculo. Con un inóculo bajo, las epidemias son menos probables y las nueces protegidas permanecen libres de la patología (fase monocíclica). 10) La baja incidencia de la patología da como resultado una baja población bacteriana en las yemas en desarrollo y un bajo inóculo posterior para el año siguiente.

Uniones: 2 – 4) Las bacterias contaminan los brotes en desarrollo y las flores de los nogales. Los tratamientos contra el tizón protegen el tejido verde, las flores y las nueces en desarrollo. 4 – 5) Las infecciones dan como resultado nueces dañadas. 4 – 8) Las pulverizaciones aplicadas protegen las nueces en desarrollo.

Fig. 23: Ciclo de la bacteriosis del nogal (Fuente: Buchner y col., 2013. Texto traducido del idioma inglés)

El inóculo de *X. arboricola* pv. *juglandis* presente en las yemas inactivas es el principal determinante de la probabilidad de infección de las nueces que se forman en los brotes derivados de tales yemas. En un estudio conducido por Lindow (2014), se demostró que la incidencia de la enfermedad en un cultivo dado se puede predecir a

partir de la proporción de yemas que albergan al patógeno y de la frecuencia con las que se producen las lluvias poco después de la brotación. La colonización de las yemas por *X. arboricola* pv. *juglandis* parece ocurrir muy pronto después de su formación en primavera. Dado que su infección puede observarse en todas las épocas del año, se presume que, una vez que el patógeno está asociado a las mismas, por lo general, permanece como residente permanente (Lindow y col., 2014).

La capacidad de *X. arboricola* pv. *juglandis* para colonizar tanto la superficie como el interior de las yemas, constituye una ventaja para mejorar su supervivencia y promover su rápida diseminación. Mientras que la colonización interna le permite al patógeno sobrevivir periodos de estrés ambiental (deseccación, luz ultravioleta), la colonización epífita asegura una fuente de inóculo disponible, dadas las condiciones ambientales favorables para la patología (Mulrean y Schroth, 1982).

Es probable que la enfermedad en un año determinado esté correlacionada con la del año anterior debido a que las yemas que albergan grandes poblaciones del patógeno, y abren en un determinado año, a menudo dan lugar a brotes contaminados, siendo probable que las nuevas yemas que se forman en esos brotes, y que invernarán y luego abrirán en la siguiente temporada, también sean colonizadas por el patógeno (Lindow y col., 2014).

1.4.2.2 Condiciones predisponentes

El desarrollo de la bacteriosis del nogal depende sumamente de las condiciones ambientales que se presentan en primavera. La infección se origina cuando se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones predisponentes:

- *Existencia de tejidos nuevos y tiernos sin protección.*
- *Inóculo presente en el monte.*
- *Humedad relativa ambiente del 95 % o agua libre por precipitaciones, con temperaturas de moderadas a elevadas, entre 16 °C y 29 °C.*

La primavera es el momento de mayor susceptibilidad al ataque del patógeno, dado que se produce la emergencia de tejidos nuevos y tiernos: brotes, flores femeninas, masculinas, hojas, pequeños frutos, etc. (Nievas y col., 2014).

La dispersión del inóculo se realiza tanto por la acción de la lluvia como por efecto del viento, del polen infectado, heridas generadas por insectos, ácaros y por la acción del hombre al utilizar instrumentos infectados (Poggi y col., 2013; Nievas y col., 2014). La

bacteria puede penetrar a través de aberturas naturales tales como estomas, o a través de heridas causadas por acontecimientos naturales (caída de hojas, granizo, heladas) o por la acción del hombre (poda, cosecha) (Lamichhane, 2014).

Las frecuencias relativamente altas de infestación de yemas no necesariamente aseguran que ocurra la enfermedad, ya que la frecuencia de las precipitaciones influye fuertemente en su incidencia. La lluvia es necesaria para trasladar el inóculo presente en o sobre las yemas a los brotes en desarrollo y a las nueces (Lindow y col., 2014).

1.4.3 Manejo de la patología

El manejo integrado de la bacteriosis del nogal consiste en la aplicación de diversas prácticas culturales, junto a un adecuado esquema de tratamientos químicos. A continuación, se listan algunas de las principales prácticas culturales de control (Nievas y col., 2014):

- *Eliminación de fuentes de inóculo*: implica retirar y quemar frutos dañados que permanecen en las plantas, frutos caídos al suelo, ramas enfermas, restos de poda, etc.
- *Control de malezas*: esta práctica facilita la circulación del aire, reduciendo la humedad ambiental en el monte, acotando las condiciones predisponentes para el desarrollo de la patología.
- *Poda de raleo*: consiste en la eliminación de ramas que se hallan en exceso, mal ubicadas, superpuestas, etc., mejorando la aireación del monte y facilitando la entrada de luz, lo cual mejora la calidad de las yemas.
- *Ajuste de la fertilización nitrogenada*: Se deben evitar excesos de nitrógeno, ya que favorece el crecimiento vegetativo, las plantas tienen más follaje, demorándose en madurar, por lo tanto, los tejidos son más succulentos y, por ende, más susceptibles.
- *Desinfección de las herramientas de poda*: implica desinfectar las herramientas antes de podar cada planta, disminuyendo las posibilidades de dispersión del patógeno.
- *Calibración de equipos pulverizadores y cálculo del volumen de aplicación por hectárea*: son prácticas imprescindibles para asegurar una correcta cobertura de los plaguicidas en toda la planta.

- *Prestar especial atención al pronóstico climático*: es una herramienta estratégica, durante la temporada los tratamientos químicos preventivos deben realizarse dentro de las 24 horas previas a la ocurrencia de lluvias.

El control químico de la bacteriosis del nogal es de carácter preventivo. Se basa en la aplicación de productos que reduzcan la población de inóculo en la planta y que ejerzan una acción de barrera defensiva sobre los tejidos tiernos y nuevos (Nievas y col., 2014). Las pérdidas elevadas que ocasiona el patógeno sobre la producción hacen necesario el empleo de productos químicos desde la apertura de las yemas, hasta que se produzca la reducción de la humedad y la menor succulencia de los tejidos hospedantes, reduciéndose el periodo de infección (Flores y col., 2004).

Los productos cúpricos constituyen la herramienta base en los programas sanitarios. Dentro de los momentos importantes de protección fitosanitaria se encuentran:

- *Yema dormida o en reposo invernal*: es necesario realizar una aplicación de productos cúpricos a fin de reducir el inóculo bacteriano (Mulrean y Schroth, 1981; Flores y col., 2004).
- *Yema hinchada*: la pulverización durante el estadio de yema hinchada se fundamenta por el hecho de que la infección comienza con la brotación y el crecimiento de los tejidos (Belisario, 1996 citado en Flores y col., 2004).
- *Floración*: Es el momento de mayor susceptibilidad a la patología debido a la emergencia de tejidos nuevos y tiernos.
- *Crecimiento de los frutos*: a principios del desarrollo del fruto y hasta que alcanza el tamaño de una aceituna, la lesión puede penetrar en el ovario y causar su caída (Sarasola, 1975; Belisario, 1996 citados en Flores y col., 2004). Durante su crecimiento, es importante mantener la sanidad con tratamientos de acuerdo a las condiciones ambientales, ya que la humectación de los tejidos jóvenes por las lluvias o rocíos favorece la multiplicación de las bacterias y su diseminación en el árbol (Germain y col., 1999 citado en Nievas y col., 2014).
- *Caída de hojas*: al caer las hojas, en el punto de abscisión, se producen pequeñas heridas que constituyen la vía de entrada para diferentes tipos de hongos y bacterias. La infección se ve favorecida por las condiciones climáticas habituales durante este periodo (normalmente humedad relativa alta provocada por lluvias, rocíos y nieblas). Se debe evitar el ingreso del patógeno en la zona de abscisión mediante la aplicación de fungicidas, que ayudan a cicatrizar las pequeñas heridas producidas y a reducir el inóculo presente. En este caso, se

recomienda realizar una única aplicación con productos a base de cobre en el momento que haya caído el 75 % de las hojas (Garnica y col., 2008).

Respecto a los productos cúpricos, el oxiclورو de cobre es el más utilizado para las aplicaciones primaverales y las de caída de hojas, aunque también se comercializan principios activos como hidróxido de cobre, óxido cuproso o sulfato de cobre pentahidratado. La mezcla de oxiclورو de cobre con el fungicida Mancozeb ha sido recomendada para incrementar la eficiencia del tratamiento, minimizar los riesgos de resistencia y fitotoxicidad propias del cobre, así como también para prevenir otras enfermedades causadas por hongos como la necrosis apical marrón (siguiente sección). Durante el estadio de yema dormida, la aplicación del tradicional caldo bordelés (mezcla de cal y sulfato de cobre) se emplea para reducir la población bacteriana en los árboles (Nievas y Rossini, 2015).

Debido a que las pulverizaciones contra la bacteriosis del nogal son de carácter preventivo, deben realizarse antes de que se den las condiciones predisponentes para el ingreso del patógeno: lluvias, temperaturas entre 16 °C y 29 °C, tejidos nuevos. En el Valle Medio del río Negro, estas condiciones se presentan entre septiembre y diciembre, coincidiendo con el periodo en que el nogal atraviesa los estados fenológicos de mayor susceptibilidad a la bacteria. En dicho periodo, no debe subestimarse la posibilidad de infección por una precipitación entre dos pulverizaciones sucesivas, ya que los tejidos que crecieron luego del último tratamiento son susceptibles al no estar protegidos por el plaguicida (Nievas y Rossini, 2015).

A continuación, se presenta un calendario básico de tratamientos químicos para el control de la bacteriosis del nogal, utilizado en el Valle Medio del río Negro, de carácter orientativo y que debe ajustarse a cada situación particular (Fig. 24).

Calendario básico de tratamientos		
época	producto	dosis
Caída de hojas	Productos cúpricos	Dosis según principio activo
Yema dormida	Caldo bordelés	1 %
Yema hinchada (*)	Productos cúpricos + mancozeb	Dosis según principio activo 200 gr/100 l
Inicio flor masculina (*)	Productos cúpricos + mancozeb	Dosis según principio activo 200 gr/100 l
A los 7 – 10 días (*)	Productos cúpricos + mancozeb	Dosis según principio activo 200 gr/100 l
(*): Repetir según condiciones ambientales	Productos cúpricos + mancozeb	Dosis según principio activo 200 gr/100 l

Fig. 24: Calendario básico de tratamientos químicos para el control de la bacteriosis del nogal

(Fuente: Nievas y Rossini, 2015)

Teniendo en cuenta que la prevención es el principio básico del manejo de las enfermedades, al momento de planificar una plantación nueva es conveniente considerar que las variedades de carga lateral presentan mayor susceptibilidad a la bacteriosis que las de carga terminal y que los sistemas de conducción en eje central, con árboles menos voluminosos y de menor altura, permitirán una mayor eficiencia y simplificación en la aplicación de agroquímicos (Nievas y Rossini, 2015).

Las pulverizaciones deben realizarse en el estado fenológico adecuado. En los establecimientos con diferentes variedades esto debe tenerse en cuenta, realizando un manejo diferencial acorde a la fenología de cada variedad (Miller, 1951; Nievas y col., 2014).

Por otra parte, la detección temprana del patógeno en materiales de vivero es la única forma de evitar su movimiento a través del comercio mundial. El comercio internacional de plantas es una de las principales causas de la rápida diseminación a larga distancia de los patógenos bacterianos. En Estados Unidos, por ejemplo, las inspecciones y certificación de viveros son parte del manejo integrado de plagas (Lamichhane, 2014).

1.4.3.1 Limitaciones de los tratamientos a base de cobre

El control de la bacteriosis se logra mediante múltiples aplicaciones de bactericidas a base de cobre, pero la eficacia de estos productos suele ser muy limitada por diversas razones. Entre ellas, la incapacidad de estos materiales para reducir o eliminar el inóculo interior de las yemas, dado que son bactericidas de contacto. Si bien las

aplicaciones reducen la población epífita del patógeno, no evitan su supervivencia en el interior de las yemas, y el posterior inicio del ciclo de la enfermedad (Mulrean y Schroth, 1981). Por otra parte, se han aislado cepas de *X. arboricola* pv. *juglandis* resistentes al cobre a partir de cultivos de nogales en los que se utilizaron pulverizaciones intensivas para el control de la patología (Lee y col., 1993; Behlau y col., 2013).

Los altos niveles de cobre pueden alterar el rendimiento de los árboles de nogal, tener efectos no deseados en el suelo, y predisponer la fruta a la necrosis (Radix y col., 1998). El uso intensivo de los bactericidas afecta el rendimiento de los árboles, como resultado de la fitotoxicidad debido al contacto directo con partes aéreas de las plantas, o a través del sistema radicular. Además, numerosas aplicaciones en establecimientos comerciales, produjeron la acumulación de cobre en los suelos, con el consiguiente impacto ambiental negativo (Ninot y col., 2002). El exceso de cobre en los suelos puede inducir un desequilibrio en el contenido de polifenoles del tejido de la nuez, especialmente en juglona, un tipo de compuesto polifenólico que se ha relacionado con la resistencia natural de las plantas, pertenecientes a la familia *Juglandaceae*, a muchas enfermedades. Los tratamientos cúpricos inducen una reducción en su contenido, lo cual podría explicar las pérdidas en los cultivos a pesar de las repetidas aplicaciones de bactericidas (Radix y col., 1998).

En consecuencia, resulta necesario reducir las aplicaciones de productos cúpricos en los establecimientos productivos. Sin embargo, actualmente, no se dispone de alternativas adecuadas al cobre. En un estudio, se ha demostrado que es posible reducir su uso si la fumigación se sincroniza adecuadamente durante el periodo vegetativo del nogal y se tienen en cuenta las condiciones ambientales (Ninot y col., 2002). El desarrollo de sistemas de pronóstico adecuados para la evaluación del riesgo de bacteriosis permitiría aumentar la precisión del momento del tratamiento, mejorando el control de la enfermedad y reduciendo los efectos no deseados de los tratamientos con cobre (Ninot y col., 2002).

Por otra parte, como nueva alternativa en estudio, se encuentra el control biológico. Sin embargo, se sabe muy poco sobre la eficacia de los agentes biológicos para controlar enfermedades de plantas leñosas causadas por *X. arboricola* (Lamichhane, 2014). Existen algunos informes sobre el uso de bacterias antagonistas para controlar el patógeno sobre frutales de carozo (Kawaguchi y col., 2014) y nogales (Özaktan y col., 2012). En un estudio conducido por Özaktan, se demostró que algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens* fueron agentes prometedores de biocontrol de *X. arboricola* pv. *juglandis*, de acuerdo con la sugerencia de que las bacterias antagonistas aisladas de plantas sanas de nogal pueden adaptarse mejor a esta especie y proporcionar un

mejor control de la patología que los organismos aislados de otras especies. No obstante, se necesitan investigaciones adicionales con la expectativa de desarrollar una nueva herramienta para el control de la bacteriosis del nogal (Özaktan y col., 2012).

1.5 NECROSIS APICAL MARRÓN

Desde finales de la década de 1990, se ha observado una nueva enfermedad que afecta a los nogales causando caída prematura de frutos e importantes mermas en el rendimiento de plantaciones en regiones mediterráneas, tales como España, Francia, Turquía e Italia.

En España, la enfermedad se observó por primera vez en 1997, en Extremadura, tras una intensa caída temprana de frutos. Cuando su incidencia fue alta, se perdió toda la producción, tal como ocurrió en algunos cultivos de nogales de Tarragona, en el noreste del país (Moragrega y Özaktan, 2010). En Francia, se reportó una caída prematura de nueces que redujo la producción nogalera en cultivos comerciales del sureste (Garcin y Duchesne, 2001). También, se registraron importantes pérdidas en la región de Mármara, una importante zona de producción de nueces, en el noroeste de Turquía (Özaktan y col., 2009 citado en Moragrega y Özaktan, 2010).

En 1998, una severa caída de frutos fue observada en el norte de Italia, donde la patología se denominó necrosis apical marrón (NAM), de acuerdo con los síntomas causados sobre los frutos. La misma, fue observada en 1999 en Francia, y nuevamente en Italia en 2002 (Belisario y col., 2002).

En Argentina, NAM se detectó por primera vez durante la temporada 2013-2014 en cultivos de la región productora del Valle Medio del río Negro. Durante esos años, se registraron pérdidas de hasta un 40 % en la producción local de nuez, lo que significó una pérdida económica muy importante para el sector productivo (Temperini y col., 2014, 2017).

1.5.1 Síntomas de la patología

Durante las primeras etapas del desarrollo de las nueces, los síntomas asociados a bacteriosis y a NAM son muy similares y suelen confundirse. Su diferenciación requiere de una detallada observación de las lesiones internas y externas de los frutos afectados (Moragrega y Özaktan, 2010; Temperini y col., 2017).

Los síntomas externos de la patología aparecen después del cuajado de los frutos como pequeñas lesiones, no húmedas, de color marrón oscuro a negro, ubicadas en el extremo apical de las nueces, a veces restringidas a los estigmas y al área circundante. A medida que el fruto crece, los síntomas se hacen más evidentes (Fig. 25). El avance de la infección en los frutos que permanecen adheridos al árbol es menos extenso que en los caídos, en los que la necrosis externa puede alcanzar la zona ecuatorial (Moragrega y Özaktan, 2010).



Fig. 25: Síntomas externos de NAM sobre fruto inmaduro

En cuanto a los síntomas internos, la infección progresa hacia el interior de la nuez y puede alcanzar la semilla, causando una pudrición marrón a negra (Fig. 26). La necrosis apical en los frutos caídos es más severa y se extiende a todos los tejidos internos (Moragrega y Özaktan, 2010).

La extensión de las lesiones externas e internas pueden no estar correlacionadas, y una pequeña necrosis externa puede estar asociada a una infección grave que afecta a todos los tejidos internos del fruto (Belisario y col., 2002; Moragrega y Özaktan, 2010).



Fig. 26: Síntomas internos de NAM sobre frutos inmaduros. Diferentes grados de avance de la lesión

1.5.2 Etiología

El desconocimiento de varios aspectos etiológicos y epidemiológicos de NAM ha dificultado su control en diversas áreas afectadas (Moragrega y Özaktan, 2010). Varias

investigaciones se han realizado a fin de determinar la etiología de esta enfermedad, obteniéndose diferentes resultados.

Estudios sobre cultivos italianos y franceses demostraron que NAM puede considerarse una enfermedad compleja, causada estrictamente por hongos, donde *Fusarium* fue confirmado como el principal género asociado. Se observó que las especies del hongo difirieron en relación al área y tiempo de muestreo, siendo *F. semitectum* y *F. graminearum* las especies más agresivas. Además, un complejo de *Alternaria* spp. que incluyó a *A. arborescens*, *A. tenuissima* y *A. alternata*, también estaría involucrado en la patología, mientras que *X. arboricola* pv. *juglandis* se aisló sólo esporádicamente a partir de los frutos enfermos (Belisario y col., 2002; Belisario y col., 2004; Hong y col., 2006; Belisario y col., 2010; Scotton y col., 2015).

En investigaciones llevadas a cabo sobre plantaciones españolas, *X. arboricola* pv. *juglandis* fue el microorganismo aislado con mayor frecuencia de los frutos afectados por NAM, solo o en asociación con especies de *Fusarium* y *Alternaria* (Arquero y col., 2005; Moragrega y col., 2011). La bacteria también se aisló con mayor frecuencia cuando se estudiaron frutos afectados en Turquía, mientras que los hongos fueron menos frecuentes en las infecciones apicales de los frutos que permanecieron en el árbol, siendo más común en los caídos (Özaktan y col., 2009 citado en Moragrega y Özaktan, 2010). A diferencia de los resultados obtenidos sobre cultivos italianos, las investigaciones realizadas en España y Turquía, llevaron a considerar a *X. arboricola* pv. *juglandis* como el principal organismo causal de la patología, mientras que *Fusarium* spp. estaría involucrado ocasionalmente interactuando con las infecciones bacterianas. La presencia de *Alternaria* spp. sobre los tejidos necróticos podría relacionarse con una colonización oportunista de los tejidos muertos, previamente infectados por la bacteria (Moragrega y Özaktan, 2010; Moragrega y col., 2011; Akat y col., 2016).

En el caso de Argentina, *X. arboricola* pv. *juglandis* y *A. tenuissima* fueron identificados como los principales microorganismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad (Temperini y col., 2014, 2017).

1.5.3 Epidemiología

A pesar de la importancia básica del estudio de la epidemiología para el control efectivo de patógenos bacterianos, para muchas enfermedades de importancia económica, hay gran cantidad de conocimientos por adquirir (Scortichini, 2010). En un estudio conducido por Moragrega (2011), se han documentado similitudes en los aspectos epidemiológicos y en la susceptibilidad de los cultivos entre NAM y la

bacteriosis del nogal, a pesar de que la primera se caracteriza por una intensa caída prematura de frutos y presenta síntomas específicos. Según estos resultados, los autores han concluido que NAM debería ser considerada una nueva manifestación de la bacteriosis del nogal, en lugar de una nueva enfermedad (Moragrega y col., 2011).

1.5.3.1 Condiciones predisponentes

Entre las variables ambientales relacionadas con la caída de los frutos se han identificado la temperatura máxima, el ángulo de dirección principal del viento frente a la orientación de la fila de árboles y la distancia del cultivo con canales o ríos cercanos, siendo la temperatura máxima la de mayor influencia (Scotton y col., 2015). Respecto a las condiciones climáticas favorables a la patología, se observó que humedades relativas superiores al 70 % y temperaturas medias superiores a 24 °C, durante el periodo de crecimiento inicial de los frutos, pueden desencadenar el desarrollo de NAM (Moragrega y Özaktan, 2010).

Por otra parte, algunas condiciones del suelo, tales como textura ligera, suelos ácidos, bajo contenido de manganeso y magnesio, y deficiencia de nutrientes (fósforo y calcio, principalmente) podrían predisponer a los árboles a la necrosis apical (Garcin y Duchesne, 2001).

2. OBJETIVOS

El desarrollo de la nogalicultura en el norte de la Patagonia Argentina ha avanzado rápidamente durante los últimos años. Esto se debe al potencial que posee la zona para la producción de este tipo de frutos y a la demanda, el consumo interno per cápita es muy importante y se tienen posibilidades de exportar. Además, para la región, esta producción resulta ser una importante alternativa para la sustentabilidad, considerando que es una opción para el desarrollo de pequeños productores, ya que es rentable incluso con pocas hectáreas. Existen ventajas comparativas de los frutos secos frente a otras producciones, que requieren una mayor mano de obra, frío y procesos complicados de conservación (Nievas y col., 2014). Respecto a la producción de frutos secos en el Valle Medio del río Negro, el nogal es la principal especie cultivada, concentrando alrededor de 1100 ha en producción (AER INTA Valle Medio, comunicación personal, 2023).

La bacteriosis del nogal, causada por *X. arboricola* pv. *juglandis*, es la principal patología que afecta al cultivo provocando la caída prematura de frutos. Es una enfermedad bastante conocida que se presenta en prácticamente todas las áreas donde se cultivan nogales. Sin embargo, durante los últimos años, en regiones mediterráneas, ha surgido una nueva enfermedad que afecta al cultivo del nogal, conocida como Necrosis Apical Marrón (NAM), que causa caída prematura de frutos e importantes pérdidas en el rendimiento productivo (Belisario y col., 2002). Estudios realizados indicaron que *X. arboricola* pv. *juglandis* es el microorganismo más frecuentemente asociado a la enfermedad y que los géneros fúngicos micotoxicogénicos *Fusarium* y *Alternaria* también podrían estar involucrados (Arquero y col., 2005; Moragrega y Özaktan, 2010; Moragrega y col., 2011; Temperini y col., 2014, 2017).

Durante los años 2013 y 2014, se han reportado severos daños en la región del Valle medio del río Negro debido a una enfermedad que presentaron los nogales, con síntomas similares a los reportados para NAM, que causaba la caída prematura de los frutos. Ante esta situación, el grupo de trabajo, junto al INTA (AER Valle Medio y EEA Alto Valle) y con la colaboración del Cluster de Frutos Secos de la Norpatagonia realizaron los primeros estudios, concluyendo en el primer reporte de la patología en el país (Temperini y col., 2014, 2017). Considerando que NAM fue reportada en la zona y que se extiende rápidamente, el objetivo general del presente trabajo fue estudiar el complejo microbiano involucrado en la necrosis apical marrón y la caída prematura de frutos de nogal en el Valle Medio del río Negro, a fin de aportar nuevos conocimientos que contribuyan a elucidar la etiología y epidemiología de la enfermedad y a optimizar el diseño de nuevas estrategias para su control.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la distribución de las poblaciones de microorganismos asociadas a la bacteriosis y NAM en diferentes estados fenológicos del nogal.
- Caracterizar la población bacteriana responsable de la bacteriosis y NAM en nogales del Valle Medio del río Negro.
- Evaluar la respuesta de algunos de los cultivares comerciales más importantes de la zona, frente a la infección por los microorganismos patógenos.
- Determinar la sensibilidad al cobre de aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis*.
- Evaluar la actividad antibacteriana de diferentes compuestos químicos de uso tradicional para el control de las patologías del nogal causadas por *X. arboricola* pv. *juglandis*.
- Estudiar la influencia de parámetros ambientales sobre el crecimiento de los microorganismos asociados a las patologías del nogal.

3. DISTRIBUCIÓN DE LAS POBLACIONES DE MICROORGANISMOS ASOCIADAS A BACTERIOSIS Y NAM EN DIFERENTES ESTADOS FENOLÓGICOS DEL NOGAL

3.1 INTRODUCCIÓN

Las patologías del nogal causadas por *X. arboricola* pv. *juglandis* han provocado importantes pérdidas económicas en todas las regiones donde se cultivan. Aunque se han realizado varios estudios para determinar la epidemiología de la bacteria estudiando su incidencia en el desarrollo de la bacteriosis (Pierce, 1901; Smith y col., 1912; Miller, 1934; Mulrean y Schroth, 1981, 1982; Giraud y col., 2010; Lindow y col., 2014), son escasos los estudios que hacen referencia a la epidemiología de la bacteria en asociación con los géneros fúngicos sugeridos de estar involucrados en el desarrollo de NAM. Dada la rápida propagación de la enfermedad, es importante identificar los microorganismos asociados y su epidemiología. Luego de una exhaustiva búsqueda bibliográfica, parecerían no existir estudios sobre la dinámica de la población de los géneros fúngicos junto a la bacteria en yemas y órganos florales antes del desarrollo del fruto. Así, el objetivo en el presente capítulo fue determinar la ocurrencia de *X. arboricola* pv. *juglandis* y de los géneros fúngicos *Alternaria* y *Fusarium* en diferentes estados fenológicos del nogal, con el fin de brindar conocimiento sobre aspectos epidemiológicos de NAM. Esta información además de constituir un aporte a una mejor comprensión de la enfermedad, resulta necesaria para el mejoramiento de los programas de manejo preventivo de la patología, que actualmente se basan en el uso de productos antimicrobianos a base de cobre y fungicidas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Muestreo

Durante los años 2016 y 2017, se llevaron a cabo dos muestreos anuales sobre plantaciones del cultivar Chandler, ubicadas en Luis Beltrán (Valle Medio del río Negro). En el primer caso, se trabajó con un establecimiento de producción orgánica y otro tradicional. En 2017, sólo se trabajó con la plantación tradicional.

Durante los diferentes estados fenológicos del nogal (Germain y col., 1999 citado en Iannamico, 2009), desde junio hasta noviembre de cada año muestreado, se recolectaron ramas conteniendo diferentes estructuras vegetales de interés, visualmente sanas. A continuación, en las tablas 4 y 5, se detallan los muestreos realizados durante ambos años:

MUESTREO AÑO 2016			
Invierno	Julio Semana 1	Af2	yemas terminales y laterales con caída de escamas externas
		Amg	amentos en reposo invernal
Primavera	Septiembre Semana 3	Bf	yemas terminales y laterales hinchadas
		Bm-Cm	amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas
		Cf	brotes
	Octubre Semana 1	Df2	escamas correspondientes a hojas desplegadas
		Dm2	amentos con apertura de flores masculinas
		Fm-Fm2	amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras
	Octubre Semana 3	Ff1-Ff2	flores femeninas: ovarios y estigmas
	Noviembre Semana 1	Gf	frutos recién cuajados

Tabla 4: Detalle del muestreo realizado durante el año 2016

MUESTREO AÑO 2017			
Invierno	Junio Semana 3	Af	yemas terminales y laterales en reposo invernal
		Amg	amentos en reposo invernal
	Agosto Semana 4	Af2	yemas terminales y laterales con caída de escamas externas
		Amg	amentos en reposo invernal
Primavera	Septiembre Semana 3	Bf	yemas terminales y laterales hinchadas
		Bm-Cm	amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas
		Cf	brotes
	Octubre Semana 1	Df2	escamas correspondientes a hojas desplegadas
		Dm2	amentos con apertura de flores masculinas
		Fm-Fm2	amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras
	Octubre Semana 3	Ff1-Ff2	flores femeninas: ovarios y estigmas
	Noviembre Semana 1	Gf	frutos recién cuajados

Tabla 5: Detalle del muestreo realizado durante el año 2017

Finalmente, en diciembre (primavera-verano), se recolectaron frutos inmaduros con lesiones típicas de bacteriosis y NAM. Toda la etapa de muestreo se realizó sobre 5 árboles de cada establecimiento productivo, elegidos al azar. Las muestras se extrajeron aleatoriamente utilizando tijeras de podar previamente desinfectadas con solución de etanol al 70 %, se envolvieron en papel tissue y se colocaron en bolsas de papel madera. Luego, se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento, el día posterior. La figura 27, presenta el aspecto de los nogales durante las diferentes estaciones del año. Las figuras 28 a 35, ilustran las diferentes estructuras vegetales muestreadas a lo largo de ambos años.



Fig. 27: Aspecto del nogal en las diferentes estaciones del año
Izquierda: invierno. Centro: inicios de primavera. Derecha: primavera-verano

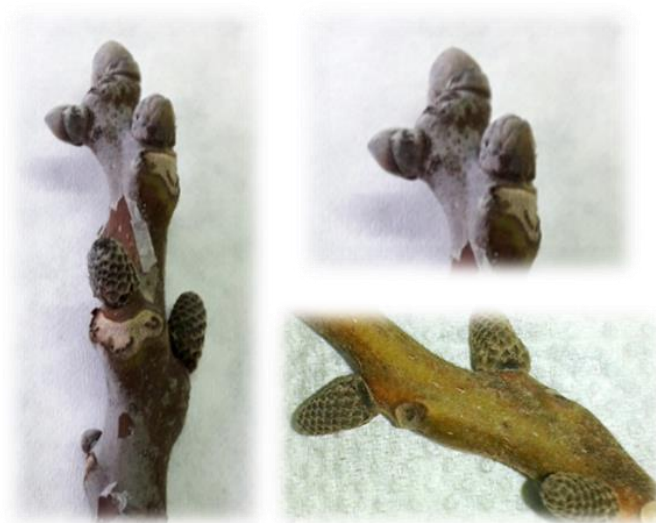


Fig. 28: Yemas en reposo invernal (Af) y amentos en reposo invernal (Amg)



Fig. 29: Yemas con caída de escamas externas (Af2)



Fig. 30: Yemas hinchadas (Bf) y amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas (Bm-Cm)



Fig. 31: Brotes (Cf) y amentos con apertura de flores masculinas (Dm2)



Fig. 32: Escamas correspondientes a hojas desplegadas (Df2) y amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras (Fm-Fm2)



Fig. 33: Flores femeninas (Ff1-Ff2)



Fig. 34: Frutos recién cuajados (Gf)

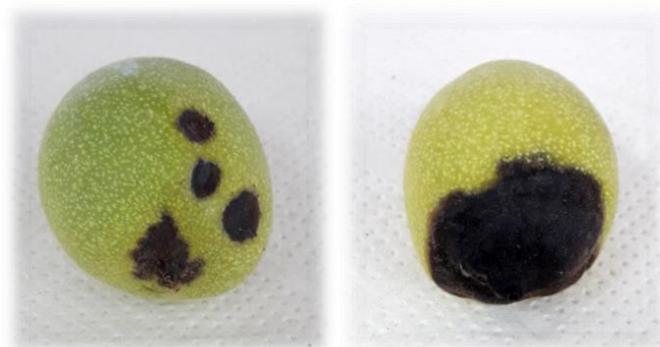


Fig. 35: Frutos lesionados. Izquierda: bacteriosis. Derecha: NAM

Los datos meteorológicos correspondientes al periodo de muestreo se obtuvieron a partir del pronóstico local de referencia proporcionado por la Estación Meteorológica Automática de Luis Beltrán perteneciente al INTA. La tabla 6 describe los valores promedio de cada parámetro meteorológico establecido para un rango de tiempo que incluye el día de muestreo y tres días previos.

Rango de tiempo	Temperatura media (°C)	Precipitaciones totales (mm)	Humedad relativa media (%)	Estadio/frutos lesionados
01/07/16-04/07/16	nd*	nd*	nd*	Af2 Amg
18/09/16-21/09/16	nd*	nd*	nd*	Bf Bm-Cm
03/10/16-06/10/16	15,9	7,9	33,5	Cf Df2 Dm2 Fm-Fm2
17/10/16-20/10/16	14,3	12,7	22,8	Ff1-Ff2
04/11/16-07/11/16	22,2	0,0	37,8	Gf
29/12/16-02/12/16	nd*	nd*	nd*	Frutos lesionados
18/12/16-21/12/16	nd*	nd*	nd*	Frutos lesionados
16/06/17-19/06/17	5,5	3,1	38,3	Af Amg
21/08/17-24/08/17	13,2	0,0	40	Af2 Amg
18/09/17-21/09/17	17,8	0,0	36,3	Bf Bm-Cm
29/09/17-02/10/17	15,2	1,8	35,8	Cf Df2 Dm2 Fm-Fm2

16/10/17- 19/10/17	18,5	4,3	36,5	Ff1-Ff2
04/11/17- 07/11/17	18,3	13,8	20,8	Gf
08/12/17- 11/12/17	24,5	0,0	31,8	Frutos lesionados
23/12/17- 26/12/17	23,3	0,0	34	Frutos lesionados

Tabla 6: Datos meteorológicos correspondientes al periodo de muestreo

*nd: datos no disponibles

3.2.2 Aislamiento de los microorganismos

Los órganos vegetales de interés se extrajeron asépticamente de las ramas utilizando un bisturí. A fin de analizar la flora superficial, los órganos se depositaron en matraces Erlenmeyers conteniendo 10-20 ml de una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9 % (de acuerdo al tamaño de la muestra) y se agitaron durante 20 minutos utilizando un shaker. Luego, 0,1 ml de la suspensión se sembró en placas de Petri conteniendo los medios Luria Bertani (LB) (Anexo 1), para bacterias y agar Papa Dextrosa suplementado con Cloranfenicol (0,1 g/L) (PDAC) (Anexo 1), para hongos. En el caso de los estigmas, por tratarse de una muestra muy pequeña, el procedimiento se llevó a cabo utilizando crioviales conteniendo 2 ml de solución de NaCl al 0,9 %.

Para proceder con el análisis de la flora interna, se efectuó una desinfección superficial de las muestras. Para ello, se descartaron las suspensiones y se reemplazaron por solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 %. Se agitaron las muestras durante 5 minutos y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, agitando durante 10 y 5 minutos, respectivamente. Como control del proceso de desinfección, se seleccionaron al azar 4 muestras y se procedió a sembrar 0,1 ml de la solución del segundo enjuague en los medios LB y PDAC. En el caso de los estigmas, los tiempos de desinfección y enjuague fueron de 2 y 3 minutos, respectivamente.

Una vez efectuada la desinfección superficial, se continuó con el análisis de la flora interna. Las muestras se extrajeron de los matraces Erlenmeyer y se trituraron asépticamente en pequeños trozos, utilizando un bisturí. Cinco trozos se sembraron directamente sobre el medio PDAC y los restantes se colocaron en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de solución de NaCl al 0,9 % estéril (crioviales conteniendo 2 ml, en el caso de los estigmas). Luego de vortexear durante 3 minutos, 0,1 ml de las suspensiones se sembró en placas de Petri conteniendo medio LB. En el caso de los frutos recién cuajados, el análisis de la flora interna descripto anteriormente se realizó

únicamente sobre la zona del extremo estigmático, área donde se presentan los síntomas de enfermedad.

Por otra parte, el procedimiento de análisis de los frutos lesionados consistió en una desinfección superficial, sumergiéndolos en una solución de NaOCl al 1 % durante 5 minutos y un enjuague posterior con agua destilada estéril. Los frutos se cortaron a la mitad y se extrajeron asépticamente trozos internos de la lesión. Los trozos se procesaron como fue descrito para el análisis de la flora interna de los órganos vegetales.

En todos los casos, una vez inoculadas, las placas de PDAC se incubaron a 25 °C durante 7 días, y las de LB a 27 °C durante 4 días.

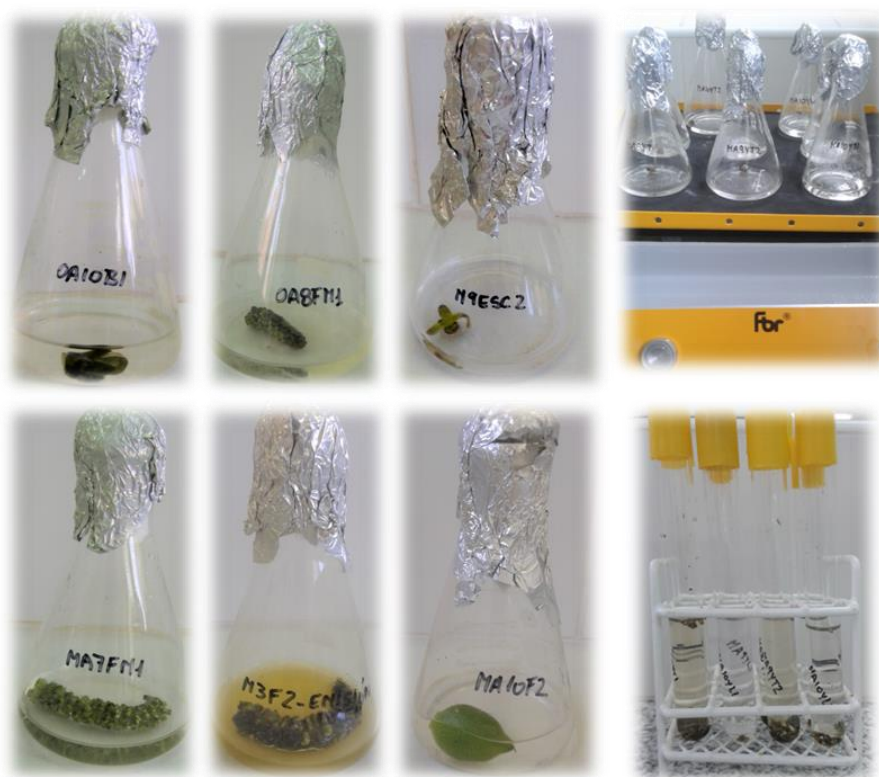


Fig. 36: Algunas etapas en el procesamiento de muestras extraídas en los diferentes estados fenológicos del nogal

3.2.3 Identificación de los microorganismos

Se realizó la identificación a nivel género de los microorganismos aislados en base a características macroscópicas y microscópicas de las colonias obtenidas. En el caso de las bacterias, aquellas que mostraron características morfológicas similares a las descritas para *Xanthomonas* en medio LB (Temperini y col., 2017), se subcultivaron en medio agar Nutritivo (AN) (Anexo 1) para obtener cultivos puros. Posteriormente, fueron sembradas por estrías en un medio diferencial para dicho género, Xan-D

(Anexo 1) (Lee y col., 2009; Temperini y col., 2017). Las placas se incubaron a 27 °C durante 5 a 7 días. Respecto a los hongos, se realizó la identificación morfológica a nivel género según los criterios propuestos por Simmons y Roberts (1993) y Simmons (2007), especialmente para determinar la incidencia del género *Alternaria* asociado a casos de NAM.

Identificación de *X. arboricola* pv. *juglandis*

La identidad de las colonias bacterianas que mostraron características morfológicas similares a las descriptas para *Xanthomonas* en medio Xan-D (presuntivas *Xanthomonas* spp.) (Lee y col., 2009; Temperini y col., 2017), fue confirmada mediante técnicas moleculares. Se seleccionaron al azar 47 colonias bacterianas caracterizadas morfológicamente como *Xanthomonas* spp. presuntivas, de las cuales 27 provenían de los diferentes estados fenológicos y 20 de los frutos sintomáticos.

Se procedió a la preparación de pellets bacterianos para la posterior extracción de ADN. Para ello, se prepararon suspensiones bacterianas a partir de los 47 aislamientos, previamente cultivados en AN. Las colonias fueron suspendidas en agua destilada estéril hasta alcanzar una absorbancia $A(600\text{ nm}) = 0,2$, a fin de obtener una concentración aproximada entre 1×10^8 UFC/ml y 5×10^8 UFC/ml (Moragrega, 2012). Las suspensiones fueron centrifugadas a 7500 rpm durante 10 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Los pellets fueron conservados a -80 °C, para su posterior uso (Temperini y col., 2017).

Las extracciones de ADN se realizaron utilizando el kit “DNeasy blood and tissue mini kit” (Qiagen) con un protocolo de pre-tratamiento para bacterias Gram negativas, siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN genómico extraído se cuantificó utilizando un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies).

Identificación a nivel especie: La identificación de los aislamientos a nivel especie se realizó mediante la amplificación del gen *qumA* (quinato deshidrogenasa) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los *primers* especie específicos para *X. arboricola*, XarbQF (GCGAGATCAATGCGACCTCGTC) y XarbQR (GGTGACCACA TCGAACCGCGCA) (Pothier y col., 2011). Las reacciones contenían un volumen total de 20 µl con 50 ng de ADN molde, buffer de PCR 1X, 0,2 µM de cada primer (Genbiotech SRL, Argentina), 0,2 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, DMSO al 1 % y 1,2 unidades de *Taq* Polimerasa (Thermo Fischer Scientific, Invitrogen Argentina S.A.). Los tubos de reacción se colocaron en un Termociclador Multigene (Labnet International Cycler) con las siguientes condiciones de reacción: paso de

desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto, con un paso final de extensión a 72 °C por 7 minutos (Temperini y col., 2017). Como control negativo se empleó agua destilada. Las amplificaciones se visualizaron bajo luz ultravioleta, luego de correr 10 µl de cada reacción en gel de agarosa al 1 % utilizando Gel Red.

Identificación a nivel patovar: Con el fin de identificar los aislamientos a nivel patovar, se llevaron a cabo dos protocolos de PCR diferentes, utilizando los *primers* específicos XAJ1 y XAJ6 para *X. arboricola* pv. *juglandis* según Fernandes y col. (2017) y Martins y col. (2019). Estos autores evaluaron previamente la ocurrencia de nueve marcadores moleculares en 108 aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis*, concluyendo que XAJ1 (XAJ1F: GTTGTCAAGGTCGCTACTGGACGC y XAJ1R: CGACAGGTACCGAAAGT GGACG) y XAJ6 (XAJ6F: AAGTCAGATGCGAAGCGAAAGG y XAJ6R: GCACA GCGGGAAGTAATAGCAAAC) estuvieron presentes en todas las cepas analizadas. Las reacciones contenían un volumen total de 20 µl con 25 ng de ADN molde, buffer de PCR 1X, 0,2 µM de cada primer (Genbiotech SRL, Argentina), 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM MgCl₂, DMSO al 1 % y 1 unidad de *Taq* Polimerasa (Genbiotech SRL, Argentina). Los tubos de reacción se colocaron en un Termociclador Multigene (Labnet International Cyclyer) con las siguientes condiciones de reacción: paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C para XAJ1 y a 48 °C para XAJ6 durante 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto, con un paso final de extensión a 72 °C por 7 minutos. Como control negativo se empleó agua destilada. Las amplificaciones se visualizaron bajo luz ultravioleta después de correr 10 µl de cada reacción en gel de agarosa al 1 % utilizando Gel Red. Genbiotech SRL (Argentina) realizó la secuenciación de los fragmentos XAJ1 y XAJ6 de cinco aislamientos elegidos al azar. Las secuencias resultantes se compararon con otras secuencias de ADN bacteriano de la base de datos de secuencias GenBank del NCBI mediante análisis BLAST para confirmar las identidades de los marcadores XAJ1 y XAJ6. Los datos obtenidos en este estudio se depositaron en la base de datos GenBank con los números de acceso OP456010 a OP456019.

Identificación de grupos-especies del género Alternaria

Se realizó la identificación de 35 aislamientos elegidos al azar mediante la determinación del grupo-especies al cual cada uno de ellos pertenecía, observando los

modelos de esporulación (Fig. 37) (Simmons y Roberts, 1993; Simmons, 2007). La identificación se realizó a partir de cultivos monospóricos (cultivos a partir de una única espora) (Nelson y col., 1983), cuyo procedimiento de obtención se describe a continuación:

Cultivo monospórico:

1. Se colocaron 5 gotas de agua destilada estéril, uniformemente distribuidas cerca de los bordes de una placa de Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo una capa delgada de medio agar Agua (AA) (Anexo 1).
2. Se esterilizó a llama un ansa ojal y se apoyó sobre una de las gotas a fin de cargar el anillo con el líquido.
3. Se procedió a frotar suavemente el ansa cargada de agua sobre la colonia a identificar, a fin de tomar conidios.
4. Los conidios se depositaron sobre una de las gotas de la placa realizando un estriado en forma de zigzag, desde el borde hacia el centro.
5. Sin quemar el ansa, se realizó el procedimiento de estriado sobre las gotas restantes para lograr un efecto de dilución.
6. Las placas se incubaron a 25 °C durante 24 horas.
7. Transcurrido el periodo de incubación, las placas se observaron bajo lupa binocular estereoscópica (40X) y, utilizando una aguja estéril, se cortó una porción del agar conteniendo un único conidio germinado.

Identificación:

1. La porción del agar conteniendo el conidio simple germinado se depositó sobre una placa de Petri conteniendo medio agar Papa Zanahoria (PZA) (Anexo 1).
2. Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días con periodos de luz-oscuridad.
3. Transcurrido el periodo de incubación, se realizó asépticamente un corte en forma de rectángulo (2 cm x 1 cm, aproximadamente) sobre el agar y se incubó durante 2 días más bajo las mismas condiciones.
4. Finalizado el periodo de incubación, las placas se observaron bajo lupa binocular estereoscópica (40X) para determinar el patrón de esporulación para la identificación de cada aislamiento.

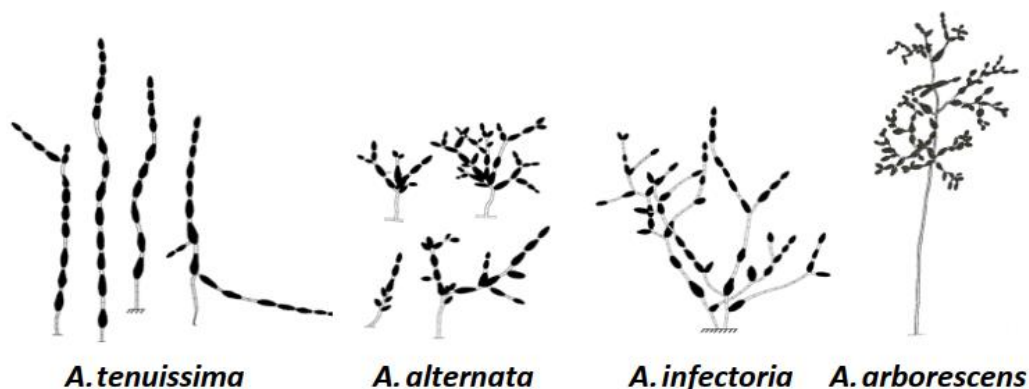


Fig. 37: Modelos de esporulación de grupos-especies de *Alternaria* (Fuente: Temperini, 2018)

Se utilizaron cuatro cepas de referencia de grupos-especies de *Alternaria* de “esporas pequeñas”: *A. alternata*, EGS 34.016; *A. tenuissima*, EGS 34.015; *A. arborescens*, EGS 39.128; y el tipo ex *A. infectoria*, EGS 27.193 proporcionadas oportunamente por el Dr. E. G. Simmons, Mycological Services, Crawfordsville, IN (Somma y col., 2011).

3.2.4 Cálculo de la frecuencia de aislamiento y abundancia de los patógenos. Análisis estadístico de datos

Aquellas muestras vegetales en las que se determinó la presencia de cada patógeno fueron consideradas como muestras positivas. La frecuencia de aislamiento de los patógenos en cada estado fenológico muestreado fue calculada en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia de aislamiento (\%)} = \frac{\text{muestras positivas} * 100}{\text{total de muestras analizadas}}$$

Los valores de las frecuencias de aislamiento de la bacteria fueron corregidos utilizando factores que representaron el porcentaje de presuntivas *Xanthomonas* spp. cuya identidad fue confirmada como *X. arboricola* pv. *juglandis* mediante técnicas moleculares.

La abundancia de los microorganismos se obtuvo a partir de los recuentos superficiales e internos de la bacteria y de los recuentos superficiales de los hongos. La misma fue calculada en base a la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{\text{órgano}} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias} * \text{volumen de la suspensión (ml)}}{\text{volumen sembrado (ml)}}$$

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el software Statgraphics Centurion 19. Se realizaron análisis de varianza empleando Modelos Lineales Generalizados (GLM) y se aplicaron pruebas de comparaciones múltiples, trabajando con un nivel de confianza del 95 % (α : 0,05).

3.2.5 Conservación de los aislamientos

A fin de asegurar la disponibilidad de los aislamientos para estudios posteriores, se procedió a la conservación de los microorganismos de interés. En el caso de la bacteria, los aislamientos se conservaron a -80°C , en eppendorfs conteniendo caldo Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (YDP) (Anexo 1) con glicerol al 20 %. Los aislamientos de *Alternaria* se conservaron a 5°C , en eppendorfs conteniendo agar Papa Dextrosa (PDA) (Anexo 1).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Identificación de los microorganismos

Identificación de los aislamientos bacterianos

Se determinó la presencia de presuntivas *Xanthomonas* spp. (cepas que resultaron positivas en el medio Xan-D) a partir de diferentes muestras analizadas. Los aislamientos exhibieron características morfológicas típicas del género en los medios LB y Xan-D (Lee y col., 2009; Temperini y col., 2017).

Los análisis moleculares a nivel especie permitieron confirmar la identidad de 38 aislamientos bacterianos como *X. arboricola*. Luego, tras la confirmación del patovar, todos estos aislamientos mostraron los fragmentos típicos correspondiente a los marcadores XAJ1 y XAJ6 en gel de agarosa después de la electroforesis. La figura 38 muestra los resultados de cinco muestras elegidas al azar (32JVM, 33JVM, 97JVM, 100JVM, 101JVM). Los tamaños moleculares de los amplicones fueron los siguientes: 32JVM, 708 pb XAJ1 y 643 pb XAJ6; 33JVM, 778 pb XAJ1 y 660 pb XAJ6; 97JVM, 665 pb XAJ1 y 677 pb XAJ6; 100JVM, 772 pb XAJ1 y 399 pb XAJ6; 101JVM, 595 pb XAJ1 y 499 pb XAJ6. El análisis BLAST de los fragmentos secuenciados mostró 99,7-100 % y 99,18-100 % de homología con las secuencias de referencia LMG 751, CPBF 1489, CPBF 1479, XAJ 417, IVIA 1317, IVIA 2499 y *isolate* 3 (GenBank, números de

registros respectivos: KU577316.1, KU577314.1, KU577313.1, CP012251.1, CP076725.1, CP076726.1, LR861807.1).

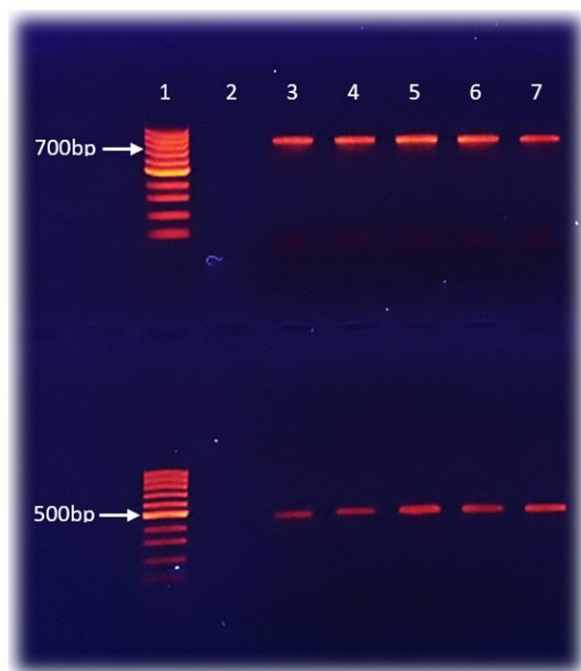


Fig. 38: Gel de agarosa exhibiendo los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR utilizando los *primers* XAJ1 (sector superior) y XAJ6 (sector inferior). 1: marcador de 100 pb, 2: control negativo, 3-7: 32JVM, 33JVM, 97JVM, 100JVM, 101JVM

Por lo tanto, los análisis moleculares permitieron confirmar la identidad de 38 aislamientos bacterianos como *X. arborícola* pv. *juglandis*, 19 pertenecientes a los estados fenológicos y 19 pertenecientes a los frutos sintomáticos. De esta manera, se confirmó la identidad del 70,4 % de las presuntas *Xanthomonas* spp. aisladas de los estados fenológicos y del 95 % de las aisladas a partir de los frutos lesionados. A partir de ello, los valores 0,70 y 0,95 se utilizaron como factores de corrección para determinar las frecuencias de aislamiento bacteriano.

Identificación de los aislamientos fúngicos

Se determinó la presencia de *Alternaria* spp. a partir de las diferentes muestras analizadas. Sin embargo, no se obtuvieron aislamientos del género *Fusarium* en ninguno de los estados fenológicos estudiados.

Los aislamientos de *Alternaria* fueron clasificados en 2 grupos-especies morfológicamente diferentes: el 88,6 % correspondió al grupo-especies *A. tenuissima* y el 5,7 % al grupo *A. alternata* (Figs. 39 y 40). Un 5,7 % quedó definido como *Alternaria* spp., dado que no fue posible determinar un patrón de esporulación claro (Anexo 2).

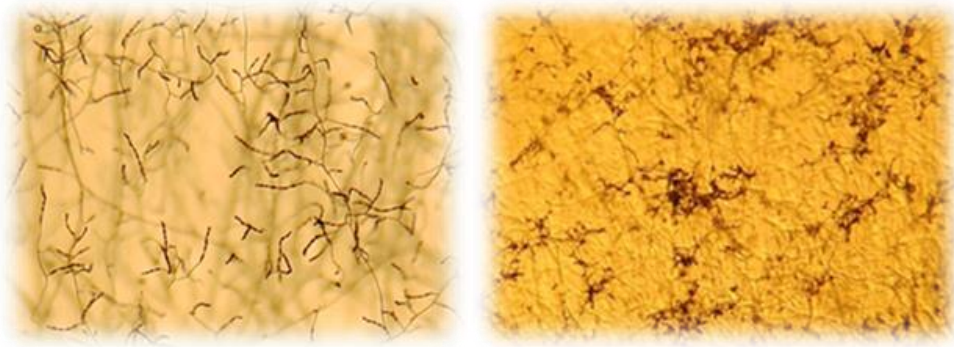


Fig.39: Patrones de esporulación de grupos-especies de *Alternaria*.

Izquierda: *A. tenuissima*. Derecha: *A. alternata*



Fig. 40: Patrones de esporulación de grupos-especies de *Alternaria*, vista lateral del corte.

Izquierda: *A. tenuissima*. Derecha: *A. alternata*

3.3.2 Frecuencias de aislamiento y abundancia de los microorganismos en diferentes estados fenológicos del nogal

Teniendo en cuenta los dos años de muestreo, *X. arborícola* pv. *juglandis* fue detectada en nueve de los once estados fenológicos analizados, y el género *Alternaria* en todos ellos. En las tablas 7 a 12, se presentan las frecuencias de aislamiento y la abundancia de los microorganismos, en el exterior e interior de los órganos florales extraídos en cada etapa fenológica, para cada establecimiento y año de muestreo (para más detalles ver Anexos 3 y 4).

Cultivo Orgánico – 2016

<i>Aislamiento y abundancia de <i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> – Cultivo Orgánico – 2016</i>						
Órgano floral	Estado fenológico	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)		
				Promedio	Mín.	Máx.
Yemas con caída de escamas externas	Af2	S	14,0	3875	400	11400
		I	21,0	18717	200	30000
Amentos en reposo invernal	Amg	S	14,0	850	100	1600
		I	0,0	–	–	–
Yemas hinchadas	Bf	S	14,0	863	150	2100
		I	10,5	1433	900	2400
Amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas	Bm-Cm	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–
Brotos	Cf	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–
Escamas correspondientes a hojas desplegadas	Df2	S	0,0	–	–	–
Amentos con apertura de flor masculina	Dm2	S	0,0	–	–	–
Amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras	Fm-Fm2	S	0,0	–	–	–
Ovarios (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–
Estigmas (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–

Tabla 7: Aislamiento y abundancia de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Cultivo orgánico, año 2016

Aislamiento y abundancia de <i>Alternaria</i> spp. – Cultivo Orgánico – 2016						
Órgano floral	Estado fenológico	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)		
				Promedio	Mín.	Máy.
Yemas con caída de escamas externas	Af2	S	30,0	117	100	200
		I	25,0			
Amentos en reposo invernal	Amg	S	10,0	100	100	100
		I	100,0			
Yemas hinchadas	Bf	S	40,0	169	150	300
		I	20,0			
Amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas	Bm-Cm	S	50,0	180	150	300
		I	70,0			
Brotes	Cf	S	0,0	—	—	—
		I	20,0			
Escamas correspondientes a hojas desplegadas	Df2	S	25,0	200	200	200
Amentos con apertura de flor masculina	Dm2	S	66,7	500	200	800
Amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras	Fm-Fm2	S	66,7	450	200	800
Ovarios (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	20,0	100	100	100
		I	0,0			
Estigmas (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	—	—	—
		I	0,0			

Tabla 8: Aislamiento y abundancia de *Alternaria* spp. Cultivo orgánico, año 2016

Cultivo Tradicional – 2016

<i>Aislamiento y abundancia de X. arboricola pv. juglandis – Cultivo Tradicional – 2016</i>						
Órgano floral	Estado fenológico	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)		
				Promedio	Min.	Máx.
Yemas con caída de escamas externas	Af2	S	14,0	1000	100	3300
		I	35,0	14880	300	30000
Amentos en reposo invernal	Amg	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–
Yemas hinchadas	Bf	S	7,0	6825	4200	9450
		I	7,0	4350	1000	7700
Amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas	Bm-Cm	S	7,0	150	150	150
		I	0,0	–	–	–
Escamas correspondientes a hojas desplegadas	Df2	S	0,0	–	–	–
Amentos con apertura de flor masculina	Dm2	S	0,0	–	–	–
Amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras	Fm-Fm2	S	0,0	–	–	–
Ovarios (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–
Estigmas (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–
Frutos recién cuajados	Gf	S	28,0	47650	10600	60000
		I	0,0	–	–	–

Tabla 9: Aislamiento y abundancia de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Cultivo tradicional, año 2016

Aislamiento y abundancia de <i>Alternaria</i> spp. – Cultivo Tradicional – 2016						
Órgano floral	Estado fenológico	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)		
				Promedio	Mín.	Máy.
Yemas con caída de escamas externas	Af2	S	15,0	133	100	200
		I	40,0			
Amentos en reposo invernal	Amg	S	20,0	100	100	100
		I	90,0			
Yemas hinchadas	Bf	S	35,0	257	150	600
		I	10,0			
Amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas	Bm-Cm	S	0,0	—	—	—
		I	50,0			
Escamas correspondientes a hojas desplegadas	Df2	S	20,0	400	200	600
Amentos con apertura de flor masculina	Dm2	S	25,0	200	200	200
Amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras	Fm-Fm2	S	40,0	450	400	600
Ovarios (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	—	—	—
		I	0,0			
Estigmas (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	—	—	—
		I	0,0			
Frutos recién cuajados	Gf	S	20,0	200	200	200
		I	0,0			

Tabla 10: Aislamiento y abundancia de *Alternaria* spp. Cultivo tradicional, año 2016

Cultivo Tradicional – 2017

<i>Aislamiento y abundancia de <i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> – Cultivo Tradicional – 2017</i>						
Órgano floral	Estado fenológico	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)		
				Promedio	Min.	Máx.
Yemas en reposo invernal	Af	S	10,5	567	300	1000
		I	31,5	8300	200	28500
Yemas con caída de escamas externas	Af2	S	10,5	2433	300	5400
		I	49,0	4550	600	15000
Amentos en reposo invernal	Amg	S	14,0	4375	100	14000
		I	3,5	100	100	100
Yemas hinchadas	Bf	S	14,0	4613	150	15000
		I	21,0	2833	100	10900
Amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas	Bm-Cm	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–
Brotes	Cf	S	0,0	–	–	–
		I	7,0	1000	1000	1000
Escamas correspondientes a hojas desplegadas	Df2	S	17,5	1000	1000	1000
Amentos con apertura de flor masculina	Dm2	S	0,0	–	–	–
Amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras	Fm-Fm2	S	14,0	200	200	200
Ovarios (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–
Estigmas (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–
Frutos recién cuajados	Gf	S	0,0	–	–	–
		I	0,0	–	–	–

Tabla 11: Aislamiento y abundancia de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Cultivo tradicional, año 2017

Aislamiento y abundancia de <i>Alternaria</i> spp. – Cultivo Tradicional – 2017						
Órgano floral	Estado fenológico	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)		
				Promedio	Mín.	Máx.
Yemas en reposo invernal	Af	S	45,0	211	100	300
		I	85,0			
Yemas con caída de escamas externas	Af2	S	40,0	188	100	500
		I	95,0			
Amentos en reposo invernal	Amg	S	25,0	140	100	200
		I	95,0			
Yemas hinchadas	Bf	S	60,0	263	150	600
		I	95,0			
Amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas	Bm-Cm	S	30,0	150	150	150
		I	80,0			
Brotos	Cf	S	40,0	250	200	400
		I	80,0			
Escamas correspondientes a hojas desplegadas	Df2	S	25,0	600	600	600
Amentos con apertura de flor masculina	Dm2	S	100,0	440	200	800
Amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras	Fm-Fm2	S	60,0	733	200	1800
Ovarios (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	10,0	100	100	100
		I	0,0			
Estigmas (flores femeninas)	Ff1-Ff2	S	0,0	—	—	—
		I	10,0			
Frutos recién cuajados	Gf	S	5,0	200	200	200
		I	0,0			

Tabla 12: Aislamiento y abundancia de *Alternaria* spp. Cultivo tradicional, año 2017

Frecuencias de aislamiento de *X. arboricola* pv. *juglandis* en los diferentes estados fenológicos

Las frecuencias de aislamiento de la bacteria en los distintos estados fenológicos estudiados se presentan en la figura 41. *X. arboricola* pv. *juglandis* se aisló con mayor frecuencia a partir de las yemas en etapas de reposo invernal y de caída de escamas externas (Af y Af2), principalmente en su interior. También se encontró tanto en la superficie como en el interior de las yemas hinchadas (Bf). Solo durante el año 2017, se determinó la presencia bacteriana en el interior de algunos brotes (Cf) y en las escamas correspondientes al estadio de hojas desplegadas (Df2). Si bien la bacteria se aisló a medida que se desarrollaron los primeros estados fenológicos femeninos, no se detectó durante la etapa de floración (Ff1-Ff2). En frutos recién cuajados (Gf), sólo se encontró en la superficie de frutos recolectados en un establecimiento durante el año 2016 (Fig. 41). Respecto a los estados fenológicos correspondientes a la floración masculina, *X. arboricola* pv. *juglandis* se aisló a partir de amentos en reposo invernal (Amg), principalmente de la superficie, a excepción del muestreo correspondiente al cultivo tradicional del año 2016, donde se determinó en la superficie de los amentos en crecimiento (Bm-Cm). La bacteria no se aisló a partir de los amentos con apertura de flores masculinas (Dm2) y durante el estadio posterior, correspondiente a la dehiscencia de anteras (Fm-Fm2), solo se aisló en la superficie de algunas muestras durante el año 2017 (Fig. 41).

Frecuencias de aislamiento del género *Alternaria* en los diferentes estados fenológicos

Las frecuencias de aislamiento del hongo en los diferentes estados fenológicos estudiados se presentan en la figura 42. *Alternaria* spp. se aislaron frecuentemente durante los primeros estados fenológicos correspondientes a la brotación y floración femenina (Af, Af2, Bf, Cf), principalmente en su interior, en la mayoría de los casos. Además, y a diferencia de la bacteria, en algunos casos se determinó la presencia del hongo en la superficie de los ovarios y en el interior de los estigmas (Ff1-Ff2). En frutos recién cuajados (Gf), solo se aisló superficialmente y, en el caso especial del año 2017, con una frecuencia notablemente menor en comparación con las etapas anteriores (Fig. 42). Respecto a los estadios de floración masculina, *Alternaria* spp. se aislaron con mayor frecuencia a partir de muestras recolectadas durante los primeros estados fenológicos (Amg, Bm-Cm), predominantemente en su interior. Asimismo, y a diferencia de *Xanthomonas*, también se determinaron en la superficie de los amentos durante la apertura de flores masculinas (Dm2) y la dehiscencia de anteras (Fm-Fm2)

(Fig. 42). Cabe destacar la mayor frecuencia de aislamiento del hongo con respecto a la bacteria en prácticamente todos los estados fenológicos analizados (Figs. 41 y 42).

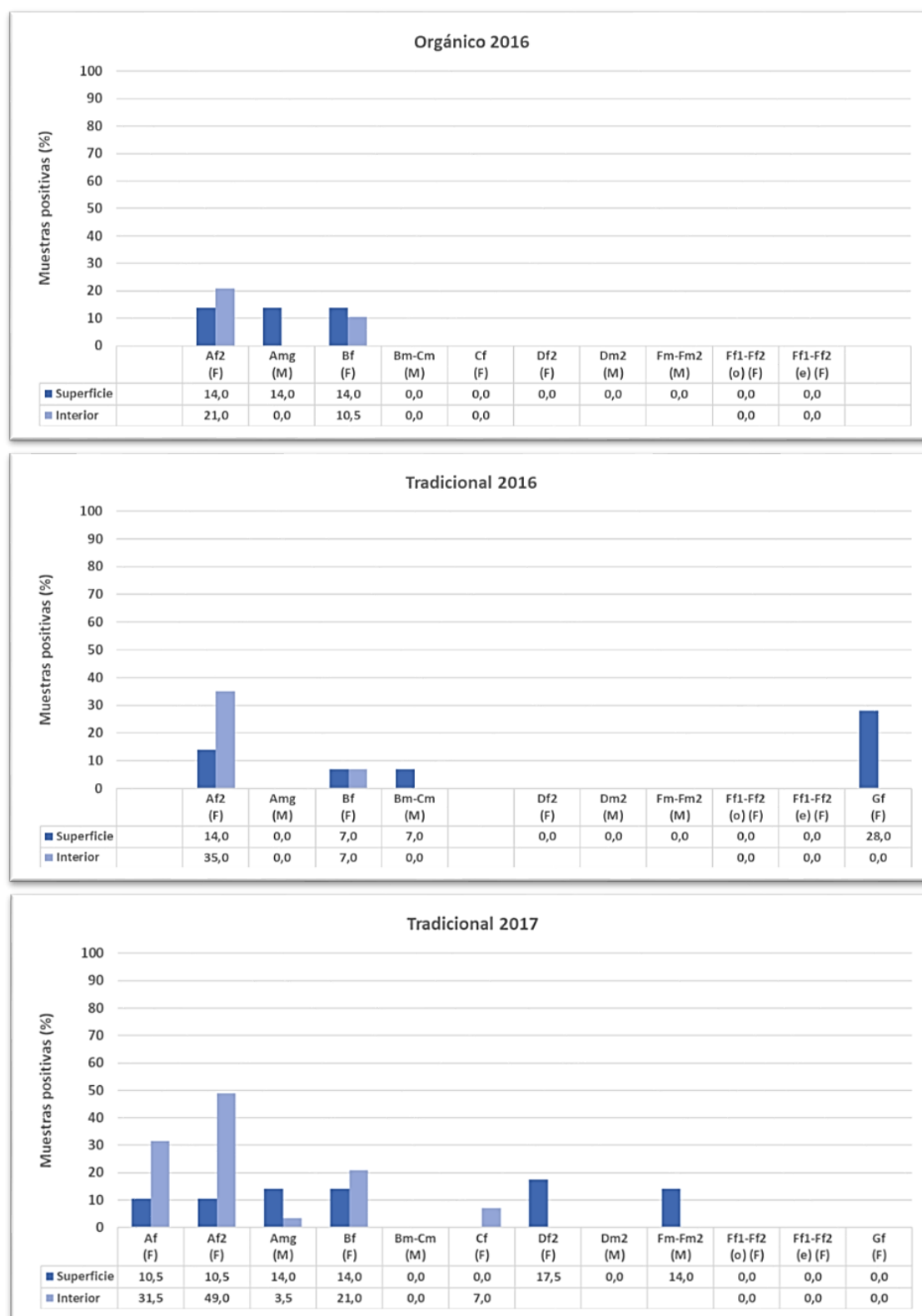


Fig. 41: Frecuencias de aislamiento de *X. arboricola* pv. *juglandis* en diferentes estados fenológicos del nogal

F: estado fenológico correspondiente a la brotación y floración femenina

M: estado fenológico correspondiente a la brotación y floración masculina

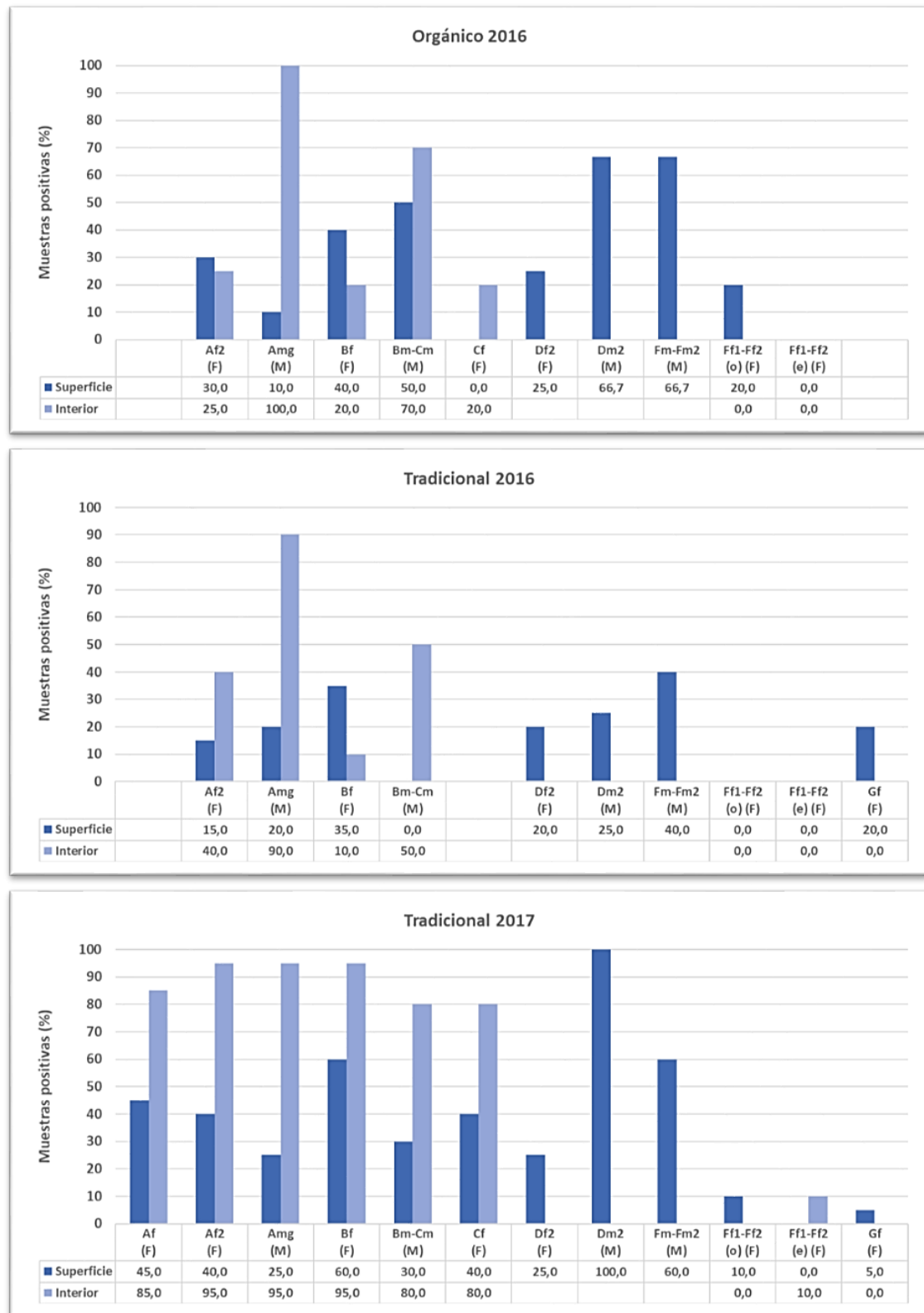


Fig. 42: Frecuencias de aislamiento de *Alternaria* spp. en diferentes estados fenológicos del nogal

F: estado fenológico correspondiente a la brotación y floración femenina

M: estado fenológico correspondiente a la brotación y floración masculina

Abundancia de *X. arborícola* pv. *juglandis* y *Alternaria* spp. en los diferentes estados fenológicos

La abundancia de *X. arborícola* pv. *juglandis* en el exterior e interior de los órganos florales se muestra en la figura 43 y la abundancia del género *Alternaria* en el exterior de los órganos florales, en la figura 44. Todos los resultados se expresaron como log (UFC/órgano). Aunque el hongo se aisló con mayor frecuencia, la bacteria fue más abundante. La población fúngica superficial fue menor que la bacteriana en todos los estados fenológicos en los que se determinó la bacteria, a excepción del estado correspondiente a la dehiscencia de anteras (Fm-Fm2) durante el año 2017 (Figs. 43 y 44).

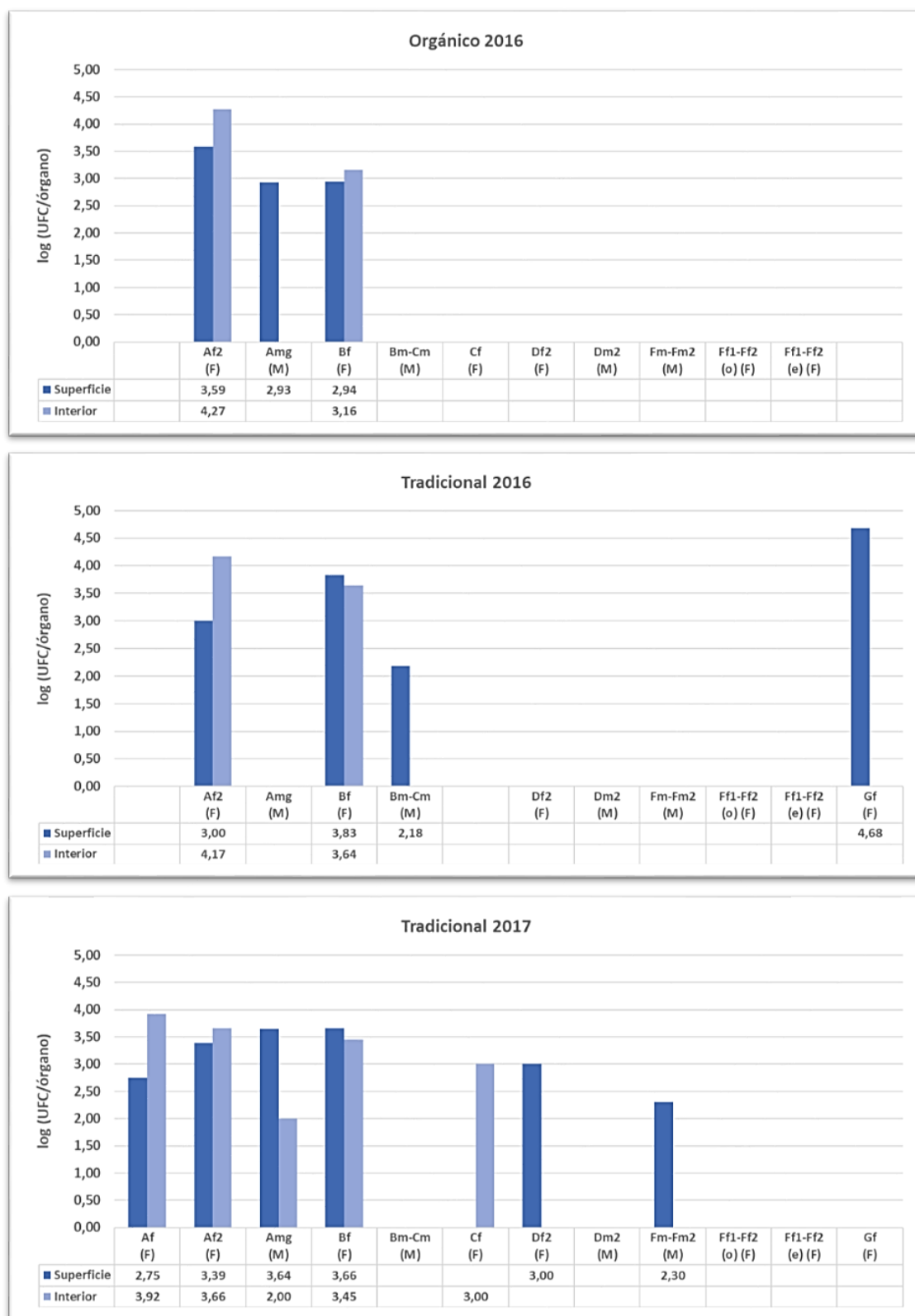


Fig. 43: Abundancia de *X. arboricola* pv. *juglandis* en diferentes estados fenológicos del nogal

F: estado fenológico correspondiente a la brotación y floración femenina

M: estado fenológico correspondiente a la brotación y floración masculina

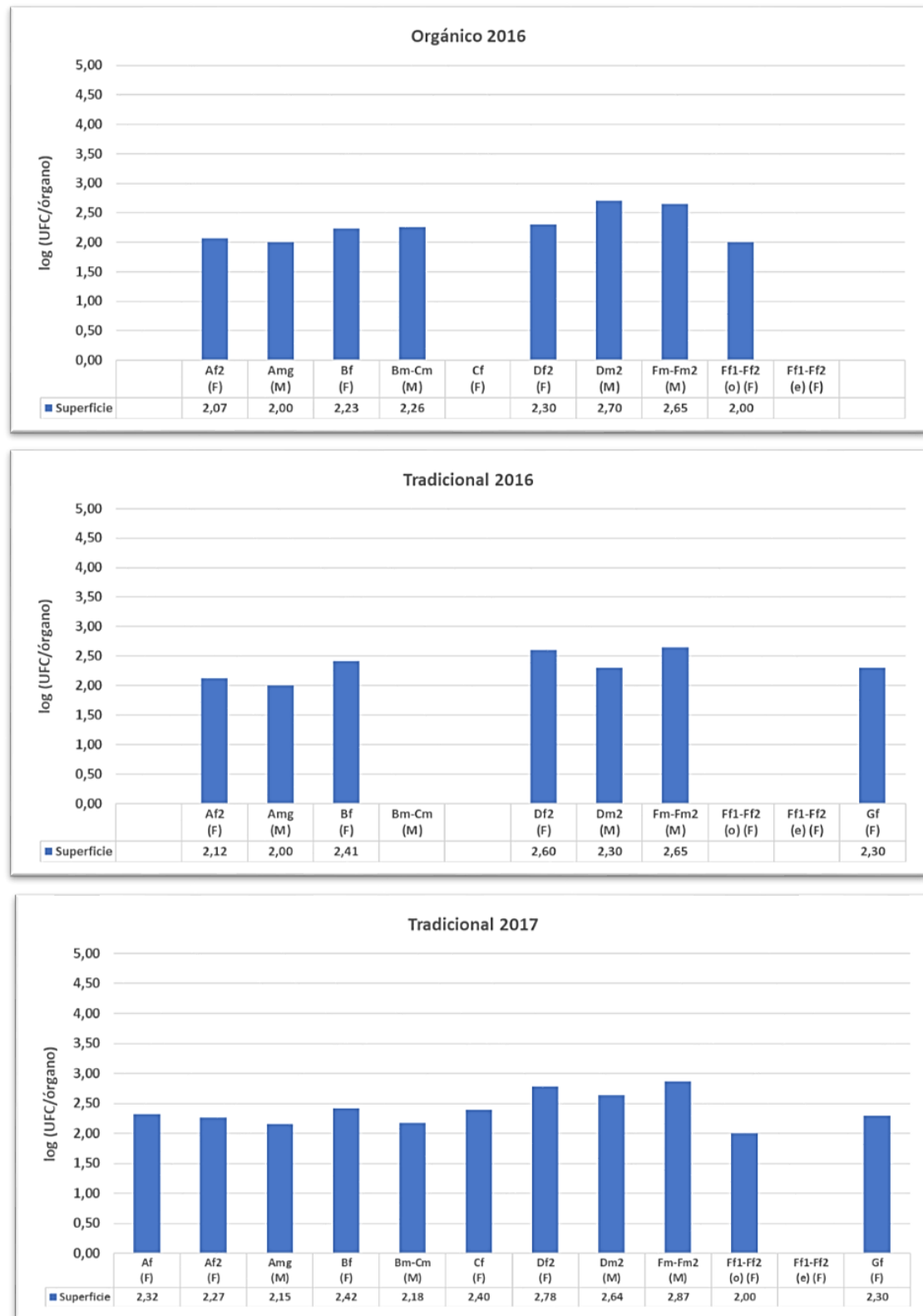


Fig. 44: Abundancia de *Alternaria* spp. en diferentes estados fenológicos del nogal

F: estado fenológico correspondiente a la brotación y floración femenina

M: estado fenológico correspondiente a la brotación y floración masculina

En la presentación de los resultados anteriores, particularmente en el caso de los estados fenológicos que involucraron yemas (Af, Af2, Bf), si bien se analizaron yemas terminales y laterales, no se discriminó entre ambos tipos dado que no se detectaron diferencias significativas en las frecuencias de aislamiento y en la abundancia de los microorganismos entre ambos tipos de órganos (Figs. 45 y 46).

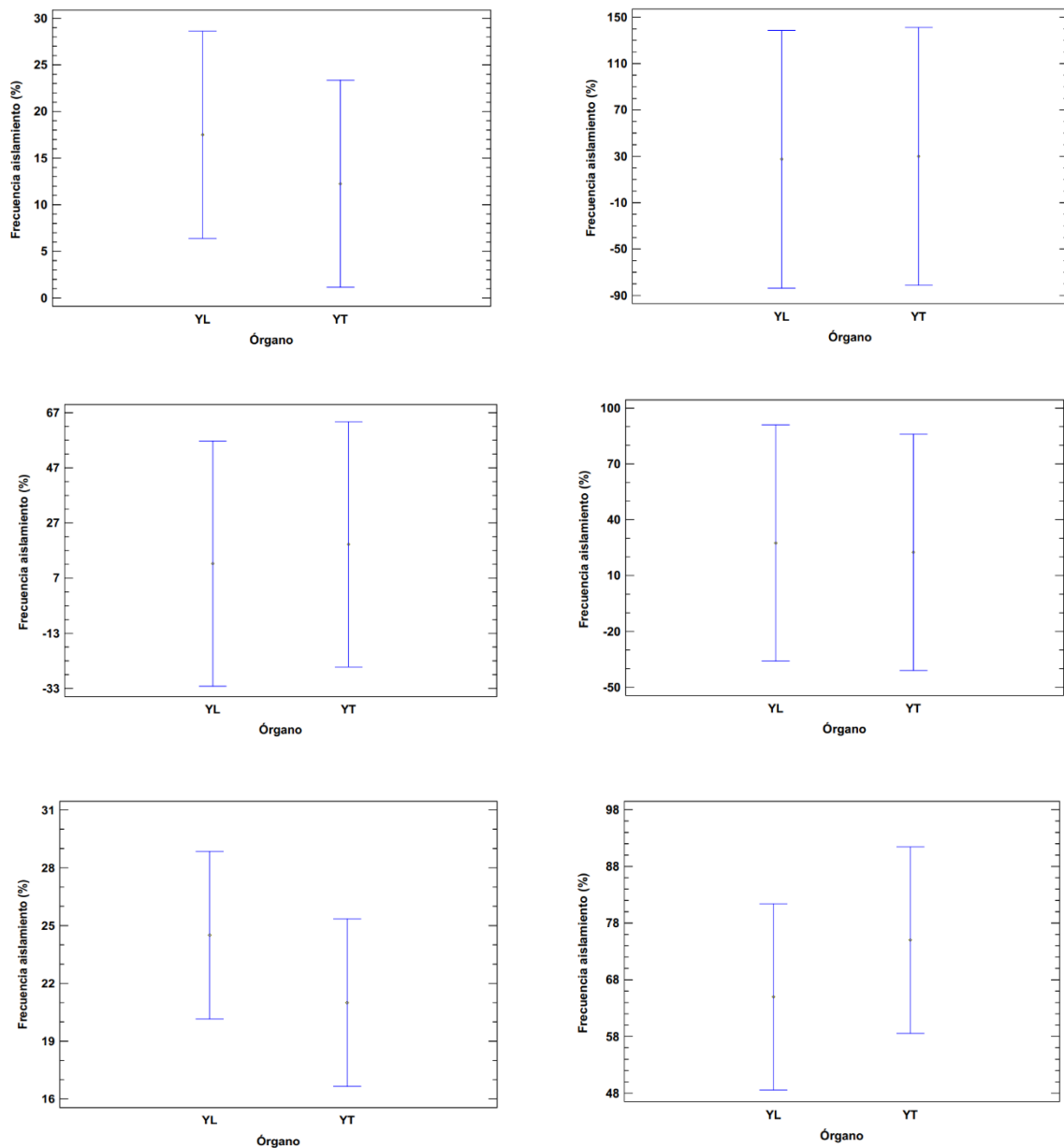


Fig. 45: Medias e Intervalos HSD de Tukey (95 %). Izquierda: Frecuencias de aislamiento de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Derecha: Frecuencia de aislamiento de *Alternaria* spp. De arriba hacia abajo: Cultivo orgánico, 2016; Cultivo tradicional, 2016; Cultivo tradicional, 2017

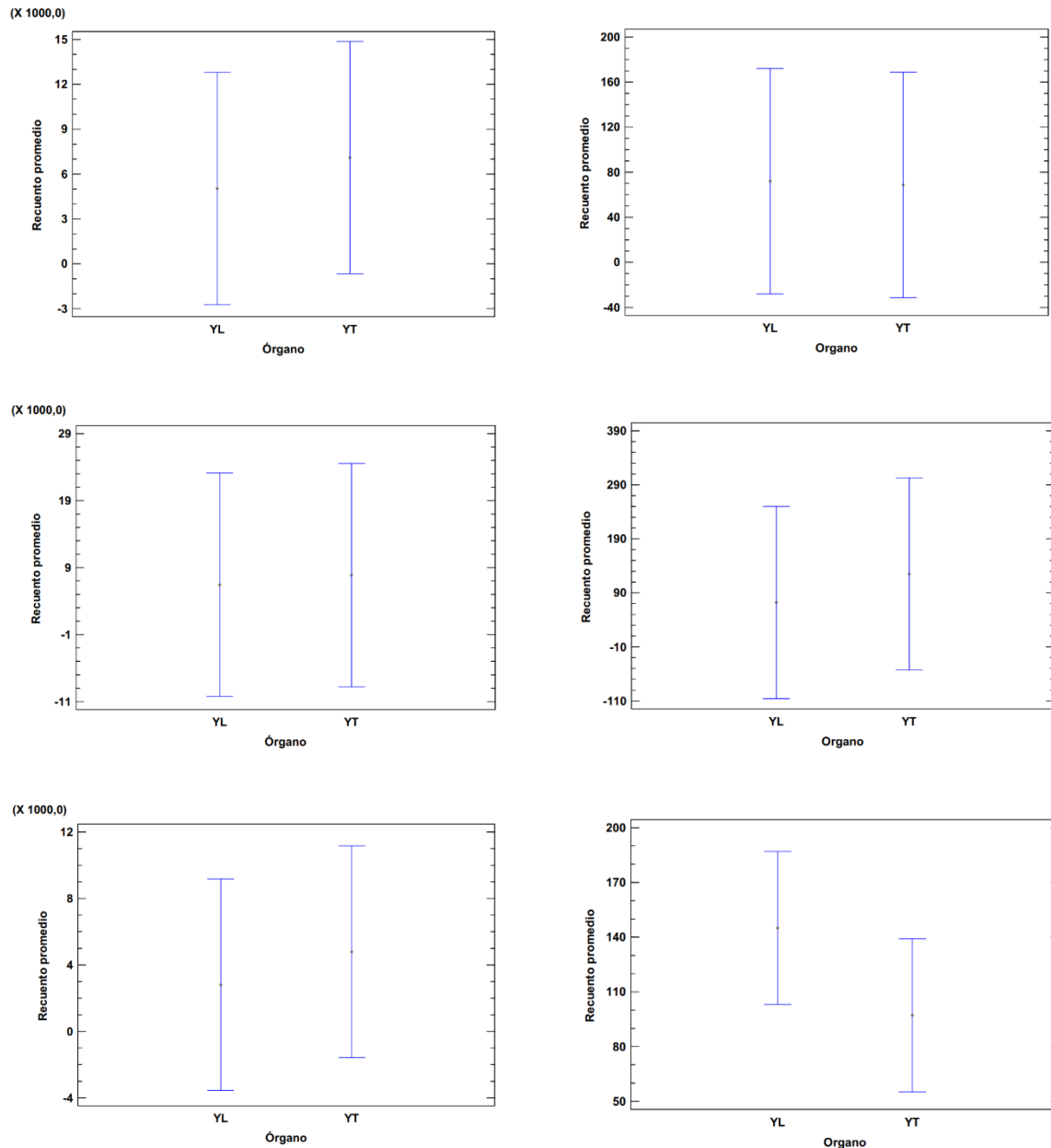


Fig. 46: Medias e Intervalos HSD de Tukey (95 %). Izquierda: Recuento promedio de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Derecha: Recuento promedio de *Alternaria* spp. De arriba hacia abajo: Cultivo orgánico, 2016; Cultivo tradicional, 2016; Cultivo tradicional, 2017

En general, los resultados obtenidos en ambos tipos de cultivo (orgánico y tradicional) durante el año 2016 no presentaron diferencias significativas (Figs. 47 y 48). A partir de ello, durante el año 2017 se decidió trabajar únicamente con el cultivo tradicional.

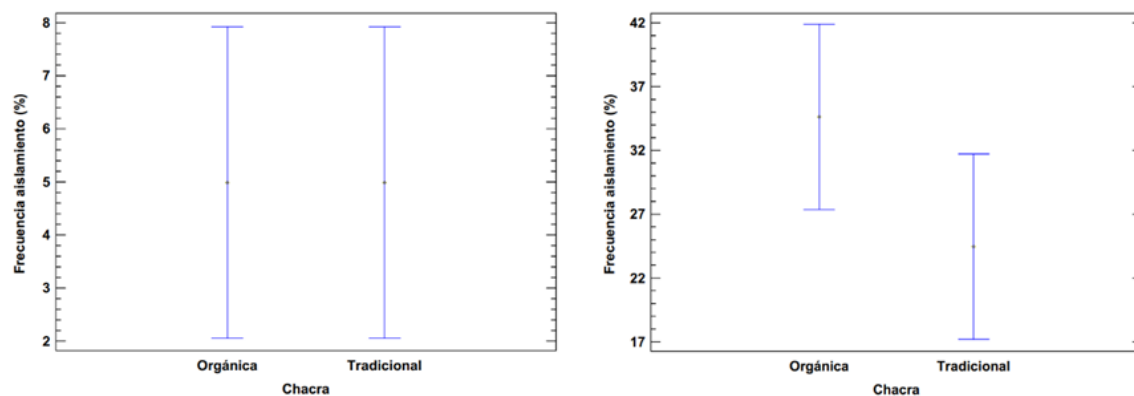


Fig. 47: Medias e Intervalos HSD de Tukey (95 %). Izquierda: Frecuencia de aislamiento de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Derecha: Frecuencia de aislamiento de *Alternaria* spp. Año 2016

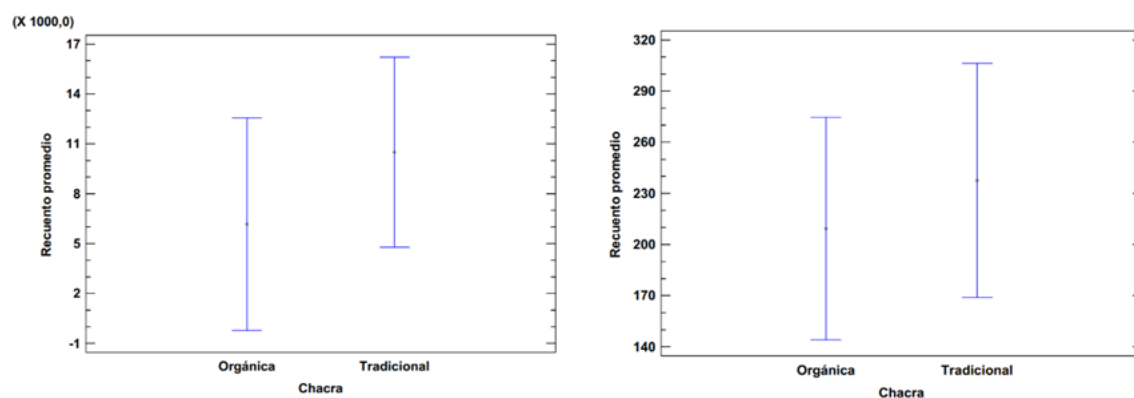


Fig. 48: Medias e Intervalos de Bonferroni (95 %). Izquierda: Recuento promedio de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Derecha: Recuento promedio de *Alternaria* spp. Año 2016

Respecto al cultivo tradicional, las frecuencias de aislamiento de la bacteria a lo largo de los años 2016 y 2017, generalmente, no fueron significativamente diferentes. Sin embargo, el género *Alternaria* se aisló con mayor frecuencia durante el segundo año de muestreo (Fig. 49). En general, la abundancia de los microorganismos fue similar durante ambos períodos (Fig. 50).

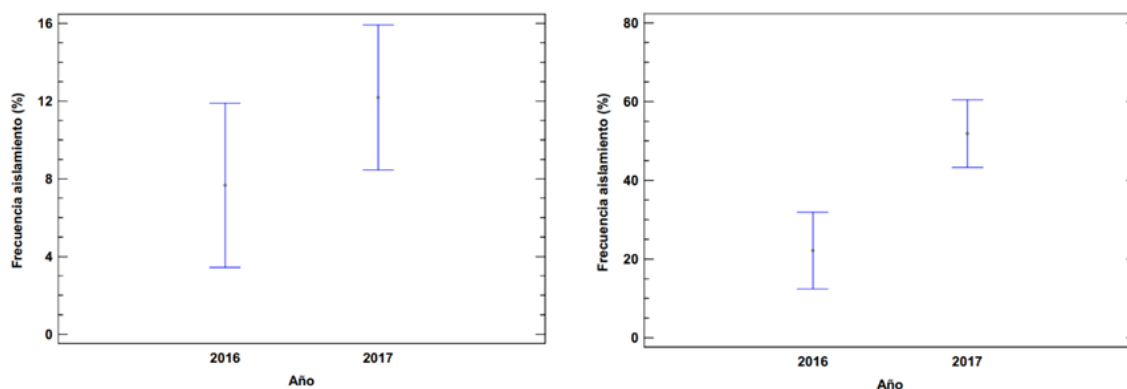


Fig. 49: Medias e Intervalos de Bonferroni (95 %). Izquierda: Frecuencia de aislamiento de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Derecha: Frecuencia de aislamiento de *Alternaria* spp. Cultivo tradicional

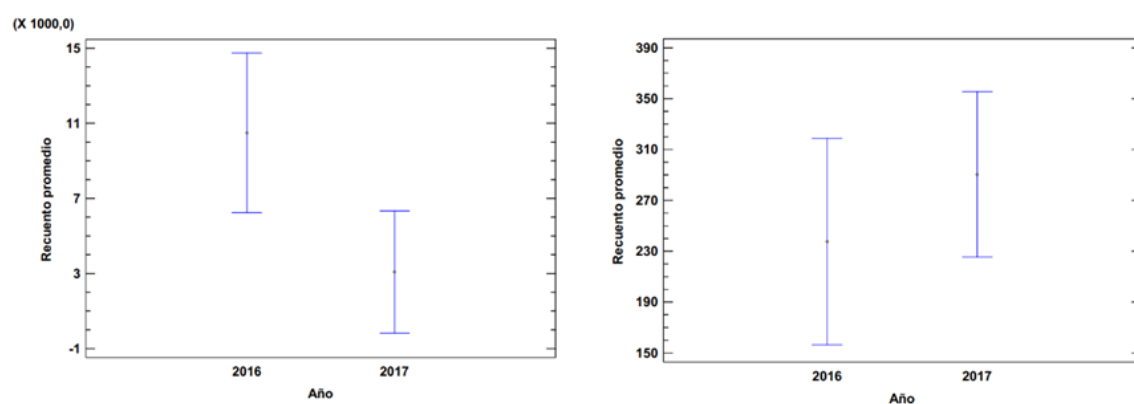


Fig. 50: Medias e Intervalos de Bonferroni (95 %). Izquierda: Recuento promedio de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Derecha: Recuento promedio de *Alternaria* spp. Cultivo tradicional

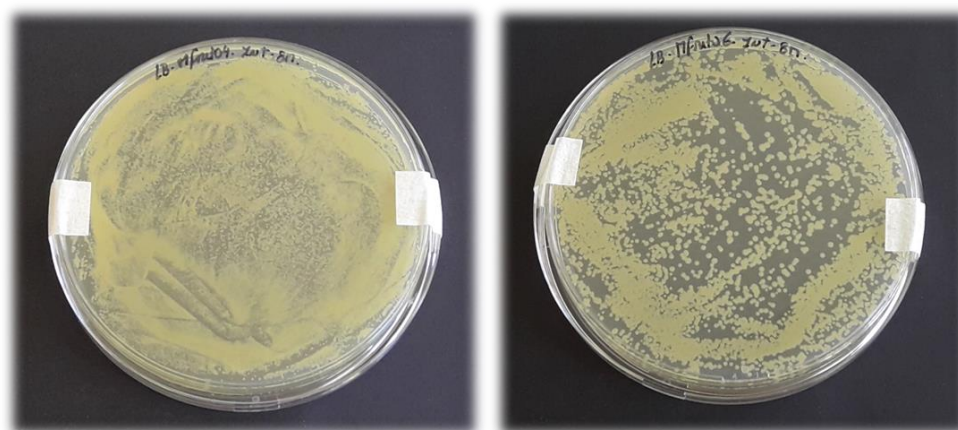
3.3.3 Frecuencias de aislamiento de los microorganismos en frutos lesionados

Respecto al análisis de los frutos inmaduros con lesiones características de NAM o bacteriosis, *X. arboricola* pv. *juglandis* fue hallada frecuentemente, en porcentajes superiores al 85 % del total de frutos analizados. En cuanto a los microorganismos fúngicos, el género *Alternaria* sólo se detectó esporádicamente en casos de NAM, sin superar el 10 % (Tabla 13). No se obtuvieron aislamientos del género *Fusarium*.

Resultados del análisis de frutos sintomáticos					
Muestreo	Cultivo	Síntomas	Muestras analizadas	Frecuencia de aislamiento (%)	
				<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	<i>Alternaria</i> spp.
Diciembre 2016 semana 1 semana 3	Tradicional	NAM	15	88,7	0,0
		Bacteriosis	10	95,0	0,0
Diciembre 2016 semana 3	Orgánico	NAM	10	85,5	10,0
Diciembre 2017 semana 2 semana 4	Tradicional	NAM	20	95,0	10,0

Tabla 13: Frecuencia de aislamiento de los microorganismos a partir de frutos sintomáticos

Cabe destacar la gran abundancia bacteriana al analizar las muestras extraídas de las lesiones típicas de las patologías sobre los frutos. El crecimiento bacteriano, generalmente, consistió en mantos amarillos (Fig. 51).

Fig. 51: Placas de aislamiento de *X. arboricola* pv. *juglandis* a partir de lesiones de frutos inmaduros

3.4 DISCUSIÓN

Esta etapa de la investigación constituye el primer estudio de monitoreo simultáneo de *X. arboricola* pv. *juglandis* y grupos-especies de *Alternaria* en diferentes estados fenológicos del nogal, en relación a NAM. Los aislamientos bacterianos se identificaron morfológicamente en los medios LB y Xan-D, pero la necesidad de aplicar factores de corrección después del análisis molecular demuestra que la especificidad del medio diferencial Xan-D no es absoluta. Este fenómeno fue observado previamente (López-Vielma y col., 2016) y expone la necesidad de realizar técnicas moleculares para

confirmar la identidad bacteriana. Las pruebas moleculares permitieron la confirmación de la bacteria como *X. arboricola* pv. *juglandis*. En cuanto al género *Alternaria*, el análisis morfológico condujo a la identificación de *A. tenuissima* como el principal grupo-especies que se encuentra en los órganos florales, mientras que el grupo *A. alternata* se aisló en menor proporción. Estos grupos-especies también se informaron en trabajos previos, siendo aislados a partir de flores y amentos (Belisario y col., 2010) y frutos sintomáticos (Hong y col., 2006; Moragrega y col., 2011, Temperini y col., 2017).

Durante el período invernal, las yemas representaron el principal sitio de hibernación de la bacteria, dado que su incidencia en el interior de los amentos en reposo invernal (Amg) fue nula o muy baja. Las mayores frecuencias de aislamiento se determinaron al analizar el interior de las yemas en reposo invernal y de las yemas con caída de escamas externas (Af y Af2). Sin embargo, la frecuencia de aislamiento disminuyó al evaluar el interior de las yemas hinchadas (Bf). Esto podría deberse a la pérdida parcial de inóculo junto con el desprendimiento de las escamas, lo cual podría significar un medio de dispersión adicional del inóculo bacteriano en los cultivos. Estos resultados son consistentes con la capacidad reportada de la bacteria para colonizar las yemas superficial e internamente, representando una ventaja para mejorar su supervivencia y promover su rápida diseminación (Mulrean y Schroth, 1982). De hecho, la colonización interna permite que el microorganismo pueda sobrevivir períodos de estrés ambiental, mientras que la colonización superficial asegura una fuente de inóculo disponible cuando las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de la enfermedad (Mulrean y Schroth, 1982). Considerando que las yemas están presentes durante casi todo el año, se esperan muchas oportunidades para la dispersión del inóculo (Lindow y col., 2014).

Durante la primavera, la incidencia de la bacteria disminuyó e incluso no se encontró en ciertas etapas fenológicas. Las diferentes morfologías que presentan los órganos vegetales a medida que avanzan hacia etapas en las que sus estructuras, más abiertas y expuestas, ya no brindan protección al microorganismo podrían explicar esta disminución o ausencia. Sin embargo, posteriormente se encontraron frutos inmaduros enfermos y *X. arboricola* pv. *juglandis* estuvo presente en porcentajes superiores al 85 % del total analizado. Esta reaparición del patógeno estaría relacionada con la presencia de varias fuentes de inóculo, como yemas emergentes de nuevos brotes durante la primavera y tejidos previamente infectados (Buchner y col., 2013; Lindow y col., 2014). Diferentes autores también han especulado sobre el importante papel de la lluvia como transportador físico de las células bacterianas desde el tejido de las yemas, cuando se abren, hasta los brotes en desarrollo y

finalmente hacia las nueces (Buchner y col., 2013; Lindow y col., 2014). De hecho, durante los dos años de muestreo se detectaron precipitaciones durante los meses de primavera que podrían haber contribuido a la reaparición del patógeno en los frutos.

Como se demostró en trabajos previos (Mulrean y Schroth, 1981, 1982; Giraud y col., 2010; Lindow y col., 2014), las yemas parecen tener un papel fundamental en la epidemiología de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Además, se observó una gran variedad de tamaños poblacionales, mientras algunas yemas estaban libres de la bacteria, otras albergaron valores de UFC/yema entre los órdenes 10^2 - 10^4 . Esta distribución no homogénea de las poblaciones bacterianas estaría relacionada con la distribución particular del inóculo a lo largo del árbol, la estructura tridimensional del nogal representa un potencial para la distribución vertical y horizontal del inóculo, debido a las salpicaduras de agua de lluvia y otros mecanismos de dispersión (Lindow y col., 2014).

El polen también se ha considerado como un medio probable de diseminación de la bacteria (Ark, 1944; Giraud y col., 2010), aunque otros estudios han sugerido que no es una fuente inicial importante de inóculo (Lindow y col., 2014). Esto es consistente con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde la incidencia de *X. arboricola* pv. *juglandis* fue nula o muy baja cuando se analizaron amentos en etapas correspondientes a la emisión de polen (Fm-Fm2).

Con respecto a la ocurrencia de grupos-especies de *Alternaria*, los resultados obtenidos brindan un primer reporte de su epidemiología a través de diferentes estados fenológicos del nogal. Durante la época invernal y hasta inicios de la primavera, el hongo se encontró en la superficie e interior de los órganos de la planta en todos los estados fenológicos hasta el estado de brotación (Cf) y crecimiento e individualización de flores masculinas (Bm-Cm). A diferencia de *X. arboricola* pv. *juglandis*, *Alternaria* spp. fueron aisladas principalmente en el interior de los amentos en reposo invernal (Amg), así como también, durante la etapa de crecimiento e individualización floral (Bm-Cm). *Alternaria* spp. también se detectaron en el resto de los estados fenológicos, incluso en el estado de floración femenina (Ff1-Ff2), lo cual es consistente con la determinación de la ocurrencia natural del hongo en el extremo estigmático de frutos sanos (Temperini y col., 2017). De esta forma, el género *Alternaria* estuvo presente en la superficie de los órganos florales durante todas las etapas fenológicas analizadas, lo que se relaciona principalmente con su frecuente aislamiento como componente principal de la flora fúngica aerotransportada en ambientes rurales (Pepeljnjak y Šegvić, 2003; Kasprzyk y Worek, 2006; Oliveira y col., 2009; Temperini y col., 2019). Sin embargo, cuando se analizaron frutos dañados, el hongo se aisló en porcentajes que no superaron al 10 %, en contraste con la alta

frecuencia de aislamiento de la bacteria. Estos resultados son consistentes con los reportados por Moragrega y col. (2011), quienes también aislaron el hongo con menor frecuencia que la bacteria, proponiendo al género *Alternaria* como un oportunista saprófito de los tejidos necrosados por acción de la bacteria.

Si bien ambos microorganismos fueron hallados en diferentes estados fenológicos del nogal, el hongo se determinó con mayor frecuencia. Sin embargo, cuando se analizaron los frutos enfermos con síntomas típicos de NAM, el género *Alternaria* solo se detectó esporádicamente, mientras que la bacteria se encontró con gran frecuencia. Si bien dilucidar la etiología de NAM no fue el objetivo de este trabajo, los resultados obtenidos permiten establecer algunas consideraciones. En este aspecto, el hongo nunca fue hallado como único agente patógeno existente, sino siempre en compañía de la bacteria. Además, teniendo en cuenta que la definición de los síntomas que caracterizan a NAM implica la progresión de la necrosis desde los tejidos externos a los internos (Moragrega y Özaktan, 2010) y que los mismos pueden ser causados únicamente por *X. arboricola* pv. *juglandis*, ya que la patogenicidad de *Alternaria* spp. está restringida al exocarpo de los frutos (Temperini y col., 2017), los resultados sugieren a *X. arboricola* pv. *juglandis* como agente causal de la enfermedad y al género *Alternaria* como agente agravante de su desarrollo. A pesar de que NAM se definió como una nueva patología del nogal (Belisario y col., 2001, 2002), los resultados obtenidos respaldarían la hipótesis que la considera una manifestación diferente de la bacteriosis del nogal, en lugar de una enfermedad diferente (Moragrega y col., 2011). Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, se deben realizar pruebas adicionales de patogenicidad de los aislamientos, ya que recientemente se han aislado cepas de *X. arboricola* pv. *juglandis* no patógenas (Fernandes y col., 2018; Assis y col., 2021).

La presencia de *X. arboricola* pv. *juglandis* en frutos recién cuajados, visiblemente sanos, durante el año 2016 podría estar relacionada con las precipitaciones ocurridas durante el mes de octubre, época de floración y emergencia de tejidos nuevos y tiernos. Las precipitaciones mensuales alcanzaron un total de 59,5 mm, la temperatura media fue de 16,5 °C y la humedad relativa media de 29 %. Durante el mismo mes, en 2017, las precipitaciones totales fueron de 4,3 mm, la temperatura media fue de 16,3 °C y la humedad relativa media de 38 % (datos obtenidos a partir de la Estación Meteorológica Automática de Luis Beltrán). La primavera es la época de mayor susceptibilidad a la infección por el patógeno, valores de humedad relativa superiores al 95 %, o agua libre por precipitaciones, con temperaturas moderadas a altas, entre 16 y 29 °C, favorecen la infección por *X. arboricola* pv. *juglandis* (Nievas y col., 2014). Respecto a *Alternaria* spp. las diferencias encontradas en las frecuencias de

aislamiento durante ambos años no pueden relacionarse únicamente con los datos climáticos. Si se considera el muestreo simultáneo de los estados fenológicos Cf, Df2, Dm2 y Fm-Fm2, los valores medio de temperatura y humedad relativa registrados durante los días previos al muestreo en ambos años fueron similares, mientras que las precipitaciones fueron mayores en 2016. Sin embargo, se observaron importantes diferencias en las frecuencias de aislamiento sólo en los estadios Cf y Dm2, siendo superiores en 2017. Por lo tanto, las diferencias en las frecuencias de aislamiento de los microorganismos podrían relacionarse con una combinación de variaciones en las condiciones climáticas de la región, estrategias de control llevadas a cabo según los cambios en las condiciones climáticas y diferencias en la morfología de los órganos. Este estudio proporciona información valiosa respecto a la distribución de las poblaciones de *X. arboricola* pv. *juglandis* y grupos-especies de *Alternaria* en diferentes estados fenológicos de nogales bajo las condiciones ambientales del Valle Medio del río Negro. Los resultados obtenidos pueden contribuir a una mejor comprensión de NAM y a la mejora de las estrategias de prevención y manejo de la enfermedad considerando las previsiones meteorológicas y la fenología del nogal.

**4. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN
BACTERIANA RESPONSABLE DE LA
BACTERIOSIS Y NAM EN NOGALES DEL
VALLE MEDIO DEL RIO NEGRO**

4.1 INTRODUCCIÓN

En el proceso de caracterización de una población bacteriana resulta imprescindible poner en evidencia rasgos especiales del metabolismo bacteriano y de su fisiología, así como también, observar características macroscópicas y microscópicas de las colonias bacterianas. Los elementos básicos del proceso de caracterización incluyen morfología, fisiología, bioquímica, ecología, nutrición, biología molecular y genética. A partir de ellos se compila una serie de datos que llevan a la caracterización y clasificación.

Durante los últimos años, los brotes de enfermedades causados por *X. arboricola* pv. *juglandis*, afectando diferentes especies de nogal, han aumentado a nivel mundial. En este aspecto, se han identificado y caracterizado poblaciones del microorganismo en diferentes regiones, abarcando análisis morfológicos, fisiológicos, nutricionales, bioquímicos y genéticos. Tal es así que, en Lituania, donde el nogal no es un cultivo de importancia económica, se caracterizó la población de *X. arboricola* pv. *juglandis* aislada a partir de las especies *J. cinérea* y *J. mandshurica* (Burokiene y Pulawska, 2012). Por otra parte, en Polonia, Kalužna y col. (2014) caracterizaron a la población bacteriana responsable de la bacteriosis del nogal en *J. regia*. En Irán, uno de los principales países productores de nueces y probablemente, sitio originario del nogal (Persia), y de muchas variedades comerciales cultivadas en el mundo, se realizaron pruebas bioquímicas sobre aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* obtenidos a partir de cultivos del noroeste (Eskandari y col., 2018). Más recientemente, en Corea, donde el nogal se cultiva principalmente como planta ornamental, se ha identificado y caracterizado la población bacteriana responsable de la bacteriosis sobre *J. sinensis* (Kim y col., 2021).

Dada la importancia de la identificación y caracterización de los microorganismos patógenos ante la presencia de enfermedades en los cultivos, el objetivo en la presente sección consistió en caracterizar la población de *X. arboricola* pv. *juglandis* responsable de la bacteriosis y NAM en nogales del Valle Medio del río Negro, mediante el empleo de técnicas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la caracterización morfológica, fisiológica, bioquímica y nutricional de la población bacteriana responsable de las patologías del nogal. Los 38 aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis*, cuya identidad había sido confirmada mediante técnicas

moleculares, se cultivaron en medio AN a 27 °C durante 4 días. De acuerdo a los protocolos propuestos por Schaad (2001), se realizaron las pruebas listadas a continuación. Para cada una de ellas se presenta un breve resumen de fundamentos, procedimientos e interpretación de resultados (Pose, 2015).

Caracterización morfológica

Morfología de la colonia

- *Procedimiento:* A fin de observar la morfología de las colonias sobre los medios de cultivo de interés (LB, Xan-D) se realizan siembras por estrías. Las placas se incuban a 27 °C durante 7 días.

Tinción de Gram

- *Fundamentos:* Mediante el empleo de colorantes, la técnica clasifica a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo a la composición de la pared celular bacteriana. El primer colorante utilizado (cristal violeta) tiene afinidad por el peptidoglicano presente en la pared celular, tiñendo las células de color morado. Posteriormente, se emplea lugol, el cual induce la formación de complejos insolubles entre el colorante y el yodo, dentro de las células. A continuación, se utiliza un decolorante a base de alcohol y acetona. Las bacterias Gram negativas contienen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que forma parte de su pared celular. Las grasas son afectadas por la solución decolorante, desestabilizando la membrana externa, y en consecuencia se libera el complejo cristal violeta-yodo formado anteriormente. Luego, en un paso posterior, estas células se tiñen con el colorante de contraste (safranina), tornándose rosadas a rojas. En el caso de las bacterias Gram positivas, el decolorante actúa reduciendo la permeabilidad de la pared, impidiendo la liberación del complejo cristal violeta-yodo, así como también la fijación de la safranina, manteniéndose la coloración morada o azulada.
- *Procedimiento:* Se coloca una gota de agua sobre un portaobjetos. La muestra del microorganismo a ensayar se toma utilizando un ansa y se esparce sobre el agua, formando un film delgado. El extendido se seca al aire, o manteniendo el portaobjetos a 60 cm de la llama de un mechero. Cuando el film se seca, el portaobjetos se pasa tres veces por la llama del mechero, rápidamente. Una vez finalizado el proceso de fijación, los extendidos se colocan en la batea de coloración y se cubren con cristal violeta (Anexo 1) durante 1 minuto. Se

procede al lavado con agua, en forma paralela a la superficie del mismo. Se cubren con lugol (Anexo 1) durante 1 minuto y se enjuagan nuevamente con agua. Se procede a aplicar gota a gota el decolorante (Anexo 1), manteniendo el portaobjetos de forma inclinada para que escurra, hasta que no fluya más tintura y luego, se lavan. Finalmente, se cubren con safranina (Anexo 1) durante 45 segundos, se lavan y se dejan secar al aire. Los extendidos se observan bajo microscopio utilizando el objetivo de inmersión.

- *Interpretación del resultado:* Las bacterias Gram positivas se observan de color azul morado. En el caso de bacterias Gram negativas, se observa coloración rosada a roja.

Producción de pigmentos en agar King B (agar F)

- *Fundamentos:* El sulfato de magnesio, contenido en el medio de cultivo empleado, provee los cationes necesarios para incrementar la producción de fluoresceína.
- *Procedimiento:* Se inocula por estrías la superficie de placas de Petri conteniendo agar F (Anexo 1). Las placas se incuban a 27 °C durante 4 días. Transcurrido el periodo de incubación, se examinan bajo luz ultravioleta, a 260 nm.
- *Interpretación del resultado:* Se considera como resultado positivo la observación de fluoresceína, un pigmento de color amarillo verdoso fluorescente que rodea a la colonia, o se extiende por todo el medio de cultivo debido a fenómenos de difusión. La ausencia de fluorescencia indica un resultado negativo.

Caracterización fisiológica

Evaluación del crecimiento bacteriano sobre AN a 35 °C

- *Procedimiento:* Se inocula por estrías la superficie de placas de Petri conteniendo AN y se incuban a 35 °C durante 4-7 días.

Evaluación del crecimiento bacteriano sobre AN conteniendo 3 % de NaCl

- *Procedimiento:* Se inocula por estrías la superficie de placas de Petri conteniendo AN modificado con NaCl (3 %) y se incuban a 27 °C durante 4-7 días.

Caracterización bioquímica

Catalasa

- *Fundamentos:* La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica la presencia de la enzima.
- *Procedimiento:* Se coloca una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes sobre un portaobjeto con ayuda de una pipeta Pasteur. Se suspende la bacteria y se observa la producción de burbujas.
- *Interpretación del resultado:* La formación de burbujas indica un resultado positivo. La ausencia de burbujas, negativo.

Oxidasa

- *Fundamentos:* Los microorganismos que contienen la enzima citocromo-c-oxidasa en su cadena respiratoria, se evidencian porque en presencia de oxígeno atmosférico y citocromo c, oxidan el sustrato presente en discos de oxidasa comerciales (impregnados con oxalato de dimetil-para-fenilendiamina) a un compuesto de color rosa-fucsia.
- *Procedimiento:* Los discos de oxidasa se colocan sobre un portaobjetos y se humedecen con una gota de agua. Se deposita una colonia del microorganismo en estudio y se observa si se produce un cambio en su coloración.
- *Interpretación del resultado:* La observación de color rosado a fucsia indica resultado positivo. Si el disco permanece sin cambios de color, el resultado es negativo.

Producción de indol

- *Fundamentos:* La enzima triptofanasa hidroliza el triptófano en indol y alanina. El triptófano forma parte de las peptonas del medio de cultivo utilizado en la prueba. El indol se detecta empleando un reactivo específico (reactivo de Kovacs).
- *Procedimiento:* Se inocula un tubo conteniendo caldo triptonado (Anexo 1) con ansa de platino, transfiriendo una porción del cultivo puro a analizar. Se incuba a 27 °C durante 4 días. Transcurrido el período de incubación, se añaden 0,5 ml del reactivo de Kovacs (Anexo 1) y se agita suavemente, observando si se presenta cambio de coloración.

- *Interpretación del resultado:* La aparición de un anillo rojo sobre la superficie del medio de cultivo, indica resultado positivo. La ausencia de color tras el agregado del reactivo, indica resultado negativo.

Reducción de nitrato

- *Fundamentos:* Las bacterias pueden utilizar nitratos mediante varios procesos, como la asimilación, desasimilación y desnitrificación. La asimilación implica la reducción del nitrato a amoníaco, el cual puede ser utilizado por las células para la síntesis de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados (es decir, lo asimila como fuente de nitrógeno). La desasimilación, consiste en la utilización de nitrato como aceptor final de electrones en ausencia de oxígeno libre, reduciéndose a nitritos, que aparecen en el medio. La desnitrificación implica la utilización del nitrato hasta la formación de productos finales gaseosos como nitrógeno, óxido nitroso u óxido de nitrógeno.
- *Procedimiento:* Se inocula el microorganismo de interés con ansa de platino en caldo Nitrato (Anexo 1) y se incuba a 27 °C durante 48 horas. Se añaden 0,5 ml del reactivo para determinar nitritos (reactivo de Griess) (Anexo 1) y se observa si se produce cambio de coloración a rojo. En el caso de que no se observe coloración roja (ausencia de nitritos) se añade zinc (para reducir nitratos) y se observa si aparece color (quedaban nitratos) o permanece incoloro (no quedaban nitratos en el cultivo).
- *Interpretación de resultados:* El desarrollo de color rojo después de añadir el reactivo indica la presencia de nitritos (desasimilación), siendo un resultado positivo. La ausencia de color puede indicar que los nitratos no han sido reducidos (un verdadero resultado negativo), o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos, como amoníaco (asimilación) o gas (desnitrificación). Por lo tanto, es necesario realizar un paso de confirmación. Para ello se añade una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas. Los iones de zinc reducen los nitratos a nitritos y el desarrollo de un color rojo tras agregar polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirma la reacción negativa. Si no se observa cambio de color tras agregar el polvo de zinc, los nitratos fueron reducidos a otros compuestos como amoníaco, nitrógeno, óxido nitroso u óxido de nitrógeno, y la prueba se interpreta como positiva (asimilación o desnitrificación).

Caracterización nutricional

Hidrólisis de almidón

- *Fundamentos:* La presencia de la enzima amilasa permite utilizar el almidón como nutriente.
- *Procedimiento:* Se inocula con una estría central la superficie de placas de Petri conteniendo agar Almidón (Anexo 1) y se incuban a 27 °C durante 4 días. Transcurrido el período de incubación, las placas se inundan con lugol (Anexo 1), dejándolo actuar durante 10 minutos.
- *Interpretación del resultado:* La presencia de halos de degradación (marrones o transparentes) alrededor de las colonias indica resultado positivo. La ausencia de halos, representa un resultado negativo.

Hidrólisis de esculina

- *Fundamentos:* Se determina la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el glucósido esculina a esculetina y glucosa en presencia de bilis. La esculetina en presencia de Fe^{3+} forma complejos, produciéndose el oscurecimiento o ennegrecimiento del medio de cultivo conteniendo bilis.
- *Procedimiento:* Se inocula con una estría central la superficie de placas de Petri conteniendo agar Bilis Esculina (Anexo 1) y se incuban a 27 °C durante 4-7 días.
- *Interpretación del resultado:* El ennegrecimiento u oscurecimiento del medio indica resultado positivo. La ausencia de oscurecimiento indica resultado negativo.

Actividad lipolítica (hidrólisis de Tween 80)

- *Fundamentos:* Se evalúa la presencia de la enzima esterasa, responsable de la hidrólisis del Tween 80, produciéndose la formación de un precipitado alrededor del crecimiento bacteriano sobre el medio de cultivo específico, debido a la combinación del Ca^{2+} y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis.
- *Procedimiento:* Se inocula con una estría central la superficie de placas de Petri conteniendo agar Tween 80 (Anexo 1) y se incuban a 27 °C durante 4-7 días.
- *Interpretación del resultado:* La presencia de un halo de opacidad alrededor de las colonias, indica resultado positivo. La ausencia de halos de opacidad, resultado negativo. Los resultados se perciben mejor sobre un fondo oscuro.

Digestión de proteínas: caseína

- *Fundamentos:* La caseína es la proteína más importante de la leche y le proporciona el aspecto blanco y opaco característico, debido a que está presente en suspensión coloidal. Muchas bacterias poseen caseasa, una exoenzima capaz de hidrolizar dicha proteína, produciendo péptidos más pequeños y, por lo tanto, suspensiones más claras.
- *Procedimiento:* Se inocula con una estría central la superficie de placas de Petri conteniendo agar Leche descremada (Anexo 1) y se incuban a 27 °C durante 4-7 días.
- *Interpretación del resultado:* La presencia de zonas claras alrededor de las colonias, indica resultado positivo. La ausencia de halos, indica resultado negativo.

Digestión de proteínas: gelatina

- *Fundamentos:* La gelatina es una proteína producida por la hidrólisis del colágeno. Por debajo de los 25 °C, la gelatina se mantiene sólida. Por encima de dicha temperatura, se licúa. La licuefacción es llevada a cabo por algunos microorganismos capaces de producir gelatinasas (enzimas que hidrolizan la gelatina a aminoácidos). Una vez ocurrida esta degradación, no se restablece la solidificación aún a 4 °C.
- *Procedimiento:* Se siembran por punción tubos conteniendo agar Gelatina nutritiva (Anexo 1), a partir de un cultivo del microorganismo de interés. Se incuban a 27 °C por 4-7 días. Luego de la incubación, los cultivos se colocan en heladera durante 30 minutos.
- *Interpretación del resultado:* Si el medio permanece líquido, el resultado es positivo. Si el medio solidifica, el resultado es negativo.

Actividad ureasa

- *Fundamentos:* La enzima ureasa es responsable de la hidrólisis de la urea, liberándose dos moléculas de amoníaco que alcalinizan el medio de cultivo empleado en la prueba. Un indicador de pH vira, si la prueba es positiva.
- *Procedimiento:* Se estría la superficie del medio Christensen (agar Urea) (Anexo 1) y se incuba en aerobiosis a 27 °C durante 4-7 días.
- *Interpretación del resultado:* Si el medio de cultivo se torna color rosado-rojizo, el resultado es positivo. Cuando el resultado es negativo, el medio permanece de color amarillo.

Como control positivo se utilizó una cepa de *X. arboricola* pv. *juglandis* aislada, identificada y caracterizada durante un estudio previo realizado en la región (11XVM) (Temperini y col., 2017).

4.3 RESULTADOS

Caracterización morfológica y fisiológica

En agar LB, las colonias de *X. arboricola* pv. *juglandis* fueron amarillas, mucoides y convexas, con bordes bien definidos (Fig. 52). En medio Xan-D, las colonias amarillas mostraron un cambio de coloración hacia tonos más verdosos, al igual que el medio de cultivo (Fig. 53). En este caso, eran mucoides, convexas y circulares. Se encontraban rodeadas de una zona clara debido a la hidrólisis de la leche descremada y de una zona lechosa, debido a la lipólisis del Tween 80 (Lee y col., 2009; Temperini y col., 2017). Bajo la visualización de un microscopio de campo claro (Motic BA210), utilizando un aumento total de 1000X, las bacterias resultaron bacilos Gram negativos (Fig. 52). *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* no produjo pigmentos en Agar F, creció muy débilmente en AN a 35 °C y en AN modificado con NaCl (3 %) (Fig. 54).

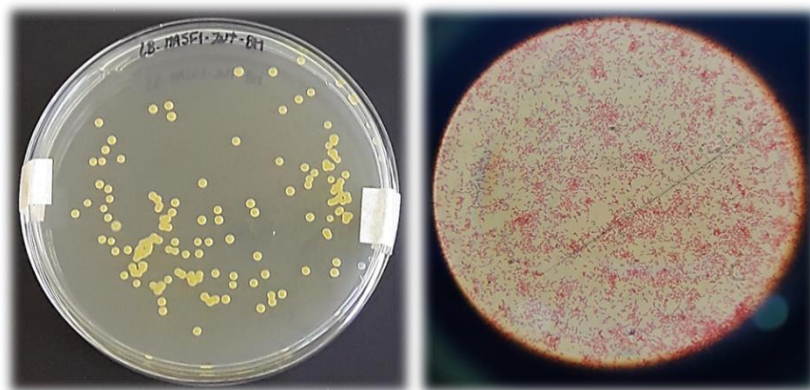


Fig. 52: Izquierda: Colonias de *X. arboricola* pv. *juglandis* en medio LB. Derecha: Resultado de la tinción de Gram

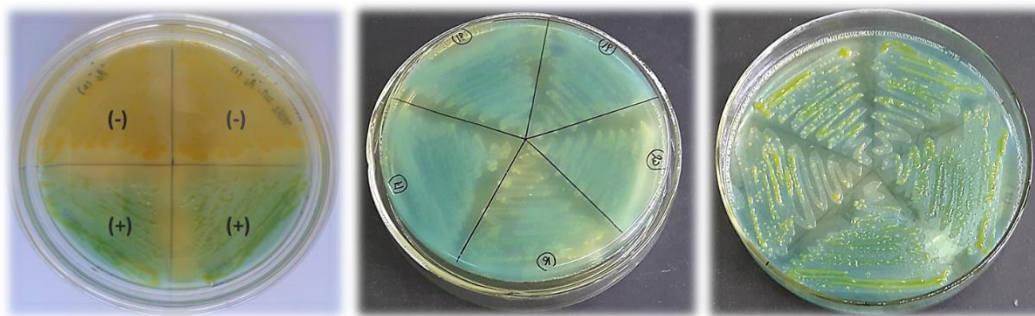


Fig. 53: Izquierda: Interpretación de resultados en medio Xan-D. Centro y derecha: *X. arboricola* pv. *juglandis* en medio Xan-D

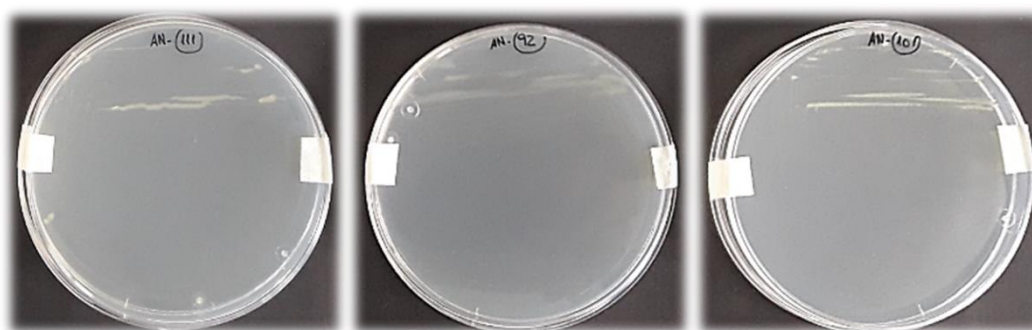


Fig. 54: Débil crecimiento de *X. arboricola* pv. *juglandis* en medio AN a 35 °C

Caracterización bioquímica

La bacteria resultó ser catalasa positiva y oxidasa negativa (Fig. 55). No se observó producción de indol, ni reducción de nitratos (Fig. 56).

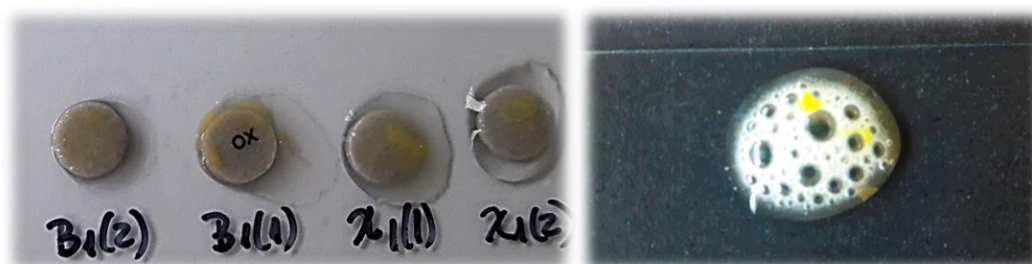


Fig. 55: Resultados de pruebas bioquímicas. Izquierda: oxidasa negativa. Derecha: catalasa positiva

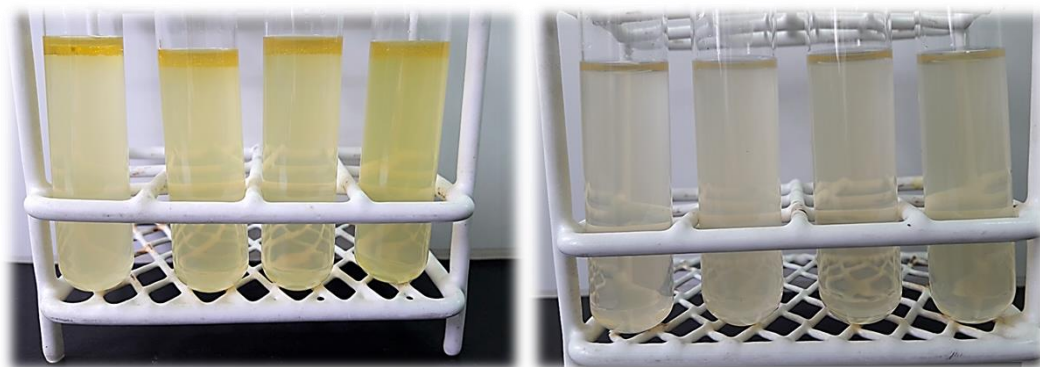


Fig. 56: Resultados negativos de pruebas bioquímicas. Izquierda: producción de indol. Derecha: reducción de nitratos

Caracterización nutricional

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* no posee actividad ureasa (Fig. 57). Posee actividad lipolítica y capacidad para hidrolizar almidón y esculina, digerir gelatina y caseína (Fig. 58).



Fig. 57: Resultados negativos de la prueba nutricional actividad ureasa

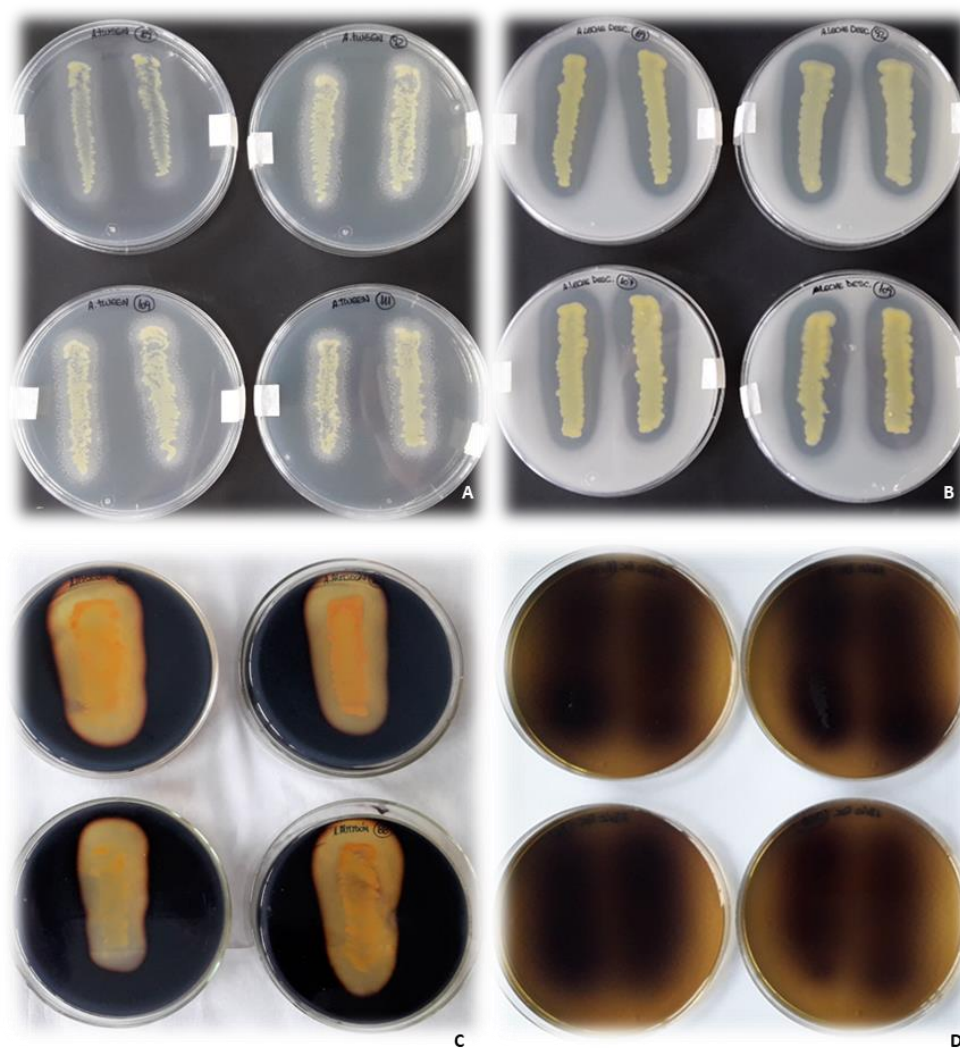


Fig. 58: Resultados positivos de pruebas nutricionales. A: hidrólisis de Tween 80, B: digestión de caseína, C: hidrólisis de almidón, D: hidrólisis de esculina

Un resumen de los resultados obtenidos a partir de los diferentes ensayos de caracterización de la población bacteriana responsable de la bacteriosis y NAM del nogal en el Valle Medio del río Negro se presenta en la tabla 14.

Caracterización de la población de <i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>		
	Pruebas	Resultados
Morfológicas	Tinción de Gram	(-)
	Producción de pigmentos en agar F	(-)
Fisiológicas	Crecimiento en AN a 35 °C	(+)
	Crecimiento en AN 3% NaCl	(+)
Bioquímicas	Catalasa	(+)
	Oxidasa	(-)
	Producción de indol	(-)
	Reducción de nitrato	(-)
Nutricionales	Hidrolisis de Tween 80	(+)
	Hidrólisis de almidón	(+)
	Hidrólisis de esculina	(+)
	Digestión de caseína	(+)
	Digestión de gelatina	(+)
	Actividad ureasa	(-)

Tabla 14: Caracterización de la población de *X. arboricola* pv. *juglandis*

4.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir de las pruebas morfológicas, fisiológicas, nutricionales y bioquímicas demostraron homogeneidad en la población bacteriana obtenida durante diferentes estados fenológicos del nogal, los cuales fueron coincidentes con los observados en trabajos previos (Kalužna y col., 2014; Temperini y col., 2017; Eskandari y col., 2018; Kim y col., 2021). Sin embargo, a diferencia de lo reportado por Burokiene y Pulawska (2012), la población bacteriana resultó ser catalasa positiva, coincidiendo con lo especificado en la definición del género *Xanthomonas* (Vauterin y col., 1995) y con lo reportado anteriormente para *X. arboricola* pv. *juglandis* (Temperini y col., 2017; Eskandari y col., 2018).

Es importante destacar que, si bien se han descripto pruebas bioquímicas y rasgos fenotípicos que contribuyen a diferenciar *Xanthomonas* de otras bacterias fitopatógenas, y especies dentro del mismo género, no se dispone de información sobre pruebas bioquímicas específicas que permitan distinguir entre patovares dentro de la especie *X. arboricola* (Schaad y col., 2001; Moragrega, 2012). La combinación de las pruebas llevadas a cabo en esta sección, junto a las técnicas moleculares de PCR para la amplificación del gen *qumA* (quinato deshidrogenasa), así como también

la amplificación del ADN utilizando *primers* específicos para el patovar *juglandis*, XAJ1 y XAJ6 (Fernandes y col., 2017), permitieron identificar y caracterizar a la población bacteriana responsable de la bacteriosis y NAM en nogales del Valle Medio del río Negro.

**5. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE
CULTIVARES COMERCIALES DE NOGAL A LA
INFECCIÓN POR LOS MICROORGANISMOS
PATÓGENOS**

5.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de cepas de *X. arboricola* pv. *juglandis* resistentes al cobre (Lee y col., 1993; Behlau y col., 2013) ha generado una continua reducción en la eficacia de los productos cúpricos utilizados para el control de la bacteriosis y NAM. Además, el uso intensivo de los bactericidas de cobre puede afectar el rendimiento de los árboles como resultado de su fitotoxicidad y tener efectos no deseados en el suelo. Numerosas aplicaciones en establecimientos comerciales produjeron la acumulación de cobre en los suelos, con el consiguiente impacto ambiental negativo (Radix y col., 1998; Ninot y col., 2002). Ante esta situación, surge la necesidad de emplear alternativas de control y prevención, donde el uso de cultivares con baja susceptibilidad al ataque del patógeno podría ser una valiosa herramienta.

Ningún genotipo de nogal ha demostrado resistencia total a la bacteriosis, pero algunos de ellos, especialmente los de brotación temprana han sido atacados con mayor intensidad debido a las lluvias primaverales (Arnaudov y col., 2014). Los cultivares de brotación más tardía, evaden al periodo de inoculación temprana crítica, donde las lluvias abundantes crean condiciones que favorecen el desarrollo y la dispersión de la enfermedad (Flores y col., 2004). En cuanto al tipo de fructificación, las variedades de carga lateral (Chandler, Tulare, entre otras) presentarían mayor susceptibilidad, que las de carga terminal (Franquette, Mayette, por ejemplo) (Gardan y col., 1986, citado en Arnaudov y col., 2014). Asimismo, se demostró que el nivel de susceptibilidad a la bacteriosis del nogal no solo depende del genotipo, sino también del órgano del árbol considerado (hojas, frutos inmaduros, frutos desarrollados) (Aletà y col., 2001).

Respecto a NAM, se ha reportado que la mayoría de los cultivares comerciales como Chandler, Hartley, Serr, Lara y Vina son muy susceptibles, a diferencia de otros como Franquette, que parecen sufrir menor daño (Aletà y Ninot, 2002; Moragrega y col., 2008, citados en Moragrega y Özaktan, 2010).

En general, uno de los principales objetivos de las actividades de mejora genética ha sido el desarrollo de cultivares resistentes a las patologías. Sin embargo, la resistencia de los cultivares mejorados genéticamente es cuestionable cuando se introducen en tierras distantes al área en el cual se desarrolló la mejora. Un importante factor que interviene en este hecho, es la variabilidad genética que presentan muchas especies bacterianas. En consecuencia, un programa de mejoramiento debería tener en cuenta la virulencia potencial, diferente o similar, de un determinado patógeno según el área geográfica (Bandi y col., 2014). Respecto a *X. arboricola* pv. *juglandis*, se ha reportado la existencia de una importante diversidad genética entre cepas de diferentes orígenes

geográficos (Scortichini y col., 2001; Burokiene y Pulawska, 2012; Kaluzna y col., 2014).

Teniendo en cuenta que los cultivares de nogal pueden diferir en la susceptibilidad al patógeno bacteriano según el área (Bandi y col., 2014), el objetivo en el presente capítulo ha sido estudiar el comportamiento de tres importantes cultivares comerciales implantados en la zona del Valle Medio del río Negro (Chandler, Tulare y Franquette) respecto a la infección causada por *X. arboricola* pv. *juglandis* y *A. tenuissima* sobre sus frutos inmaduros. Estudiar sus comportamientos permitirá evaluar el riesgo de enfermedad y ofrecer información a los productores respecto a su elección.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el comportamiento de los cultivares Chandler, Tulare y Franquette respecto a la infección causada por *X. arboricola* pv. *juglandis* y *A. tenuissima* de manera individual, y por combinación de ambos microorganismos. Frutos sanos e inmaduros fueron recolectados tras transcurrir, aproximadamente, 40 días después del cuaje de cada cultivar. Las pruebas fueron realizadas utilizando un aislamiento bacteriano y uno fúngico, cuya patogenicidad *in vitro* fue confirmada previamente (Temperini y col., 2017). Los frutos recolectados fueron lavados y cepillados bajo agua del grifo, se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos en una solución de NaOCl al 1 % durante 5 minutos, y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril (Fig. 59).



Fig. 59: Proceso de desinfección superficial de los frutos sanos e inmaduros

Posteriormente, se procedió a inocular los frutos de la siguiente manera:

Inoculación con X. arboricola pv. juglandis: Para evaluar la respuesta de los distintos cultivares respecto al daño producido por la bacteria se utilizaron colonias crecidas por 4 días en medio AN. Los frutos desinfectados fueron heridos dos veces en la zona ecuatorial y una vez en el extremo estigmático a escasa profundidad, utilizando una aguja estéril, que luego se introdujo impregnada con el cultivo bacteriano.

Inoculación con A. tenuissima: Respecto al hongo, círculos de 5 mm de diámetro fueron extraídos del margen de colonias crecidas por 7 días en agar PDA, utilizando un sacabocados estéril. Los discos se colocaron, con el micelio hacia abajo, sobre la superficie de los frutos desinfectados, uno sobre la zona ecuatorial y otro sobre el extremo estigmático.

Inoculación con ambos microorganismos: En este caso se inoculó en primer lugar la bacteria, de la forma descripta anteriormente, y luego se colocó el círculo de la colonia fúngica sobre la herida anterior.

Los frutos inoculados se colocaron individualmente en frascos de vidrio conteniendo un trozo de algodón impregnado con agua destilada estéril, a fin de generar condiciones de cámara húmeda (Fig. 60) y se incubaron a 25 °C durante 15 días (Temperini y col., 2017). Cada prueba se realizó sobre 7 frutos de cada variedad, inoculando un total de 63 nueces. Los controles negativos fueron inoculados con agua destilada estéril.



Fig. 60: Frutos inoculados listos para incubar

Los diámetros de las lesiones fueron medidos a los 7 y a los 15 días de incubación, tomando dos medidas en cada caso. A partir de estos datos se calcularon los rangos de lesión producidos por cada microorganismo, y por su combinación. A los 15 días,

se realizó el corte de los frutos para evaluar el progreso de las lesiones hacia el interior. Para ello, se emplearon los siguientes índices de infección: 1- necrosis afectando al exocarpo, 2- necrosis afectando al mesocarpo, 3- necrosis afectando al endocarpo, 4- necrosis afectando la semilla (Aletà y col., 2001, Temperini y col., 2017). Finalmente, a fin de cumplir con los postulados de Koch y comprobar la patogenicidad de las cepas, trozos internos de las lesiones fueron procesados con el objetivo de reaislar los microorganismos en los medios LB y PDA.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el software Statgraphics Centurion 19. Se realizaron análisis de varianza empleando Modelos Lineales Generalizados (GLM) y se aplicaron pruebas de comparaciones múltiples, trabajando con un nivel de confianza del 95 % (α : 0,05).

5.3 RESULTADOS

Todos los frutos inoculados indujeron síntomas externos típicos de bacteriosis y NAM en comparación con los controles negativos y los microorganismos se reaislaron a partir del tejido infectado, siguiendo los postulados de Koch. Los controles negativos no manifestaron ningún tipo de síntomas sobre los frutos sanos.

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* produjo lesiones de color marrón a negro, de aspecto húmedo y bordes regulares. *Alternaria tenuissima* provocó lesiones de mayor extensión que la bacteria, de similar coloración, pero de aspecto seco y con bordes más irregulares (Fig. 61). Las lesiones causadas por la combinación de ambos microorganismos fueron similares a las producidas por el hongo.

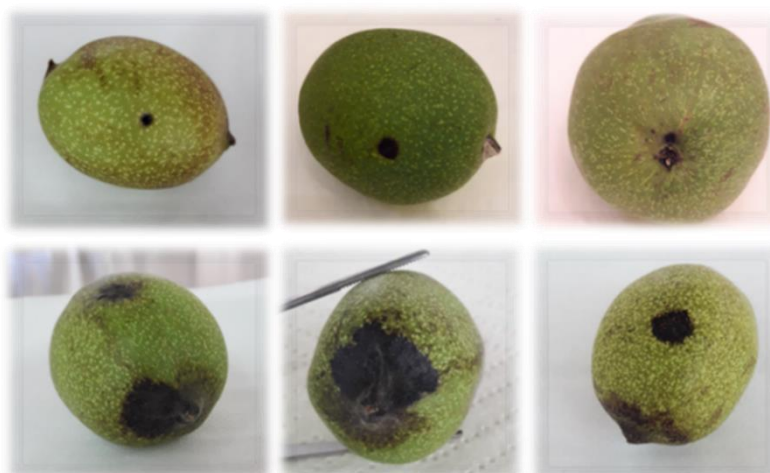


Fig. 61: Superior: lesiones causadas por *X. arboricola* pv. *juglandis* sobre frutos inmaduros.
Inferior: lesiones causadas por *A. tenuissima* sobre frutos inmaduros

En cuanto a la infección causada por la bacteria, las lesiones producidas sobre el extremo estigmático de los frutos inmaduros oscilaron entre 0,00-2,50; 1,25-1,75; 1,25-2,00 mm (7 días) y 1,25-2,75; 1,75-4,00; 1,25-2,25 mm (15 días) para los cultivares Tulare, Chandler y Franquette, respectivamente (Fig. 62, para más detalles consultar Anexo 5). En el caso de la zona ecuatorial, los valores oscilaron entre 0,00-3,00; 2,00-2,75; 1,50-3,25 mm (7 días) y 2,00-4,25; 2,25-8,50; 1,50-4,00 mm (15 días), en el orden de cultivares mencionado previamente (Fig. 63, para más detalles consultar Anexo 5). Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los rangos de lesión producidos sobre el extremo estigmático, al analizar la zona ecuatorial, transcurridos 15 días de incubación, Chandler presentó lesiones de mayor extensión (Fig. 63). Tras realizar el corte de los frutos, en todos los cultivares se observó necrosis extendiéndose a través del mesocarpo (índice 2).

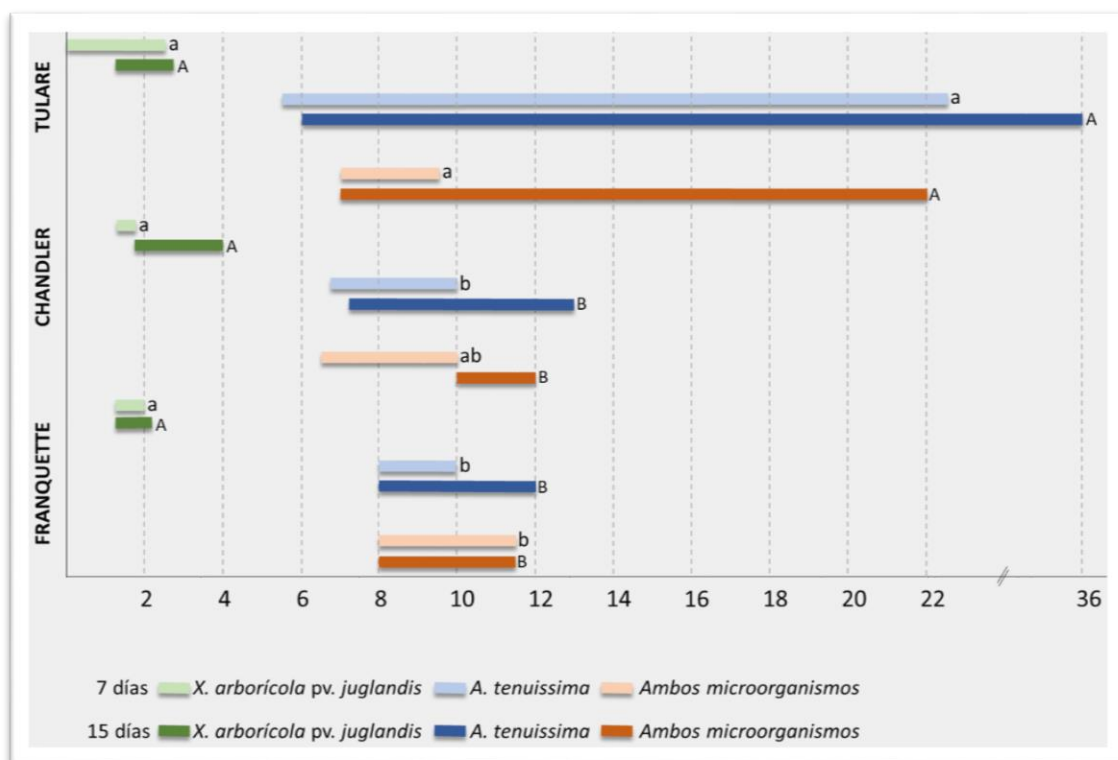


Fig. 62: Rangos de lesión (mm) producidos por los microorganismos sobre el extremo estigmático de frutos inmaduros de diferentes cultivares de nogal. Para un determinado microorganismo (o su combinación), letras minúsculas similares no representan diferencias significativas transcurridos 7 días de incubación. Letras mayúsculas similares, no representan diferencias significativas transcurridos 15 días de incubación (método: LSD de Fisher, α : 0,05)

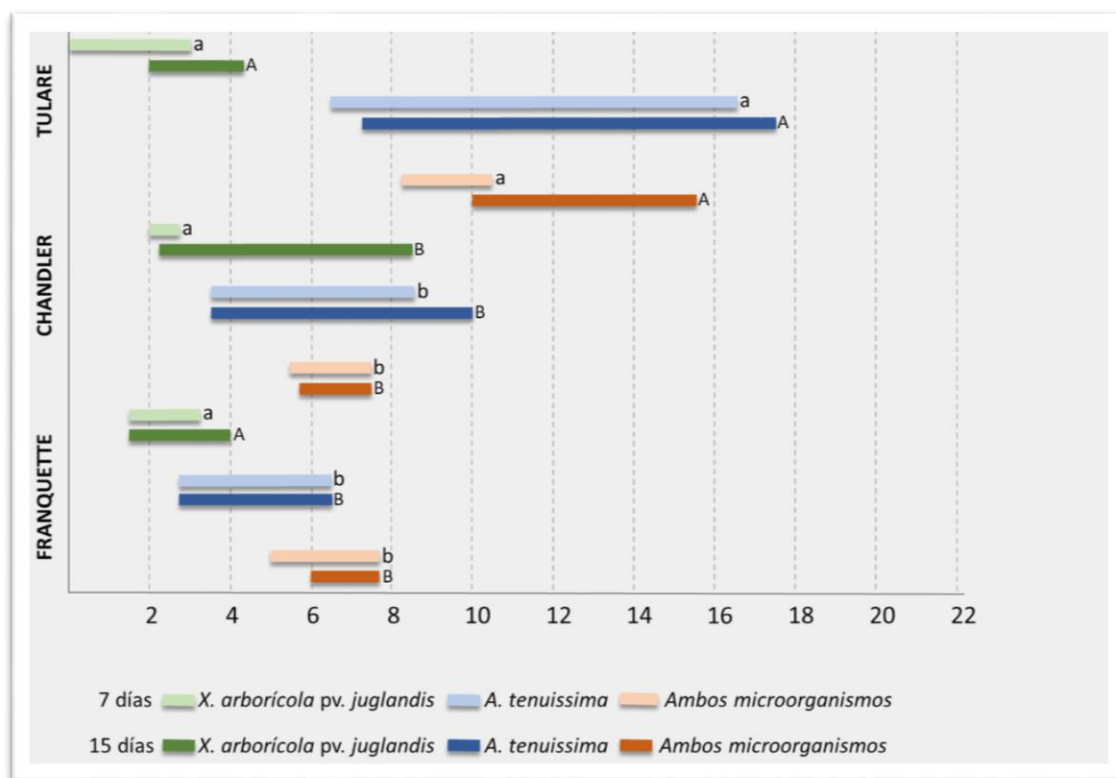


Fig. 63: Rangos de lesión (mm) producidos por los microorganismos sobre la zona ecuatorial de frutos inmaduros de diferentes cultivares de nogal. Para un determinado microorganismo (o su combinación), letras minúsculas similares no representan diferencias significativas transcurridos 7 días de incubación. Letras mayúsculas similares, no representan diferencias significativas transcurridos 15 días de incubación (método: LSD de Fisher, α : 0,05)

Alternaria tenuissima produjo lesiones de mayor extensión superficial sobre los frutos, en comparación con la bacteria. Los diámetros de lesión sobre el extremo estigmático oscilaron entre 5,50-22,5; 6,75-10,0; 8,00-10,0 mm (7 días) y 6,00-36,0; 7,25-13,0; 8,00-12,0 mm (15 días), para los cultivares Tulare, Chandler y Franquette, respectivamente (Fig. 62, para más detalles consultar Anexo 5). En el caso de la zona ecuatorial, los valores oscilaron entre 6,50-16,5; 3,50-8,50; 2,75-6,50 mm (7 días) y 7,25-17,5; 3,50-10,0; 2,75-6,50 mm (15 días), en el orden de cultivares mencionado (Fig. 63, para más detalles consultar Anexo 5). De esta manera, Tulare se comportó como el cultivar más sensible, sin existir diferencias significativas entre Chandler y Franquette (Figs. 62 y 63). En este caso, las infecciones observadas estuvieron siempre limitadas a la superficie de los frutos (índice 1).

Respecto a la combinación de ambos microorganismos, los diámetros de lesión sobre el extremo estigmático oscilaron entre 7,00-9,50; 6,50-10,0; 8,00-11,5 mm (7 días) y 7,00-22,0; 10,0-12,0; 8,0-11,5 mm (15 días) para los cultivares Tulare, Chandler y Franquette, respectivamente (Fig. 62, para más detalles consultar Anexo 5). En el caso de la zona ecuatorial, los valores oscilaron entre 8,25-10,50; 5,50-7,50; 5,00-7,75

mm (7 días) y 10,0-15,5; 5,75-7,50; 6,00-7,75 mm (15 días), en el orden de cultivares mencionado previamente (Fig. 63, para más detalles consultar Anexo 5). De esta manera, transcurridos 15 días de incubación, Tulare continuó siendo el cultivar más sensible (Figs. 62 y 63). Tras realizar el corte de los frutos, en la mayoría de los casos se observó necrosis afectando el mesocarpo (índice 2), a excepción de un fruto correspondiente al cultivar Chandler que presentó necrosis alcanzando la semilla en la infección correspondiente al extremo estigmático (índice 4), y un fruto del cultivar Tulare, en el que la necrosis de la zona ecuatorial afectó al endocarpo (índice 3). A modo de resumen, en la tabla 15 se presentan algunas de las lesiones exteriores producidas sobre los frutos de los distintos cultivares evaluados. Los diferentes índices de infección se presentan en la figura 64.

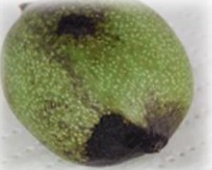
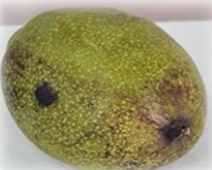
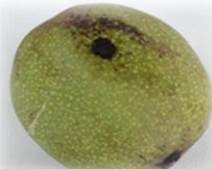
	TULARE	CHANDLER	FRANQUETTE
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>			
<i>A. tenuissima</i>			
Ambos microorganismos			

Tabla 15: Lesiones exteriores producidas por *X. arboricola* pv. *juglandis* y *A. tenuissima* sobre frutos inmaduros de nogal

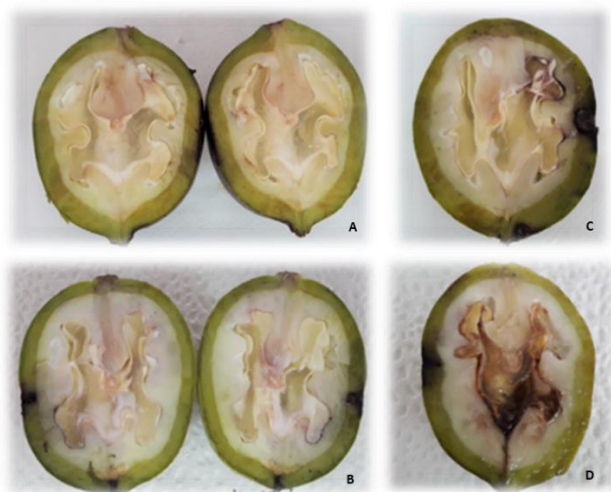


Fig. 64: Diferentes índices de infección: A: índice 1, B: índice 2, C: índice 3 (ecuatorial), D: índice 4 (extremo estigmático)

5.4 DISCUSIÓN

El presente estudio permitió observar la respuesta de tres cultivares de importancia comercial implantados en la región del Valle Medio del río Negro frente a los microorganismos involucrados en las patologías del nogal. A partir de los resultados obtenidos, Chandler se comportó como el cultivar más sensible tras inocular los frutos con *X. arboricola* pv. *juglandis*. Esto resulta coincidente con lo observado por Aletà y col. (2001), en un estudio realizado en España, quienes calificaron a este cultivar como altamente susceptible respecto a la infección en nueces inmaduras. Cuando los frutos fueron inoculados con *A. tenuissima* y con la combinación de ambos microorganismos, los correspondientes al cultivar Tulare, presentaron lesiones de mayor diámetro.

La menor susceptibilidad del cultivar Franquette frente a *X. arboricola* pv. *juglandis* observada en este estudio, también fue reportada en un estudio previo realizado en Grecia (Vagelas y col., 2012). Sin embargo, Aletà y col. (2001) informaron que nueces inmaduras de este cultivar fueron muy susceptibles al ataque bacteriano. Resultados variables pueden ser obtenidos cuando las inoculaciones artificiales son utilizadas para evaluar la resistencia de diferentes genotipos de nogal frente a *X. arboricola* pv. *juglandis* (Vagelas y col., 2012). Además, los cultivares podrían diferir en la susceptibilidad al patógeno bacteriano según el área geográfica (Bandi y col., 2014) dada la existencia de una importante diversidad genética entre cepas de diferentes orígenes geográficos (Scortichini y col., 2001; Burokiene y Pulawska, 2012; Kalužna y

col., 2014). Esta variabilidad podría influir en la virulencia potencial de las cepas de *X. arboricola* pv. *juglandis* según el área geográfica considerada (Bandi y col., 2014).

Resultados acordes a los obtenidos fueron reportados en el Valle Inferior del río Negro, donde Franquette presentó mejor sanidad que Chandler, tras evaluar la intensidad e incidencia de la bacteriosis del nogal sobre los cultivares (Chorolque y col., 2020).

Por otra parte, la inoculación artificial de los frutos brinda información sobre la capacidad fitopatógena de los microorganismos. Tanto la bacteria, como el hongo fueron capaces de provocar lesiones sobre los frutos inmaduros, a diferencia de lo observado en un estudio conducido por Moragrega (2011), donde los aislamientos de *Alternaria* spp. ensayados no fueron patogénicos sobre frutos inmaduros de nogal.

Alternaria tenuissima causó parches necróticos externos de mayor extensión que las lesiones causadas por la bacteria. Sin embargo, las lesiones producidas por el hongo no progresaron hacia el interior de los frutos. La combinación de ambos microorganismos generó lesiones más extensas que las producidas por *X. arboricola* pv. *juglandis* y progresaron hacia el interior alcanzando mayores profundidades. Resultados similares fueron observados en un estudio realizado en la región, donde tras evaluar la patogenicidad de ambos microorganismos sobre nueces inmaduras, las lesiones provocadas por el hongo estuvieron restringidas al exocarpo (Temperini y col., 2017).

En conclusión, los frutos de los cultivares Chandler y Tulare fueron más afectados respecto al ataque de *X. arboricola* pv. *juglandis* y *A. tenuissima* que los correspondientes a Franquette. Si bien los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* no pueden extrapolarse directamente a campo, ya que las infecciones naturales dependen de muchos factores abióticos (Vagelas y col., 2012), pueden interpretarse como el potencial que poseen los frutos inmaduros de un determinado cultivar a ser dañados por *X. arboricola* pv. *juglandis* y *A. tenuissima* en condiciones favorables para la enfermedad, contribuyendo al diseño de estrategias de prevención capaces de controlar la infección por los microorganismos patógenos.

**6. DETERMINACIÓN FENOTÍPICA Y
GENOTÍPICA DE LA SENSIBILIDAD AL COBRE
DE AISLAMIENTOS DE *X. arboricola* pv.
*juglandis***

6.1 INTRODUCCIÓN

Durante muchas décadas, los bactericidas a base de cobre se han utilizado para el control de enfermedades bacterianas que afectan a una amplia gama de cultivos, entre ellos el nogal. Estos productos actúan por contacto y las aplicaciones deben realizarse de forma preventiva, atentos a la presencia de condiciones predisponentes para el ingreso del patógeno. Sin embargo, un problema generalizado que surge con la aplicación frecuente de este tipo de compuestos es el desarrollo de cepas patógenas resistentes al cobre y, por ende, la reducción en el control de la enfermedad (Behlau y col., 2013). Cepas de *X. arboricola* pv. *juglandis* resistentes al cobre han sido aisladas en nogales de Estados Unidos (Lee y col., 1993), Francia (Gardan y col., 1993), Italia (Giovanardi y col., 2016), Chile (Esterio y col., 2006; Moya Elizondo y col., 2018), Corea (Kim y col., 2021), entre otros.

La caracterización de los determinantes de la resistencia al cobre en varias especies de *Xanthomonas* reveló que la misma se debe, principalmente, a la presencia del grupo de genes *copLAB* (Behlau y col., 2011, 2013) o *copABCD* (Lee y col., 1994). Dentro del grupo *copLAB*, *copL* regula la expresión de *copA* y *copB*, que codifican proteínas de unión al cobre (Behlau y col., 2012, 2013, 2020). El secuestro y la acumulación del metal, es el principal mecanismo de resistencia en *Xanthomonas* spp. (Cooksey, 1990). Los genes *copLAB* se encuentran en plásmidos y la transferencia horizontal, mediante conjugación, es el mecanismo principal por el cual las bacterias adquieren la resistencia. De hecho, los genes de resistencia al cobre se conservan entre las especies y pueden transferirse horizontalmente hacia cepas sensibles de otras especies (Behlau y col., 2012, 2020).

En el caso del grupo *copABCD*, el proceso de desintoxicación es similar al conferido por *copLAB*. Los genes *copA* y *copC*, codifican proteínas periplasmáticas que se unen a los iones cobre y son responsables de una resistencia parcial mientras que, *copB* y *copD* codifican proteínas de membrana externa e interna, respectivamente, siendo responsables de una resistencia completa (Cooksey, 1993). Aunque, en la mayoría de los casos, los genes de resistencia al cobre en *Xanthomonas* spp. se encuentran en plásmidos (Behlau y col., 2012), los genes *copABCD* descritos por Lee y col. (1994) en *X. arboricola* pv. *juglandis* se ubican en el cromosoma.

Por otra parte, en el cromosoma de *Xanthomonas* spp. se encuentra el grupo de genes homólogos a *copLAB*, los genes *cohLAB*, que no son responsables de la resistencia al cobre, pero intervienen en la homeostasis o tolerancia del mismo. El proceso de homeostasis está presente en todas las bacterias y es responsable de mantener en equilibrio los niveles esenciales de cobre en el ambiente intracelular

mientras que, la resistencia protege a la célula de los efectos tóxicos causados por concentraciones excesivas de cobre (Cooksey, 1993; Argüello y col., 2013; Behlau y col., 2020). La similitud entre ambos grupos de genes ha llevado a caracterizar erróneamente los genes *coh* como genes *cop*. Este hecho puede tener serias implicancias para el control de patologías causadas por *Xanthomonas* spp. que dependen de aplicaciones regulares de cobre (Marin y col., 2019).

Generalmente, la sensibilidad al cobre se ha clasificado de forma binaria, considerando cepas resistentes o sensibles. Sin embargo, un estudio reciente describió cepas de *X. citri* subsp. *citri* tolerantes al cobre (Marin y col., 2019). La resistencia y la tolerancia al cobre son fenotipos diferentes y no deberían utilizarse como sinónimos. Las cepas tolerantes difieren de las cepas resistentes por la falta de los genes de resistencia y los plásmidos que los portan. Además, se diferencian de las cepas sensibles por la mayor expresión de los genes cromosómicos homólogos, principalmente *cohA* y *cohB*, en presencia de cobre. Las cepas de *X. citri* subsp. *citri* tolerantes al cobre no representaron una amenaza para el control de la patología sobre cítricos (Marin y col., 2019).

Teniendo en cuenta que en el Valle Medio del río Negro los productos cúpricos constituyen la base del control en las patologías bacterianas del nogal, el objetivo consistió en determinar la sensibilidad al cobre de la población de *X. arboricola* pv. *juglandis* responsable de la bacteriosis y NAM del nogal mediante análisis fenotípicos y genotípicos.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Determinación fenotípica

Se evaluó la sensibilidad al cobre de 39 cepas de *X. arboricola* pv. *juglandis* observando el crecimiento bacteriano en medio CYEG (Anexo 1) modificado con diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 0; 0,2; 0,5; 1 y 2 mM (Pernezny y col., 2008; Griffin y col., 2018; Roach y col., 2020).

Consideraciones sobre el medio de cultivo utilizado

La determinación *in vitro* de la sensibilidad al cobre en bacterias implica la evaluación del crecimiento bacteriano sobre un medio de cultivo modificado con varias concentraciones de cobre. Normalmente, se utiliza $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dado que los iones

sulfato no tienen efecto sobre el crecimiento bacteriano (Zevenhuizen y col., 1979; Griffin y col., 2018).

Al momento de seleccionar un medio de cultivo, se debe tener en cuenta que los ingredientes pueden influir en su capacidad para formar complejos con el cobre, lo que modifica la disponibilidad de iones de cobre libres para interactuar con las bacterias. Estos iones libres son absorbidos y metabolizados. Si no están disponibles, las bacterias crecen y la sensibilidad no se determina de manera confiable (Zevenhuizen y col., 1979; Hasman y col., 2009; Griffin y col., 2018). Si bien los medios AN, PDA y CYEG son adecuados para realizar pruebas de sensibilidad al cobre, Griffin y col. (2018) recomiendan especialmente el uso de CYEG, dada su baja capacidad de formar complejos con los iones libres.

Por otra parte, el pH del medio también puede afectar significativamente los resultados del ensayo de sensibilidad. Un valor fuera del rango óptimo específico de cada especie, afectaría su crecimiento. Además, a medida que el pH varía, la disponibilidad de iones de cobre libres en el medio modificado también puede cambiar (Zevenhuizen y col., 1979; Hasman y col., 2009; Griffin y col., 2018).

En la preparación del medio de cultivo modificado con cobre, la adición de sulfato de cobre, incluso a bajas concentraciones, reduce el pH del medio debido a la ionización en solución y la consecuente formación de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Por lo tanto, después de su adición resulta necesario medir y ajustar el pH a fin de garantizar un valor dentro del rango requerido por el patógeno (Griffin y col., 2018).

Mixon (2012) utilizó tampón de ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES) como estabilizador del pH para las pruebas de sensibilidad *in vitro*. El MES no forma complejos con los iones de cobre (Mash y col., 2003). Además, se informó que no afecta la capacidad de las bacterias para crecer en los medios AN, PDA y CYEG modificados con cobre (Griffin y col., 2018). De esta manera, la adición de MES al medio de cultivo, reduce el tiempo necesario para su preparación, ya que no se requiere del ajuste adicional de pH después de la adición del sulfato de cobre. Se puede hacer un único ajuste luego de mezclar los ingredientes en agua y antes de esterilizarlos en autoclave. La adición de MES se realiza luego de la esterilización, y antes de agregar sulfato de cobre a fin de evitar la formación de precipitados (Griffin y col., 2018).

Preparación del medio CYEG suplementado con cobre

El medio CYEG modificado con cobre se preparó de acuerdo a métodos publicados (Pernezny y col., 2008; Griffin y col., 2018; Roach y col., 2020), ligeramente

modificado. En este caso, se utilizó tripteína bacteriológica en reemplazo de la casitona (Casitone, Bacto), utilizada originalmente. Esta última es un hidrolizado pancreático de origen animal, similar al hidrolizado de caseína DIFCO, pero de alto contenido de aminoácidos, haciéndolo más nutritivo (ThermoFisher, catálogo: 225930). La tripteína utilizada es un hidrolizado pancreático de caseína, de alto contenido de aminoácidos (Britania, ficha técnica).

Los ingredientes se mezclaron teniendo en cuenta las proporciones detalladas a continuación, y se disolvieron utilizando un agitador magnético con calefacción:

Tripteína bacteriológica	1,70 g
Extracto de levadura	0,35 g
Glucosa	5,00 g
Agar	17,0 g
Agua destilada	1,00 L

La glucosa suele sustituir al glicerol en la receta original de CYEG dado que *Xanthomonas* generalmente no crece bien si el glicerol es la principal fuente de carbono (Pernezny y col., 2008).

Luego de mezclar los ingredientes, el pH del medio se ajustó a 7, utilizando una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N. Las mediciones se realizaron utilizando un pH-metro digital de mesa (Adwa, AD1030). El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a 55 °C aproximadamente, utilizando un baño térmico para mantener la temperatura. Luego, se adicionó buffer MES 1 M (pH 6,9) (Anexo 1) esterilizado por filtración hasta alcanzar una concentración final de 20 mM. Posteriormente, se adicionaron las cantidades adecuadas de una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,64 M) (Anexo 1) esterilizada por filtración a fin de obtener las concentraciones finales de interés (0; 0,2; 0,5; 1 y 2 mM). El medio se distribuyó en placas de Petri de 90 mm de diámetro y se utilizó al día siguiente de su preparación. A continuación, se detallan las cantidades de buffer MES 1 M y de solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,64 M) necesarias para preparar 200 ml de medio CYEG modificado:

Concentración final CuSO ₄ ·5H ₂ O	Medio CYEG	Buffer MES 1 M	Solución CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,64 M
0,0 mM	200 ml	4 ml	
0,2 mM	200 ml	4 ml	62,5 µl
0,5 mM	200 ml	4 ml	156,3 µl
1,0 mM	200 ml	4 ml	312,5 µl
2,0 mM	200 ml	4 ml	625,0 µl

Tabla 16: Preparación del medio CYEG modificado con cobre

Preparación del inóculo

Los aislamientos a ensayar se cultivaron en agar Nutritivo modificado con glucosa (0,5 % p/v) (ANG) (Anexo 1) a 25 °C durante 48 horas (Griffin y col., 2018). A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones bacterianas. Las colonias fueron suspendidas en agua destilada estéril hasta alcanzar una absorbancia $A(600\text{ nm}) = 0,2$, a fin de obtener una concentración aproximada entre 1×10^8 UFC/ml y 5×10^8 UFC/ml (Moragrega, 2012). Se realizaron dos repeticiones del ensayo.

Inoculación e incubación

Las placas conteniendo medio CYEG modificado con las diferentes concentraciones de cobre fueron sembradas con 10 µl de suspensión bacteriana e incubadas a 25 °C durante 48 horas (Roach y col., 2020).

Las placas que no presentaron crecimiento fueron incubadas por un periodo adicional de 48 horas (96 horas en total) y, en caso de detectarse crecimiento, se observaron nuevamente a los 7 días de incubación (Ramos y Rosato, 1996; Moya Elizondo y col., 2018).

Sensibilidad-resistencia al cobre

La sensibilidad-resistencia al cobre fue determinada tras observar crecimiento sobre el medio de cultivo modificado transcurridas 48 horas de incubación, según lo establecido por Roach y col. (2020), determinado a partir de dos cepas control de *Pseudomonas syringae*, previamente clasificadas una como sensible y otra como resistente. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) fueron de 0,2 mM y 2 mM de CuSO₄·5H₂O, respectivamente.

Para cada concentración ensayada, el crecimiento bacteriano se clasificó con un criterio similar al establecido por Behlau y col. (2013). En este caso, se consideró

crecimiento confluyente (+), cuando fue uniforme y completo; débil ($\pm$), tras observar colonias aisladas; o negativo (-), sin crecimiento.

6.2.2 Determinación genotípica

Se evaluó la presencia del grupo de genes *copLAB* sobre 10 aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis*, seleccionados según los resultados obtenidos en el ensayo fenotípico. Se evaluaron 7 aislamientos que crecieron hasta la concentración 0,2 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3 con crecimiento débil, 4 con crecimiento confluyente) y 3 que crecieron hasta la concentración 0,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Las extracciones de ADN se realizaron utilizando el kit “DNeasy blood and tissue mini kit” (Qiagen) con un protocolo de pretratamiento para bacterias Gram negativas, siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN genómico extraído se cuantificó utilizando un fluorómetro Qubit 2.0 (Life Technologies).

La amplificación de los genes *copL*, *copA* y *copB* se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de PCR propuesto por Behlau y col. (2013), con modificaciones, utilizando los *primers* específicos *copLF* (CCGTGTCAGCCTCCTCACTTCTAC), *copLR* (CAGCGGCATGACATCCAGGCC), *copAF* (CCTCCATGGCACGGACACTTCC ATC), *copAR* (CCAGACATATCCATCGACCCATGATCCA), *copBF* (CTCAGGATCAC TCTGCACATCAG) y *copBR* (GCACGTAGCTCTTAATCGAGTTGTC).

Las reacciones contenían un volumen total de 20 μl con 25 ng de ADN molde, buffer de PCR 1X, 0,5 μM de cada primer (Genbiotech SRL, Argentina), 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl_2 , DMSO al 1 % y 1 unidad de *Taq* Polimerasa (Genbiotech SRL, Argentina). Los tubos de reacción se colocaron en un Termociclador Multigene (Labnet International Cycler) con las siguientes condiciones de reacción: paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 52 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 45 segundos, con un paso final de extensión a 72 °C por 10 minutos. Las amplificaciones se visualizaron bajo luz ultravioleta, luego de correr 10 μl de cada reacción en gel de agarosa al 1 % utilizando Gel Red.

Como control positivo se empleó una cepa de *X. campestris* pv. *vesicatoria* aislada a partir de tomates en Bella Vista, Corrientes, Argentina (BV5-4a) (Canteros, 1990).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Determinación fenotípica

El total de los aislamientos ensayados crecieron en medio CYEG en ausencia de cobre (control), un 97,4 % (38/39) creció en medio CYEG conteniendo 0,2 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y un 10,3 % (4/39) en el medio conteniendo 0,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. No se observó crecimiento a las mayores concentraciones evaluadas, 1 y 2 mM. En la tabla 17 se detallan los aislamientos utilizados en el ensayo y las características del crecimiento bacteriano en cada caso (para más detalle sobre la procedencia de los mismos, ver Anexo 6).

Las colonias mostraron patrones de crecimiento desiguales a diferentes concentraciones de cobre, observándose crecimiento confluyente en los controles y a la concentración 0,2 mM. En este último caso, algunos aislamientos presentaron un crecimiento débil, con pequeñas colonias aisladas, al igual que sucedió a mayor contenido de cobre (0,5 mM). Cuando el crecimiento fue débil, las morfologías fueron levemente diferentes a las colonias características de *X. arboricola* pv. *juglandis*, respecto a la textura y al color, siendo menos cremosas y más pálidas. Asimismo, en ocasiones, a las 48 horas se observaron colonias muy pequeñas, en forma de puntos casi transparentes, siendo más coloridas si se mantenían en incubación hasta las 96 horas, y en algunos casos, un poco más grandes (Fig. 65).

En las placas que no se detectó crecimiento, transcurrido el tiempo adicional de incubación, se observó el desarrollo de una única colonia amarilla sobre el medio conteniendo 0,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en el caso de dos aislamientos (100JVM y 112JVM) y a la concentración 1 mM, en un único caso (112JVM). Estas placas se observaron a los 7 días de incubación, presentando un cambio de coloración en las colonias, tornándose color ocre desde el centro hacia la periferia (Fig. 66).

Aislamiento	Concentraciones de CuSO ₄ .5H ₂ O en medio CYEG (mM)				
	0	0,2	0,5	1,0	2,0
H7(1)JVM	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
U1(2)JVM	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
X1(1)JVM	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
X1(2)JVM	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
B6JVM*	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
C7JVM	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
71JVM*	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
88JVM*	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
89JVM	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
98JVM	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
100JVM	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
101JVM	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
B1(1)JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
B1(2)JVM*	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
U1(1)JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
C6JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
C6(2)JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
P6JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
I7JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
L7(1)JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
32JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
33JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
56JVM*	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
66JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
68JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
73JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
79JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
81JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
92JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
97JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
106JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
107JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
111JVM	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
112JVM*	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
11XVM*	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
39JVM*	(+)	(+)	(±)	(-)	(-)
42JVM	(+)	(+)	(±)	(-)	(-)
53JVM*	(+)	(+)	(±)	(-)	(-)
55JVM*	(+)	(+)	(±)	(-)	(-)

Tabla 17: Crecimiento de aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* a diferentes concentraciones de CuSO₄.5H₂O

(+): crecimiento confluyente, (±): crecimiento débil, (-): sin crecimiento

*Aislamientos sometidos al análisis genotípico

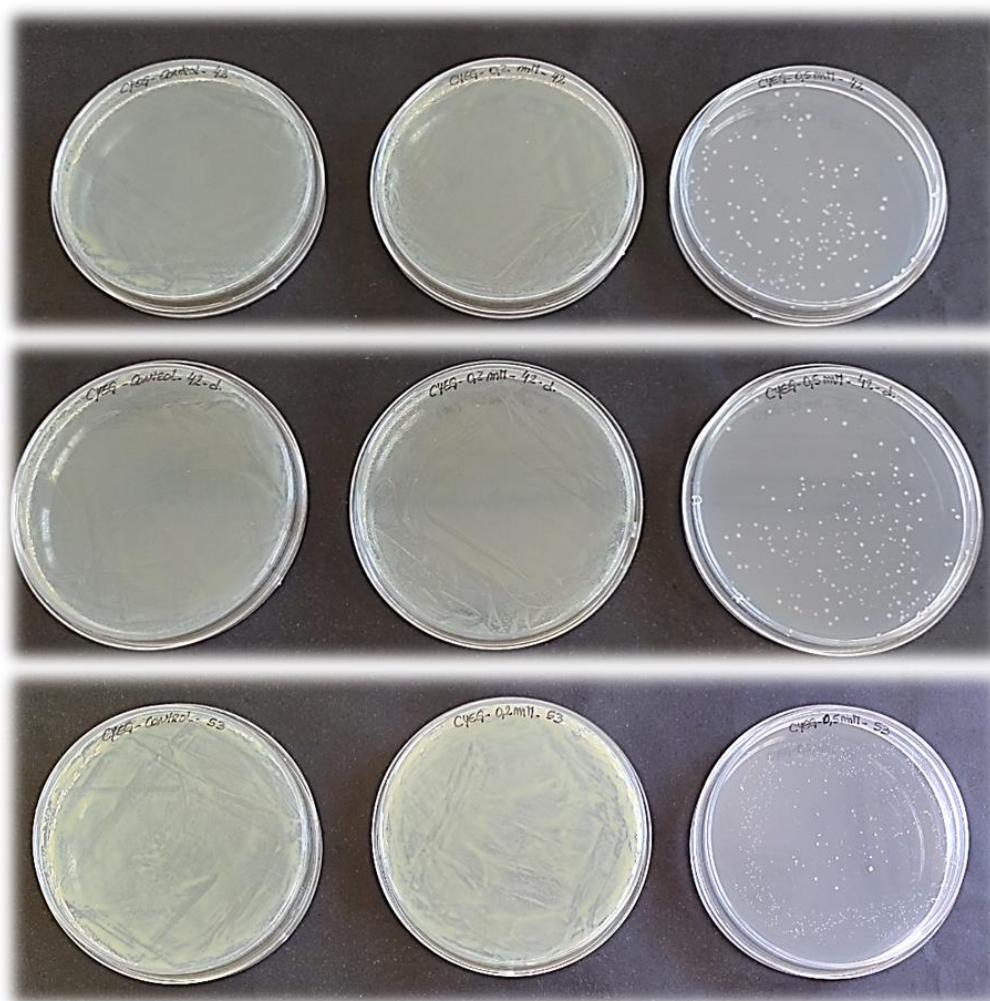


Fig. 65: Crecimiento de *X. arboricola* pv. *juglandis* sobre medio CYEG modificado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ luego de 96 horas de incubación a 25 °C. De izquierda a derecha: 0 mM; 0,2 mM; 0,5 mM

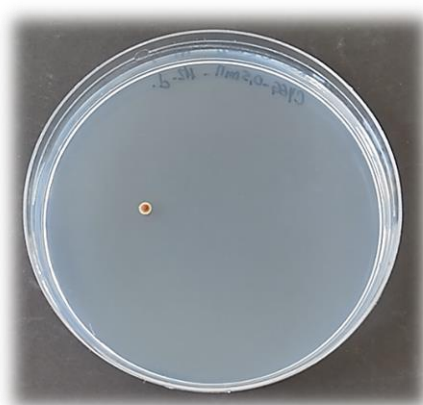


Fig. 66: Colonia de *X. arboricola* pv. *juglandis* en medio CYEG modificado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mM, luego de 7 días de incubación a 25 °C

6.3.2 Determinación genotípica

Respecto a la determinación genotípica de la resistencia al cobre, la cepa control *X. campestris* pv. *vesicatoria* presentó la banda de 870 pb correspondiente al amplicón copA, la banda de 531 pb correspondiente al amplicón copB y la banda de 356 pb correspondiente al amplicón copL sobre el gel de agarosa. Ninguno de los aislamientos ensayados presentó los fragmentos de amplificación característicos, correspondientes a los genes de interés.

6.4 DISCUSIÓN

Este trabajo constituye el primer estudio de sensibilidad al cobre sobre la población bacteriana responsable de las patologías del nogal en el Valle Medio del río Negro, donde los productos cúpricos constituyen la herramienta base de los programas sanitarios.

En los últimos años, se ha reportado una falta de coherencia en la metodología utilizada para evaluar *in vitro* la sensibilidad al cobre. La falta de un método de detección estandarizado, ha dificultado las comparaciones entre diferentes regiones y países (Griffin y col., 2017). La metodología utilizada en este trabajo fue consistente con la recomendada por Griffin y col. (2018) para evaluar la sensibilidad al cobre en bacterias patógenas de plantas.

Los aislamientos ensayados mostraron diferentes niveles de tolerancia al cobre transcurridas 48 horas de incubación sobre el medio CYEG modificado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Un 97,4 % creció en el medio conteniendo 0,2 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y un 10,3 % toleró la concentración de 0,5 mM. Ninguno de los aislamientos creció a las máximas concentraciones ensayadas (1 y 2 mM).

Dado que la metodología empleada en el presente estudio fue acorde a la utilizada por Roach y col. (2020) en la evaluación de la sensibilidad al cobre sobre cepas de *X. arborícola*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. vesicatoria*, es posible realizar comparaciones de los resultados obtenidos. En dicho trabajo, para la cepa control *P. syringae* sensible, la menor concentración de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ que inhibió el crecimiento fue de 0,2 mM, mientras que para el control resistente fue de 2 mM. La cepa resistente fue capaz de crecer en el medio CYEG modificado hasta con una concentración de 1,5 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ transcurridas 48 horas de incubación (Roach y col., 2020). De acuerdo a ello, ninguno de los aislamientos ensayados en el presente trabajo podría clasificar como resistente. Los resultados indicarían la existencia de aislamientos

tolerantes al cobre en la región, donde un 87,2 % de los aislamientos ensayados fueron capaces de crecer hasta la concentración 0,2 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, observándose crecimiento débil en el 32,4 % de los casos, y confluyente en los restantes. Asimismo, un 10,3 % tendría una tolerancia más alta, creciendo hasta la concentración 0,5 mM. Un único aislamiento clasificaría como sensible al cobre, dado que no fue capaz de crecer a la menor concentración de cobre ensayada (0,2 mM).

En el mencionado trabajo, se determinaron diferentes niveles de tolerancia al cobre en la población de *Xanthomonas* australiana, incluso varias cepas presentaron el mismo valor de CMI que el control resistente. Los valores de CMI oscilaron entre 0,5 mM y 2 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. En promedio, las cepas de *X. vesicatoria* (2 mM), *X. euvesicatoria* (1,5 mM) y *X. perforans* (1,5 mM) mostraron mayores CMI, que las cepas de *X. arboricola* (0,8 mM) (Roach y col., 2020).

Por otra parte, se han detectado cepas de *X. citri* subsp. *citri* tolerantes al cobre en Brasil, siendo capaces de crecer hasta las concentraciones 0,6 mM y 0,8 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agar MGY (Marin y col., 2019). Sobre este mismo medio, se ha evaluado la sensibilidad al cobre de cepas de *Xanthomonas* de diferentes orígenes geográficos, entre ellas *X. citri* subsp. *citri*, *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri*, *X. arboricola* pv. *juglandis*. En este caso las cepas resistentes crecieron hasta concentraciones de 1,2 y 1,8 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Behlau y col., 2013).

Cuando el crecimiento fue débil, las morfologías observadas fueron diferentes a las colonias características de *X. arboricola* pv. *juglandis*, presentando un color más pálido. Moya Elizondo y col. (2018) asociaron una menor expresión del pigmento característico de *X. arboricola* pv. *juglandis* con el costo metabólico que sufren los microorganismos ante una situación de presión selectiva, como es la aplicación de cobre, reflejándose en una disminución de su síntesis en función de tratar de sobrevivir y desintoxicarse.

En el caso de dos aislamientos, que fueron capaces de crecer a las concentraciones 0,5 y 1 mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, tras un periodo adicional de incubación (96 horas totales) respecto del establecido (48 horas), se observó el desarrollo de una única colonia sobre las placas del medio de cultivo, las cuales presentaron un cambio de coloración luego de 7 días de incubación, tornándose color ocre desde el centro hacia la periferia. Esta tonalidad fue observada en estudios previos donde se evaluó la sensibilidad al cobre *in vitro* sobre cepas de *X. campestris* pv. *vesicatoria* y *X. arboricola* pv. *juglandis*, sugiriendo la acumulación interna del metal (Ramos y Rosato, 1996; Moya Elizondo y col., 2018).

Respecto al análisis genómico, los aislamientos estudiados no mostraron contener el grupo de genes *copLAB*. Estos genes se encuentran en plásmidos, cuya presencia permitiría la transferencia horizontal mediante conjugación, siendo el mecanismo principal por el cual las bacterias adquieren resistencia, potenciando el desarrollo de una población resistente al cobre. Asimismo, se debe considerar que, si bien la resistencia al cobre en especies de *Xanthomonas* ha sido asociada a la presencia de alguno de los dos grupos de genes, *copABCD* o *copLAB*, es posible que la misma esté conferida por otros genes que aún no hayan sido caracterizados, por lo tanto, los análisis de PCR no pueden considerarse concluyentes (Marin y col., 2019).

En un estudio de genómica comparativa realizado sobre cepas de *X. arboricola* pv. *juglandis* asociadas a la bacteriosis del nogal en Chile se realizó una caracterización de la diversidad genética y una búsqueda de determinantes genéticos de la resistencia al cobre mediante un enfoque bioinformático, realizando genómica comparativa de genomas publicados, correspondientes a cepas chilenas e internacionales (Alonso Barrueto Estay, 2022). A partir de los resultados obtenidos, no se logró establecer una relación clara entre el genotipo y el fenotipo resistente al cobre. Un mayor número de determinantes genéticos relacionados con una mayor capacidad de soportar cobre no significó una mayor CMI al evaluar el crecimiento de la bacteria en medio conteniendo cobre, y viceversa. Los mecanismos involucrados en la resistencia al cobre son mucho más complejos de lo que se conoce al presente, y posiblemente existan otros determinantes que aún no se han considerado (Alonso Barrueto Estay, 2022). Roach y col. (2020) también reportaron que las bases genómicas correspondientes son complejas, ya que los umbrales de resistencia no se correlacionan directamente con la presencia de los genes.

Los resultados obtenidos en esta etapa permitieron observar diferentes niveles de tolerancia al cobre de los aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* aislados en el Valle Medio del río Negro, no pudiendo determinar marcadores de resistencia en la población.

Aún determinada la ausencia de grupo de genes *copLAB* que conferiría resistencia, dado que los análisis genotípicos pueden no ser concluyentes sobre la resistencia bacteriana (Marin y col., 2019; Roach y col., 2020; Alonso Barrueto Estay, 2022), resultaría de suma importancia monitorear y comparar, a lo largo del tiempo, las concentraciones de cobre que diferentes aislamientos bacterianos puedan tolerar, manteniendo una metodología estandarizada, que permita realizar la comparación de resultados. Sería fundamental que estas determinaciones *in vitro* sean acompañadas de observaciones a campo, prestando especial atención a los resultados de los tratamientos de control y/o prevención aplicados sobre los cultivos.

**7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DE DIFERENTES
COMPUESTOS QUÍMICOS DE USO
TRADICIONAL PARA EL CONTROL DE LAS
PATOLOGÍAS DEL NOGAL CAUSADAS POR *X.
arborícola* pv. *juglandis***

7.1 INTRODUCCIÓN

El control químico de las patologías del nogal causadas por *X. arborícola* pv. *juglandis* es de carácter preventivo. Se basa principalmente en la aplicación de productos cúpricos que reduzcan la población del inóculo en la planta y que ejerzan una acción de barrera defensiva sobre los tejidos nuevos y tiernos (Nievas y col., 2014).

En bajas concentraciones, el cobre es un microelemento esencial para el metabolismo celular de los organismos procariotas y eucariotas, participa en reacciones redox (transporte de electrones, respiración celular, etc.) y en algunos casos es un elemento estructural. Sin embargo, en altas concentraciones resulta tóxico para las células bacterianas al inducir la producción de radicales libres y, en consecuencia, dañar las membranas y el ADN (Hoshino y col., 1999; Chillappagari y col., 2010 citados en Marin y col., 2019).

Los bactericidas cúpricos tienen baja solubilidad en agua. Actúan formando una película que recubre la superficie de las hojas, frutos y otros tejidos con partículas microscópicas de cobre, impidiendo o dificultando la penetración de las bacterias a través de los estomas o heridas. Esta película actúa como un reservorio de iones de cobre, los cuales se movilizan por el dióxido de carbono presente en el agua de lluvia, exudados microbianos y agentes solubilizantes presentes en los exudados de la superficie de las plantas. Los iones de cobre movilizados pueden estar en forma libre, resultando tóxicos para las bacterias o quelados por compuestos orgánicos, en cuya forma pierden toxicidad (Lee y col., 1993; Marin y col., 2019).

Las formulaciones comerciales que contienen oxiclورو de cobre, hidróxido cúprico y óxido cuproso, así como también el sulfato de cobre pentahidratado, son algunos de los bactericidas más utilizados. En este caso, el objetivo consistió en evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes productos cúpricos utilizados en la región para el control y prevención de la bacteriosis y NAM del nogal.

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad antimicrobiana de diferentes productos cúpricos comerciales, aplicados tradicionalmente en la región para el tratamiento y la prevención de la bacteriosis y NAM del nogal, se evaluó mediante la técnica de difusión en agar. El ensayo se llevó a cabo empleando 10 aislamientos de *X. arborícola* pv. *juglandis*, siendo representativos de los tres niveles de tolerancia determinados en el capítulo anterior (Tabla 18).

Previo al mencionado ensayo, se determinó la concentración más apropiada de cobre/disco para su realización.

Aislamiento	Concentraciones de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en medio CYEG (mM)		Tolerancia al cobre
	0,2	0,5	
B6JVM	(±)		Menor tolerancia al cobre
71JVM	(±)		
88JVM	(±)		
B1(2)JVM	(+)		Tolerancia intermedia
56JVM	(+)		
11XVM	(+)		
112JVM*	(+)		
39JVM	(+)	(±)	Mayor tolerancia al cobre
53JVM	(+)	(±)	
55JVM	(+)	(±)	

Tabla 18: Aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* ensayados y caracterización de la sensibilidad al cobre

* aislamiento que presentó desarrollo de una colonia a 0,5 y 1 mM tras 96 h de incubación

Preparación de las soluciones madre de antibacterianos

Los productos cúpricos ensayados, de uso tradicional, fueron aportados por productores de la región y otorgados por la Agencia de Extensión Rural AER INTA Valle Medio. La actividad antibacteriana se evaluó de forma individual y en combinación con el fungicida Mancozeb (Complejo polimérico de etilenbisditiocarbamato manganeso con sales de zinc). En este último caso, se tuvo en cuenta la proporción generalmente utilizada a campo, producto cúprico/mancozeb: 1,5 (AER INTA Valle Medio, comunicación personal, 2021). A continuación, se detalla el principio activo y el contenido de cobre en cada uno de ellos.

Principio activo	Producto	Contenido de cobre
oxicloruro de cobre	A1	50,0 %
oxicloruro de cobre	A2	50,0 %
oxicloruro de cobre	A3	50,0 %
hidróxido cúprico	B	35,0 %
oxicloruro de cobre + hidróxido cúprico	C	27,2 %
sulfato tetra-amino cúprico	D	12,6 %
sulfato de cobre pentahidratado	E	25,5 %
óxido cuproso	F	75,0 %

Tabla 19: Características de los productos cúpricos ensayados

A partir de los datos anteriores, se procedió a la preparación de soluciones con una concentración final de cobre de 20 g/L (Anexo 1), estandarizando de esta forma el contenido de cobre activo.

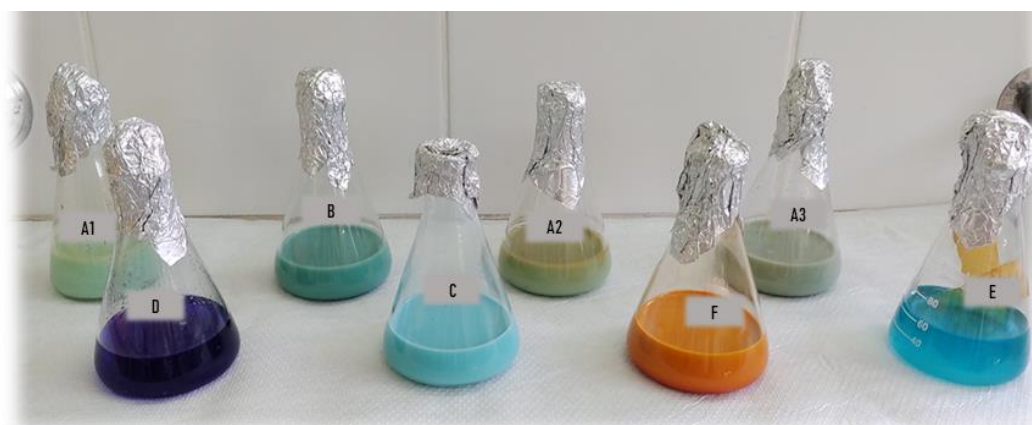


Fig. 67: Solución madre de cada producto cúprico (20 g/L de cobre activo)



Fig. 68: Solución madre de cada producto cúprico en combinación con Mancozeb (20 g/L de cobre activo)

Determinación de la concentración de antimicrobiano a evaluar: “Screening” de la actividad antibacteriana a diferentes concentraciones de productos

- Preparación de los discos de antibacterianos

Se cortaron discos de papel de filtro Whatman N° 1 de 6 mm de diámetro. Los discos se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se procedió a cargarlos, a partir de la solución madre de cada producto, hasta alcanzar las siguientes concentraciones finales de cobre:

- 100 µg/disco, equivalente a cargar el disco con 5 µl de solución madre
- 200 µg/disco, equivalente a cargar el disco con 10 µl de solución madre
- 500 µg/disco, equivalente a cargar el disco con 25 µl de solución madre
- 1000 µg/disco, equivalente a cargar el disco con 50 µl de solución madre

Los discos se distribuyeron sobre portaobjetos y la carga se realizó de forma discontinua, depositando alícuotas de 5 µl de solución, hasta completar el volumen final requerido (Fig. 69). Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo flujo laminar. Una vez secos, se conservaron en crioviales estériles y se almacenaron en un desecador hasta su utilización, el día posterior.

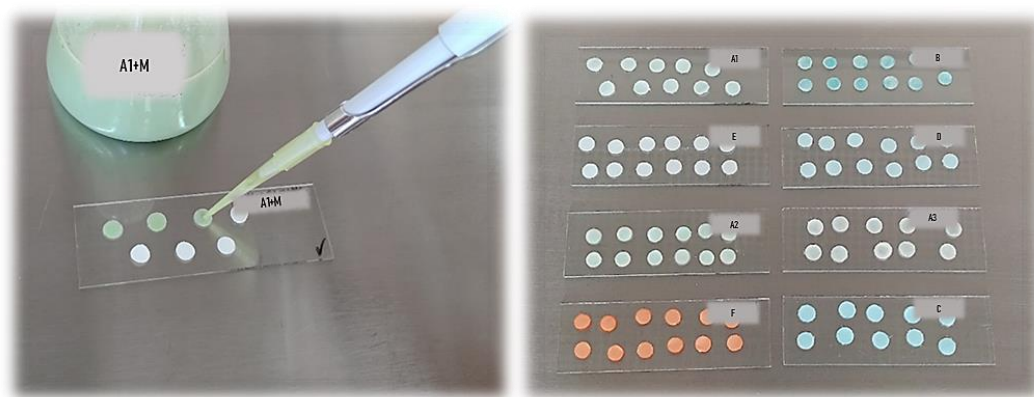


Fig. 69: Carga de discos de antibacterianos

- Determinación de la concentración de cobre/disco a utilizar

El ensayo de difusión en agar descrito a continuación, en primer lugar, se llevó a cabo sobre dos aislamientos elegidos al azar, uno de ellos de menor tolerancia al cobre y otro de tolerancia superior, a fin de seleccionar la concentración final de cobre/disco adecuada para desarrollar el ensayo.

Estudio de la actividad antimicrobiana de diferentes productos cúpricos comerciales: Ensayo de difusión en agar

Los aislamientos a ensayar se cultivaron en medio ANG a 25 °C durante 48 horas (Griffin y col., 2018). A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones bacterianas en agua destilada estéril con una absorbancia $A(600\text{ nm}) = 0,2$, a fin de obtener una concentración aproximada entre 1×10^8 UFC/ml y 5×10^8 UFC/ml (Moragrega, 2012).

Para asegurar un desarrollo bacteriano confluyente, se sembraron 20 μl de cada suspensión en placas de Petri conteniendo medio CYEG (pH 7) suplementado con buffer MES 1 M en una concentración de 20 mM. Con ayuda de una pinza estéril, los discos correspondientes al producto cúprico individual y a su combinación con Mancozeb se colocaron sobre la superficie del agar inoculado (Figs. 70 y 71). Como control negativo se emplearon discos sin antibacterianos. Las placas se incubaron a 25 °C durante 48 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se midió el diámetro de los diferentes halos de inhibición (zona clara en ausencia de crecimiento bacteriano alrededor del disco), utilizando una regla y tomando dos medidas en cada caso. Se realizaron 2 repeticiones del ensayo, trabajando por duplicado en cada una de ellas.

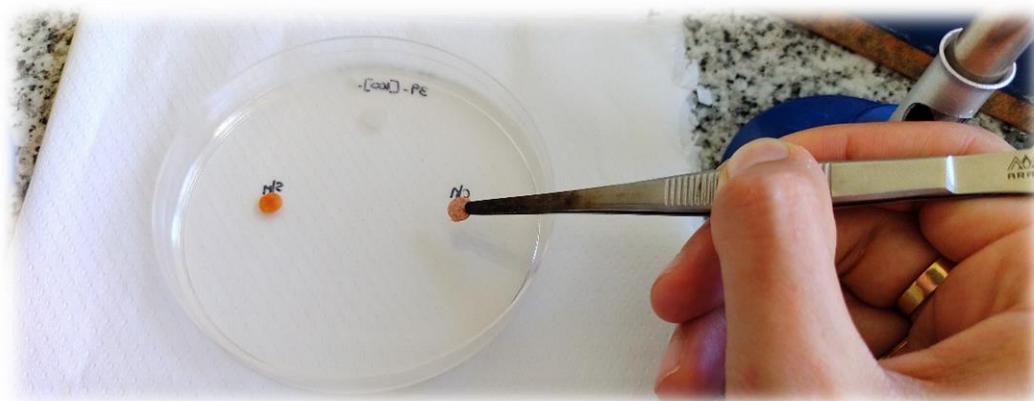


Fig. 70: Colocación de los discos impregnados con los diferentes compuestos. Parte superior: disco control. Izquierda: disco correspondiente al producto cúprico. Derecha: disco correspondiente al producto cúprico + Mancozeb

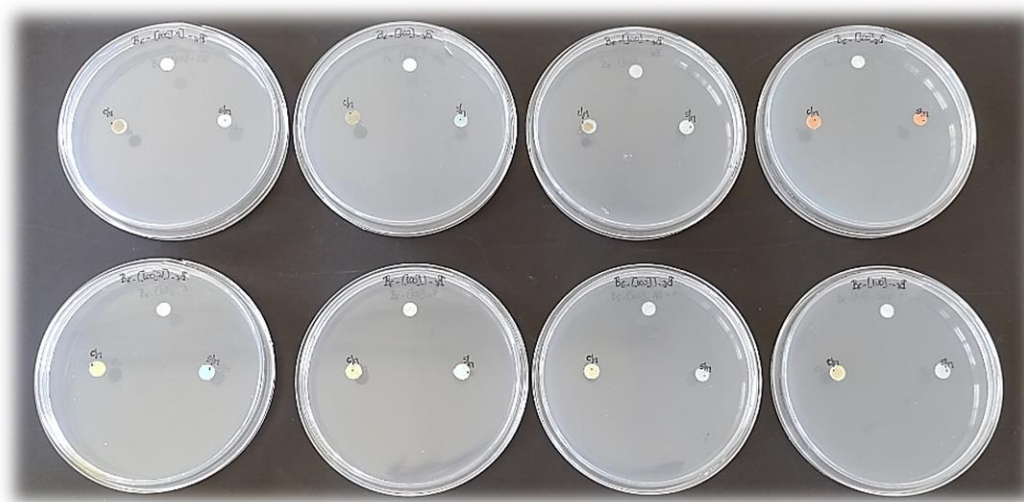


Fig. 71: Placas inoculadas. Concentración de cobre: 100 µg/disco

Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el software Statgraphics Centurion 19. Se realizaron análisis de varianza simple (ANOVA), y cuando fue necesario se emplearon Modelos Lineales Generalizados (GLM). En ambos casos, se aplicaron pruebas de comparaciones múltiples, trabajando con un nivel de confianza del 95 % (α : 0,05).

7.3 RESULTADOS

Se observó la capacidad de inhibición de los agentes evaluados en las diferentes concentraciones bajo estudio. Se determinó que la concentración más efectiva para llevar a cabo el estudio de actividad antimicrobiana fue de 100 µg de cobre/disco ya que posibilitó lecturas adecuadas de los halos de inhibición, permitiendo evaluar la eficacia de cada antimicrobiano sin ser necesario utilizar concentraciones superiores (200 µg, 500 µg y 1000 µg). Estas últimas implicaron mayor tiempo y complejidad a la hora de cargar los discos y dieron como resultados halos de mayor tamaño, lo cual dificultaría la lectura en caso de colocar dos o más discos en cada placa de Petri. A modo de ilustración, la figura 72 presenta las zonas de inhibición generadas por los diferentes antimicrobianos evaluados, para un determinado aislamiento.

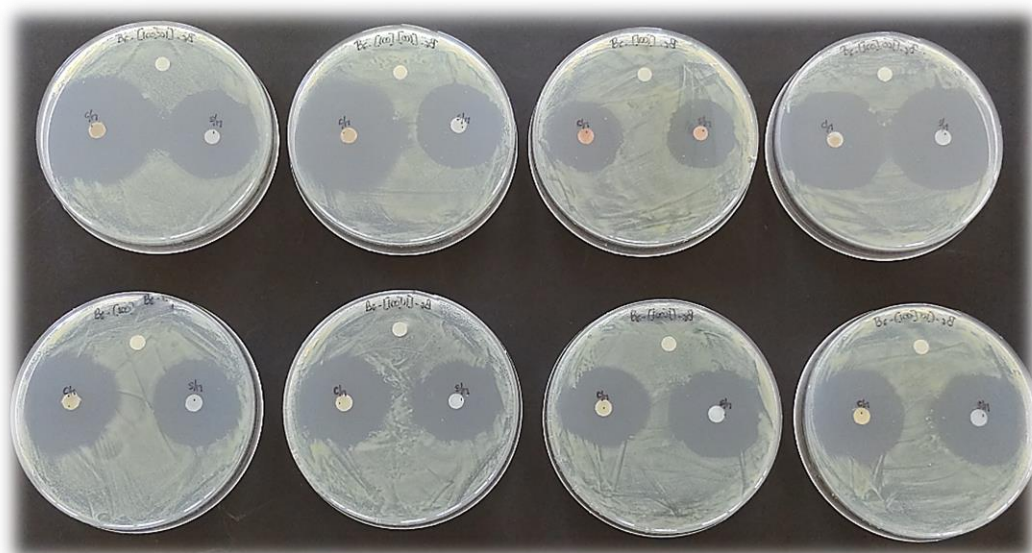


Fig. 72: Halos de inhibición obtenidos sobre el aislamiento B6JVM. Concentración de cobre: 100 µg/disco

A una misma concentración de cobre, todos los productos cúpricos evaluados ejercieron acción inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano. Los diámetros promedio de los halos obtenidos variaron entre 1,65 y 4,73 cm. A continuación, en la tabla 20, se presentan los valores promedio correspondientes a los diámetros de los halos de inhibición generados por cada tratamiento químico sobre los diferentes aislamientos. Las medidas de los halos de inhibición para cada uno de los aislamientos ensayados se presentan en las figuras 73 a 82.

Diámetros promedio de los halos de inhibición (cm)										
	B6JVM	71JVM	88JVM	B1(2)JVM	56JVM	11XVM	39JVM	53JVM	55JVM	112JVM
A1	3,16	3,20	3,23	2,31	2,86	2,25	2,18	2,28	2,39	2,29
A1 + M	3,33	3,68	3,33	3,00	3,15	2,56	2,75	3,08	2,94	3,04
A2	2,98	3,21	3,13	2,10	2,78	2,09	2,09	2,13	2,20	2,23
A2 + M	3,41	3,53	3,21	2,95	3,24	2,51	2,60	2,73	2,89	3,03
A3	3,09	3,30	3,29	2,38	2,65	2,30	2,04	2,29	2,28	2,31
A3 + M	3,64	3,88	3,44	3,09	3,30	2,88	2,81	3,14	3,19	3,29
B	3,33	3,06	3,18	2,66	2,85	2,45	2,45	2,46	2,19	2,69
B + M	4,23	4,21	4,03	3,84	3,59	3,33	3,61	4,08	3,98	3,98
C	3,38	3,44	3,33	2,48	3,26	2,39	2,44	2,50	2,41	2,49
C + M	3,41	3,33	3,40	3,00	3,04	2,75	2,94	2,96	3,18	3,29
D	3,19	3,08	3,29	2,39	3,15	2,23	2,43	2,49	2,49	2,40
D + M	4,13	3,99	3,89	3,59	3,80	3,39	3,81	3,90	3,93	3,58
E	3,88	4,15	4,05	3,24	3,96	2,74	3,21	3,14	3,23	3,05
E + M	4,09	4,73	4,33	3,79	4,15	3,16	3,61	4,16	4,19	4,38
F	2,49	2,56	2,79	1,93	2,73	1,65	1,84	1,74	1,80	1,93
F + M	2,46	3,11	2,66	1,94	2,68	1,76	1,84	1,76	1,71	1,99
CONTROL	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabla 20: Diámetro promedio de los halos de inhibición generados por los productos cúpricos (A-F) y su combinación con Mancozeb (M)

Aislamientos con menor nivel de tolerancia al cobre (B6JVM, 71JVM, 88JVM)

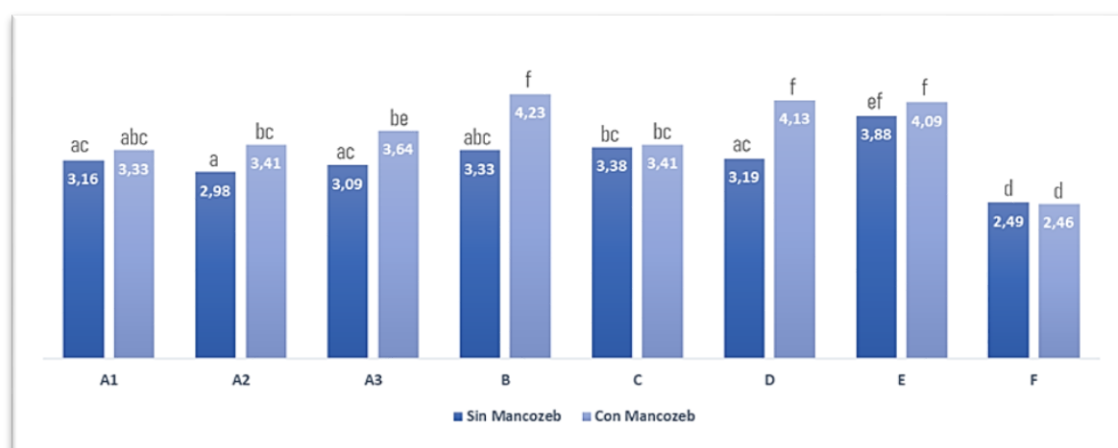


Fig. 73: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento B6JVM

Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)

Principios activos: A1, A2, A3-oxiclورو de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxiclورو de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

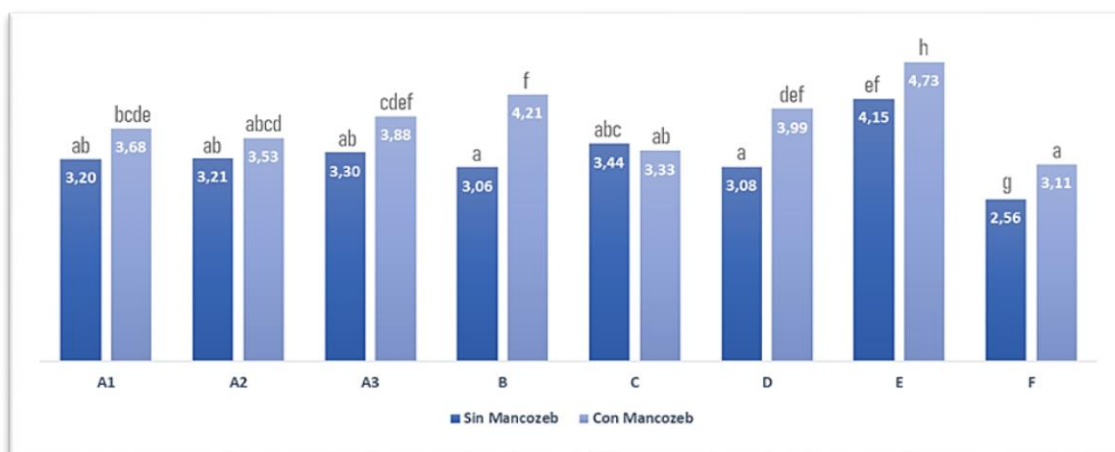


Fig. 74: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento 71JVM

Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)

Principios activos: A1, A2, A3-oxicloruro de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxicloruro de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

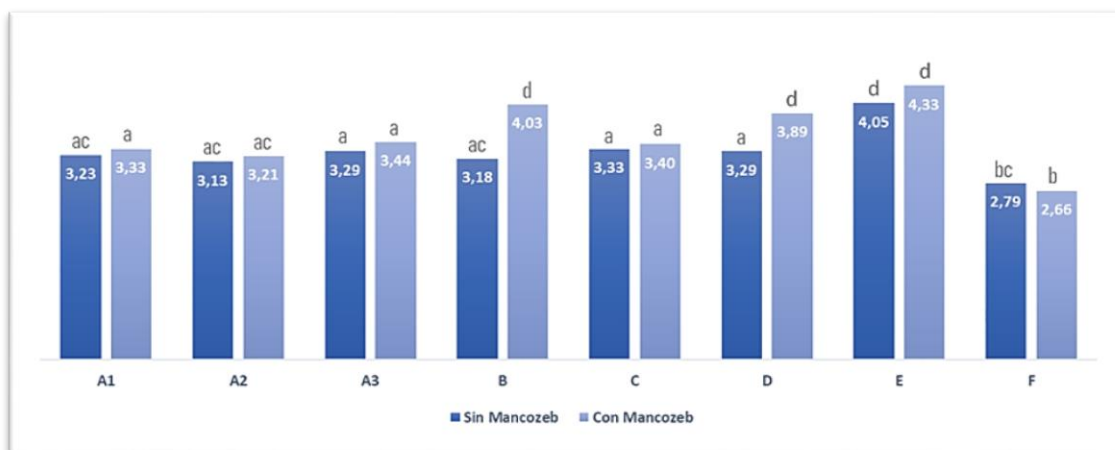


Fig. 75: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento 88JVM

Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)

Principios activos: A1, A2, A3-oxicloruro de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxicloruro de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

Observando el comportamiento de los aislamientos frente a los productos cúpricos individuales, el menor efecto inhibitorio registrado correspondió al antimicrobiano a base de óxido cuproso (F), mientras que los mayores efectos correspondieron al sulfato de cobre pentahidratado (E). Además, a excepción de dos productos (C y F), la combinación con Mancozeb siempre generó mayor inhibición comparada con cada producto cúprico individual. Sin embargo, las diferencias no siempre fueron significativas, a excepción de los antimicrobianos a base de hidróxido cúprico (B) y sulfato tetra-amino cúprico (D).

Aislamientos con tolerancia intermedia al cobre (B1(2)JVM, 56JVM, 11XVM)

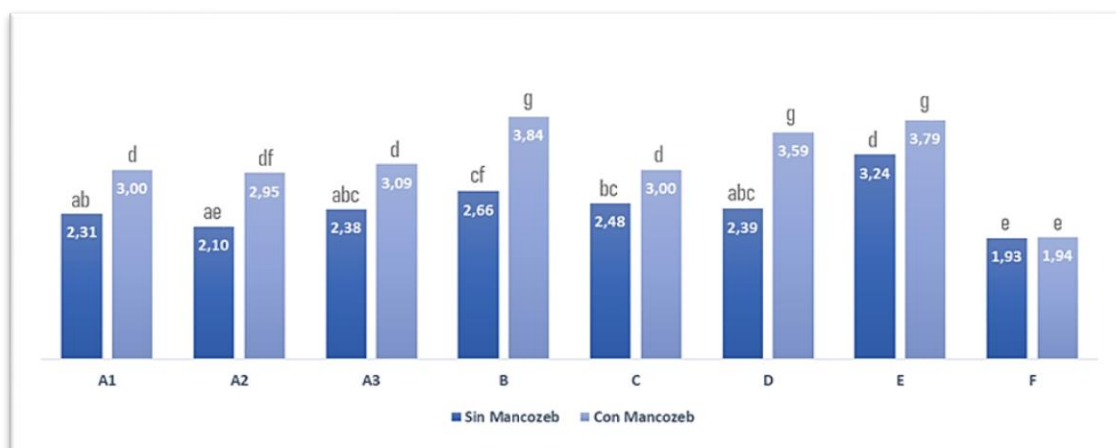


Fig. 76: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento B1(2)JVM
Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)
Principios activos: A1, A2, A3-oxicloruro de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxicloruro de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

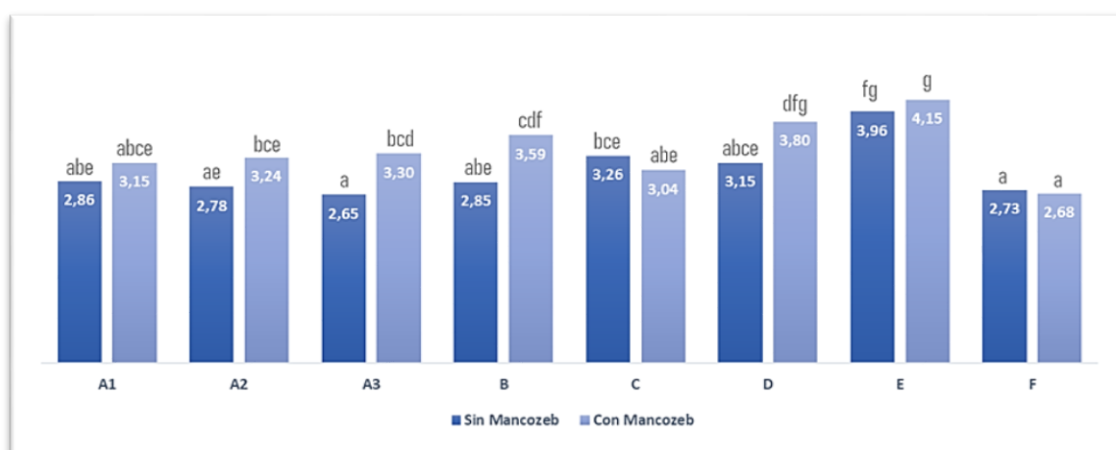


Fig. 77: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento 56JVM
Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)
Principios activos: A1, A2, A3-oxicloruro de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxicloruro de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

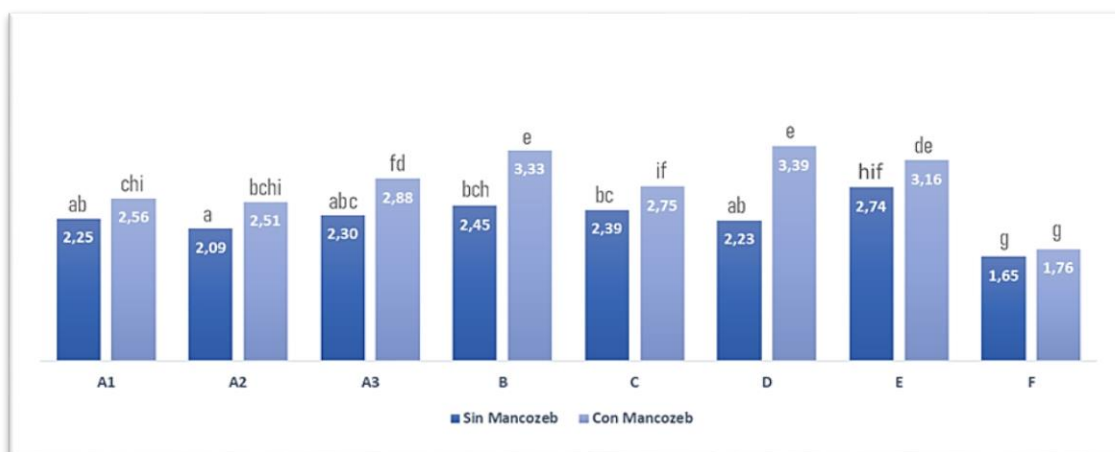


Fig. 78: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento 11XVM

Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)

Principios activos: A1, A2, A3-oxicloruro de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxicloruro de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

Al igual que en el caso anterior, observando el comportamiento de los aislamientos frente a los productos cúpricos individuales, los mayores efectos inhibitorios correspondieron al sulfato de cobre pentahidratado (E). En la mayoría de los casos, la combinación con Mancozeb generó diferencias significativas en el crecimiento bacteriano, observándose mayor inhibición comparada con cada producto cúprico individual, a excepción del óxido cuproso (F).

Aislamientos con mayor nivel de tolerancia al cobre (39JVM, 53JVM, 55JVM)

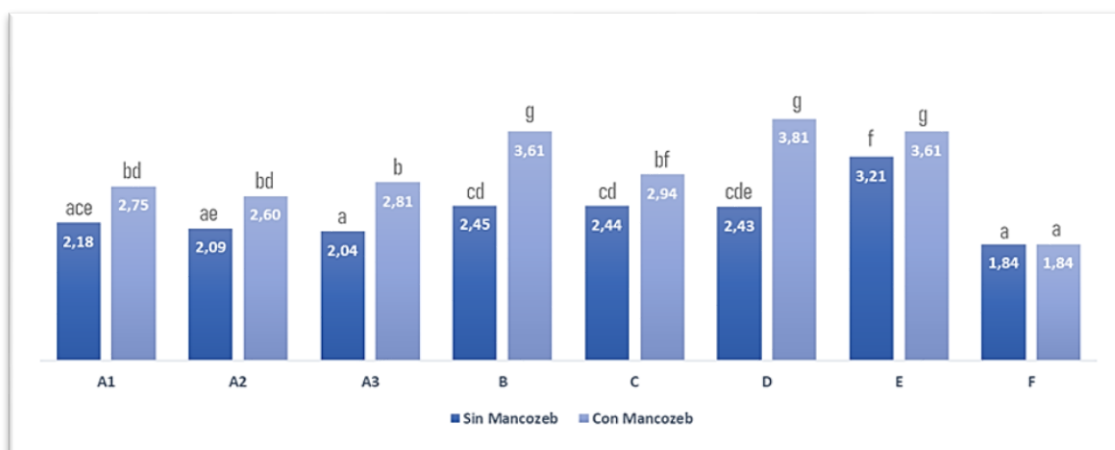


Fig. 79: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento 39JVM

Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)

Principios activos: A1, A2, A3-oxicloruro de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxicloruro de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

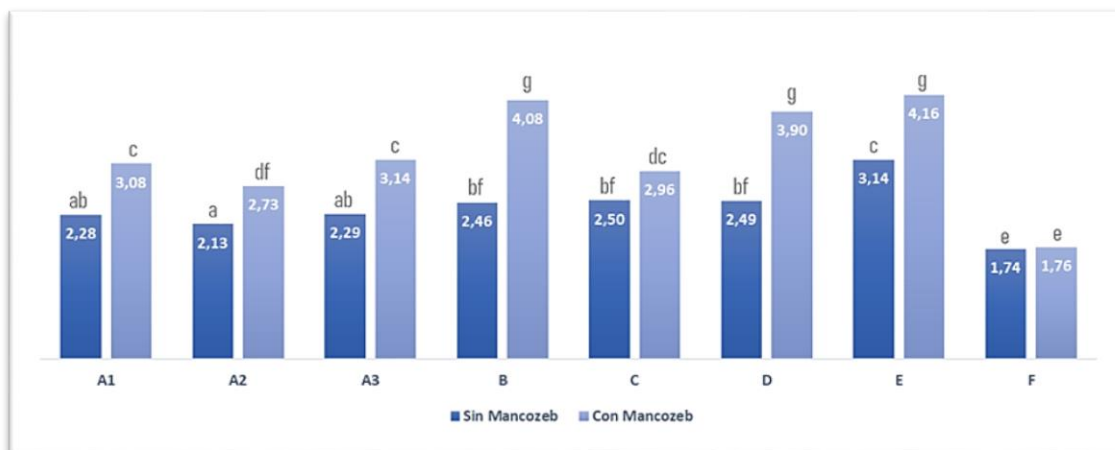


Fig. 80: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento 53JVM

Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)

Principios activos: A1, A2, A3-oxicloruro de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxicloruro de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

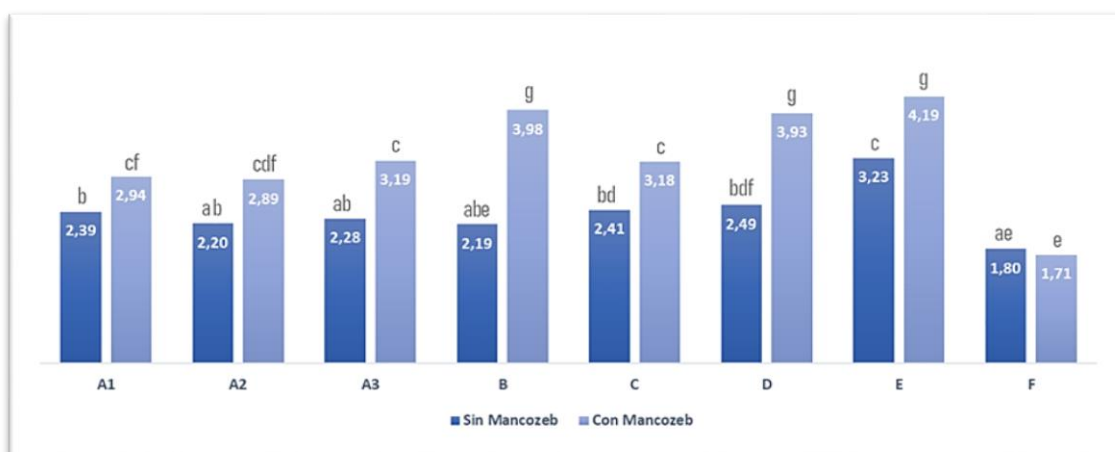


Fig. 81: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento 55JVM

Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)

Principios activos: A1, A2, A3-oxicloruro de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxicloruro de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

Al igual que en los casos anteriores, al observar el comportamiento de los aislamientos frente a los productos cúpricos individuales, el mayor efecto inhibitorio registrado correspondió al sulfato de cobre pentahidratado (E). A excepción del antimicrobiano a base de óxido cuproso (F), la combinación con Mancozeb siempre generó mayor inhibición comparada con cada producto cúprico individual, registrándose diferencias significativas en las medidas de los diámetros de los halos de inhibición.

Finalmente, se presentan los resultados obtenidos para el aislamiento 112JVM, un aislamiento particular que desarrolló una única colonia a las concentraciones 0,5 y 1

mM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, tras un periodo de incubación más prolongado. Los resultados fueron similares a los descriptos anteriormente.

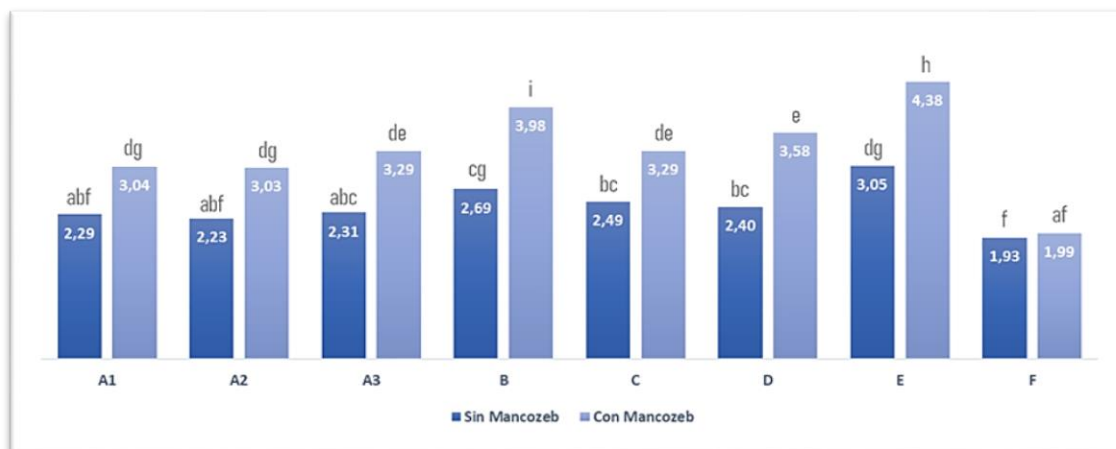


Fig. 82: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico. Aislamiento 112JVM

Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)

Principios activos: A1, A2, A3-oxicloruro de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxicloruro de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

Un resumen de los resultados anteriores, se presenta en la figura 83. Los mayores efectos inhibitorios se lograron al combinar los productos cuyos principios activos fueron sulfato de cobre pentahidratado (E), hidróxido cúprico (B) y sulfato tetra-amino cúprico (D) con el fungicida Mancozeb, registrándose diámetros promedio de inhibición de 4,06; 3,89 y 3,80 cm, respectivamente, sin existir diferencias significativas entre ellos (Fig. 84). Asimismo, los menores efectos inhibitorios registrados correspondieron a la formulación a base de óxido cuproso (F) y su combinación con Mancozeb, registrándose halos de inhibición con diámetros promedio de 2,14 y 2,19 cm, respectivamente.

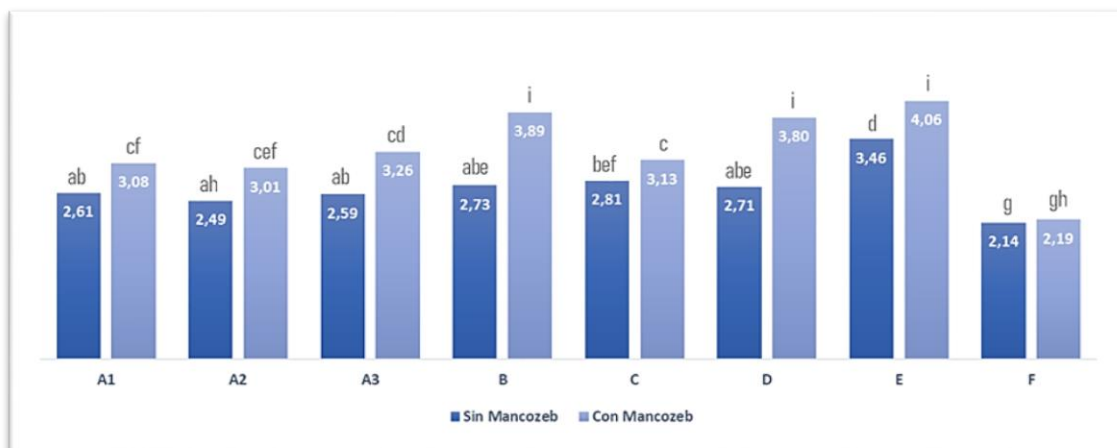


Fig. 83: Diámetro promedio de los halos de inhibición (cm) por tratamiento químico

Valores con letras similares no presentan diferencias estadísticamente significativas (método: HSD de Tukey, 95%)

Principios activos: A1, A2, A3-oxiclورو de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxiclورو de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

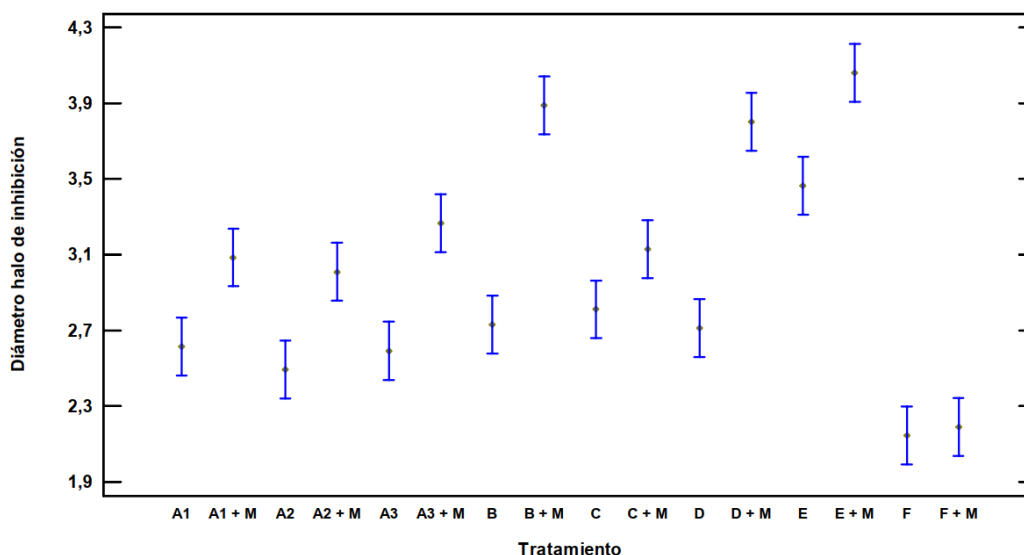


Fig. 84: Medias e Intervalos HSD de Tukey (95 %). Diámetro promedio de los halos de inhibición por tratamiento químico

Principios activos: A1, A2, A3-oxiclورو de cobre. B-hidróxido cúprico. C-oxiclورو de cobre+hidróxido cúprico. D-sulfato tetra-amino cúprico. E-sulfato de cobre pentahidratado. F-óxido cuproso

Respecto al comportamiento de los aislamientos teniendo en cuenta el nivel de tolerancia al cobre, aquellos que resultaron menos tolerantes registraron mayores efectos inhibitorios. Sin embargo, no existieron diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los demás niveles de tolerancia (Fig. 85).

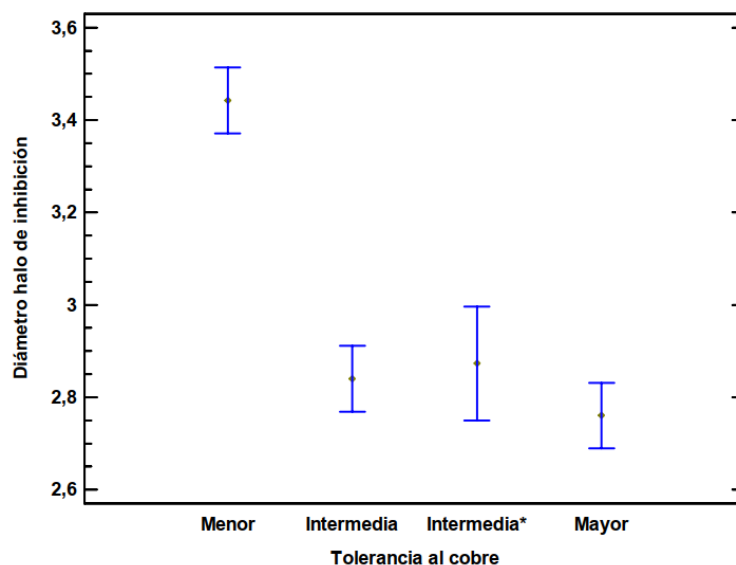


Fig. 85: Medias e Intervalos de Bonferroni (95 %). Diámetro promedio de los halos de inhibición según nivel de tolerancia al cobre

* aislamiento particular, se detectó crecimiento de una colonia a 0,5 y 1 mM tras 96 h de incubación

7.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de susceptibilidad a los antimicrobianos permitieron observar diferentes capacidades de inhibición *in vitro* por parte de los productos cúpricos más comúnmente utilizados en la región sobre aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis*. A igual concentración de cobre, los productos ensayados mostraron diferencias en el control ejercido sobre el crecimiento bacteriano. Diferencias de este tipo han sido reportadas para tres diferentes sales de cobre evaluadas sobre aislamientos de la Región del Biobío, en Chile (Moya Elizondo y col., 2018).

Al evaluar los productos de forma individual, el control más efectivo correspondió al sulfato de cobre pentahidratado. En contraste, cuando el óxido cuproso fue el principio activo, el control fue el menos efectivo. Una efectividad intermedia sobre el control de la bacteria fue determinada para los productos a base de sulfato tetra-amino cúprico, hidróxido cúprico, y oxiclورو de cobre. En este último caso, no se registraron diferencias significativas entre las diferentes marcas comerciales evaluadas. Respecto al producto cuyo principio activo fue una combinación de oxiclورو de cobre e hidróxido cúprico, el efecto fue similar al ejercido por aquellos productos a base de cada componente individual. Sin embargo, al combinarlo con Mancozeb, el efecto fue equivalente al de los productos a base del primer componente. Resultados similares

fueron obtenidos en el estudio previamente mencionado, donde se ensayaron *in vitro* sulfato de cobre pentahidratado, hidróxido cúprico y óxido cuproso sobre aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* (Moya Elizondo y col., 2018).

En cuanto a la combinación cobre-mancozeb, en general, se observó una mayor efectividad sobre la inhibición del crecimiento de *X. arboricola* pv. *juglandis*, comparado con el uso individual de cada producto químico. Incluso, los tratamientos más efectivos consistieron en las combinaciones sulfato de cobre pentahidratado-mancozeb, hidróxido cúprico-mancozeb y sulfato tetra amino-cúprico-mancozeb, sin existir diferencias significativas entre ellos. La adición de fungicidas de etilenbisditiocarbamato (EBDC) a los bactericidas de cobre puede mejorar el control de la bacteriosis del nogal, en comparación con las aplicaciones basadas solo en cobre (Buchner y col., 2001; Lang y col., 2006). Los iones del metal se unen a muchas sustancias orgánicas presentes en la superficie de las plantas, formando complejos que dejan de ser tóxicos para las bacterias. Se supone que la capacidad quelante de los EBDC aumentaría la toxicidad del cobre evitando la formación de estos complejos, sin embargo, no está claro cómo las bacterias absorben los iones tóxicos del complejo cobre-carbamato (Cooksey, 1990).

Por otra parte, la mayor eficacia del hidróxido cúprico en comparación con el oxiclورو de cobre ha sido informada en estudios previos para *X. axonopodis* pv. *citri*. En un ensayo realizado sobre plantines de pomelo, se observó que a una misma dosis de cobre elemental el hidróxido cúprico ejerció mayor control que el oxiclورو de cobre, siendo este el menos efectivo entre los productos evaluados (Velazquez y Corroto, 2005). Asimismo, el hidróxido cúprico fue más eficiente que el oxiclورو cuando se compararon tratamientos a igual contenido de cobre sobre una plantación de limoneros para el control de la cancrrosis de los cítricos (Stein y col., 2014). Sin embargo, en el presente estudio, esta característica solo se observó al trabajar con las combinaciones cobre-mancozeb. En el caso de los productos individuales, en general, no existieron diferencias significativas entre el control ejercido por los productos a base de hidróxido cúprico y oxiclورو de cobre, coincidiendo con los resultados obtenidos por Stein y col. (2007), quienes evaluaron distintas formulaciones en el control de *X. axonopodis* pv. *citri* sobre un cultivo de limoneros.

Respecto al comportamiento de los aislamientos teniendo en cuenta los niveles de tolerancia al cobre, los tratamientos fueron efectivos sobre todos ellos. Aquellos aislamientos que resultaron menos tolerantes presentaron mayor grado de inhibición, pero no existieron diferencias significativas en el control ejercido sobre los aislamientos pertenecientes a los otros dos niveles de tolerancia. Ha sido reportado

que la tolerancia al cobre no significó una amenaza para el control de cepas de *X. citri* subsp. *citri* sobre cítricos (Marin y col., 2019).

El estudio de sensibilidad *in vitro* de diferentes antimicrobianos permite predecir las reacciones de las cepas frente a las medidas de control aplicadas, y comparar la eficacia de los productos químicos bajo condiciones estándares predeterminadas. La información suministrada puede constituir una valiosa herramienta para orientar la aplicación ante una infección específica.

Se debe tener en cuenta que, para determinar la eficacia de cada producto cúprico en la práctica, esta información debe ser acompañada por un análisis de las características de cada producto químico a campo, tales como contenido de coadyuvantes que aseguren persistencia y resistencia al lavado por lluvias, estado fenológico de aplicación, adherencia, facilidades/dificultades de pulverización. Asimismo, deberán considerarse las posibles diferencias que puedan presentarse debido a la complejidad de los sistemas naturales que no pueden replicarse por completo en estudios de laboratorio.

8. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE PARÁMETROS AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO DE *A. tenuissima*

8.1 INTRODUCCIÓN

El género fúngico *Alternaria* contiene numerosas especies que son saprófitas y patógenas de plantas, entre ellas frutales, vegetales y gramíneas. Durante la colonización de los cultivos, los hongos pueden producir metabolitos tóxicos que se acumulan en las partes comestibles de las plantas, representando un peligro para la salud humana y animal (Pose y col., 2009).

Los resultados obtenidos a partir del estudio de la distribución de las poblaciones de *X. arborícola* pv. *juglandis* y grupos-especies de *Alternaria* asociadas a NAM, durante diferentes estados fenológicos del nogal, proponen al género fúngico como un agente agravante de la patología. En estudios previos, llevados a cabo sobre la región bajo estudio, *A. tenuissima* fue el grupo-especies aislado con mayor frecuencia a partir de frutos inmaduros sintomáticos (Temperini y col., 2014, 2017). Asimismo, este grupo predominó tras analizar la distribución del género en los cultivos durante la primera etapa del presente trabajo. El grupo *A. alternata*, también se aisló en ambos casos, aunque con una frecuencia significativamente menor.

Alternaria tenuissima es una especie de distribución cosmopolita y un patógeno saprófito y oportunista de plantas, con una amplia gama de hospedadores (Bottalico y Logrieco, 1992). Es uno de los tres grupos morfológicamente diferentes, cada uno de ellos tipificado por una especie de *Alternaria* representativa, que se han asociado a casos de NAM en nogales, el grupo *A. alternata*, el grupo *A. tenuissima* y el grupo *A. arborescens* (Belisario y col., 2004; Hong y col., 2006; Moragrega y col., 2011).

El crecimiento de los hongos se ve ampliamente afectado por diferentes factores ambientales, siendo los más importantes la temperatura y la actividad de agua (a_w) (Magan y Lacey, 1984-a; Pose y col. 2009). La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es un factor importante para el desarrollo de los microorganismos. Sin embargo, no sólo influye la cantidad de agua sino también la forma en que esta se encuentra. El agua se puede encontrar en forma libre o ligada. El agua libre existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células. La forma ligada está presente en los tejidos vegetales y animales, formando parte integrante de las células que los componen y en unión con constituyentes celulares. Para la germinación de esporas de hongos y para el crecimiento bacteriano es necesario que el agua se encuentre en forma libre, o sea, disponible. Este factor se considera en base a la determinación de la a_w (López y Guinovart, 2005).

Varios estudios han reportado el efecto que la temperatura y la a_w poseen sobre la germinación y el crecimiento de diferentes especies de *Alternaria*. Entre ellos, Magan y Lacey (1984-b) realizaron estudios sobre cepas de *A. alternata* contaminantes de

granos de trigo, sobre un medio de cultivo a base del sustrato natural. Pose y col. (2009) estudiaron el efecto que ambos factores tienen sobre la germinación y el crecimiento de cepas de *A. alternata* aisladas a partir de tomates (*Lycopersicum esculentum*) afectados por moho negro, diseñando y utilizando un medio de cultivo sintético a base de pulpa de tomates. Posteriormente, este medio fue utilizado por Vaquera y col. (2014), para llevar a cabo un estudio similar sobre *A. arborescens*, responsable de la cancrrosis del tallo del tomate. A su vez, Oviedo y col. (2011) analizaron el efecto de la temperatura y la a_w sobre el crecimiento de cepas de *A. alternata* aislada a partir de soja (*Glycine max* L. Merr.) sobre un medio de cultivo obtenido a base de dicha legumbre. Por otra parte, Betancourt Rodríguez y col. (2019) trabajaron en la formulación de un modelo matemático para predecir el crecimiento de cepas de *Alternaria* spp. aisladas a partir de papayas (*Carica papaya* L.) en función de la temperatura, empleando un medio a base de la cáscara del fruto. Particularmente, para el caso de *A. tenuissima*, parecerían existir pocos datos disponibles sobre su ecofisiología. A nuestro conocimiento, sólo existe un estudio realizado en Argentina donde se analizaron los efectos que la temperatura y la a_w tienen sobre el crecimiento de dos cepas sobre un medio de cultivo a base de trigo molido (Patriarca y col., 2014). Esta información es importante para desarrollar sistemas de pronóstico más realistas en virtud de predecir el riesgo de colonización, y producción de micotoxinas (Pose y col., 2009).

Dado que Argentina es un importante país productor y exportador de productos agrícolas, es fundamental conocer a fondo el comportamiento fisiológico del género *Alternaria* en un contexto de seguridad alimentaria (da Cruz Cabral, 2018).

El objetivo del presente estudio fue determinar los efectos que los principales factores ambientales (temperatura y a_w) tienen sobre la germinación de conidios y el crecimiento de aislamientos del grupo-especies *A. tenuissima* asociados a NAM en nogales sobre un medio de cultivo estándar y sobre un medio análogo al sustrato natural a base de pulpa de nuez.

8.2 MATERIALES Y MÉTODOS

8.2.1 Ecofisiología sobre medio de cultivo estándar

Se evaluó el crecimiento de tres aislamientos pertenecientes al grupo-especies *A. tenuissima* bajo distintas combinaciones de temperatura y actividad de agua. Los parámetros estudiados consistieron en 7 valores de a_w (0,99; 0,97; 0,95; 0,93; 0,90;

0,88; 0,85) en medio de cultivo PDA modificado con glicerol, y 6 valores de temperatura (5, 15, 25, 30, 37 y 40 °C). Los aislamientos fúngicos evaluados fueron aislados a partir de nueces inmaduras sintomáticas, y clasificados de acuerdo a pruebas de patogenicidad en tres niveles de agresividad (leve, medio, severo), según la extensión de las lesiones producidas sobre la superficie de frutos inmaduros (Temperini y col., 2017; Temperini y col., datos no publicados).

Preparación del inóculo

Los aislamientos a ensayar se cultivaron en medio AA, a 25 °C durante 15 días, con el fin de obtener cultivos densamente esporulados. A partir de estas placas se procedió a la preparación de suspensiones de conidios, en tubos de ensayos conteniendo 5 ml de solución estéril agua/glicerol con la actividad de agua ajustada al valor requerido para el ensayo de acuerdo a Chirife y col. (1980). Luego, se realizó el recuento de conidios en cámara de Neubauer, ajustando a una concentración final entre $1,5 \times 10^5$ y 3×10^5 conidios/ml (Pose y col., 2009).

Preparación de los medios de cultivos modificados

La actividad de agua del medio de cultivo se ajustó utilizando glicerol, de acuerdo a la siguiente proporción:

a_w	Glicerol (g/L de medio)
0,99	18
0,97	120
0,95	200
0,93	275
0,90	340
0,88	380
0,85	410

Tabla 21: Ajuste de la actividad acuosa del medio PDA

En primer lugar, se pesó el glicerol. Luego, se procedió a agregar el agua, reemplazando agua por glicerol. Finalmente, se agregó la cantidad correspondiente de PDA. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Los valores de actividad acuosa fueron verificados utilizando un medidor de a_w (Aqualab CX-2, Decagon Devices Inc., USA) antes de iniciar el ensayo (UBA, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Depto. Química Orgánica).

Inoculación e incubación

Un microlitro de cada suspensión se sembró en el centro de placas de Petri, de 90 mm de diámetro, conteniendo el medio PDA modificado con glicerol. Las placas así inoculadas, correspondientes a cada a_w , se colocaron en bolsas de polietileno para su incubación a cada temperatura en particular. A fin de minimizar la transferencia de agua desde la placa de cultivo al medio ambiente y viceversa, en el interior de cada bolsa se colocó un vaso de precipitado con solución de glicerol ajustada a la actividad de agua correspondiente, la cual se renovó cada 7 días. El ensayo se realizó por sextuplicado.

Seguimiento del desarrollo fúngico

A fin de determinar el tiempo de germinación (TG), las placas de Petri fueron observadas utilizando una lupa binocular estereoscópica (40X) varias veces al día. Se adoptó como criterio para determinar el TG la producción del tubo germinativo de longitud similar al diámetro del conidio en el 50 % del inóculo (Hocking y Miscamble, 1995; Pose y col., 2009; Greco, 2014). Se registraron también los tiempos correspondientes a la formación de microcolonias, visibles a simple vista, de aproximadamente 2 mm de diámetro, con una ramificación incompleta del micelio, y al desarrollo de colonias, las cuales contaban con una ramificación completa del mismo (Fig. 86). El seguimiento del crecimiento se realizó tomando mediciones de dos diámetros perpendiculares entre sí utilizando una regla, generalmente dos o tres veces al día, durante un periodo de 40 días en total o hasta que la colonia cubrió, aproximadamente, 85 mm de la superficie de la placa de Petri correspondiente.

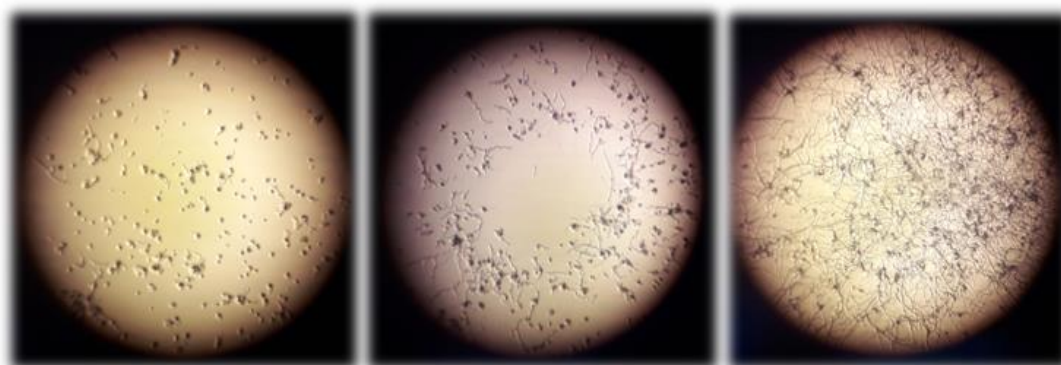


Fig. 86: Vista bajo lupa binocular estereoscópica (40X) de las etapas de desarrollo fúngico.

Izquierda: conidios germinados. Centro: microcolonia. Derecha: colonia

Cálculo de las velocidades de crecimiento

Las velocidades de crecimiento se determinaron a partir de las curvas de crecimiento obtenidas al graficar el diámetro de la colonia en función del tiempo para cada réplica y condición. Para ello, en primera instancia se calculó el promedio de los registros diarios (dos medidas) del diámetro de las colonias, para cada réplica ensayada. A partir de las fechas y horarios en los que cada medida fue tomada, se realizó un ajuste a minutos y se calculó la cantidad de días acumulados, a fin de estandarizar la medida del tiempo. En cada gráfico se seleccionó la parte lineal de la curva y se realizó una regresión lineal. La velocidad de crecimiento (mm/día) de cada réplica se determinó como la pendiente de la recta (Pose y col., 2009; Oviedo y col., 2011; Vaquera y col., 2014). Finalmente, se calcularon las velocidades medias de crecimiento (mm/día) para cada condición experimental.

Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el software Statgraphics Centurion 19. Se realizaron análisis de varianza empleando Modelos Lineales Generalizados (GLM) y se aplicaron pruebas de comparaciones múltiples, trabajando con un nivel de confianza del 95 % (α : 0,05).

8.2.2 Ecofisiología sobre agar Nuez

A fin de analizar el crecimiento en un sustrato que asemeje al sustrato natural, se trabajó en el diseño y optimización de un medio de cultivo a base de pulpa de nueces, el agar Nuez (ANz).

Desarrollo del sustrato análogo

- Preparación de la pulpa de nuez

La pulpa de nuez se preparó a partir de pequeños frutos sanos e inmaduros del cultivar Chandler. Los frutos se recolectaron en la chacra tradicional al transcurrir, aproximadamente, 20 días después del cuaje. Se procedió a su lavado bajo agua del grifo y secado con papel tissue. Se cortaron en pequeños trozos y luego se trituraron utilizando en primer lugar, una procesadora y luego un mixer (minipimer). La pulpa resultante se fraccionó en bolsas con cierre hermético y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

- **Elaboración y evaluación del agar Nuez**

Se ensayaron tres proporciones de pulpa distintas (80 %, 60 % y 50 %). De esta manera fueron evaluadas las siguientes preparaciones:

<u>Agar Nuez 1</u>	<u>Agar Nuez 2</u>	<u>Agar Nuez 3</u>
80 g de Pulpa	60 g Pulpa	50 g Pulpa
1,5 g de Agar	1,5 g Agar	1,5 g de Agar
20 ml de Agua	40 ml Agua	50 ml de Agua

Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y luego, se distribuyeron en placas de Petri de 90 mm de diámetro.

A fin de determinar la concentración del medio más adecuada para realizar la experiencia, se procedió a inocular con ansa aguja el centro de tres placas de Petri, conteniendo los diferentes medios a evaluar, con un aislamiento de *A. tenuissima*. Las placas se incubaron a 25 °C. El diámetro de las colonias fúngicas se midió con regla, tomando dos medidas perpendiculares entre sí, a los 7 y 10 días de incubación. La adecuabilidad del sustrato fue evaluada de acuerdo a su textura y al desarrollo del hongo sobre el mismo.

Ensayo de ecofisiología

Se evaluó el crecimiento de los tres aislamientos pertenecientes al grupo-especies *A. tenuissima* sobre ANz, a diferentes temperaturas: 5,15, 25, 30 y 37 °C.

La suspensión de conidios se realizó de la forma descripta anteriormente, en 5 ml de agua destilada con una gota de tween 80. Un microlitro de cada suspensión se sembró en el centro de placas de Petri, de 90 mm de diámetro, conteniendo el medio ANz. Las placas se incubaron a las diferentes temperaturas establecidas. En este caso, el ensayo se realizó por cuadruplicado.

El seguimiento del desarrollo fúngico se realizó desde el momento en el que fue posible observar a simple vista una microcolonia (debido a la coloración del medio, que no permitió la distinción de los conidios bajo lupa estereoscópica). A partir de ese momento, se realizó el seguimiento del crecimiento de las colonias fúngicas tomando mediciones de dos diámetros perpendiculares entre sí, generalmente dos o tres veces al día, durante un periodo de 40 días en total o hasta que la colonia cubrió, aproximadamente, 85 mm de la superficie de la placa de Petri.

El cálculo de las velocidades de crecimiento se realizó de acuerdo a lo descripto en el apartado anterior.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Ecofisiología sobre medio de cultivo estándar

A continuación, se presentarán los resultados obtenidos y el procedimiento realizado para el cálculo de las velocidades medias de crecimiento (mm/día) para una condición en particular, a fin de ejemplificar el método aplicado sobre cada condición ensayada.

La tabla 22 presenta los valores de los diámetros promedios (mm) obtenidos en cada medición realizada durante el crecimiento del aislamiento de agresividad leve, sobre medio PDA, con una a_w de 0,99 y a 30 °C. En este caso, los registros se realizaron hasta el momento en que se cubrió casi la totalidad de las placas de Petri (85 mm).

Fecha	Hora	Minutos acum.	Días acum.	Diámetro (mm)					
				Réplica	Réplica	Réplica	Réplica	Réplica	Réplica
				1	2	3	4	5	6
8-nov	08:30	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8-nov	20:00	690	0,5	3,0	2,8	2,8	3,0	3,0	3,0
8-nov	22:30	840	0,6	3,0	2,8	2,8	3,0	3,0	3,0
9-nov	09:05	1475	1,0	6,0	5,8	6,0	6,3	7,0	6,3
9-nov	12:05	1655	1,1	7,5	6,5	6,5	7,3	7,5	7,0
9-nov	15:05	1835	1,3	8,0	8,5	8,3	9,3	9,3	8,8
9-nov	18:05	2015	1,4	8,8	9,5	9,3	10,0	10,5	9,8
9-nov	21:05	2195	1,5	10,8	10,3	11,0	11,5	11,5	11,8
10-nov	09:05	2915	2,0	16,5	16,5	17,3	17,8	17,8	18,3
10-nov	14:05	3215	2,2	18,5	18,0	19,0	19,3	20,0	20,3
10-nov	19:05	3515	2,4	20,0	21,0	21,3	22,3	22,3	22,3
11-nov	11:05	4475	3,1	28,3	28,0	30,3	30,8	30,5	30,8
11-nov	17:05	4835	3,4	31,3	30,8	33,0	33,3	33,3	33,3
12-nov	09:05	5795	4,0	39,3	38,8	42,3	41,5	41,8	41,0
12-nov	14:05	6095	4,2	41,0	40,5	44,3	44,0	44,5	44,0
12-nov	18:05	6335	4,4	42,3	42,5	46,3	46,0	45,0	45,8
13-nov	09:05	7235	5,0	50,3	47,8	53,3	53,0	52,8	53,3
13-nov	15:05	7595	5,3	52,0	49,5	56,0	56,0	55,5	55,8
13-nov	19:05	7835	5,4	53,5	51,3	57,5	57,3	56,5	57,8
14-nov	10:05	8735	6,1	60,5	56,8	65,0	64,5	63,3	64,3
14-nov	14:35	9005	6,3	60,5	58,3	67,3	67,0	65,8	67,3
14-nov	18:35	9245	6,4	62,0	60,0	68,0	68,3	67,3	68,3
15-nov	09:35	10145	7,0	67,5	64,5	76,5	76,0	73,3	75,5

15-nov	13:35	10385	7,2	68,3	67,0	77,5	77,5	75,5	77,0
15-nov	17:35	10625	7,4	71,5	67,0	79,5	79,3	77,5	79,0
15-nov	20:35	10805	7,5	72,0	68,0	81,0	80,0	78,5	80,5
16-nov	16:15	11985	8,3	78,5	75,0	85,0	85,0	85,0	85,0
17-nov	07:15	12885	8,9	82,0	77,5				
18-nov	17:20	14930	10,4	85,0	85,0				

Tabla 22: Registro de datos del crecimiento de *A. tenuissima* (agresividad leve) sobre PDA a 30 °C (a_w : 0,99)

A partir de los datos anteriores se trazaron las curvas de crecimiento para cada réplica, obteniéndose el gráfico que se presenta a continuación.

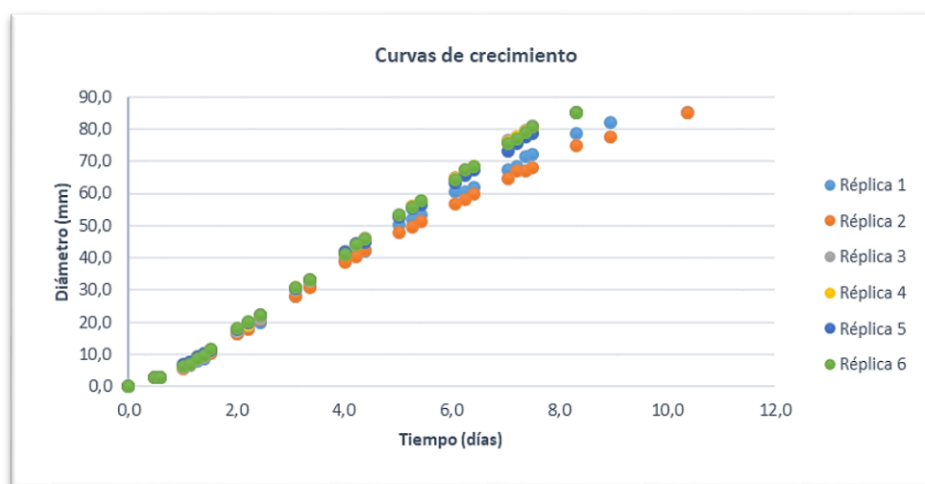


Fig. 87: Curvas de crecimiento de *A. tenuissima* (agresividad leve) a 30 °C sobre PDA (a_w :0,99)

Las velocidades de crecimiento de cada réplica se calcularon considerando la parte lineal de cada curva, mediante regresión lineal (Figs. 88 a 93). La velocidad de crecimiento se determinó como la pendiente de la recta, quedando expresada en mm/día.

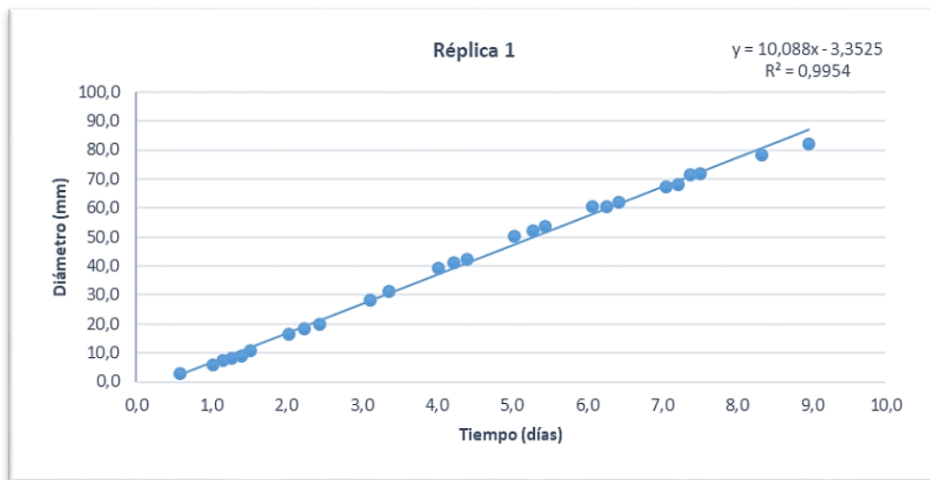


Fig. 88: Determinación de la velocidad de crecimiento para la réplica 1

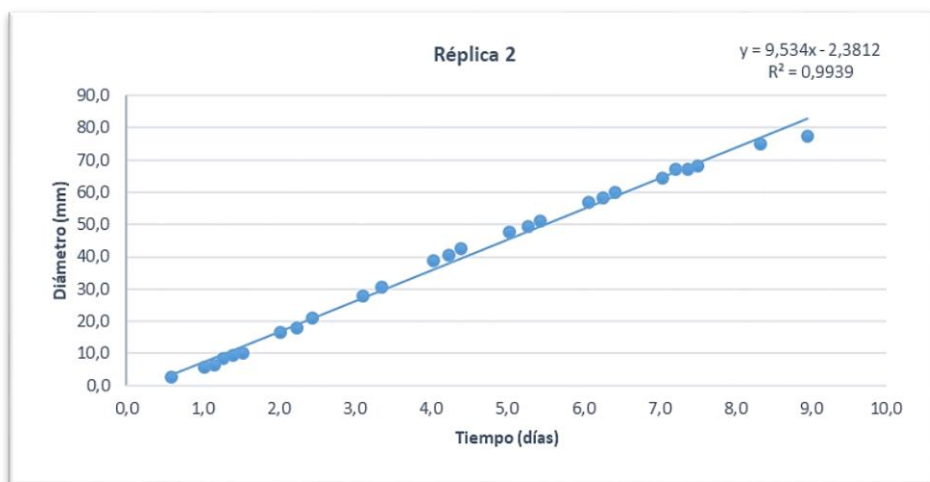


Fig. 89: Determinación de la velocidad de crecimiento para la réplica 2

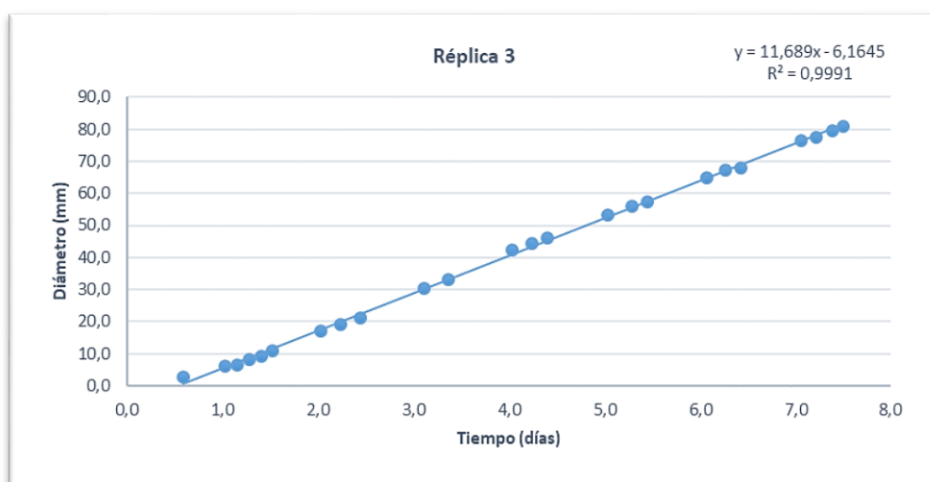


Fig. 90: Determinación de la velocidad de crecimiento para la réplica 3

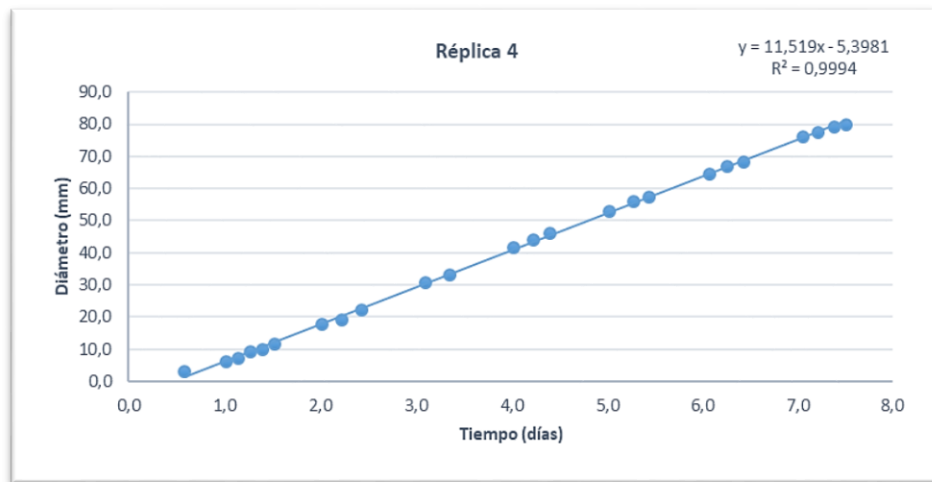


Fig. 91: Determinación de la velocidad de crecimiento para la réplica 4

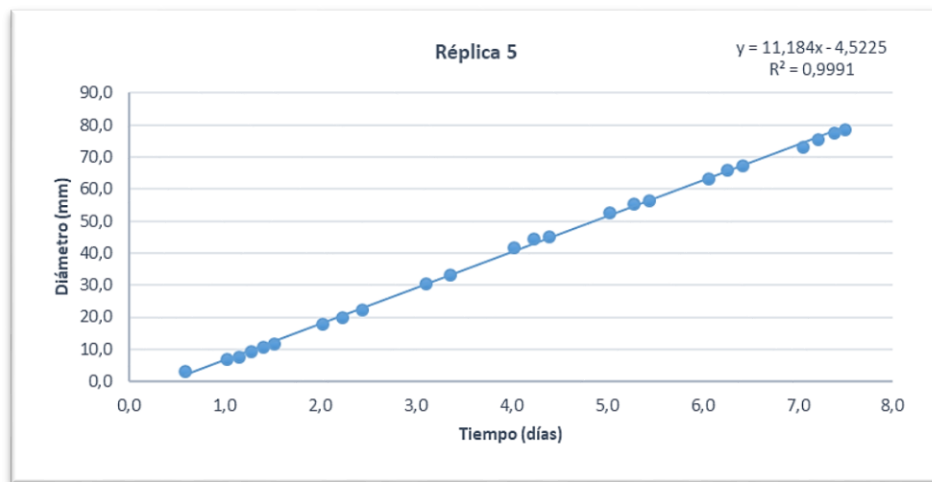


Fig. 92: Determinación de la velocidad de crecimiento para la réplica 5

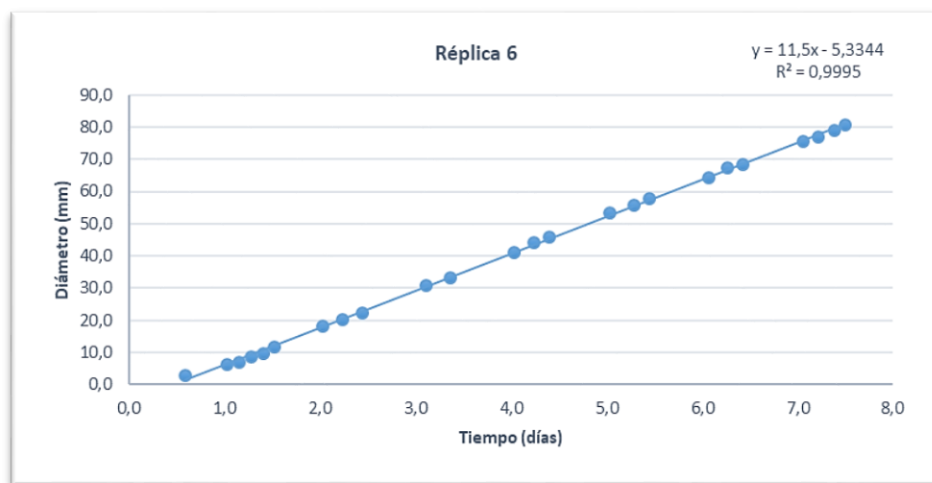


Fig. 93: Determinación de la velocidad de crecimiento para la réplica 6

Finalmente, promediando los valores obtenidos, se calculó la velocidad media de crecimiento para la condición dada (Tabla 23).

Réplica	Velocidad (mm/día)	Velocidad media (mm/día)
1	10,088	10,92
2	9,534	
3	11,689	
4	11,519	
5	11,184	
6	11,500	

Tabla 23: Velocidades de crecimiento obtenidas para cada una de las réplicas y velocidad media de crecimiento determinada para la condición: a_w : 0,99, T: 30 °C, agresividad: leve

El procedimiento anterior se repitió sobre las demás condiciones de crecimiento. A continuación, las tablas 24 a 30 presentan las velocidades medias de crecimiento obtenidas para los aislamientos de *A. tenuissima* bajo las diferentes condiciones ensayadas. Las figuras 94, 95 y 96 ilustran los datos.

Velocidad media (mm/día) a_w : 0,99						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	0,00	0,00	10,92	13,19	7,17	2,30
Media	0,00	0,00	8,22	12,63	7,58	1,77
Severa	0,00	0,00	4,89	12,32	4,81	2,25

Tabla 24: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,99)

Velocidad media (mm/día) a_w : 0,97						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	9,33	8,85	3,96	1,18
Media	-	-	8,91	9,20	3,55	1,07
Severa	-	-	3,06	5,02	2,22	0,69

Tabla 25: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,97)

Velocidad media (mm/día) a_w : 0,95						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	2,92	2,23	1,43	0,28
Media	-	-	4,12	4,46	1,31	0,32
Severa	-	-	2,63	2,15	1,34	0,30

Tabla 26: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,95)

Velocidad media (mm/día) a_w : 0,93						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	1,26	1,32	0,69	0,07
Media	-	-	1,01	1,34	0,67	0,08
Severa	-	-	1,49	1,55	0,55	0,04

Tabla 27: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,93)

Velocidad media (mm/día) a_w : 0,90						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	0,19	0,44	0,15	0,00
Media	-	-	0,08	0,25	0,18	0,00
Severa	-	-	0,13	0,27	0,05	0,00

Tabla 28: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,90)

Velocidad media (mm/día) a_w : 0,88						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	0,00	0,15	0,00	-
Media	-	-	0,00	0,05	0,00	-
Severa	-	-	0,00	0,20	0,00	-

Tabla 29: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,88)

Velocidad media (mm/día) a_w : 0,85						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	-	0,00	-	-
Media	-	-	-	0,00	-	-
Severa	-	-	-	0,00	-	-

Tabla 30: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,85)

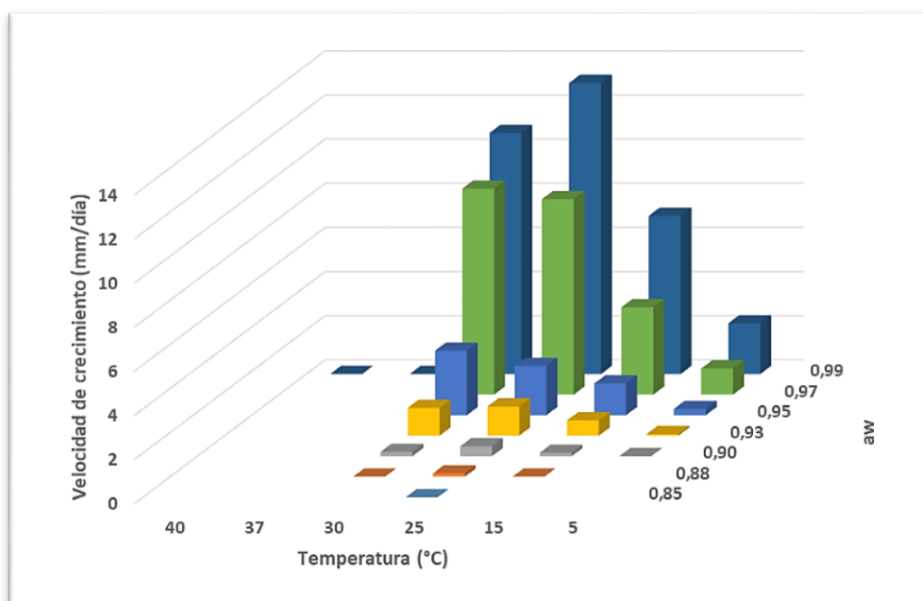


Fig. 94: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* a diferentes temperaturas y actividad de agua.
Aislamiento de agresividad leve

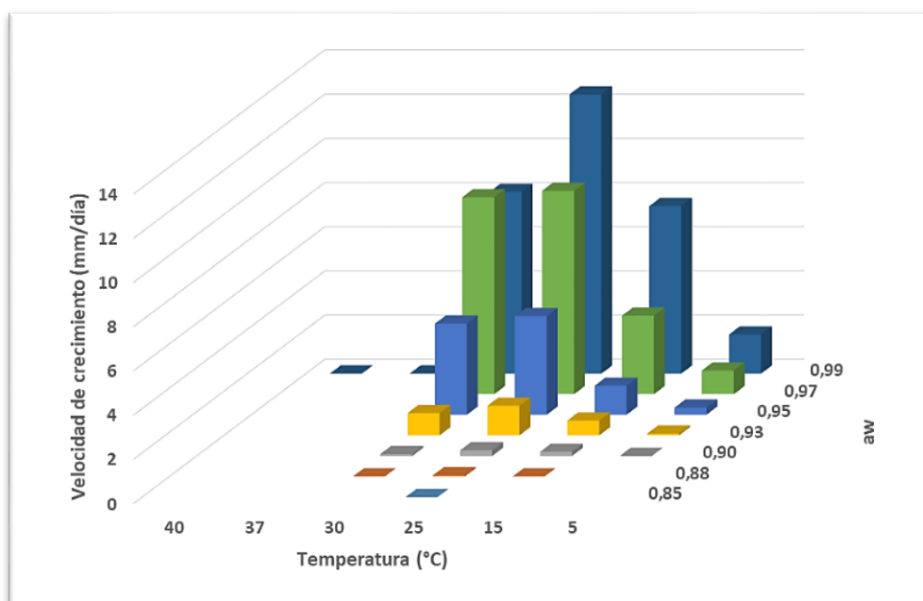


Fig. 95: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* a diferentes temperaturas y actividad de agua.
Aislamiento de agresividad media

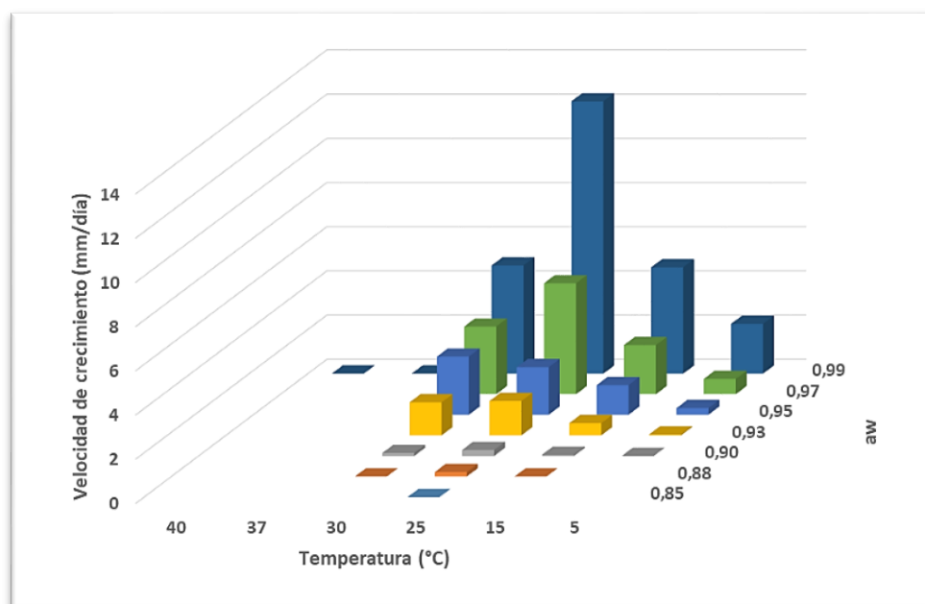


Fig. 96: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* a diferentes temperaturas y actividad de agua.

Aislamiento de agresividad severa

El análisis estadístico demostró que la interacción de los tres factores (temperatura, actividad acuosa, nivel de agresividad) afectó significativamente la velocidad de crecimiento de *A. tenuissima*, indicando que los factores estudiados no actúan independientemente (Figs. 97, 98 y 99).

En general, las mayores velocidades de crecimiento fúngico se registraron a 25 y 30 °C y a valores de a_w de 0,99 y 0,97, siendo la condición óptima 25 °C y un valor de a_w de 0,99. Bajo esta misma condición de actividad de agua, se obtuvieron las mayores velocidades para todas las temperaturas en las que el hongo fue capaz de crecer, a excepción de 30 °C para el aislamiento de agresividad media, cuya velocidad de crecimiento fue mayor para la a_w de 0,97. En la mayoría de los casos, a medida que los valores de a_w decrecieron, las velocidades de crecimiento disminuyeron significativamente, sin observarse desarrollo a 0,85, indicando que el crecimiento de *A. tenuissima* se ve favorecido por altos valores de actividad acuosa. En general, para un mismo valor de a_w , las velocidades disminuyeron según el siguiente orden de temperaturas: 25, 30, 15, 5 °C. A 37 y 40 °C, no se observó crecimiento fúngico. Aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de agresividad leve y medio, los aislamientos correspondientes a la categoría severo, bajo determinadas condiciones de incubación, presentaron menores velocidades de crecimiento (Figs. 97, 98 y 99).

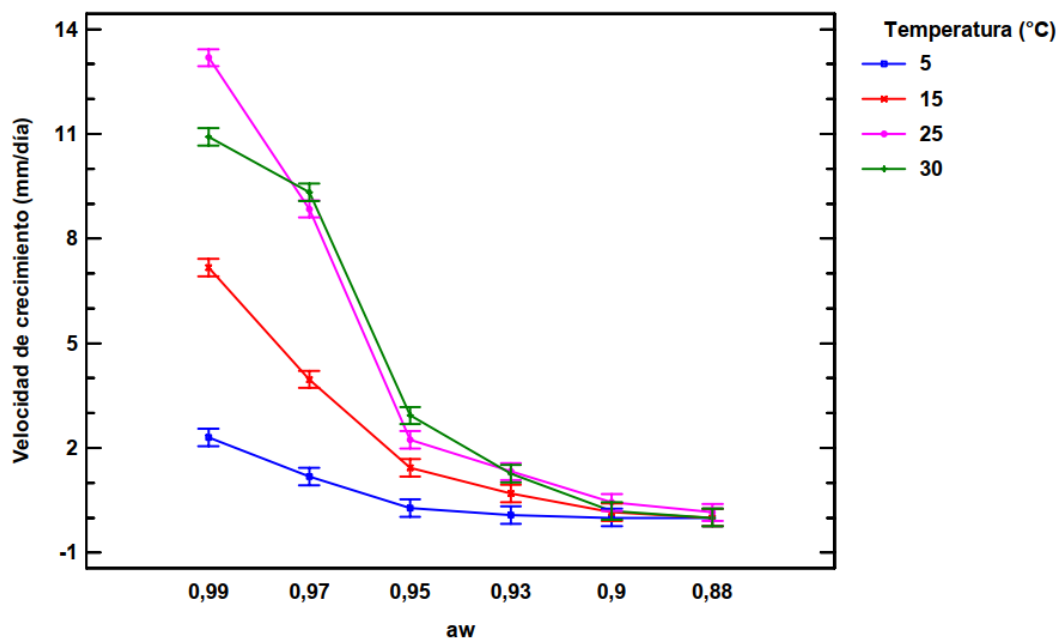


Fig. 97: Velocidad de crecimiento de *A. tenuissima*. Aislamiento de agresividad leve.

Gráfico de interacción entre los factores actividad de agua y temperatura. Medias e intervalos HSD de Tukey (95 %)

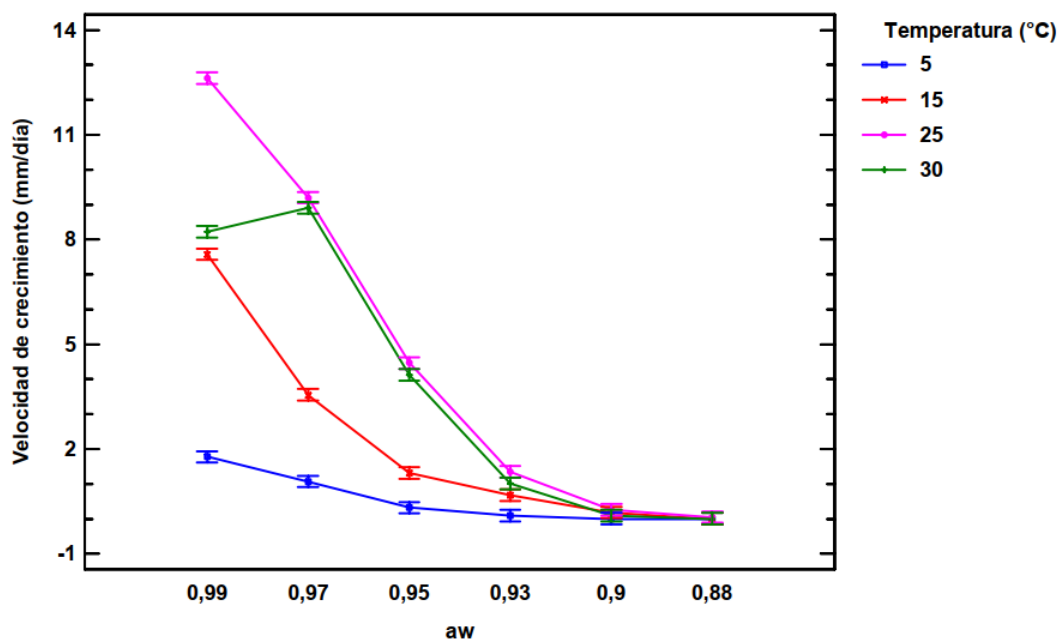


Fig. 98: Velocidad de crecimiento de *A. tenuissima*. Aislamiento de agresividad media.

Gráfico de interacción entre los factores actividad de agua y temperatura. Medias e intervalos HSD de Tukey (95 %)

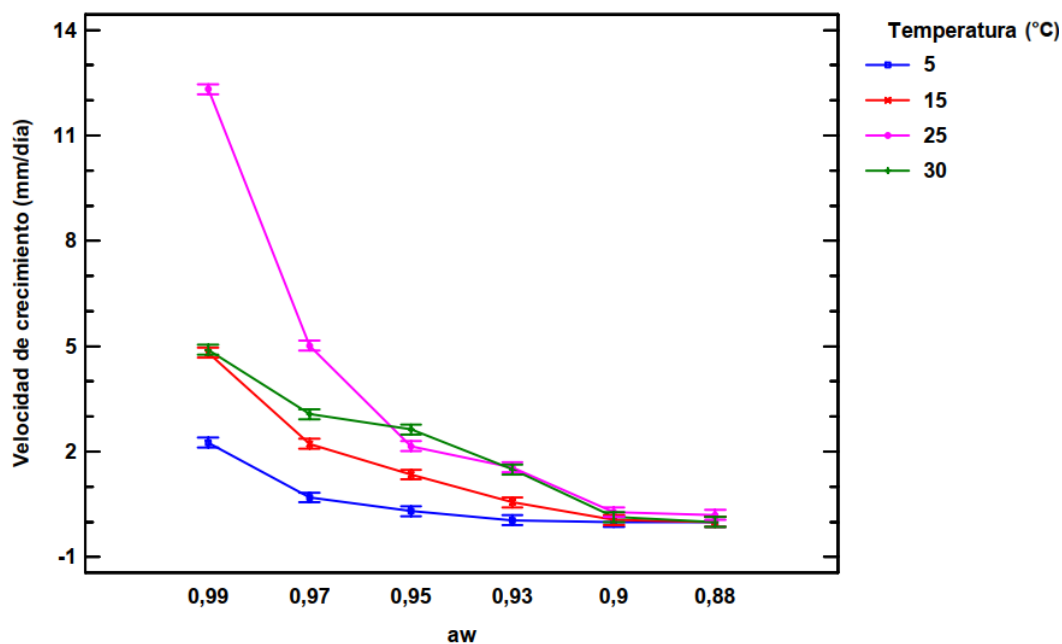
Fig. 99: Velocidad de crecimiento de *A. tenuissima*. Aislamiento de agresividad severa.

Gráfico de interacción entre los factores actividad de agua y temperatura. Medias e intervalos HSD de Tukey (95 %)

Respecto a la germinación, en las tablas 31 a 37 se detalla el promedio de días acumulados que fueron necesarios para que se produzca la germinación de las réplicas, momento determinado por la producción del tubo germinativo con longitud similar al diámetro del conidio en el 50 % del inóculo.

Tiempo de germinación a_w : 0,99						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	16,0	0,2	0,2	0,2	0,4	1,0
Media	13,0	0,2	0,2	0,2	0,4	1,0
Severa	9,2	0,3	0,2	0,3	0,5	1,3

Tabla 31: Tiempo de germinación (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,99)

Tiempo de germinación a_w : 0,97						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	ng*	0,1	0,2	0,2	0,4	1,4
Media	ng*	0,1	0,2	0,2	0,4	1,4
Severa	ng*	0,1	0,2	0,3	0,5	1,4

Tabla 32: Tiempo de germinación (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,97)

*ng: no germina

Tiempo de germinación a_w : 0,95						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	0,2	0,5	0,6	2,0	4,0
Media	-	0,2	0,4	0,5	1,3	2,3
Severa	-	0,2	0,5	0,6	2,0	5,1

Tabla 33: Tiempo de germinación (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,95)

Tiempo de germinación a_w : 0,93						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	0,3	0,5	0,5	2,0	13,6
Media	-	0,3	0,6	0,6	2,1	6,6
Severa	-	0,3	0,5	0,8	2,0	14,0

Tabla 34: Tiempo de germinación (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,93)

Tiempo de germinación a_w : 0,90						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	ng*	1,5	1,5	10,5	ng*
Media	-	ng*	1,2	1,2	5,6	ng*
Severa	-	ng*	1,6	1,8	7,6	ng*

Tabla 35: Tiempo de germinación (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,90)

*ng: no germina

Tiempo de germinación a_w : 0,88						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	1,8	2,1	ng*	-
Media	-	-	1,9	1,9	ng*	-
Severa	-	-	1,7	1,8	ng*	-

Tabla 36: Tiempo de germinación (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,88)

*ng: no germina

Tiempo de germinación a_w : 0,85						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	ng*	ng*	-	-
Media	-	-	ng*	ng*	-	-
Severa	-	-	ng*	ng*	-	-

Tabla 37: Tiempo de germinación (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,85)

*ng: no germina

Los datos anteriores se ilustran en las figuras 100, 101 y 102. El análisis estadístico demostró que tanto la temperatura, como la actividad acuosa, afectaron significativamente la germinación de los conidios de *A. tenuissima* (Figs. 103 y 104).

Los menores tiempos de germinación ocurrieron a valores de a_w elevados, 0,99, 0,97, e incluso a 0,95, junto a valores de temperaturas de 25, 30 y 37 °C, registrándose tiempos de germinación similares para estos casos. En términos generales, el periodo de tiempo necesario para la germinación aumentó con el descenso de la actividad acuosa. Los conidios no germinaron, en ninguna de las temperaturas evaluadas, cuando el valor de a_w fue de 0,85. Respecto a la temperatura, a 40 °C sólo se observó germinación para el máximo valor de actividad acuosa. Generalmente, bajo un mismo valor de a_w , no existieron diferencias significativas entre los tiempos de germinación a 37, 30 y 25 °C, aumentando significativamente a 15 y 5 °C. No se detectaron diferencias significativas entre los distintos niveles de agresividad ensayados (Fig. 105).

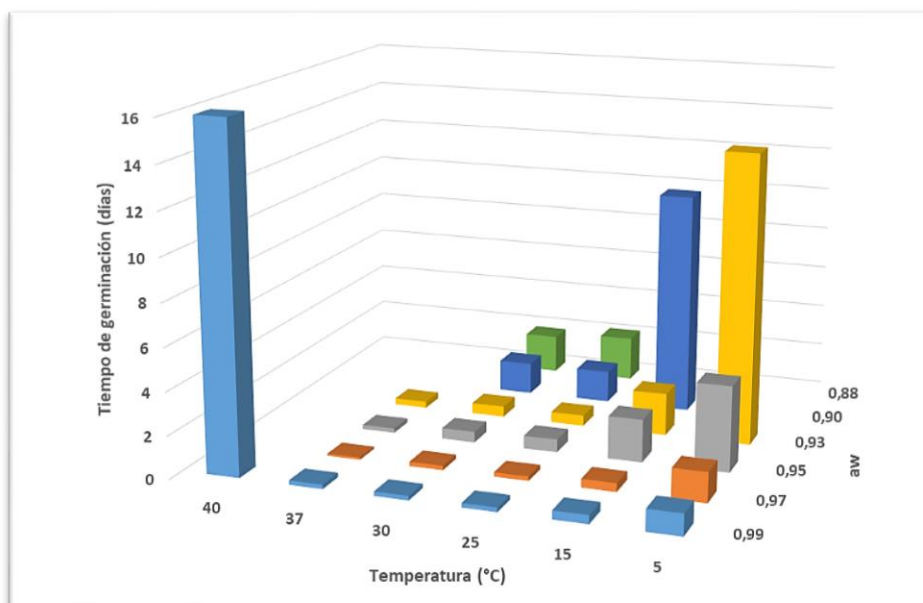


Fig. 100: Tiempo de germinación de *A. tenuissima* a diferentes temperaturas y actividad de agua.

Aislamiento de agresividad leve

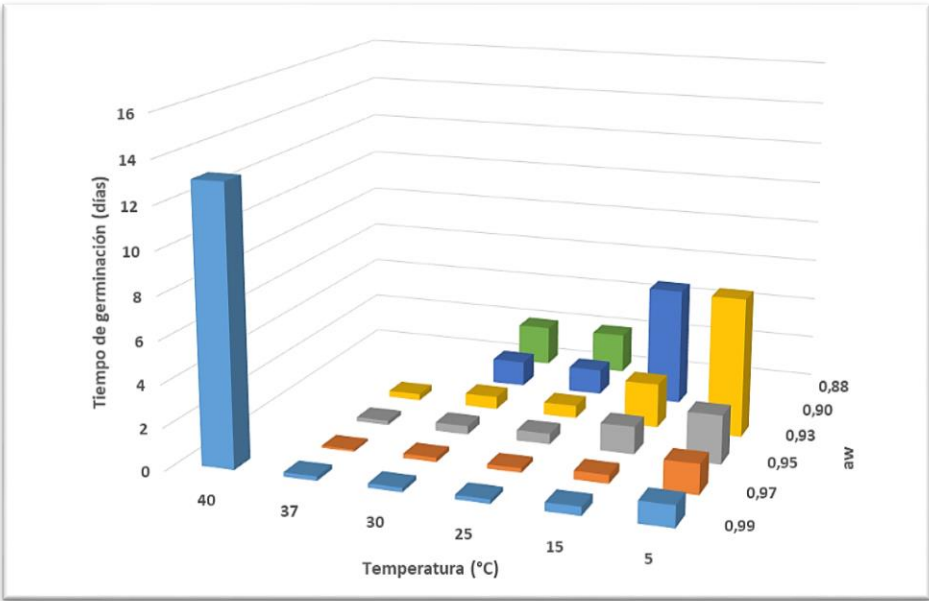


Fig. 101: Tiempo de germinación de *A. tenuissima* a diferentes temperaturas y actividad de agua.
Aislamiento de agresividad media

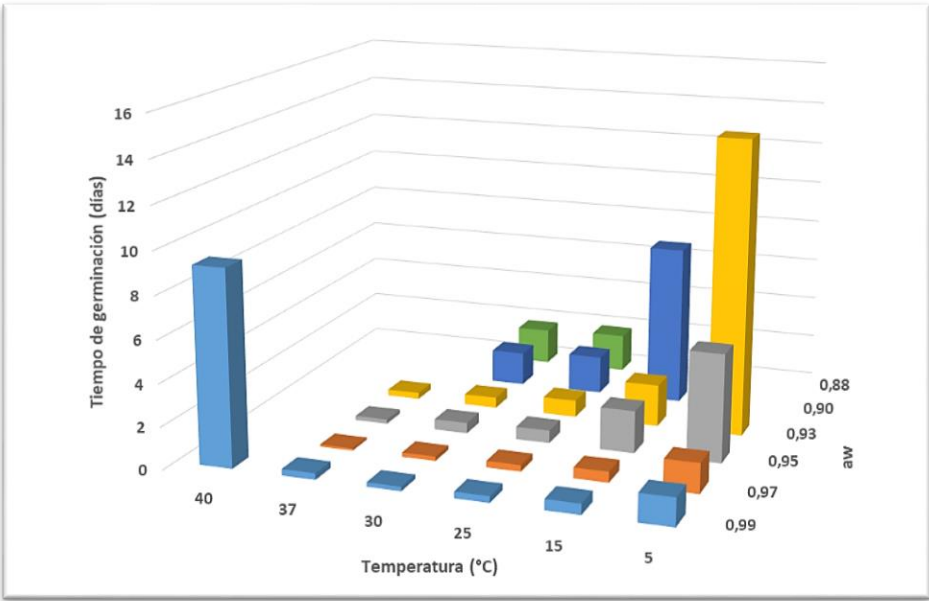


Fig. 102: Tiempo de germinación de *A. tenuissima* a diferentes temperaturas y actividad de agua.
Aislamiento de agresividad severa

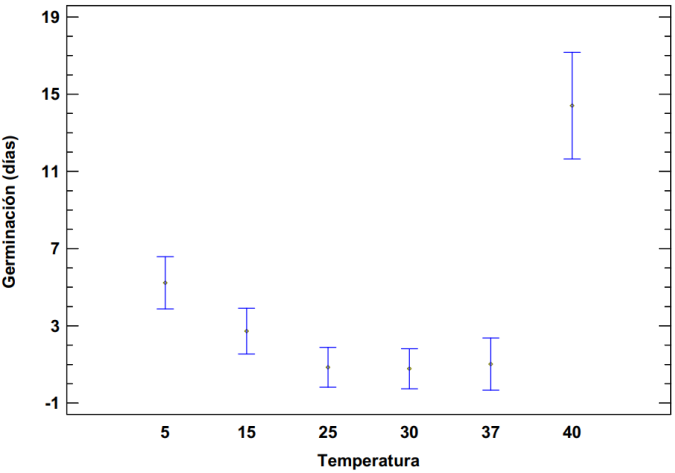


Fig. 103: Medias e intervalos de Bonferroni (95 %).
Tiempos de germinación de *A. tenuissima* a diferentes temperaturas

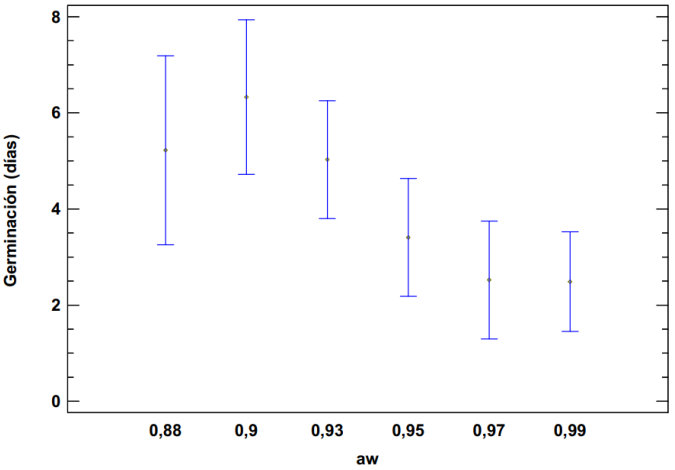


Fig. 104: Medias e intervalos de Bonferroni (95 %)
Tiempos de germinación de *A. tenuissima* a diferentes valores de a_w

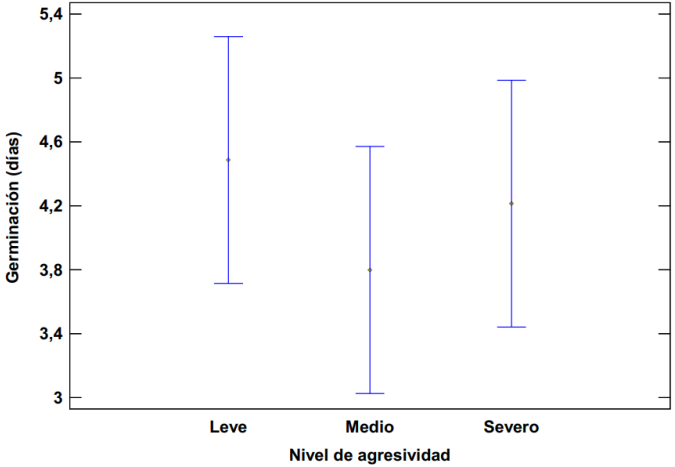


Fig. 105: Medias e intervalos HSD de Tukey (95 %).
Tiempos de germinación de aislamientos de *A. tenuissima*

Respecto a la formación de microcolonias y colonias, a continuación, en las tablas 38 a 49, se detallan las cantidades de días transcurridos hasta su respectiva formación.

Formación de microcolonias a_w : 0,99						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	nm*	6,1	0,5	0,5	0,6	2,3
Media	nm*	17,1	0,4	0,5	1,1	2,0
Severa	nm*	19,1	0,7	0,7	1,3	2,5

Tabla 38: Tiempo necesario para la formación de microcolonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,99)

*nm: no forma microcolonias

Formación de microcolonias a_w : 0,97						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	10,0	0,4	0,5	1,3	4,3
Media	-	21,0	0,6	0,6	1,3	4,3
Severa	-	10,0	0,4	0,6	1,3	4,3

Tabla 39: Tiempo necesario para la formación de microcolonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,97)

Formación de microcolonias a_w : 0,95						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	10,0	1,4	1,6	4,0	21,0
Media	-	10,0	1,2	1,3	3,4	17,3
Severa	-	10,0	1,4	1,6	3,9	18,9

Tabla 40: Tiempo necesario para la formación de microcolonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,95)

Formación de microcolonias a_w : 0,93						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	2,0	1,5	1,5	4,5	28,6
Media	-	5,0	1,5	1,5	4,5	24,6
Severa	-	2,0	1,5	1,5	4,5	27,7

Tabla 41: Tiempo necesario para la formación de microcolonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,93)

Formación de microcolonias a_w : 0,90						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	2,7	2,7	20,5	-
Media	-	-	2,6	2,6	8,6	-
Severa	-	-	2,1	2,6	12,6	-

Tabla 42: Tiempo necesario para la formación de microcolonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,90)

Formación de microcolonias a_w : 0,88						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	8,9	3,9	-	-
Media	-	-	10,9	4,1	-	-
Severa	-	-	4,7	3,7	-	-

Tabla 43: Tiempo necesario para la formación de microcolonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,88)

Formación de colonias a_w : 0,99						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	nc*	0,6	0,6	1,3	4,0
Media	-	nc*	0,6	0,6	1,4	3,0
Severa	-	nc*	1,0	1,0	2,0	5,4

Tabla 44: Tiempo necesario para la formación de colonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,99)

*nc: no forma colonias

Formación de colonias a_w : 0,97						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	nc*	0,9	1,1	2,0	7,0
Media	-	nc*	1,0	1,0	2,0	7,0
Severa	-	nc*	0,9	1,1	2,1	7,1

Tabla 45: Tiempo necesario para la formación de colonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,97)

*nc: no forma colonias

Formación de colonias a_w : 0,95						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	nc*	2,0	2,0	7,0	24,0
Media	-	nc*	2,0	2,0	4,4	20,1
Severa	-	nc*	2,0	2,0	5,1	21,1

Tabla 46: Tiempo necesario para la formación de colonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,95)

*nc: no forma colonias

Formación de colonias a_w : 0,93						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	nc*	2,6	2,0	7,6	33,6
Media	-	nc*	2,0	2,0	6,5	30,6
Severa	-	nc*	1,9	2,0	6,5	31,7

Tabla 47: Tiempo necesario para la formación de colonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,93)

*nc: no forma colonias

Formación de colonias a_w : 0,90						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	4,6	3,7	23,5	-
Media	-	-	4,6	4,6	11,6	-
Severa	-	-	3,6	4,6	17,6	-

Tabla 48: Tiempo necesario para la formación de colonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,90)

Formación de colonias a_w : 0,88						
Agresividad	40°C	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	-	nc*	6,9	-	-
Media	-	-	nc*	6,9	-	-
Severa	-	-	nc*	6,7	-	-

Tabla 49: Tiempo necesario para la formación de colonias (días) de *A. tenuissima* sobre PDA (a_w : 0,88)

*nc: no forma colonias

Los datos anteriores se presentan en las figuras 106, 107 y 108. Tanto la temperatura, como la actividad de agua afectaron los tiempos de formación de microcolonias y colonias (Figs. 109 y 110). Al igual que en el caso de la germinación, los niveles de agresividad no resultaron significativos (Fig. 111).

A 40 °C, bajo una a_w de 0,99, si bien hubo germinación, no se determinó crecimiento fúngico. Asimismo, a 37 °C, se observó la formación de microcolonias en el rango de actividad acuosa 0,93-0,99, sin embargo, tampoco se registró crecimiento a esta temperatura. Para un determinado valor de actividad acuosa, la formación de microcolonias fue más rápida a 25 y 30 °C. El orden de los demás valores de temperaturas varió de acuerdo al valor de a_w ensayado. Teniendo en cuenta un orden decreciente de la rapidez de formación, las temperaturas mencionadas fueron seguidas de 15-5-37 °C (a_w : 0,99 y 0,97), 15-37-5 °C (a_w : 0,93) y 37-15-5 °C (a_w : 0,95). Sin embargo, cabe mencionar que, para el aislamiento de agresividad leve, no

existieron diferencias significativas entre los tiempos de formación de microcolonias a 30, 25 y 15 °C cuando la a_w fue de 0,99. En general, bajo un determinado valor de temperatura, la formación de microcolonias fue más lenta a medida que disminuyeron los valores de a_w .

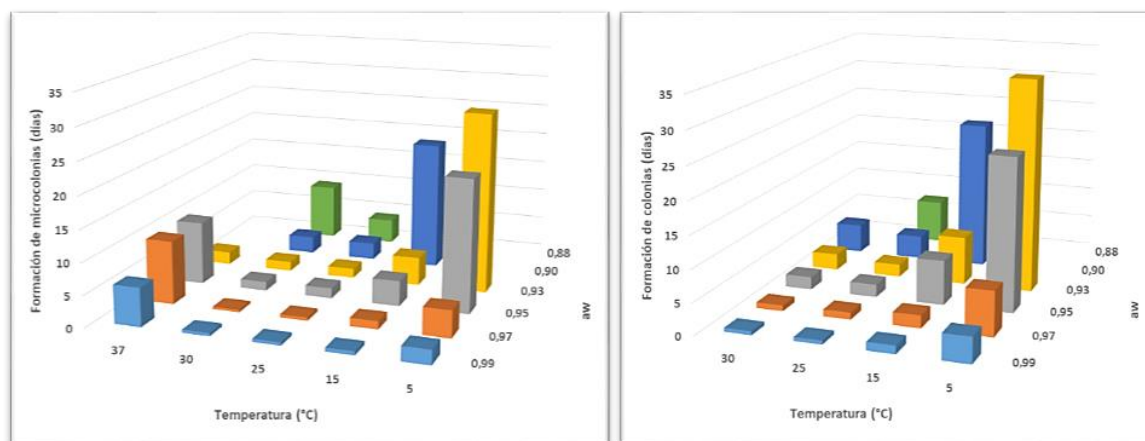


Fig. 106: Tiempo necesario para la formación de microcolonias y colonias de *A. tenuissimas* sobre PDA a diferentes temperaturas y actividad de agua. Aislamiento de agresividad leve

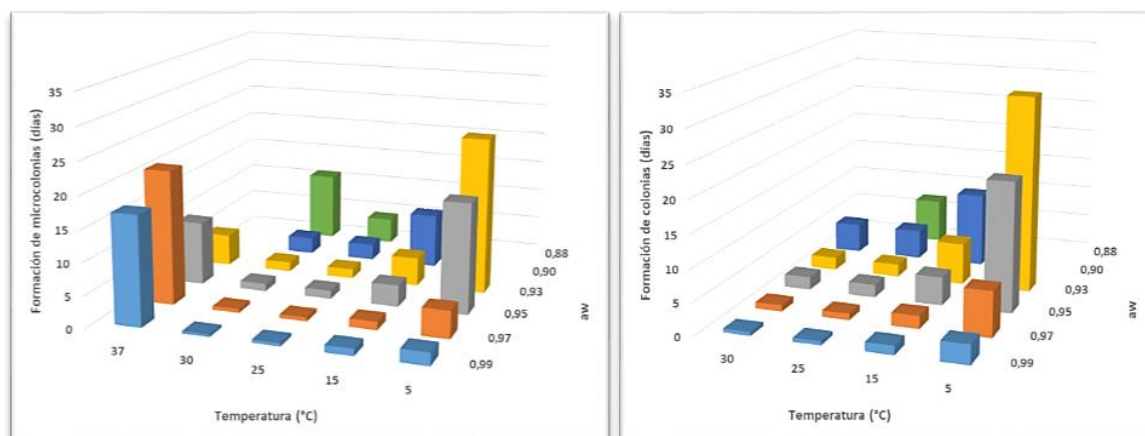


Fig. 107: Tiempo necesario para la formación de microcolonias y colonias de *A. tenuissimas* sobre PDA a diferentes temperaturas y actividad de agua. Aislamiento de agresividad media

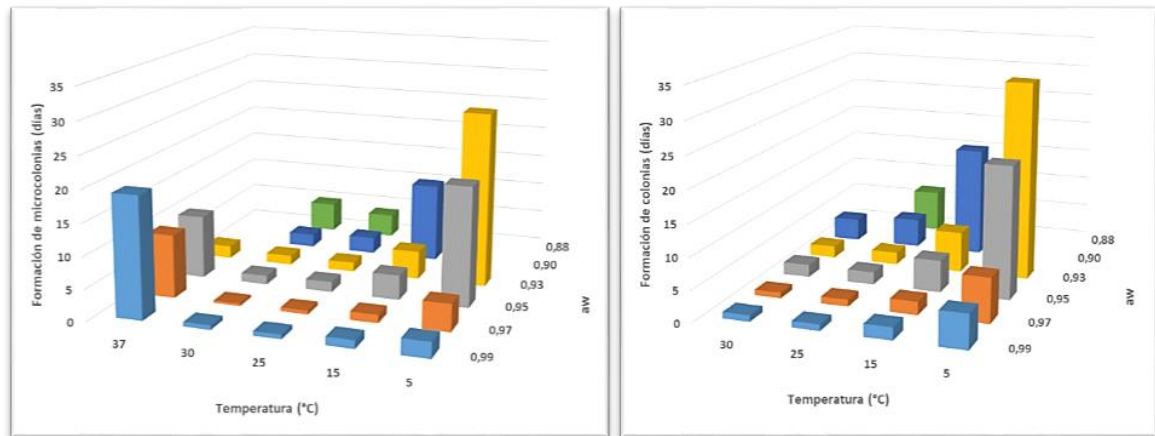


Fig. 108: Tiempo necesario para la formación de microcolonias y colonias de *A. tenuissima* sobre PDA a diferentes temperaturas y actividad de agua. Aislamiento de agresividad severa

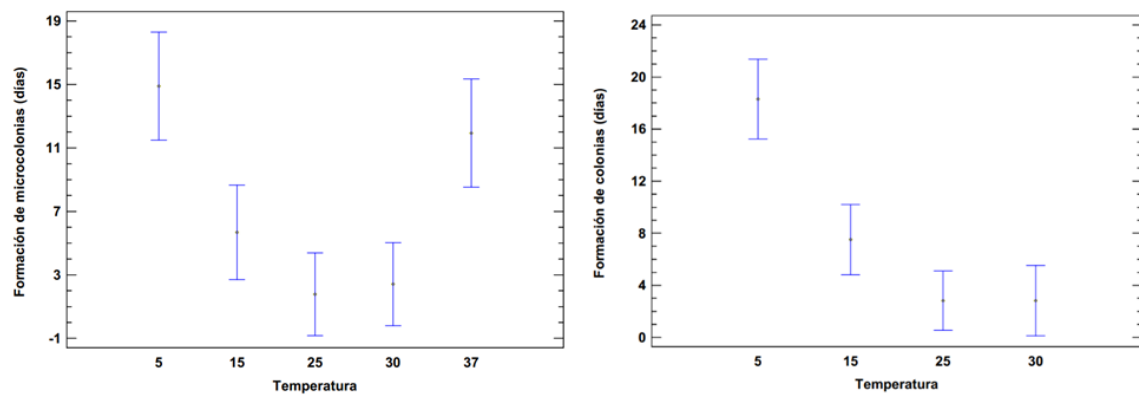


Fig. 109: Medias e intervalos de Bonferroni (95 %)

Tiempos necesarios para la formación de microcolonias y colonias de *A. tenuissima* a diferentes temperaturas

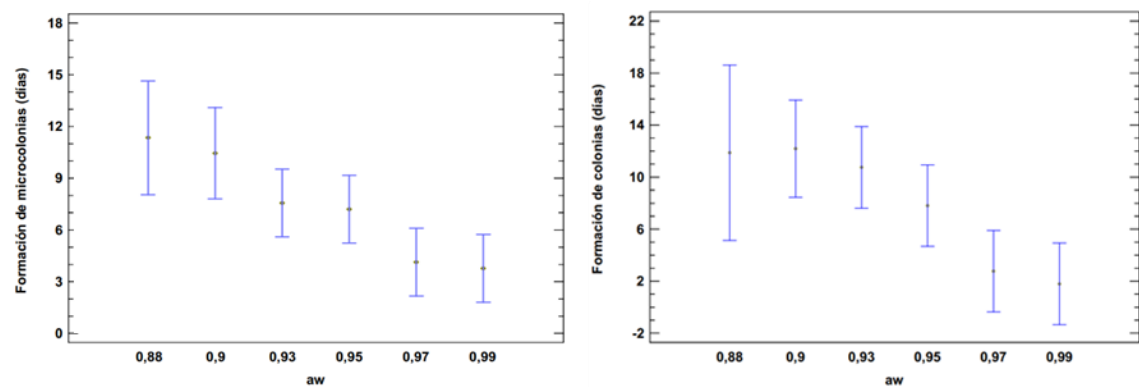


Fig. 110: Medias e intervalos de Bonferroni (95 %)

Tiempos necesarios para la formación de microcolonias y colonias de *A. tenuissima* a diferentes valores de a_w

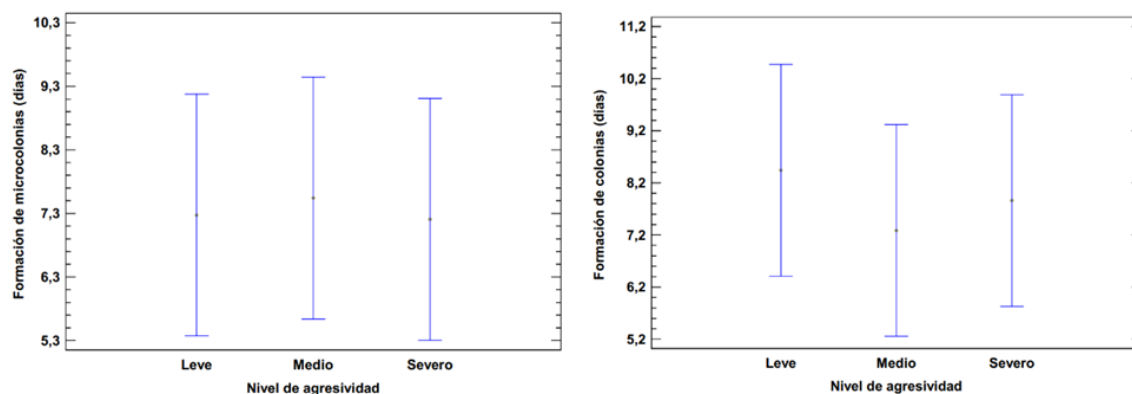


Fig. 111: Medias e intervalos HSD de Tukey (95 %).

Tiempos necesarios para la formación de microcolonias y colonias de *A. tenuissima*

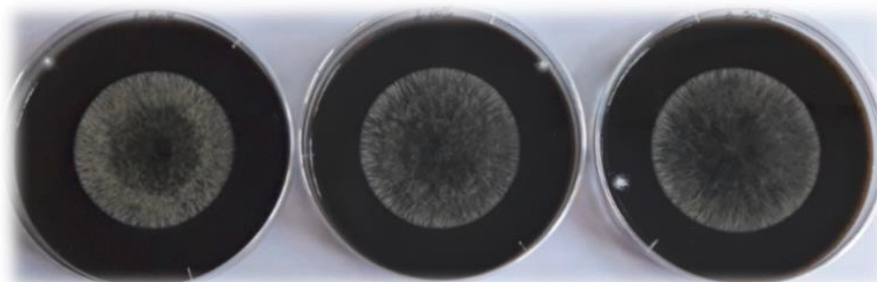
Alternaria tenuissima creció en el rango de temperaturas comprendido por 5 y 30 °C, cuando los valores de actividad acuosa estuvieron comprendidos entre 0,93 y 0,99. Cuando el valor de a_w fue de 0,90, se observó formación de colonias en el rango de temperaturas 15-30 °C, mientras que a 0,88 sólo se observó crecimiento a 25 °C. La formación de las colonias fúngicas se vio favorecida por altos valores de actividad acuosa, siendo más rápida a 0,99 y 0,97, para todas las temperaturas evaluadas. A medida que disminuyó el valor de a_w , el periodo de tiempo necesario para la formación de las mismas se incrementó. Respecto a las temperaturas, 25 y 30 °C fueron los valores más favorecedores, seguidos por 15 y 5 °C. La mayor rapidez observada en el desarrollo de las colonias fúngicas fue de aproximadamente 14,5 horas (0,6 días), valor registrado a temperaturas de 25 y 30 °C, junto a una actividad acuosa de 0,99. Asimismo, el desarrollo más lento se registró a 5 °C, a un valor de a_w de 0,93, siendo de aproximadamente 34 días (33,6 días).

8.3.2 Ecofisiología sobre agar Nuez

Respecto al medio de cultivo desarrollado, a partir de 70 frutos sanos e inmaduros de variedad Chandler, recolectados tras transcurrir 20 días después del cuaje, fue posible obtener 1 kg de pulpa.

El medio resultó adecuado para sostener el crecimiento de *A. tenuissima*, y no se observaron diferencias importantes en el crecimiento con diferentes contenidos de pulpa (Tabla 50). Sin embargo, las opciones con mayores concentraciones resultaron muy espesas y dificultaron su distribución en las placas de Petri. La figura 112 muestra el desarrollo fúngico sobre el medio ANz conteniendo las diferentes concentraciones evaluadas tras 10 días de incubación a 25 °C.

Crecimiento de <i>A. tenuissima</i> sobre ANz a 25 °C		
Contenido de pulpa	Diámetro promedio (mm)	
	7 días	10 días
50 %	54,3	68,5
60 %	53,5	66,8
80 %	51,0	67,8

Tabla 50: Crecimiento de *A. tenuissima* sobre ANz a 25 °CFig. 112: Crecimiento de *A. tenuissima* a 25 °C sobre ANz conteniendo diferentes proporciones de pulpa.

De izquierda a derecha: 80 %, 60 %, 50 %

A partir de las observaciones anteriores, la experiencia se llevó a cabo utilizando la preparación cuyo contenido de pulpa fue del 50 %.

Las velocidades medias de crecimiento de los aislamientos sobre ANz se detallan en la tabla 51 y se ilustran en la figura 113. El análisis estadístico demostró que la interacción entre los dos factores (temperatura y nivel de agresividad) afectó significativamente la velocidad de crecimiento de *A. tenuissima*, indicando que los factores estudiados no actúan independientemente (Fig. 114).

Las mayores velocidades de crecimiento se observaron a 30 °C, disminuyendo significativamente a medida que la temperatura se redujo, a excepción del aislamiento de agresividad severa, cuyo crecimiento no presentó diferencias significativas a 30 y 25 °C. A 37 °C, el hongo no creció. Las velocidades de crecimiento del aislamiento de agresividad media fueron superiores a 30, 25 y 15 °C, sin existir diferencias significativas en el crecimiento de los demás, a excepción de 25 °C, donde el aislamiento de agresividad leve fue más lento. A 5 °C, las velocidades de crecimiento fueron similares entre sí (Fig. 114).

Velocidad media de crecimiento (mm/día)					
Agresividad	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	0,00	4,67	4,30	2,42	0,91
Media	0,00	5,43	4,81	2,93	0,84
Severa	0,00	4,70	4,62	2,48	0,95

Tabla 51: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* sobre ANz

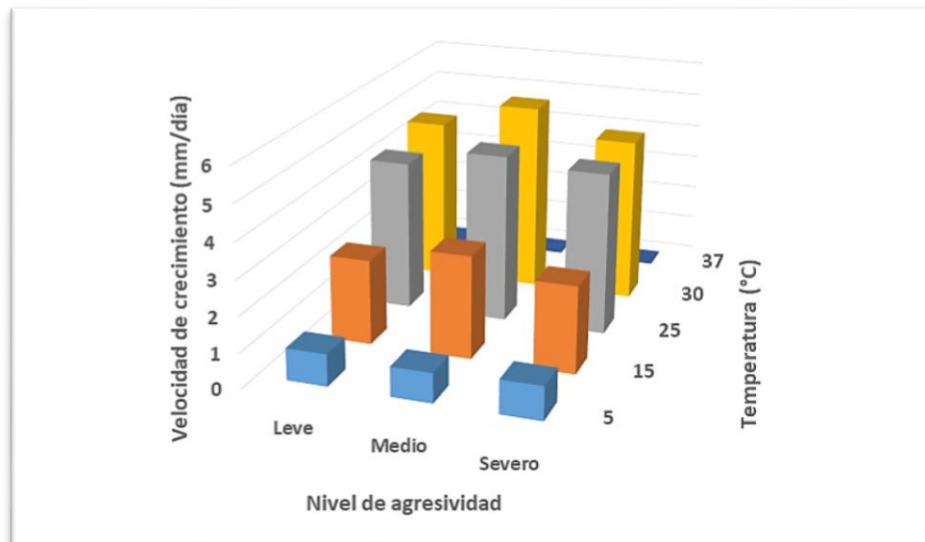


Fig. 113: Velocidades medias de crecimiento de *A. tenuissima* sobre ANz a diferentes temperaturas

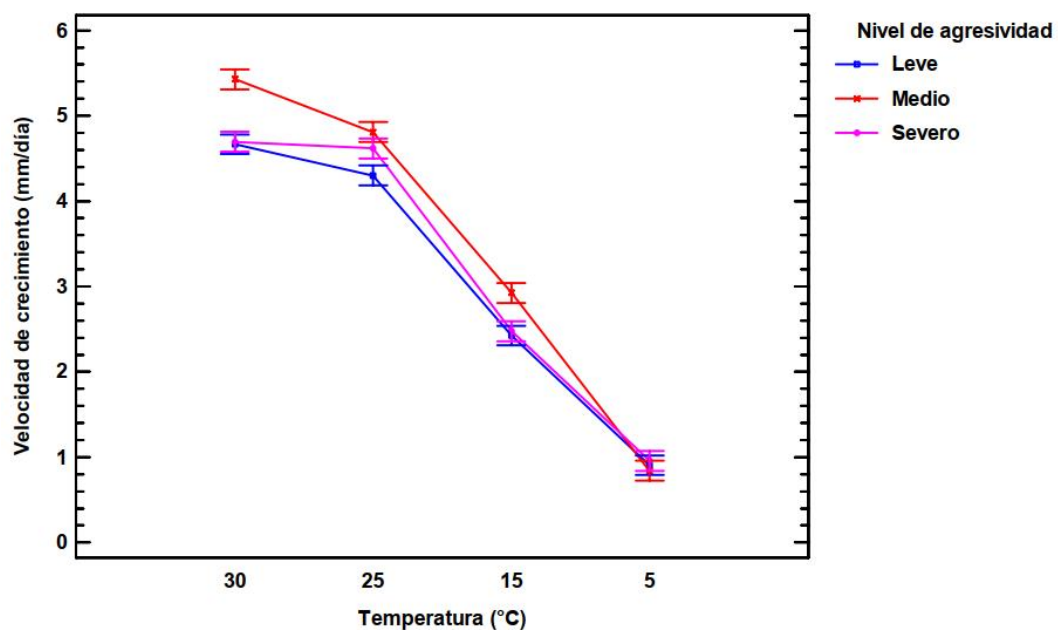


Fig. 114: Velocidades de crecimiento de *A. tenuissima* sobre ANz.

Gráfico de interacción entre los factores temperatura y nivel de agresividad. Medias e intervalos HSD de Tukey (95 %)

Respecto a la formación de microcolonias, en la tabla 52 se detallan los días transcurridos hasta su desarrollo. La figura 115, ilustra los datos. El análisis estadístico demostró que la interacción entre ambos factores (temperatura y nivel de agresividad) resultó significativa (Fig. 116).

Las microcolonias fueron visibles rápidamente a 30, 25 y 15 °C, incrementándose significativamente los tiempos de formación cuando la temperatura disminuyó a 5 °C. Respecto a los niveles de agresividad, a 30 °C se detectaron diferencias significativas entre los niveles medio y leve, siendo más rápida la formación en el último caso, mientras que a 25 y 15 °C, no se observaron diferencias significativas. A 5 °C, la rapidez de formación de las microcolonias fue significativamente diferente para los tres aislamientos evaluados, siendo más rápida para el aislamiento de agresividad severa, y más lenta para el aislamiento de agresividad media (Fig. 116).

Formación de microcolonias (días)					
Agresividad	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	1,7	0,9	1,9	25,2
Media	-	4,1	2,0	3,2	31,0
Severa	-	2,7	1,9	2,5	22,3

Tabla 52: Tiempo necesario para la formación de microcolonias (días) de *A. tenuissima* sobre ANz

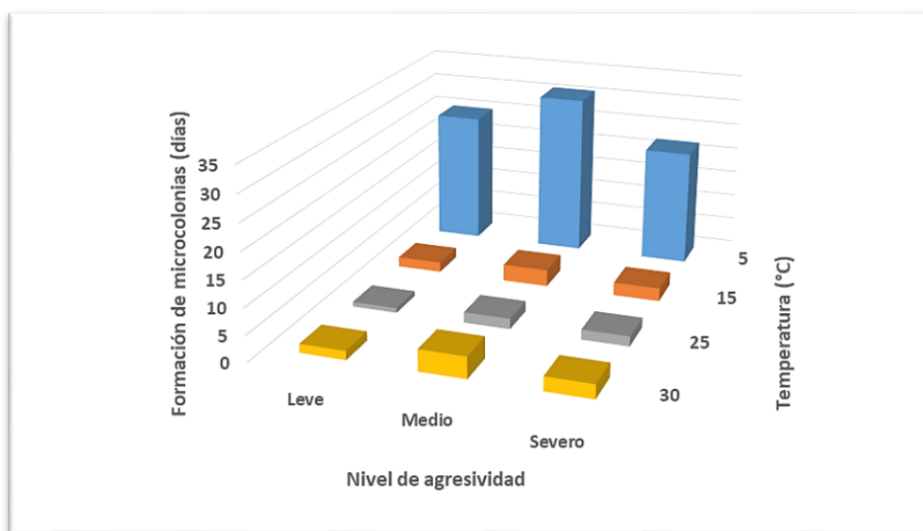


Fig. 115: Tiempo necesario para la formación de microcolonias de *A. tenuissima* sobre ANz a diferentes temperaturas

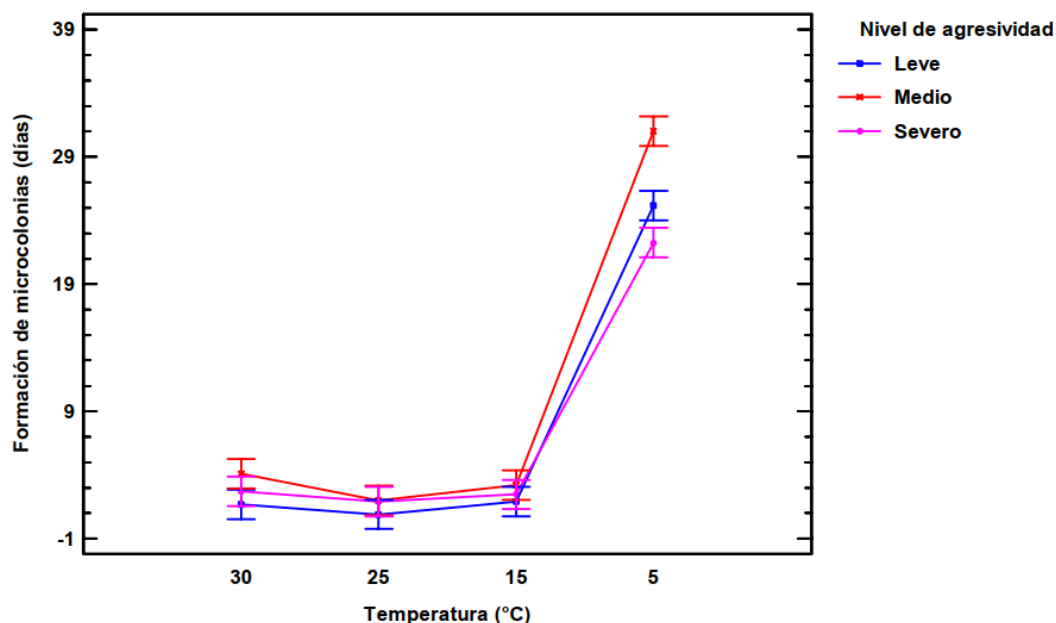
Fig. 116: Formación de microcolonias de *A. tenuissima* sobre ANz.

Gráfico de interacción entre los factores temperatura y nivel de agresividad. Medias e intervalos HSD de Tukey (95 %)

En cuanto a la formación de colonias, en la tabla 53 se detallan los días transcurridos hasta su observación. La figura 117, ilustra los datos. Al igual que en los casos anteriores, el análisis estadístico demostró que la interacción entre ambos factores (temperatura y nivel de agresividad) resultó significativa (Fig. 118).

Tal como sucedió con las microcolonias, las colonias se formaron rápidamente a 30, 25 y 15 °C, incrementándose significativamente los tiempos de formación cuando la temperatura disminuyó a 5 °C. Respecto a los niveles de agresividad, a 30 °C se detectaron diferencias significativas entre los niveles medio y leve, siendo más rápida la formación en el último caso. A 5 °C, la rapidez de formación de las colonias fue significativamente más lenta para el aislamiento de agresividad media. Entre los niveles leve y severo, no se registraron diferencias importantes (Fig. 118).

Formación de colonias (días)					
Agresividad	37°C	30°C	25°C	15°C	5°C
Leve	-	2,1	1,9	2,7	27,1
Media	-	5,0	2,8	4,0	32,2
Severa	-	4,0	2,7	3,2	24,7

Tabla 53: Tiempo necesario para la formación de colonias (días) de *A. tenuissima* sobre ANz

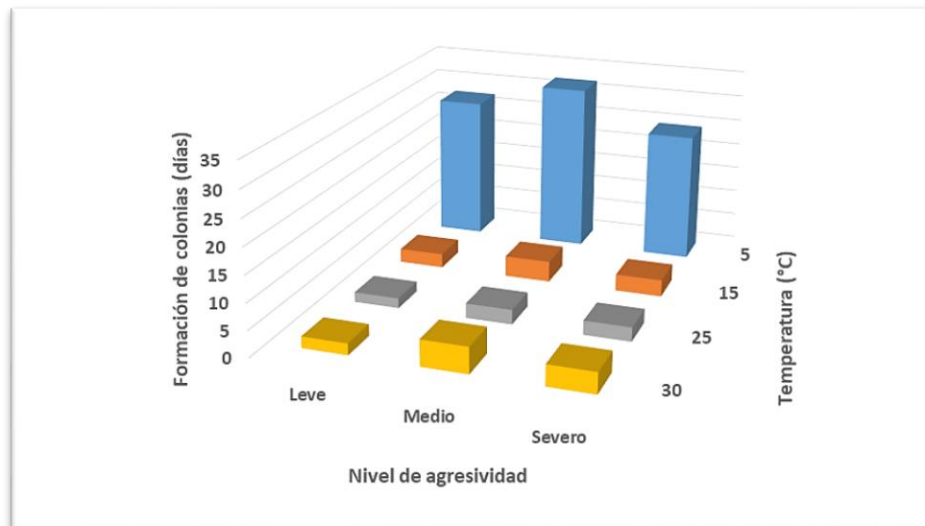


Fig. 117: Tiempo necesario para la formación de colonias de *A. tenuissima* sobre ANz a diferentes temperaturas

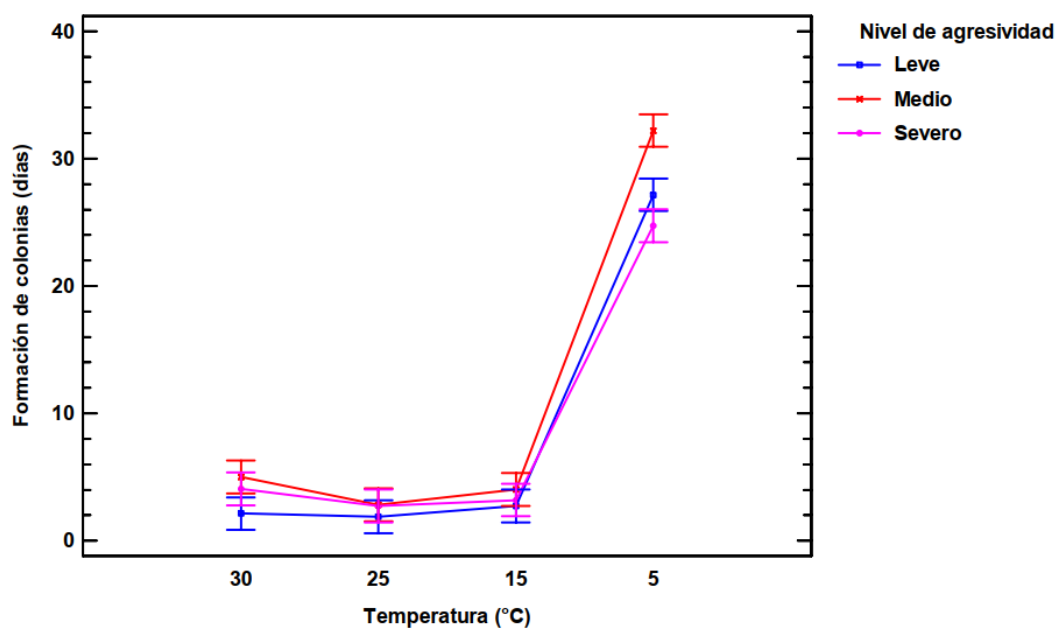


Fig. 118: Formación de colonias de *A. tenuissima* sobre ANz.

Gráfico de interacción entre los factores temperatura y nivel de agresividad. Medias e intervalos HSD de Tukey (95 %)

Las colonias de *A. tenuissima* sobre ANz, transcurridos 7 y 15 días de incubación en las diferentes temperaturas ensayadas, se muestran en las tablas 54 y 55, respectivamente. Asimismo, en la tabla 56 se muestran las colonias tras 40 días de incubación a 5 °C.

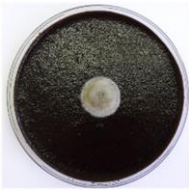
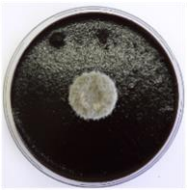
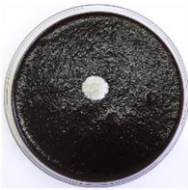
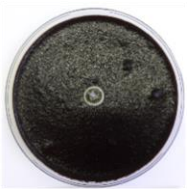
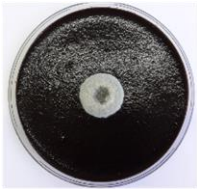
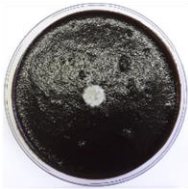
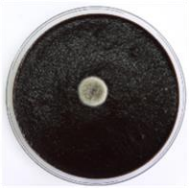
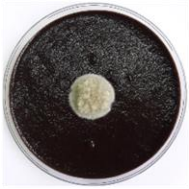
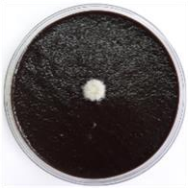
	37 °C	30 °C	25 °C	15 °C	5 °C
Leve	No crece				Aún no crece
Media	No crece				Aún no crece
Severa	No crece				Aún no crece

Tabla 54: Colonias de *A. tenuissima* tras 7 días de incubación sobre ANz a diferentes temperaturas

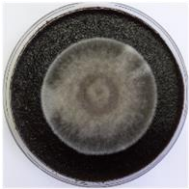
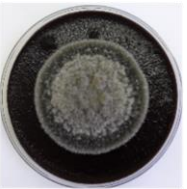
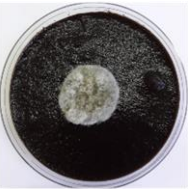
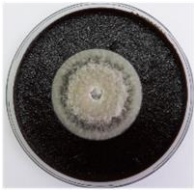
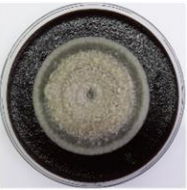
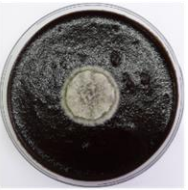
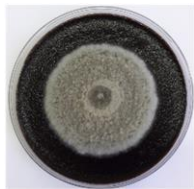
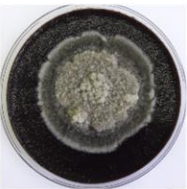
	37 °C	30 °C	25 °C	15 °C	5 °C
Leve	No crece				Aún no crece
Media	No crece				Aún no crece
Severa	No crece				Aún no crece

Tabla 55: Colonias de *A. tenuissima* tras 15 días de incubación sobre ANz a diferentes temperaturas

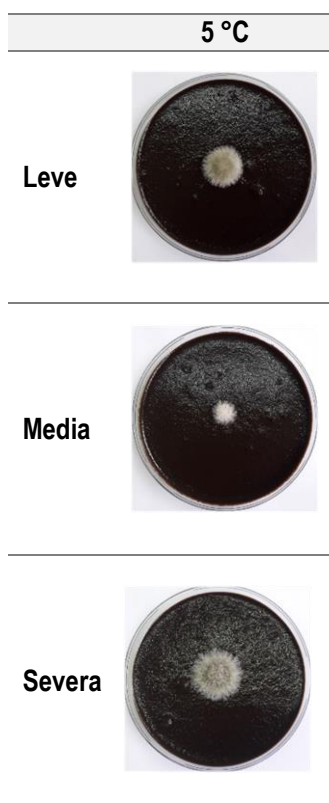


Tabla 56: Colonias de *A. tenuissima* tras 40 días de incubación sobre ANz a 5 °C

8.4 DISCUSIÓN

El estudio de los efectos que los principales factores ecofisiológicos tienen sobre el crecimiento fúngico permite conocer y predecir el comportamiento de las poblaciones bajo determinadas condiciones (Greco, 2014). En este caso, se estudió el efecto que la temperatura y la actividad acuosa ejercen sobre el crecimiento de aislamientos pertenecientes al grupo-especies *A. tenuissima* obtenidos a partir de frutos de nogal afectados por NAM. El rango de temperaturas seleccionado para el estudio fue representativo de las temperaturas ambientales a las que se exponen los frutos del nogal a campo, mientras que el rango de a_w consideró los valores óptimos y mínimos reportados para el crecimiento de *Alternaria* spp. (Magan y Lacey, 1984-a; Pose y col., 2009; Oviedo y col., 2011).

La interacción entre los factores temperatura, actividad acuosa y nivel de agresividad del patógeno afectó significativamente la velocidad de crecimiento de *A. tenuissima* sobre el medio PDA. Asimismo, la germinación y la formación de microcolonias y colonias fueron afectadas por la temperatura y la actividad de agua. Sobre el medio de cultivo estándar, tanto la germinación, como el crecimiento fúngico se vieron

favorecidos por altos valores de a_w (0,99-0,97) y temperaturas de 25 y 30 °C, siendo la condición óptima de crecimiento 25 °C bajo una a_w de 0,99. Cuando el valor de la actividad de agua fue de 0,85, no se observó germinación de conidios en ninguna de las temperaturas evaluadas. A 40 y 37 °C, el hongo no fue capaz de crecer.

En cuanto a los resultados observados sobre el medio ANz, la interacción entre la temperatura y el nivel de agresividad afectó significativamente la velocidad de crecimiento, así como también la formación de microcolonias y colonias. Al igual que en el medio de cultivo estándar, las mayores velocidades de crecimiento se registraron a 25 y 30 °C, mientras que a 37 °C el hongo no creció.

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo han sido informados para otras especies del género *Alternaria* creciendo sobre diferentes sustratos, reportándose temperaturas óptimas de crecimiento en el rango 25-30 °C y valores de a_w dentro del rango 0,98-1 (Magan y Lacey, 1984-b; Pose y col., 2009; Oviedo y col., 2011; Vaquera y col., 2014; Betancourt Rodríguez y col., 2019). A diferencia de lo observado en este trabajo, el mínimo valor de actividad acuosa reportado para la germinación de conidios de *A. alternata* fue de 0,84-0,85 a 25 °C (Magan y Lacey, 1984-a).

Respecto a la ecofisiología de *A. tenuissima*, tras una intensa búsqueda bibliográfica se halló un único estudio reportando el crecimiento de dos cepas sobre un medio de cultivo a base de trigo molido dentro del rango de temperaturas 15-34 °C, y a valores de a_w de 0,98 y 0,95. Sobre ese análogo de sustrato, la temperatura óptima de crecimiento fue de 25-30 °C, cuando la a_w fue de 0,98, y 30 °C para el valor de 0,95 (Patriarca y col., 2014). Resultados acordes fueron observados en el presente trabajo sobre el medio PDA, determinándose crecimiento de los tres aislamientos evaluados en el rango de temperaturas 5-30 °C para valores de a_w de 0,95, 0,97 y 0,99. En los primeros dos casos, la temperatura óptima varió entre 25 y 30 °C, dependiendo de la agresividad de los aislamientos, y fue de 25 °C a 0,99. En cuanto al medio ANz, *A. tenuissima* también creció en el rango de temperaturas 5-30 °C, siendo 30 °C la condición óptima para los aislamientos de agresividad leve y media, y tanto 30 °C como 25 °C para el aislamiento de mayor agresividad.

El desarrollo del medio ANz proporcionó una ventaja práctica, facilitando el seguimiento del crecimiento fúngico, que sería difícil de realizar directamente sobre los frutos del nogal. El crecimiento de *A. tenuissima* sobre el mismo, evidencia el potencial que posee la especie para afectar los frutos inmaduros del nogal. Además, las diferencias observadas entre los aislamientos de diferentes niveles de agresividad demuestran la existencia de una población heterogénea de *A. tenuissima* en los cultivos de nogales.

Los datos obtenidos a partir de este estudio proporcionan una matriz de respuestas del crecimiento y la germinación de conidios de *A. tenuissima* a la temperatura y actividad acuosa, ampliando la información disponible sobre la ecología del crecimiento de esta especie. A futuro, serán utilizados en la construcción de un modelo matemático que permita predecir el riesgo de infección en los cultivos de acuerdo a las condiciones ambientales.

**9. PARÁMETROS AMBIENTALES SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *X. arborícola* pv.
juglandis: DETERMINACIÓN DE
LAS BASES DE SU INFLUENCIA**

9.1 INTRODUCCIÓN

El uso de cobre, el único químico registrado para el control de *X. arboricola* pv. *juglandis*, debería reducirse por cuestiones medioambientales (Giraud y col., 2010). En nuestro país, el control químico de la bacteria es de carácter netamente preventivo y se basa en la aplicación de productos que reduzcan el inóculo en la planta y que ejerzan una acción de barrera defensiva sobre los tejidos nuevos. Durante la temporada se realizan varias aplicaciones preventivas (Nievas y col., 2014). En Europa se ha propuesto utilizar modelos de predicción de enfermedades basados en las condiciones climáticas como sistema de apoyo para guiar las aplicaciones y aumentar la eficacia del control (Morales y col., 2017).

Las enfermedades causadas por *X. arboricola* están fuertemente influenciada por las condiciones climáticas (Poggi y col., 2013; Nievas y col., 2014; Morales y col., 2016), por lo tanto, el crecimiento y las infecciones podrían predecirse en función de diferentes parámetros ambientales. Un modelo para predecir el crecimiento de *X. arboricola* pv. *pruni* en función de la temperatura fue desarrollado en España (Morales y col., 2017), sin embargo, no existen datos relacionados a la actividad de agua. Dada la importancia de estudiar la influencia de este parámetro en la ecofisiología de *Xanthomonas*, estudios previos fueron llevados a cabo en nuestro grupo de trabajo. Así, se evaluaron distintos compuestos químicos (glicerol, NaCl, KCl y urea) para lograr diferentes actividades de agua en el medio de cultivo LB y posteriormente, el crecimiento/no crecimiento de *X. arboricola* pv. *juglandis* a distintos valores (0,99; 0,97; 0,95; 0,93; 0,90; 0,88; 0,85). No se encontraron diferencias relevantes entre el uso de NaCl y KCl en cuanto a la homogeneidad del medio y al rango de crecimiento de la bacteria, determinándose que *X. arboricola* pv. *juglandis* sólo es capaz de crecer en valores altos de a_w (Greco y col., datos no publicados).

La lucha contra las enfermedades que afectan a los cultivos debe basarse en diferentes métodos y en la utilización de la mayor parte de las herramientas disponibles. De esta manera se racionalizarán los tratamientos, mejorando la eficacia y control de los patógenos, reduciendo el riesgo de aparición de fenómenos de resistencias (Poggi y col., 2013).

El objetivo consistió en realizar un tamizado (o “screening”) cualitativo *in vitro* respecto a la habilidad de crecimiento de *X. arboricola* pv. *juglandis* a diferentes combinaciones de temperaturas y a_w , en función de determinar los parámetros limitantes que los principales factores ambientales tienen sobre el crecimiento de la bacteria. Se generará la información básica que permitirá ampliar los estudios que servirán al desarrollo de un modelo de predicción de las enfermedades que permita ajustar la

aplicación de los productos cúpricos y mejorar el control de las patologías causadas por *X. arboricola* pv. *juglandis*.

9.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó el crecimiento de cuatro aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* bajo distintas combinaciones de temperatura y actividad de agua. Los parámetros a estudiar consistieron en 7 valores de temperatura (5, 15, 22, 25, 27, 30, y 35 °C) y 3 valores de a_w (0,99; 0,98 y 0,97) en medio de cultivo caldo LB (Anexo 1). Los aislamientos ensayados fueron obtenidos a partir de frutos lesionados en un estudio previo realizado en la región bajo estudio, y clasificados según su nivel de agresividad (índices 1 a 4, en orden creciente) tras realizar pruebas de patogenicidad (Temperini y col., 2017). El seguimiento del crecimiento bacteriano se realizó mediante mediciones de densidad óptica utilizando un lector multimodo de imágenes celulares (Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader, BioTek Instruments, Inc.).

Preparación de los medios de cultivos modificados

La actividad de agua del caldo LB se ajustó utilizando NaCl de acuerdo a lo siguiente:

a_w	NaCl (%)
0,99	0
0,98	3
0,97	3,5

Tabla 57: Ajuste de la actividad acuosa del caldo LB

Los valores fueron verificados utilizando un medidor de a_w (LabSwift- a_w Novasina) antes de iniciar el ensayo.

Determinación de la curva de calibración

Con el fin de establecer la relación entre los valores de densidad óptica y el recuento viable de bacterias, se realizó la curva de calibración, siguiendo el protocolo de Morales y col. (2017) con algunas modificaciones. Los aislamientos a ensayar se cultivaron en medio LB, a 27 °C durante 3 días. A partir de estas placas se procedió a la preparación de suspensiones individuales en solución de NaCl 0,9 % ajustando a una concentración comprendida entre 1×10^8 y 5×10^8 UFC/ml, correspondiente a una

densidad óptica de 0,5 a 600 nm. Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 de cada suspensión a fin de obtener concentraciones de un orden menor. El ensayo se llevó a cabo en placas estériles de 96 pocillos. Los cuatro aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* se inocularon generando 21 réplicas de cada uno de ellos. En cada pocillo se colocaron 180 µl del caldo LB y 20 µl de la suspensión de cada aislamiento. De esta forma, la concentración inicial del ensayo fue en el orden de 10^6 UFC/ml. En los pocillos restantes (12 unidades), se colocó caldo LB como blanco y se inocularon 20 µl de agua destilada estéril. La temperatura de incubación fue de 27 °C y la duración del ensayo fue de 72 horas. Las mediciones de densidad óptica se realizaron con el equipo Cytation 5. A intervalos de 6 horas, se tomaron de forma aleatoria 100 µl de la suspensión de cada aislamiento y, posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:10. Luego, se sembraron 100 µl de cada suspensión en placas conteniendo agar LB. Las placas se incubaron a 27 °C y al cabo de 3 días se realizó el recuento de colonias viables. El ensayo se realizó por duplicado. Los valores de densidad óptica se corrigieron con el valor del blanco.

Inoculación y seguimiento del crecimiento bacteriano

Para cada combinación de temperatura y a_w , se procedió a la preparación del inóculo y siembra de los pocillos de la forma descripta anteriormente. Para el rango de temperatura 25-30 °C, las mediciones de densidad óptica se realizaron a intervalos de 1 hora, con agitación orbital de 10 segundos de duración previa a la lectura, y durante un periodo de 5 días, o hasta alcanzar la fase estacionaria. Para las demás condiciones de temperatura, las placas se incubaron externamente, en incubadoras calibradas a las temperaturas correspondientes, y se realizaron entre 2 y 5 mediciones diarias. Luego de cada lectura de densidad óptica, el valor fue corregido con el blanco. El tiempo máximo de duración del ensayo se estableció en 15 días. Finalmente, para cada set de datos obtenidos se determinaron crecimiento y fase de latencia. El análisis de los mismos se realizó haciendo uso de distintos programas informáticos y estadísticos (Excel, InfoStat y R).

9.3 RESULTADOS

Se determinaron las fases de latencia y el crecimiento o ausencia de este para cada aislamiento bajo cada condición. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 58 y 59.

En caldo LB sin modificación de a_w (0,99) se registró crecimiento en el rango de temperaturas 5-30 °C. No se registró crecimiento a 35 °C. Se determinó que la fase lag a 5 °C fue de 50 horas, siendo la más corta de 2,5 horas a 27 °C (Tabla 58).

a_w:0,99		
Temperatura (°C)	Crecimiento	Fase lag (h)
5	(+)	50
15	(+)	24
22	(+)	4
25	(+)	9,5
27	(+)	2,5
30	(+)	6
35	(-)	

Tabla 58: Crecimiento y fase de latencia de *X. arboricola* pv. *juglandis* sobre caldo LB (a_w : 0,99)

(+): crecimiento, (-): ausencia de crecimiento

Para un valor de a_w de 0,98, se registró crecimiento en el rango de temperaturas 15-30 °C. No se detectó crecimiento a 5 °C como tampoco a 35 °C. La fase lag a 15 °C se estableció en 53,7 horas, siendo la más corta de 7 horas a 27 °C (Tabla 59).

a_w:0,98		
Temperatura (°C)	Crecimiento	Fase lag (h)
5	(-)	
15	(+)	53,7
22	(+)	18,5
25	(+)	nd
27	(+)	7
30	(+)	10
35	(-)	

Tabla 59: Crecimiento y fase de latencia de *X. arboricola* pv. *juglandis* sobre caldo LB (a_w : 0,98)

(+): crecimiento, (-): ausencia de crecimiento

*nd: no determinado

En el caso de un valor de a_w de 0,97, sólo se determinó crecimiento de un único aislamiento (nivel de agresividad: 3) a 25 y 27 °C, poniéndose en evidencia un comportamiento específico entre cepas frente a esta condición de mayor estrés.

En cuanto a las velocidades de crecimiento, en términos generales, se pudo establecer que para el valor de a_w de 0,99, las mayores tasas se obtuvieron en el rango de temperatura comprendido entre los 25 y 30 °C (Fig. 119), registrándose para una a_w de 0,98 las mayores tasas de crecimiento a 27 y 30 °C. Sin embargo, a una misma temperatura, existieron diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos de acuerdo con el nivel de agresividad. No pudiéndose establecer un patrón de comportamiento, más estudios deberán realizarse al respecto.

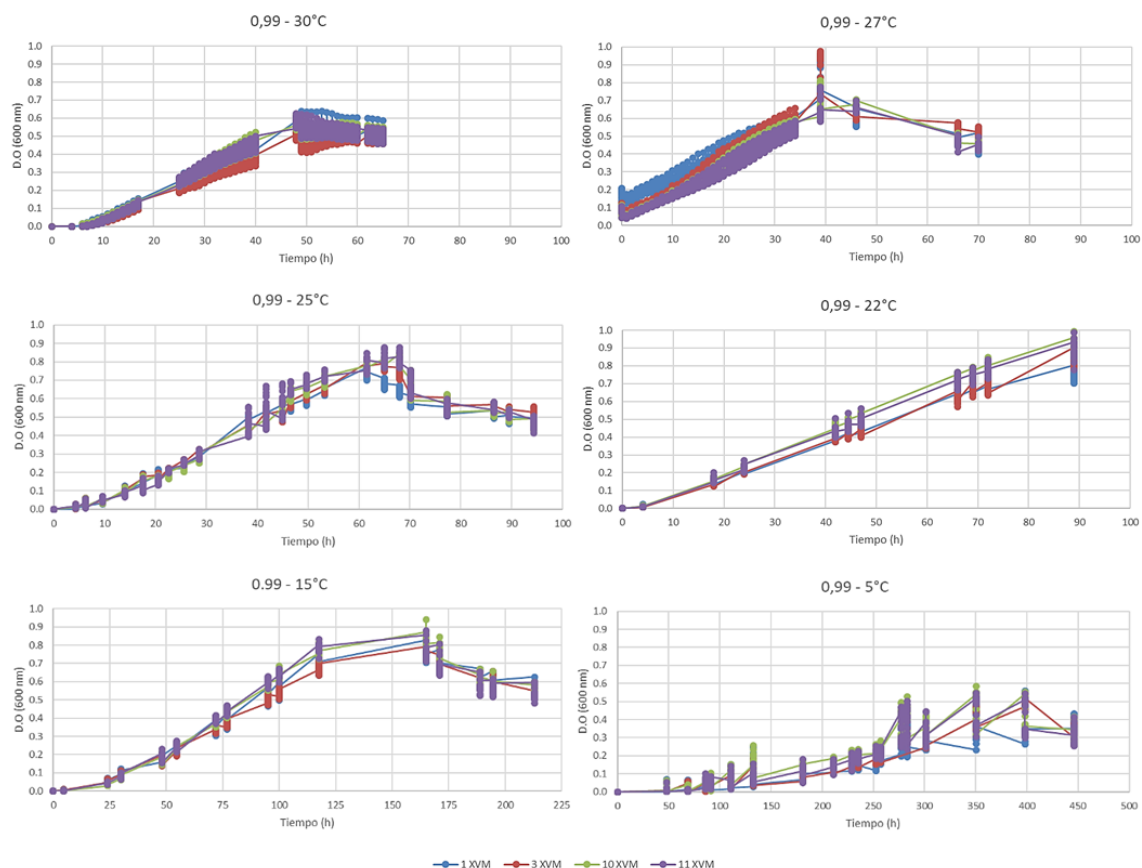


Figura 119: Crecimiento de aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* en caldo LB (a_w : 0,99) a diferentes temperaturas. Niveles de agresividad: 1) 1 XVM, 2) 10 XVM, 3) 3 XVM, 4) 11 XVM.

9.4 DISCUSIÓN

Se realizó un primer estudio que permitió establecer la base de la influencia de los principales factores ambientales (temperatura y a_w) sobre el crecimiento de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Se determinó que el crecimiento bacteriano se ve favorecido por valores altos de a_w . Asimismo, se pudo corroborar que el rango de temperatura óptimo reportado para el género *Xanthomonas* (Bradbury, 1984, citado en An y col.,

2020) concuerda con el obtenido para los aislamientos de la región, registrándose las mayores tasas de crecimiento en un intervalo de 25 a 30 °C para una a_w de 0,99. Se determinó además que *X. arboricola* pv. *juglandis* fue capaz de crecer a 5 °C, sólo para dicho valor de actividad acuosa, aunque de forma lenta. Esta escasa tolerancia al frío, también fue observada en *X. arboricola* pv. *pruni* (Young y col., 1977; Morales y col., 2017), reflejando la común presencia de *Xanthomonas* spp. en condiciones tropicales o subtropicales (Young y col., 1977). A 35 °C no se determinó crecimiento bacteriano, acorde con lo reportado en un estudio previo para algunas cepas de *X. arboricola* pv. *pruni* (Morales y col., 2017).

Este estudio permitió observar un panorama general sobre el comportamiento de la bacteria patógena del nogal frente a distintas combinaciones de temperatura y a_w , datos no existentes al momento. Si bien se obtuvo la información básica respecto al comportamiento frente a los parámetros ambientales más relevantes, es necesario realizar más estudios sobre la ecofisiología de la bacteria, incluyendo un mayor número de cepas. Dado que las patologías del nogal causadas por *X. arboricola* pv. *juglandis* están fuertemente influenciadas por condiciones ambientales, principalmente humedad y temperatura, el desarrollo de un modelo predictivo basado en las condiciones climáticas resultaría de gran apoyo en el control de la bacteriosis y NAM.

10. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Los conocimientos generados a partir del presente trabajo de tesis pretenden ser un real aporte al sector productivo de la región del Valle Medio del río Negro, brindando información acerca de aspectos referidos a la bacteriosis y necrosis apical marrón del nogal (NAM), esta última, observada por primera vez en la región durante la temporada 2013-2014, constituyendo el primer reporte de la patología en el país (Temperini y col., 2014, 2017).

A través del mismo, se analizó la distribución de las poblaciones de *X. arboricola* pv. *juglandis* y de grupos-especies de *Alternaria* durante diferentes estados fenológicos del nogal y se caracterizó la población bacteriana responsable de las patologías. Por otra parte, se estudió el comportamiento de los principales cultivares de nogal de la región, respecto al ataque de los microorganismos patógenos en frutos inmaduros, a fin de evaluar el potencial que posee cada cultivar de ser infectado cuando se presentan las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de las enfermedades. Además, teniendo en cuenta que, los productos cúpricos constituyen la herramienta base de los programas sanitarios, se llevó a cabo el primer estudio de sensibilidad al cobre sobre la población bacteriana. Asimismo, se evaluó la actividad antibacteriana de diferentes productos químicos a base de cobre, frecuentemente utilizados en el control y prevención de las patologías del nogal causadas por *X. arboricola* pv. *juglandis*. Finalmente, se analizaron los efectos que los principales factores ambientales (temperatura, a_w) tienen sobre el crecimiento de aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* y de *A. tenuissima*, principal especie fúngica asociada a NAM en el Valle Medio del río Negro. A partir de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, se evidencian los siguientes aportes y conclusiones generales:

- *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y *A. tenuissima* se hallaron en diferentes estados fenológicos del nogal. Durante el periodo invernal, las yemas representaron el principal sitio de hibernación de la bacteria. Esta capacidad para colonizar las yemas superficial e internamente, representa una ventaja para mejorar su supervivencia y promover su rápida diseminación en los cultivos (Mulrean y Schroth, 1982).
- A pesar de que NAM se definió como una nueva patología del nogal (Belisario y col., 2001, 2002), tras analizar la distribución de los microorganismos en diferentes estados fenológicos y frutos sintomáticos, los resultados obtenidos respaldarían la hipótesis que la considera una manifestación diferente de la bacteriosis del nogal, en lugar de una enfermedad diferente (Moragrega y col., 2011). Asimismo, los resultados sugieren a *X. arboricola* pv. *juglandis* como

agente causal de la patología y al género *Alternaria* como un agravante de su desarrollo, destacándose el grupo-especies *A. tenuissima*. Análisis de patogenicidad empleando un número significativo de aislamientos de ambos microorganismos permitirían confirmar la hipótesis.

- Se caracterizó la población bacteriana de la región por primera vez mediante pruebas morfológicas, fisiológicas, nutricionales y bioquímicas.
- Respecto al comportamiento de diferentes cultivares de nogal de la región frente a la infección por los microorganismos patógenos, los frutos inmaduros de las variedades Chandler y Tulare resultaron más sensibles que los correspondientes a Franquette.
- Los aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* demostraron diferentes niveles de tolerancia al cobre, componente base de los tratamientos de control y prevención de la bacteriosis y NAM del nogal. No se determinó la presencia del grupo de genes *copLAB*, uno de los determinantes más comunes de resistencia al cobre en *X. arboricola* pv. *juglandis*.
- Las formulaciones comerciales que contienen oxiclورو de cobre, hidróxido cúprico y óxido cuproso, así como también el sulfato de cobre pentahidratado, son algunos de los bactericidas más utilizados en el control y prevención de las patologías del nogal. Se determinó la diferente capacidad de inhibición *in vitro* por parte de estos productos sobre aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis*. La combinación cobre-mancozeb, en general, ejerció un mayor control sobre el crecimiento de la bacteria, comparado con el uso individual de cada producto cúprico. Incluso, los tratamientos más efectivos consistieron en las combinaciones sulfato de cobre pentahidratado-mancozeb, hidróxido cúprico-mancozeb y sulfato tetra amino-cúprico-mancozeb, sin existir diferencias significativas entre ellos.
- Respecto a los estudios ecofisiológicos, la temperatura y la actividad acuosa afectaron significativamente la germinación de los conidios de *A. tenuissima*. Asimismo, la interacción entre los factores temperatura, actividad acuosa y nivel de agresividad afectó significativamente las velocidades de crecimiento fúngico. Los datos obtenidos permiten el desarrollo de un modelo matemático que podría

predecir el riesgo de infección en los cultivos de acuerdo a las condiciones ambientales.

- En el caso de *X. arboricola* pv. *juglandis*, se determinaron los parámetros limitantes que los principales factores ambientales tienen sobre el crecimiento de la bacteria, generando la información base para el desarrollo de estudios ecofisiológicos. Estos últimos permitirán la construcción de un modelo matemático que prediga el comportamiento de la bacteria en diferentes condiciones ambientales.

Consideramos, por lo mencionado anteriormente, que la información suministrada en el presente trabajo constituye un aporte a la comprensión de la etiología y epidemiología de NAM en nogales. Asimismo, representa una herramienta para el mejoramiento de los programas de manejo preventivo de las enfermedades del nogal, que actualmente se basan en el uso repetido de productos antimicrobianos a base de cobre y fungicidas (Mancozeb).

En cuanto a perspectivas futuras, y en virtud de los conocimientos generados, se pretende:

- Determinar la patogenicidad de los aislamientos de *X. arboricola* pv. *juglandis* sobre frutos inmaduros en función de confirmar la hipótesis acerca de la etiología de NAM. Se ha reportado la existencia de cepas de *X. arboricola* pv. *juglandis* no patógenas (Fernandes y col., 2018; Assis y col., 2021). El desarrollo de pruebas de patogenicidad permitirá identificar la presencia de las mismas sobre cultivos del Valle Medio del río Negro.
- Estudiar la ecofisiología de *X. arboricola* pv. *juglandis*. Esto se llevará a cabo empleando un diseño factorial en el cual se incluirán diferentes actividades de agua y temperaturas. Los parámetros serán seleccionados considerando los valores de temperatura y a_w óptimos, máximos y mínimos de crecimiento, en todos los casos, en virtud de los datos previamente obtenidos (Young y col., 1977; Pose y col., 2009; Morales y col., 2017; Greco y col., datos no publicados).
- Con los resultados del estudio previamente mencionado y los obtenidos respecto a la ecofisiología de *A. tenuissima*, construir un modelo matemático que permita predecir el comportamiento de la enfermedad (Bombelli y col., 2013). Esto puede

utilizarse para generar un “Sistema de Alarma” que permita determinar los momentos de aplicación de plaguicidas, restringiendo las mismas a los momentos en los que son realmente necesarias (Maeso y col., 2012).

- Estudiar la ocurrencia natural de micotoxinas de *Alternaria* en nueces. La mayoría de las especies de *Alternaria* son fitopatógenas y poseen la capacidad de producir micotoxinas. La ocurrencia natural de estas toxinas en nueces ha sido muy escasamente estudiada en nuestro país. Este estudio consistirá en determinar 3 de las más importantes micotoxinas, AOH, AME y TeA, por HPLC. El conocimiento de su incidencia permitirá aportar datos útiles para la evaluación del riesgo al que están expuestos los consumidores y aplicar acciones preventivas y correctivas, que, además, permitirán adecuarse a los estándares internacionales de comercialización que pudieran aplicarse (en progreso, PICT 2021*).

* “Calidad micológica y ocurrencia natural de micotoxinas en productos agrícolas y alimentos balanceados en producciones agropecuarias incipientes – Prevención de su impacto para el desarrollo socio-productivo regional y nacional”. Directora G. Pose. PICT 2021. Periodo 2023-2027.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akat, S., Özaktan, H. and Yolageldi, L. (2016) Studies on the etiology and control of brown apical necrosis (BAN) of walnut fruits in Turkey. *Acta Horticulturae*, 1149, 53-57.
- Aletà, N., Ninot, A., Moragrega, C., Llorente, I., and Montesinos, E. (2001) Blight sensitivity of Spanish selections of *J. regia*. *Acta Horticulturae*, 544, 353-362.
- Alonso Barrueto Estay, J. (2022) *Genómica comparativa de cepas de Xanthomonas arboricola pv. juglandis asociadas a brotes de peste negra en nogales chilenos*. Seminario de título. Chile, Universidad de Chile.
- An, S. Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F. J., He, Y. Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N. Bleris, L. and Tang, J. L. (2020) Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(1), 1-32.
- Andersen, B., Nielsen, K., Fernández Pinto, V. and Patriarca, A. (2015) Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. *International Journal of food Microbiology*, 196, 1-10.
- Andrew, M., Peever, T. L. and Pryor, B. M. (2009) An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*, 101, 1, 95-109.
- Argüello, J. M., Raimunda, D. and Padilla-Benavides, T. (2013) Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 73.
- Argumedo, F. (2014) “Intensificar la diversificación” *El negocio de la nuez de nogal*. XVI Jornadas Frutihortícola 2014.
- Ark, P.A. (1944) Pollen as a source of walnut bacterial blight infection. *Phytopathology*, 34(3), 330-334.

- Arnaudov, V., Gandev, S. and Dimova, M. (2014) Susceptibility of Some Walnut Cultivars to *Gnomonia leptostyla* and *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Bulgaria. *Agroзнанье*, 15(1), 41-54.
- Arquero, O., Lovera, M., Rodriguez, R., Salguero, A. and Trapero, A. (2005) Characterization and development of necrotic lesions of walnut tree fruits in Southern Spain. *Acta Horticulturae*, 705, 457-461.
- Assis, R. A., Varani, A. M., Sagawa, C. H., Patané, J. S., Setubal, J. C., Uceda-Campos, G., da Silva, A. M., Zaini, P., A., Almeida, N. F., Moreira, L. M. and Dandekar, A. M. (2021) A comparative genomic analysis of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* strains reveal hallmarks of mobile genetic elements in the adaptation and accelerated evolution of virulence. *Genomics*, 113(4), 2513-2525.
- Bandi, A., Tóth, M. and Hevesi, M. (2014) Comparison of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates from walnut trees grown in Romania and Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 20(1-2), 65-69.
- Behlau, F., Canteros, B. I., Minsavage, G. V., Jones, J. B. and Graham, J. H. (2011) Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied and environmental microbiology*, 77(12), 4089-4096.
- Behlau, F., Canteros, B. I., Jones, J. B. and Graham, J. H. (2012) Copper resistance genes from different *xanthomonads* and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *European Journal of Plant Pathology*, 133(4), 949–963.
- Behlau, F., Hong, J. C., Jones, J. B. and Graham, J. H. (2013) Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated *xanthomonads*. *Phytopathology*, 103(5), 409-418.
- Behlau, F., Gochez, A. M. and Jones, J. B. (2020) Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. *Tropical Plant Pathology*, 45(3), 200-212.

- Belisario, A., Forti, E., Santori, A., Balmas, V., Valier, A., and Corazza, L. (2001) *Fusarium* necrosis on Persian (English) walnut fruit. *Acta Horticulturae*, 544, 389-393.
- Belisario, A., Maccaroni, M., Corazza, L., Balmas, V. and Valier, A. (2002) Occurrence and etiology of brown apical necrosis on Persian (English) walnut fruit. *Plant Disease*, 86(6), 599-602.
- Belisario, A., Maccaroni, M., Coramusi, A., Corazza, L., Pryor, B. M. and Figuli, P. (2004) First report of *Alternaria* species groups involved in disease complexes of hazelnut and walnut fruit. *Plant Disease*, 88, 426-426.
- Belisario, A., Santori, A., Potente, G., Fiorin, B., Saphy, B., Reigne, J. L., Pezzini, C., Bortolin, E. and Valier, A. (2010) Brown apical necrosis (BAN): a fungal disease causing fruit drop of english walnut. VI International Walnut Symposium, *Acta Horticulturae*, 861, 449-452.
- Betancourt Rodriguez, J., Sandoval Contreras, T., Garrido Sánchez, L. y Calderón Santoyo, M. (2019) Modelo del crecimiento del hongo *Alternaria alternata* aislado de papaya (*Carica papaya* L.) en función de parámetros ambientales para control de calidad poscosecha. IV Congreso en tendencias en ciencias de alimentos y desarrollo tecnológico. México.
- Blomhoff, R., Carlsen, M. H., Andersen, L. F. and Jacobs Jr, D. R. (2006) Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition*, 96(2), 52-60.
- Bombelli, E. C., Moschini, R., Wright, E. R., López, M. V., y Fabrizio, M. D. C. (2013). Modelado para la predicción de enfermedades en cultivos de alto valor comercial. *Proyecciones*, 11(1), 47-60.
- Bottalico, A. and Logrieco, A. (1992) *Alternaria* plant diseases in Mediterranean countries and associated mycotoxins. *Alternaria: biology, plant diseases and metabolites*. In: Chelkowski J., Visconti A. (Eds.). Amsterdam. Elsevier.

- Bouhier, R. A., Martin, D. M., Gallo, S. L. y Fuente, G. E. (2018) Características de la producción de frutos secos en el valle inferior del Río Negro. En: *Territorios y Producción en el Noreste de la Patagonia*. Compilado por: Villegas N., H.M y Miñón, D.P. Argentina, 71-86.
- Brenes, C. L. y Sánchez, P. R. (2017) Fenología de *Talauma gloriensis* Pittier (Magnoliaceae), Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes, San Ramón, Alajuela, Costa Rica. *Revista Pensamiento Actual*, 17(1), 11-22.
- Buchner, R. P., Adaskaveg, J. E., Olson, W. H. and Lindow, S. E. (2001) Walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*) control investigations in northern California, USA. *Acta Hortic.*, 544, 369-378.
- Buchner, R. P., Gilles, C., Olson, W. H., Adaskaveg, J. E., Lindow, S. E. and Koutsoukis, R. (2013) Walnut blight management using *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* dormant bud population sampling. *VII International Walnut Symposium, Acta Horticulturae*, 1050, 331-338.
- Burokiene, D. and Pulawska, J. (2012) Characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolated from walnuts in Lithuania. *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 1-23.
- Canteros, B. I. (1990) *Diversity of plasmids and plasmid-encoded phenotypic traits in Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Doctoral dissertation. United States, University of Florida.
- Chirife, J., Ferro Fontan, C. and Benmergui, E. A. (1980) The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods IV. aw prediction in aqueous non electrolyte solutions. *International Journal of Food Science and Technology*, 15(1), 59-70.
- Chorolque, A. A., Pozzo Ardizzi, M. C. y Hernandez, L. F. (2020) Bacteriosis en nogal (*Juglans regia* L.) en el Valle Inferior del Río Negro. *AgroUNS*, 34, 5-9.
- Cooksey, D. A. (1990) Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 28, 201-219.

- Cooksey, D. A. (1993) Copper uptake and resistance in bacteria. *Molecular Microbiology*, 7(1), 1–5.
- Cubero, J., Redondo, C., Sabuquillo, P., Sena-Vélez, M., Garita-Cambronero, J. y Ferragud, E. (2015) *Xanthomonas*: un género de bacterias fitopatógenas con una alta especialización. *SEM@foro, Revista de la Sociedad Española de Microbiología*, 60, 38-41.
- da Cruz Cabral, L. (2018) *Caracterización de poblaciones de Alternaria en productos de interés agroalimentarios en Argentina mediante un enfoque polifásico para el desarrollo de estrategias alternativas de prevención y control del patógeno*. Tesis doctoral. Argentina, Universidad de Buenos Aires.
- Diario Río Negro (2018) *Buena temporada para las nueces en Valle Medio* [en línea] disponible en <https://www.rionegro.com.ar/buena-temporada-para-las-nueces-en-valle-medio-HX4536018/> [consulta: 03 de enero, 2020].
- Directiva 2000/29/CE, de 8 de mayo, relativa a las medidas de protección contra la introducción en la Comunidad de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales y contra su propagación en el interior de la Comunidad. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas (BOE)* L, 169, 1-112.
- Donoso C., J., Bastías I., R., Lemus S., G. y Silva R., L. (2007) Comportamiento fenológico del nogal (*Juglans regia* L.) en tres localidades de la VI región: temporadas 2005-2006 y 2006-2007. Informativo N° 12, INIA. Chile.
- EPPO/OEPP. 2004. Diagnosis protocols for regulated pests *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*. EPPO Bull., 179,179-181.
- EPPO/OEPP. 2006. Diagnostics *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. EPPO Bull., 36,129-133.
- EPPO Global Database (2022) *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Distribution* [en línea] disponible en <https://gd.eppo.int/taxon/XANTJU/distribution> [consulta: 21 de agosto, 2022].

- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G. and Manyes, L. (2017) *Alternaria* Mycotoxins in Food and Feed: An Overview. *Journal of Food Quality*.
- Eskandari, S., Khakvar, R. and Torchi, M. (2018) Detection of bacterial blight of walnut (*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*) in northwest of Iran and investigation of its pathogenicity on different native walnut cultivars. *Biochemical and Cellular Archives*, 18(2), 1785-1788.
- Esterio, M., Auger, J., Agurto, L. y Pérez, E. (2006) Resistencia de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* al ion cobre en Chile. *Fitopatología*, 41(3), 93-101.
- FAO (2023) FAOSTAT [en línea] disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#data> [consulta: 25 de enero, 2023].
- Farr, D. and Rossman, A. (2013) Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA.
- Fernandes, C., Albuquerque, P., Sousa, R., Cruz, L., and Tavares, F. (2017) Multiple DNA markers for identification of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates and its direct detection in plant samples. *Plant Disease*, 101(6), 858-865.
- Fernandes, C., Albuquerque, P., Cruz, L., and Tavares, F. (2018) Genotyping and epidemiological metadata provides new insights into population structure of *Xanthomonas* isolated from walnut trees. *bioRxiv*, 397703.
- Fernández Górgolas, M. C. (2012) Consideraciones sobre el mercado de la nuez en Catamarca – Argentina. *Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial* 19, 1-9.
- Fernández Pinto, V. E. and Patriarca, A. (2017) *Alternaria* species and their associated mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi*, 13-32.
- Fischer-Le Saux, M., Bonneau, S., Essakhi, S., Manceau, C. and Jacques, M. A. (2015) Aggressive Emerging Pathovars of *Xanthomonas arboricola* Represent Widespread Epidemic Clones Distinct from Poorly Pathogenic

- Strains, as Revealed by Multilocus Sequence Typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4651-4668.
- Flores, P., Seta, S., Gonzalez, M., Coniglio, R., Sferco, S. y Trevizán, A. (2004) Manejo químico y varietal de nogales frente a bacteriosis del nogal. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 5, 25-31.
 - Fruitex (n.d.) *Bacteriosis* [en línea] disponible en <https://fruitex.es/patologias-del-nogal/bacteriosis> [consulta: 02 de febrero, 2021].
 - Frutos, D. (2010) Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. *Journal of Plant Pathology*, 92, 79-85.
 - Garcin, A. and Duchesne, D. (2001) Walnut blight and apical necrosis. *Acta Horticulturae*, 544, 379-387.
 - Gardan, L., Brault, T. and Germain, E. (1993) Copper resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* in French walnut orchards and its association with conjugative plasmids. *Acta Horticulturae*, 239-265.
 - Garnica, I., Esparza, M., Sánchez, L. y Zuñig, J. (2008) Control de enfermedades a la caída de hojas de los frutales. *Navarra Agraria*, 19-22.
 - GifeX (2022) *GifeX* [en línea] disponible en https://www.gifex.com/America-del-Sur/Argentina/Rio_Negro/index.html [consulta: 7 de enero, 2022].
 - Giovanardi, D., Bonneau, S., Gironde, S., Saux, M. F. L., Manceau, C. and Stefani, E. (2016) Morphological and genotypic features of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* populations from walnut groves in Romagna region, Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 145(1), 1-16.
 - Giraud, M., Prunet, J. P., Chevallier, A., Romain, S., Thiriaud, V., Santrac, I. and Bray, O. (2010) Study of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* population dynamics in French walnut orchards over three years. *Acta Horticulturae*, 861, 439-444.

- Greco, M. V. (2014) *Caracterización de hongos contaminantes de alimentos balanceados destinados a la producción pecuaria argentina. Estudio de su ecofisiología, capacidad toxicogénica y ocurrencia natural de sus micotoxinas*. Tesis doctoral. Argentina, Universidad Nacional de Quilmes.
- Griffin, K., Gambley, C., Brown, P. and Li, Y. (2017) Copper-tolerance in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review. *Crop Protection*, 96, 144-150.
- Griffin, K., Brown, P. and Gambley, C. (2018) Media pH and media type can significantly affect the reliability of in vitro copper tolerance assessments of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of applied microbiology*, 125(1), 216-226.
- Harrison, J., Grant, M. R. and Studholme, D. J. (2016) Draft Genome Sequences of Two Strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *celebensis* Isolated from Banana Plants. *Genome Announcements*, 4(1), e01705-15.
- Hasman, H., Bjerrum, M. J., Christiansen, L. E., Hansen, H. C. B. and Aarestrup, F. M. (2009) The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth media. *Journal of microbiological methods*, 78(1), 20-24.
- Hayward, A. C. (1993) The hosts of *Xanthomonas*. En *Xanthomonas*. Dordrecht: Springer, 1-119.
- Henz, G. P. (2002) Present situation of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) diseases in Brazil. *Horticultura Brasileira*, 20(2), 135, 144.
- Hocking, A. D. and Miscamble, B. F. (1995) Water relations of some Zygomycetes isolated from food. *Mycological Research*, 99, 1113-1115.
- Hong, S. G., Maccaroni, M., Figuli, P., Belisario, A. and Pryor, B. M. (2006) Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe. *Mycological Research*, 110, 1290-1300.

- Iannamico, L. (2009) *El cultivo del nogal en climas templado-fríos*. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Iannamico, L. (2015) *Cultivo del nogal*. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- INDEC (2023) Sistema de consulta de comercio exterior de bienes [en línea] disponible en <https://www.indec.gob.ar/indec/web/Nivel4-Tema-3-2-124> [consulta: 25 de enero, 2023].
- INTA (2021) Red Agrometeorológica del INTA Alto Valle [en línea] disponible en <http://sipan.inta.gob.ar/agrometeorologia/met/42/clima.htm> [consulta: 10 de septiembre, 2021].
- International Society for Plant Pathology (ISPP) (2001) *Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria: International Standards for Naming Pathovars of Phytopathogenic Bacteria* [en línea] disponible en https://www.isppweb.org/about_tppb_naming.asp [consulta: 11 de febrero, 2021].
- International Society for Plant Pathology (ISPP) (2004) *Names of Plant Pathogenic Bacteria, 1864-2004* [en línea] disponible en https://www.isppweb.org/names_bacterial_revised.asp [consulta: 11 de febrero, 2021].
- Jacques, M. A., Arlat, M., Boulanger, A., Boureau, T., Carrère, S., Cesbron, S., Chen, N. W. G., Cociancich, S., Darrasse, A., Denancé, N., Saux, M. F. L., Gagnevin, L., Koebnik, R., Lauber, E., Noël, L. D., Pieretti, I., Portier, P., Pruvost, O., Rieux, A., Robène, I., Royer, M., Szurek, B., Verdier, V. and Vernière, C. (2016) Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 14 (8).
- Joubert, J. J. and Truter, S. J. (1972) A variety of *Xanthomonas campestris* pathogenic to *Zantedeschia aethiopica*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 78, 212–217.

- Juri, C. (2017) Análisis del mercado de la nuez de nogal (*Juglans regia* L) en la República Argentina. *Revista de Divulgación Técnica Agrícola y Agroindustrial* 71, 1-16.
- Kalužna, M., Pulawska, J., Waleron, M., and Sobiczewski, P. (2014) The genetic characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight in Poland. *Plant Pathology*, 63(6), 1404-1416.
- Kasprzyk, I. and Worek, M. (2006) Airborne fungal spores in urban and rural environments in Poland. *Aerobiologia*, 22(3), 169.
- Kawaguchi, A., Inoue, K. and Inoue, Y. (2014). Biological control of bacterial spot on peach by nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 158-163.
- Kim, H. S., Cheon, W., Lee, Y., Kwon, H. T., Seo, S. T., Balaraju, K. and Jeon, Y. (2021) Identification and characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* causing bacterial blight of walnuts in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 37(2), 137-151.
- Lamichhane, J. R. (2014) *Xanthomonas arboricola* diseases of stone fruit, almond, and walnut trees: progress toward understanding and management. *Plant Disease*, 98(12), 1600-1610.
- Lang, M. D., Hills, J. L. and Evans, K. J. (2006) Preliminary studies toward managing walnut blight in Tasmania, Australia. *Acta Horticulturae*, 705, 451-456.
- Lee, Y. A., Schroth, M. N., Hendson, M., Lindow, S. E., Wang, X. L., Olson, B., Buchner, R. P. and Teviotdale, B. (1993) Increased Toxicity of Iron-Amended Copper-Containing Bactericides to the Walnut Blight Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. *Phytopathology*, 83(12), 1460-1465.
- Lee, Y. A., Hendson, M., Panopoulos, N. J., and Schroth, M. N. (1994) Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with

- small blue copper proteins and multicopper oxidase. *Journal of bacteriology*, 176(1), 173-188.
- Lee, Y. A., Chen, K. P. and Chang, Y. C. (2005) First report of bacterial leaf blight of white-flowered calla lily caused by *Xanthomonas campestris* pv. *zantedeschiae* in Taiwan. *Plant Pathology*, 54, 239.
 - Lee, Y.A., Sung, A.N., Liu, T.F. and Lee, Y.S. (2009) Combination of chromogenic differential medium and estA-specific PCR for isolation and detection of phytopathogenic *Xanthomonas* spp. *Applied and environmental microbiology*, 75(21), 6831-6838.
 - Lemus, G., Ibacache A., Pinilla B., Riveros, F., Sellés G., Ferreira E., R., Martinez, L., Ruiz, R., Sierra, C., Bianchini, V., Rojas, C., Reginato, G., Albornoz, A., Marin, M., Latorre, B., Gratacos, E., Zaviezo, T., Valdés, G. y Vial, J.L. (2010) *Producción de nueces de nogal: para profesionales y técnicos del área agropecuaria*. Santiago, Chile.
 - Lindow, S., Olson, W. and Buchner, R. (2014) Colonization of dormant walnut buds by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* is predictive of subsequent disease. *Phytopathology*, 104(11), 1163-1174.
 - López, S. y Guinovart, J. M. (2005) *Influencia del nivel de humedad y Aw de pienso y materias primas sobre el desarrollo microbiano* [en línea] disponible en https://www.3tres3.com/latam/articulos/influencia-del-nivel-de-humedad-y-aw-de-pienso-y-materias-primas-sobre_9787/ [consulta: 20 de septiembre, 2023].
 - López Vielma, C., Solís Sánchez, A., Quiñones Aguilar, E., Qui Zapata, J. y Rincón Enríquez, G. (2016) Aislamiento del agente causal de la mancha bacteriana de chile en las regiones productoras de Jalisco, Zacatecas y Michoacán. *Biotecnología y sustentabilidad*, 1, 143-146.
 - Maeso, D. C., Campelo, E. y Arboleya, J. (2012) Sistemas de pronóstico para el manejo de enfermedades de follaje en cebolla en la zona sur de Uruguay. *Revista INIA*, 30, 43-47.

- Magan, N. and Lacey, J. (1984-a) Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1), 71-81.
- Magan, N. and Lacey, J. (1984-b) Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(1), 83-93.
- Marin, T. G. S., Galvanin, A. L., Lanza, F. E. and Behlau, F. (2019) Description of copper tolerant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and genotypic comparison with sensitive and resistant strains. *Plant Pathology*, 68(6), 1088-1098.
- Martins, L., Fernandes, C., Albuquerque, P., Tavares, F. (2019) Assessment of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* bacterial load in infected walnut fruits by quantitative PCR. *Plant disease*, 103(10), 2577-2586.
- Mash, H. E., Chin, Y. P., Sigg, L., Hari, R. and Xue, H. (2003) Complexation of copper by zwitterionic zminosulfonic (good) buffers. *Analytical Chemistry*, 75, 671–677.
- Miller, P. W. (1934) *Walnut blight and its control in the Pacific Northwest*. U.S. Dept. Agric. Circ. 331.
- Miller, P. W. and Bollen, W. B. (1946) Walnut bacteriosis and its control. *Technical Bulletin of Oregon Agricultural Experiment Station*, 9, 1-107.
- Miller, P. W. (1951) The control of walnut blight in the Pacific Northwest.
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca-Presidencia de la Nación (MAGyP), Secretaría de Alimentos y Bioeconomía, Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas, Dirección de Cadenas Alimentarias (DCA) (2019) *Cadena de la nuez (Juglans regia)*. Argentina.
- Mixon, J.T. (2012) *Prevalence of copper resistance among foliar bacterial pathogens of tomato in Tennessee*. Master of Science Thesis. The University of Tennessee.

- Moragrega, C. and Özaktan, H. (2010) Apical necrosis of Persian (English) walnut (*Juglans regia*): an update. *Journal of Plant Pathology*, 92, 67-71.
- Moragrega, C., Matias, J., Aletà, N., Montesinos, E. and Rovira, M. (2011) Apical necrosis and premature drop of Persian (English) walnut fruit caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Plant Disease*, 95(12), 1565-1570.
- Moragrega, C. (2012) Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *Journal of Plant Pathology*, 94, 155-159.
- Morales, G, Llorente I, Montesinos, E. and Moragrega, C. (2016) Basis for a predictive model of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* growth and infections in host plants. *Acta Horticulturae*, 1149, 1-8.
- Morales, G., Llorente, I., Montesinos, E. and Moragrega, C. (2017) A model for predicting *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* growth as a function of temperature. *PLoS One*, 12(5), e0177583.
- Moya Elizondo, E., Auil, P., Oyarzúa, P. y Gerding, M. (2018) Resistencia al ión cobre de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nodedales de la región del Biobío. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science*, 34(1), 3-11.
- Mulrean, E. N. and Schroth, M. N. (1981). A semi-selective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* from walnut buds and catkins. *Phytopathology*, 71(3), 336-339.
- Mulrean, E. N. and Schroth, M. N. (1982) Ecology of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* on Persian (English) walnuts. *Phytopathology*, 72(4), 434-438.
- Muncharaz Pou, M. (2012) *El nogal: Técnicas de producción de fruto y madera*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Myresiotis, C. K., Testempasis, S., Vryzas, Z., Karaoglanidis, G. S. and Papadopoulou-Mourkidou, E. (2015) Determination of mycotoxins in pomegranate fruits and juices using a QuEChERS-based method. *Food Chemistry*, 182, 81-88.

- Myung, I. S., Jeong, I. H., Moon, S. Y., Lee, S. W. and Shim, H. S. (2010-a) A new disease, arboricola leaf spot of bell pepper, caused by *Xanthomonas arboricola*. *Plant Disease*, 94, 271.
- Myung, I. S., Moon, S. Y., Jeong, I. H., Lee, S. W. and Ra, D. S. (2010-b) A new disease, bacterial fruit rot of jujube, caused by *Xanthomonas arboricola* in Korea. *New Disease Reports*, 22, 12.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. (1983) *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. University Park, USA. Pennsylvania State University Press.
- Nievas, W., Rossini, M. y Tooranzo, J. (2014) Bacteriosis del nogal (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*) en el Valle Medio del río Negro. Río Negro, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Nievas, W. y Rossini, M. (2015) Bacteriosis del nogal en Valle Medio. *Fruticultura*, 75, 6-9.
- Ninot, A., Aletà, N., Moragrega, C., and Montesinos, E. (2002). Evaluation of a reduced copper spraying program to control bacterial blight of walnut. *Plant Disease*, 86(6), 583-587.
- Nutrinfo (2020) *Nutrinfo* [en línea] disponible en <https://www.nutrinfo.com/vademecum/index?AlimentoSearch%5Bnombre%5D=nueces> [consulta: 7 de enero, 2022].
- Oliveira, M., Guerner-Moreira, J., Mesquita, M.M. and Abreu, I. (2009) Important phytopathogenic airborne fungal spores in a rural area: incidence of *Botrytis cinerea* and *Oidium* spp. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 16(2), 197-204.
- Oviedo, M. S., Ramirez, M. L., Barros, G. G., and Chulze, S. N. (2011) Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* on irradiated soya beans. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2), 127-132.

- Özaktan, H., Erdal, M., Akkopru, A. and Aslan, E. (2012) Biological control of bacterial blight of walnut by antagonistic bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 94, 53-56.
- Patriarca, A., Medina, A., Fernández Pinto, V. and Magan, N. (2014) Temperature and water stress impacts on growth and production of altertoxin-II by strains of *Alternaria tenuissima* from Argentinean wheat. *World Mycotoxin Journal*, 7(3), 329-334.
- Patriarca, A., da Cruz Cabral, L., Pavicich, M. A., Nielsen, K. F. and Andersen, B. (2019) Secondary metabolite profiles of small-spored *Alternaria* support the new phylogenetic organization of the genus. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 135-143.
- Pepeljnjak, S. and Šegvić, M. (2003) Occurrence of fungi in air and on plants in vegetation of different climatic regions in Croatia. *Aerobiologia*, 19(1), 11-19.
- Pernezny, K., Nagata, R., Havranek, N. and Sanchez, J. (2008) Comparison of two culture media for determination of the copper resistance of *Xanthomonas* strains and their usefulness for prediction of control with copper bactericides. *Crop Protection*, 27, 256–262.
- Pierce, N. B. (1901) Walnut bacteriosis. *Botanical Gazette*, 31(4), 272-273.
- Poggi, D. R., Flores, P. C. y Catraro, M. A. (2013) El cultivo del nogal y su sensibilidad a la bacteriosis del nogal (*X. campestris* pv. *juglandis*)- Actualización. *Agromensajes*, 35, 23-29.
- Pose, G. (2007) *Caracterización de hongos fitopatógenos-toxicogénicos en productos frutihortícolas. El modelo Alternaria causante de 'enmohecimiento negro' en frutos de tomate cultivados en Argentina*. Tesis doctoral. Argentina, Universidad Nacional de Quilmes.
- Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A. and Fernández Pinto, V. (2009) Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a

- synthetic tomato medium. *International journal of food microbiology*, 135(1), 60-63.
- Pose, G. (2015) *Apuntes de la asignatura Fisiología y genética de microorganismos*. Documento inédito. Río Negro: Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente, Universidad Nacional de Río Negro.
 - Pothier, J.F., Pagani, M.C., Pelludat, C., Ritchie, D.F. and Duffy, B. (2011) A duplex-PCR method for species-and pathovar-level identification and detection of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *Journal of Microbiological Methods*, 86, 16-24.
 - Radix, P., Bastien, C., Jay-Allemand, C., Charlot, G. and Seigle-Murandi, F. (1998) The influence of soil nature on polyphenols in walnut tissues. A possible explanation of differences in the expression of walnut blight. *Agronomie*, 18, 627-637.
 - Ramos, G. B. D. A. and Rosato, Y. B. (1996) Copper accumulation in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Brazilian journal of Genetics*, 19, 551-554.
 - Resolución 1352/1967, Secretaría de Agricultura y Ganadería, 14 de noviembre de 1967.
 - Roach, R., Mann, R., Gambley, C. G., Shivas, R. G., Chapman, T. and Rodoni, B. (2020) Pathogenicity and copper tolerance in Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot. *Crop Protection*, 127, 1-11.
 - Rodriguez, A. B. y Muñoz, A. R. (2020) Análisis climático de Valle Medio y Río Colorado: caracterización agrometeorológica y cartografía de suelos. Argentina. Ediciones INTA.
 - Ryan, R. P., Vorhölter, F. J., Potnis, N., Jones, J. B., Van Sluys, M. A., Bogdanove, A. J. and Dow, J. M. (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 9(5), 344-55.

- Sánchez, E. E. (2020) *Programa Nacional Frutales. Superficie ocupada por plantaciones frutales en el país y cambios en su estructura productiva*. Buenos Aires, Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Sawada, H., Kunugi, Y., Watauchi, K., Kudo, A. and Sato, T. (2011) Bacterial spot, a new disease of grapevine (*Vitis vinifera*) caused by *Xanthomonas arboricola*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 77, 7-22.
- Schaad, N. W., Jones, J. and Chum, W. (2001) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Scortichini, M., Marchesi, U. and Di Prospero, P. (2001) Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *juglandis*; *X. juglandis* pv. *juglandis*) strains from different geographical areas shown by repetitive polymerase chain reaction genomic fingerprinting. *Journal of Phytopathology*, 149(6), 325-332.
- Scortichini, M. (2010) Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and nut fruit trees species. *Journal of Plant Pathology*, 92, 73-78.
- Scotton, M., Bortolin, E., Fiorin, A. and Belisario, A. (2015) Environmental and pathogenic factors inducing brown apical necrosis on fruit of English (Persian) walnut. *Phytopathology*, 105(11), 1427-1436.
- Sena Vélez, M. (2015) *Mecanismos implicados en las etapas iniciales de infección en la canchrosia de los cítricos provocada por Xanthomonas citri subsp. citri*. Tesis doctoral. Madrid, Universidad Politécnica de Madrid.
- Seta, S. A. (2019) *Caracterización y epidemiología de Xanthomonas arboricola pv. juglandis en nogal europeo (Juglans regia) en la región centro de la República Argentina*. Tesis doctoral. Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario.

- Simmons, E.G. and Roberts, R.G. (1993) *Alternaria* themes and variations (73), XII. Morphology and toxigenicity of *Alternaria* associated with black spot disease of Japanese pear. *Mycotaxon*, 48, 109-140.
- Simmons, E. (2007) *Alternaria: An identification manual*. Fungal Biodiversity Centre. Netherlands.
- Smith, R. E., Smith, C. O. and Ramsey, H. J. (1912) Walnut culture in California and walnut blight. *Calif. Agric. Exp. Stn. Bull.* 231,119-398.
- Somma, S., Pose, G., Pardo, A., Mulè, G., Pinto, V. F., Moretti, A. and Logrieco, A. F. (2011) AFLP variability, toxin production, and pathogenicity of *Alternaria* species from Argentinean tomato fruits and puree. *Int J Food Microbiol.*, 145 (2-3), 414-419.
- Stein, B., Ramallo, J., Foguet, L., and Graham, J. H. (2007) Citrus leafminer control and copper sprays for management of citrus canker on lemon in Tucuman, Argentina. *Proceedings of the Florida state horticultural society*, 120, 127-131.
- Stein, B. E., Ramallo, C. J., Salas, H., Foguet, L., y Graham, J. H. (2014) Evaluación de diferentes formulaciones cúpricas para el control de la cancrrosis de los cítricos en limoneros en la provincia de Tucumán, R. Argentina. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 91(2), 9-16.
- Temperini, C. V., Pardo, A. G., y Pose, G. N. (2014) Bacteriosis y necrosis apical del nogal: complejos microbianos involucrados en caída temprana de frutos en el Valle Medio del río Negro. *SNS publicación periódica científico-tecnológica*, 5; 9-14.
- Temperini, C. V., Pardo, A. G. and Pose, G. N. (2017) First report of apical necrosis in walnut cultivars from Northern Argentinean Patagonia. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 8(7), 414.
- Temperini, C.V. (2018) *Biodiversidad, concentración y caracterización de hongos fitopatógenos y micotoxigenicos en ambientes agrícolas de la*

- región productora del Alto Valle del río Negro. Tesis doctoral. Argentina, Universidad Nacional de Quilmes.
- Temperini, C. V., Franchi, M. L., Rozo, M. E. B., Greco, M., Pardo, A. G. and Pose, G. N. (2019) Diversity and abundance of airborne fungal spores in a rural cold dry desert environment in Argentinean Patagonia. *Science of The Total Environment*, 665, 513-520.
 - Torres Pinto, A. (2017) Consejo técnico: Cómo reconocer la bacteriosis del nogal o peste negra. *PortalFrutícola.com* [en línea] disponible en <https://www.portalfruticola.com/noticias/2017/01/13/consejo-tecnico-reconocer-la-bacteriosis-del-nogal-pesto-negra/> [consulta: 06 de marzo, 2021].
 - Trapero Casas A. y Arquero Quílez, O. (2019) “*Enfermedades de la parte área del nogal*”. Jornada técnica, El conreu del noguer.
 - Triplett, L. R., Verdier, V., Campillo, T., Van Malderghem, C., Cleenwerck, I., Maes, M., Deblais, L., Corral, R., Koita, O., Cottyn, B. and Leach, J.E. (2015) Characterization of a novel clade of *Xanthomonas* isolated from rice leaves in Mali and proposal of *Xanthomonas maliensis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*.
 - Vagelas, I. K., Rumbos, C. I., and Tsiantos, J. (2012) Variation in disease development among persian walnut cultivars, selections and crosses when inoculated with *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 57-61.
 - Vaquera, S., Patriarca, A., and Pinto, V. F. (2014) Water activity and temperature effects on growth of *Alternaria arborescens* on tomato medium. *International journal of food microbiology*, 185, 136-139.
 - Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings, J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(3), 472-489.

- Vauterin, L., Rademaker, J. and Swings, J. (2000) Synopsis on the Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 90(7), 677-682.
- Velazquez, P. y Corroto, A. J. (2005) Evaluación de bactericidas cúpricos para el control de cancrrosis en plantines de pomelo. V Congreso Argentino de Citricultura.
- Vinson, J.A. y Cai Y. (2012) Nuts, especially walnuts, have both antioxidant quantity and efficacy and exhibit significant potential health benefits. *Food and Function*, 3, 134-140.
- Young, J., Luketina, R. and Marshall, A. (1977) The effects on temperature on growth in vitro of *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas pruni*. *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 345-354.
- Zevenhuizen, L. P. T. M., Doling, J., Eshuis, E. J. and Scholten-Koerselman, I. J. (1979) Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology*, 5(2), 139-146.

ANEXOS

ANEXO 1

Composición y preparación de medios de cultivos y soluciones

Medios de cultivo

Agar Agua (AA)	
Agar	20 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Mezclar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar Almidón	
Extracto de carne	3 g
Almidón soluble	10 g
Agar	12 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Disolver los ingredientes, ajustar el pH a 7,2 y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar Bilis Esculina (Polvo comercial)	
Extracto de carne	3 g
Peptona de carne	5 g
Bilis de buey	40 g
Esculina	1 g
Citrato férrico	0,5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Suspender 64,5 g del polvo en 1 L de agua destilada. Dejar reposar 5 min y calentar hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar F (Polvo comercial)	
Tripteína	10 g
Peptona de carne	10 g
Fosfato dipotásico	1,5 g
Sulfato de magnesio	1,5 g
Agar	15 g
Glicerina	10 ml
Agua destilada	1 L
Preparación: Suspender 38 g de polvo por litro de agua. Agregar glicerina. Mezclar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar Gelatina Nutritiva	
Peptona de carne	10 g
Extracto de carne	3 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Disolver los ingredientes, colocar en tubos de a 5 ml y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar Leche Descremada	
Medio basal:	
Pluripeptona	5 g
Extracto de carne	3 g
NaCl	8 g
Agar	15 g
Agua destilada	900 ml
Solución leche descremada:	
Leche descremada	20 g
Agua destilada	100 ml
Preparación: Esterilizar en autoclave ambas preparaciones por separado durante 15 min (Medio basal, 121 °C. Solución de leche descremada, 115 °C, para evitar su caramelización). Dejar enfriar a 45-50 °C y mezclar ambas preparaciones (volumen final: 1L).	

Agar Luria Bertani (LB)	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agar	10 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Mezclar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar Nutritivo (AN)	
Caldo Nutritivo	8 g
NaCl	8 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Mezclar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar Nutritivo modificado con glucosa (ANG)	
Caldo Nutritivo	8 g
NaCl	8 g
Glucosa	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Mezclar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar Papa Dextrosa (PDA) (Polvo comercial)	
Infusión de papa	4 g
Glucosa	120 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
Preparación: 39 g de polvo por litro de agua. Mezclar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. pH final: 5,6	

Agar Papa Dextrosa (Polvo comercial) suplementado con Cloranfenicol (PDAC)	
Infusión de papa	4 g
Glucosa	120 g
Agar	15 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Pesar 39 g de polvo y 0,1 g de Cloranfenicol por litro de agua. Mezclar los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar Papa Zanahoria (PZA)	
Papa	20 g
Zanahoria	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Cortar los vegetales sin pelar y hervirlos en 0,5 L de agua destilada durante 20-30 min. Filtrar y llevar a volumen final de 1 L. Mezclar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Agar Tween 80	
Peptona	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g
Agar	15 g
Tween 80	10 ml
Agua destilada	1 L
Preparación: Ajustar el pH a 7,4. Esterilizar en recipientes separados el medio y el Tween. Luego, mezclarlos.	

Agar Urea	
Triptena	1 g
Glucosa	1 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Rojo fenol	0,012 g
Agar	15 g
Agua destilada	950 ml
Solución de urea al 40 %	50 ml
Preparación: Disolver en los 950 ml de agua destilada todos los ingredientes, dejar reposar 5 minutos. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C. Enfriar a 50 °C y agregar la solución de urea.	

Caldo Extracto de levadura-peptona-dextrosa (YDP)	
Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Dextrosa	20 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Mezclar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Caldo Luria Bertani (LB)	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Mezclar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Caldo Nitrato	
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
KNO ₃	1 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Disolver los ingredientes, colocar en tubos de a 5 ml y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Caldo Triptonado	
Triptona	15 g
NaCl	5 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Disolver los ingredientes, colocar en tubos de a 5 ml y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. pH final: 7,1.	

Medio CYEG (glucosa)	
Tripteína bacteriológica	1,7 g
Extracto de levadura	0,35 g
Glucosa	5 g
Agar	17 g
Agua destilada	1 L
Preparación: Mezclar y ajustar el pH del medio a 7 (puede utilizarse solución NaOH 1N). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.	

Medio Xan-D	
<i>Medio basal:</i>	
Peptona de soja	10 g
Tween 80	10 ml
KBr	10g
Agar	15 g
Agua destilada	0,5 L
<i>Solución de leche descremada:</i>	
Leche descremada	10 g
Agua destilada	0,5 L
<i>Colorante:</i>	
Azul de bromotimol	24 mg
Preparación: Esterilizar en autoclave ambas preparaciones por separado durante 15 min (Medio basal, 121 °C. Solución de leche descremada, 115 °C, para evitar su caramelización). Luego, mezclar en caliente ambas preparaciones (volumen final: 1L). Enfriar a 50-60 °C y agregar bajo condiciones de esterilidad el azul de bromotimol. Homogenizar. pH final: 6,5	

Soluciones

Ácido acético 5 N	
Ácido acético glacial	28,75 ml
Agua destilada	71,25 ml

Buffer MES 1M	
MES	48,8 g
Agua destilada	250 ml
Preparación: Mezclar y ajustar el pH a 6,9 utilizando solución NaOH 1 N. Esterilizar por filtración utilizando un filtro de jeringa de 0,2 µm.	

Cristal violeta y oxalato de amonio	
<i>Solución A:</i>	
Cristal violeta (pureza mínima 90%)	2 g
Etanol 95 %	20 ml
<i>Solución B:</i>	
Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80 ml
Preparación: Mezclar cada soluto en su respectivo disolvente. Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice. Mezclar las dos soluciones y filtrar.	

Decolorante alcohol acetona	
Alcohol etílico (95 %)	500 ml
Acetona	300 ml

Lugol	
Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	300 ml
Preparación: Mezclar y filtrar. Almacenar la solución en una botella oscura.	

Reactivo de Griess	
<i>Solución A:</i>	
Ácido sulfanílico	8 g
Ácido acético 5N	1 L
<i>Solución B:</i>	
α-naftol	5 g
Ácido acético 5N	1 L
Preparación: Si es necesario, calentar para disolver y filtrar. Colocar en un frasco color ámbar y conservar a 2-8 °C en oscuridad. Si cualquiera de las soluciones se torna colorida, agitar colocando 0,5 g de zinc en polvo por cada 150 ml de solución y filtrar.	

Reactivo de Kovacs	
Para-dimetil-aminobenzaldehído	10 g
Alcohol amílico o isoamílico	150 ml
HCl concentrado	50 ml
Preparación: Disolver el aldehído en el alcohol y añadir el ácido lentamente. Se almacena en heladera.	

Safranina	
Safranina (pureza: 90%)	0,25 g
Alcohol etílico (95 %)	10 ml
Agua destilada	1 L
Preparación: Disolver el colorante en el alcohol. Agregar el agua destilada. Filtrar. Almacenar en frasco con tapón de vidrio.	

Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O) 0,64 M	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	15,98 g
Agua destilada	100 ml
Preparación: Mezclar y esterilizar por filtración utilizando un filtro de jeringa de 0,2 µm.	

Soluciones de antimicrobianos

Soluciones de antimicrobianos. Concentración final de cobre: 20 g/L		
Producto	Cantidad de producto químico	Cantidad de agua destilada
A1	2 g	50 ml
A2	2 g	50 ml
A3	2 g	50 ml
B	2,86 g	50 ml
C	3,7 ml	46,3 ml
D	7,9 ml	42,1 ml
E	3,92 g	50 ml
F	1,33 g	50 ml

ANEXO 2

Identificación de aislamientos de *Alternaria* a nivel grupos-especies

<i>Identificación de Alternaria a nivel grupos-especies</i>			
Aislamiento	Estado fenológico	Órgano floral	Grupo-especies
A.AVM	Af2	yema terminal	<i>A. tenuissima</i>
B.AVM	Df2	escamas	<i>A. alternata</i>
C.AVM	Af2	yema terminal	<i>A. tenuissima</i>
D.AVM	Af2	yema terminal	<i>Alternaria</i> sp.
E.AVM	Bm-Cm	amento	<i>A. tenuissima</i>
F.AVM	Af2	yema terminal	<i>A. tenuissima</i>
G.AVM	Fm-Fm2	amento	<i>A. alternata</i>
3AVM	Af	yema terminal	<i>A. tenuissima</i>
22AVM	Af	yema lateral	<i>A. tenuissima</i>
30AVM	Af	yema terminal	<i>A. tenuissima</i>
46AVM	Af	yema lateral	<i>A. tenuissima</i>
93AVM	Amg	amento	<i>A. tenuissima</i>
100AVM	Amg	amento	<i>A. tenuissima</i>
106AVM	Af2	yema terminal	<i>A. tenuissima</i>
111AVM	Af2	yema terminal	<i>A. tenuissima</i>
159AVM	Af2	yema lateral	<i>A. tenuissima</i>
160AVM	Af2	yema lateral	<i>A. tenuissima</i>
187AVM	Amg	amento	<i>Alternaria</i> sp.
208AVM	Bf	yema terminal	<i>A. tenuissima</i>
217AVM	Bf	yema lateral	<i>A. tenuissima</i>
223AVM	Bf	yema lateral	<i>A. tenuissima</i>
236AVM	Bf	yema terminal	<i>A. tenuissima</i>
249AVM	Bm-Cm	amento	<i>A. tenuissima</i>
262AVM	Df2	escamas	<i>A. tenuissima</i>
263AVM	Df2	escamas	<i>A. tenuissima</i>
269AVM	Cf	brote	<i>A. tenuissima</i>
273AVM	Cf	brote	<i>A. tenuissima</i>
285AVM	Fm-Fm2	amento	<i>A. tenuissima</i>
291AVM	Dm2	amento	<i>A. tenuissima</i>
293AVM	Dm2	amento	<i>A. tenuissima</i>
296AVM	Ff1-Ff2	estigmas	<i>A. tenuissima</i>
298AVM	Ff1-Ff2	ovario	<i>A. tenuissima</i>
299AVM	Gf	fruto (cuaje)	<i>A. tenuissima</i>
300AVM	-	fruto	<i>A. tenuissima</i>
301AVM	-	fruto	<i>A. tenuissima</i>

ANEXO 3

Frecuencia de aislamiento y abundancia de *X. arboricola* pv. *juglandis* en diferentes estados fenológicos del nogal

Cultivo Orgánico - 2016									
Muestreos	Órgano floral	Estado fenológico	Muestras analizadas	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)			
						Prom.	Mín.	Máx.	Desvío estándar
INVIERNO	Julio semana 1	Af2	10	Superficie	14,0	6450	1500	11400	4950
				Interior	28,0	19575	200	30000	11471
			10	Superficie	14,0	1300	400	2200	900
				Interior	14,0	17000	400	30000	13000
		Amg	10	Superficie	14,0	850	100	1600	750
				Interior	0,0	—	—	—	—
			10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	7,0	2400	2400	2400	0
PRIMAVERA	Septiembre semana 3	Bf	10	Superficie	28,0	863	150	2100	768
				Interior	14,0	950	900	1000	50
			10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
		Bm-Cm	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
			5	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
	Octubre semana 1	Df2	8	Superficie	0,0	—	—	—	—
		Dm2	3	Superficie	0,0	—	—	—	—
		Fm-Fm2	6	Superficie	0,0	—	—	—	—
		Ff1-Ff2	5	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
			5	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—

Cultivo Tradicional – 2016									
Muestreos	Órgano floral	Estado fenológico	Muestras analizadas	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)			
						Prom.	Mín.	Máx.	Desvío estándar
INVERNO	Julio semana 1	Af2	10	Superficie	14,0	1700	100	3300	1600
				Interior	49,0	12586	300	30000	12741
			10	Superficie	14,0	300	300	300	0
				Interior	21,0	20233	700	30000	13812
		Amg	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
	Septiembre semana 3	Bf	10	Superficie	7,0	9450	9450	9450	0
				Interior	7,0	7700	7700	7700	0
			10	Superficie	7,0	4200	4200	4200	0
				Interior	7,0	1000	1000	1000	0
		Bm-Cm	10	Superficie	7,0	150	150	150	0
				Interior	0,0	—	—	—	—
PRIMAVERA	Octubre semana 1	Df2	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
		Dm2	4	Superficie	0,0	—	—	—	—
		Fm-Fm2	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
	Octubre semana 3	Ff1-Ff2	5	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
		Ff1-Ff2	5	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
	Noviembre semana 1	Gf	10	Superficie	28,0	47650	10600	60000	21391
				Interior	0,0	—	—	—	—

Cultivo Tradicional – 2017									
Muestreos	Órgano floral	Estado fenológico	Muestras analizadas	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)			
						Prom.	Mín.	Máx.	Desvío estándar
INVIERNO	Junio semana 3	Af	10	Superficie	7,0	400	400	400	0
				Interior	28,0	15450	2100	28500	10566
			10	Superficie	14,0	650	300	1000	350
				Interior	35,0	2580	200	7000	2558
	Agosto Semana 4	Af2	10	Superficie	7,0	300	300	300	0
				Interior	42,0	6183	1100	15000	4495
			10	Superficie	14,0	3500	1600	5400	1900
				Interior	56,0	3325	600	6800	2527
	Junio semana 3 Agosto semana 4	Amg	20	Superficie	14,0	4375	100	14000	5682
				Interior	3,5	100	100	100	0
PRIMAVERA	Septiembre semana 3	Bf	10	Superficie	21,0	5450	150	15000	6766
				Interior	21,0	967	100	2700	1226
			10	Superficie	7,0	2100	2100	2100	0
				Interior	21,0	4700	100	10900	4552
		Bm-Cm	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
	Octubre semana 1	Cf	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	7,0	1000	1000	1000	0
		Df2	4	Superficie	17,5	1000	1000	1000	0
				Superficie	0,0	—	—	—	—
		Fm-Fm2	5	Superficie	14,0	200	200	200	0
				Superficie	0,0	—	—	—	—
	Octubre semana 3	Ff1-Ff2	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
		Ff1-Ff2	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—
	Noviembre semana 1	Gf	20	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0	—	—	—	—

ANEXO 4

Frecuencia de aislamiento y abundancia de *Alternaria* spp. en diferentes estados fenológicos del nogal

Cultivo Orgánico – 2016									
Muestreos	Órgano floral	Estado fenológico	Muestras analizadas	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)			
						Prom.	Mín.	Máx.	Desvío estándar
INVIERNO	Julio semana 1	Af2	10	Superficie	40,0	125	100	200	43
				Interior	10,0				
			10	Superficie	20,0	100	100	100	0
				Interior	40,0				
		Amg	10	Superficie	10,0	100	100	100	0
				Interior	100,0				
PRIMAVERA	Septiembre semana 3	Bf	10	Superficie	40,0	150	150	150	0
				Interior	30,0				
			10	Superficie	40,0	188	150	300	65
				Interior	10,0				
		Bm-Cm	10	Superficie	50,0	180	150	300	60
				Interior	70,0				
	Octubre semana 1	Cf	5	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	20,0				
		Df2	8	Superficie	25,0	200	200	200	0
		Dm2	3	Superficie	66,7	500	200	800	300
		Fm-Fm2	6	Superficie	66,7	450	200	800	260
	Octubre semana 3	Ff1-Ff2	5	Superficie	20,0	100	100	100	0
				Interior	0,0				
		Ff1-Ff2	5	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0				

Cultivo Tradicional – 2016									
Muestreos	Órgano floral	Estado fenológico	Muestras analizadas	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)			
						Prom.	Mín.	Máx.	Desvío estándar
INVERNO	Julio semana 1	Af2	10	Superficie	20,0	150	100	200	50
				Interior	30,0				
			10	Superficie	10,0	100	100	100	0
				Interior	50,0				
		Amg	10	Superficie	20,0	100	100	100	0
				Interior	90,0				
PRIMAVERA	Septiembre semana 3	Bf	10	Superficie	30,0	350	150	600	187
				Interior	10,0				
			10	Superficie	40,0	188	150	300	65
				Interior	10,0				
		Bm-Cm	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	50,0				
	Octubre semana 1	Df2	10	Superficie	20,0	400	200	600	200
		Dm2	4	Superficie	25,0	200	200	200	0
		Fm-Fm2	10	Superficie	40,0	450	400	600	87
	Octubre semana 3	Ff1-Ff2	5	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0				
		Ff1-Ff2	5	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	0,0				
	Noviembre semana 1	Gf	10	Superficie	20,0	200	200	200	0
				Interior	0,0				

Cultivo Tradicional - 2017									
Muestreos	Órgano floral	Estado fenológico	Muestras analizadas	Ubicación	Frecuencia aislamiento (%)	Recuento (UFC/órgano)			
						Prom.	Mín.	Máx.	Desvío estándar
INVERNO	Junio semana 3	Yemas terminales en reposo invernal	10	Superficie	40,0	200	100	300	71
				Interior	70,0				
			10	Superficie	50,0	220	200	300	40
				Interior	100,0				
	Agosto Semana 4	Yemas terminales con caída de escamas externas	10	Superficie	60,0	150	100	300	76
				Interior	100,0				
			10	Superficie	20,0	300	100	500	200
				Interior	90,0				
	Junio semana 3 Agosto semana 4	Amentos en reposo invernal	20	Superficie	25,0	140	100	200	49
				Interior	95,0				
PRIMAVERA	Septiembre semana 3	Yemas terminales hinchadas	10	Superficie	90,0	233	150	450	103
				Interior	90,0				
			10	Superficie	30,0	350	150	600	187
				Interior	100,0				
		Amentos en crecimiento e individualización de flores masculinas	10	Superficie	30,0	150	150	150	0
				Interior	80,0				
		Brotes	10	Superficie	40,0	250	200	400	87
				Interior	80,0				
	Octubre semana 1	Escamas correspondientes a hojas desplegadas	4	Superficie	25,0	600	600	600	0
		Amentos con apertura de flor masculina	5	Superficie	100,0	440	200	800	233
		Amentos entre inicio de dehiscencia y dehiscencia total de anteras	5	Superficie	60,0	733	200	1800	754
	Octubre semana 3	Ovarios (flores femeninas)	10	Superficie	10,0	100	100	100	0
				Interior	0,0				
		Estigmas (flores femeninas)	10	Superficie	0,0	—	—	—	—
				Interior	10,0				
	Noviembre semana 1	Frutos recién cuajados	20	Superficie	5,0	200	200	200	0
				Interior	0,0				

ANEXO 5

**Evaluación de la respuesta de cultivares comerciales de nogal a la infección por los
microorganismos patógenos**

<i>Lesiones causadas por X. arboricola pv. juglandis sobre frutos inmaduros de diferentes cultivares de nogal</i>									
VARIEDAD	DIÁMETRO PROMEDIO DE LESIÓN EXTERNA (mm)						ÍNDICE DE LESIÓN INTERNA		
	Días	7 días			15 días			15 días	
	Zona	Ecuatorial 1	Ecuatorial 2	Extremo estigmático	Ecuatorial 1	Ecuatorial 2	Extremo estigmático	Ecuatorial	Extremo estigmático
TULARE	1	2,75	2,50	2,50	3,00	2,50	2,75	2	2
	2	3,00	0,00	2,00	3,50	2,75	2,75	2	2
	3	2,00	1,50	0,00	4,25	3,50	1,25	2	2
	4	2,50	2,00	1,25	3,25	2,00	1,75	2	2
CHANDLER	1	2,50	2,25	1,75	3,75	2,75	2,00	2	2
	2	2,75	2,00	1,75	8,50	8,50	4,00	2	2
	3	2,75	2,00	1,25	6,25	3,25	2,00	2	2
	4	2,50	2,00	1,25	2,50	2,25	1,75	2	2
	5	2,50	2,00	1,50	6,00	3,00	3,50	2	2
	6	2,75	2,00	1,75	7,00	3,50	2,00	2	2
FRANQUETTE	1	2,75	2,00	1,25	3,50	2,00	1,25	2	2
	2	1,50	1,50	1,25	1,50	1,50	1,50	2	2
	3	2,50	2,00	2,00	3,75	3,25	2,00	2	2
	4	2,75	2,00	2,00	4,00	3,75	2,00	2	2
	5	2,50	2,00	1,50	3,25	2,50	2,00	2	2
	6	3,25	2,00	1,75	3,75	2,25	2,25	2	2
	7	2,25	2,00	2,00	2,75	2,00	2,00	2	2

Lesiones causadas por <i>A. tenuissima</i> sobre frutos inmaduros de diferentes cultivares de nogal							
VARIEDAD	DIÁMETRO PROMEDIO DE LA LESIÓN EXTERNA (mm)					ÍNDICE DE LESIÓN INTERNA	
	Días	7 días		15 días		15 días	
	Zona	Ecuatorial	Extremo estigmático	Ecuatorial	Extremo estigmático	Ecuatorial	Extremo estigmático
TULARE	1	6,75	15,25	7,25	18,75	1	1
	2	14,50	22,50	14,50	22,50	1	1
	3	8,50	8,00	9,75	9,50	1	1
	4	16,50	21,00	17,50	36,00	1	1
	5	6,50	5,50	8,00	6,00	1	1
CHANDLER	1	5,75	6,75	7,50	7,50	1	1
	2	3,50	7,25	3,50	7,25	1	1
	3	6,25	7,00	8,50	9,00	1	1
	4	7,00	10,00	10,00	13,00	1	1
	5	6,00	9,00	6,50	9,50	1	1
	6	8,50	9,00	8,50	9,50	1	1
FRANQUETTE	1	5,00	9,50	5,25	9,50	1	1
	2	4,25	8,00	4,25	8,00	1	1
	3	2,75	10,00	2,75	10,00	1	1
	4	6,50	8,00	6,50	8,00	1	1
	5	6,50	9,00	6,50	9,00	1	1
	6	6,50	8,50	6,50	8,50	1	1
	7	5,50	9,50	5,50	12,00	1	1

Lesiones causadas por <i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> y <i>A. tenuissima</i> sobre frutos inmaduros de diferentes cultivares de nogal							
VARIEDAD	DIÁMETRO PROMEDIO DE LA LESIÓN EXTERNA (mm)					ÍNDICE DE LESIÓN INTERNA	
	Días	7 días		15 días		15 días	
	Zona	Ecuatorial	Extremo estigmático	Ecuatorial	Extremo estigmático	Ecuatorial	Extremo estigmático
TULARE	1	10,00	7,00	10,00	7,00	3	2
	2	10,50	9,50	15,50	22,00	2	2
	3	8,25	8,00	13,00	20,00	2	2
	4	8,75	7,00				
CHANDLER	1	5,50	9,50	5,75	12,00	2	2
	2	7,00	8,50	7,00	10,00	2	2
	3	5,50	10,00	6,50	10,00	2	2
	4	7,50	10,00	7,50	10,00	2	4
	5	7,50	6,50	7,50	10,00	2	2
FRANQUETTE	1	7,75	8,00	7,75	8,00	2	2
	2	7,50	11,50	7,50	11,50	2	2
	3	6,50	10,50	6,50	10,50	2	2
	4	6,50	9,50	6,50	10,00	2	2
	5	6,00	10,00	6,25	10,00	2	2
	6	7,00	9,00	7,00	9,00	2	2
	7	5,00	11,50	6,00	11,50	2	2

ANEXO 6

Determinación de la sensibilidad al cobre de aislamientos de *X. arborícola* pv. *juglandis*

Aislamiento	Estado fenológico	Órgano floral	Concentraciones de CuSO ₄ .5H ₂ O en medio CYEG (mM)				
			0	0,2	0,5	1,0	2,0
H7(1)JVM	-	fruto lesionado	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
U1(2)JVM	Af2	yema terminal	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
X1(1)JVM	Af2	yema lateral	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
X1(2)JVM	Af2	yema lateral	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
B6JVM	-	fruto lesionado	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
C7JVM	-	fruto lesionado	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
71JVM	Bf	yema lateral	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
88JVM	-	fruto lesionado	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
89JVM	-	fruto lesionado	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
98JVM	-	fruto lesionado	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
100JVM	-	fruto lesionado	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
101JVM	-	fruto lesionado	(+)	(±)	(-)	(-)	(-)
B1(1)JVM	Af2	yema lateral	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
B1(2)JVM	Af2	yema lateral	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
U1(1)JVM	Af2	yema terminal	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
C6JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
C6(2)JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
P6JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
I7JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
L7(1)JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
32JVM	Amg	amento	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
33JVM	Amg	amento	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
56JVM	Amg	amento	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
66JVM	Bf	yema terminal	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
68JVM	Bf	yema terminal	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
73JVM	Df2	escamas	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
79JVM	Cf	brote	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
81JVM	Df2	escamas	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
92JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
97JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
106JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
107JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
111JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
112JVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
11XVM	-	fruto lesionado	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
39JVM	Af	yema terminal	(+)	(+)	(±)	(-)	(-)
42JVM	Af2	yema lateral	(+)	(+)	(±)	(-)	(-)
53JVM	Af2	yema lateral	(+)	(+)	(±)	(-)	(-)
55JVM	Af2	yema lateral	(+)	(+)	(±)	(-)	(-)

Crecimiento de aislamientos de *X. arborícola* pv. *juglandis* a diferentes concentraciones de CuSO₄.5H₂O.

(+) : crecimiento confluyente, (±) : crecimiento débil, (-) : sin crecimiento

ANEXO 7

Publicación de resultados

Presentaciones a Congresos y Jornadas

“Bacteriosis y Necrosis Apical: Microorganismos aislados en diferentes estados fenológicos del nogal”.

Marangi, M.J.; Temperini, C.V.; Segura, J.A.; Pardo, A.G. y Pose, G.N. 4º Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza, Argentina, 2017. Modalidad: Presentación de Póster.

“Presencia de Xanthomonas arboricola en diferentes estados fenológicos del nogal – caracterización de la población bacteriana responsable de la Bacteriosis y Necrosis Apical del nogal”.

Marangi, M.J.; Temperini, C.V.; Fernández D.; Pardo, A.G. y Pose, G.N. XV Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires, Argentina, 2019. Modalidad: Presentación de Póster.

“Efecto de la temperatura en el crecimiento de cepas de Alternaria tenuissima aisladas a partir de nueces afectadas por Necrosis Apical Marrón sobre un medio de cultivo elaborado en base a nueces”.

Marangi, M.; Greco M.; Temperini, C.; Pardo, A. y Pose, G. X Congreso Latinoamericano de Micología. Santiago, Chile, 2020. Modalidad: Presentación de Video.

“Evaluación de la susceptibilidad de cultivares de importancia comercial a la Bacteriosis y Necrosis Apical Marrón del nogal”.

Marangi, M.J.; Temperini, C.; Greco, M.; Pardo, A. y Pose, G. XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Asunción, Paraguay, 2021. Modalidad: Presentación de Póster.

“Estudio de la influencia de parámetros ambientales sobre el crecimiento de cepas de Alternaria tenuissima aisladas a partir de nueces afectadas por necrosis apical marrón”.

Marangi, M.J.; Greco M.V.; Temperini, C.V.; Uthurry Weinberger, C.A.; Pardo, A.G. y Pose, G.N. III Reunión Argentina de Micología. Córdoba, Argentina, 2022. Modalidad: Presentación de Póster.

Artículos publicados en Revistas científicas

“Distribution of Xanthomonas arboricola pv. juglandis and Alternaria species-groups populations associated with brown apical necrosis at different phenological stages of walnut trees”.

Marangi, M.J.; Temperini, C.V.; Greco, M.; Pardo, A.G. y Pose, G.N. European Journal of Plant Pathology. ISSN en línea: 1573-8469. ISSN impreso: 0929-1873. Agosto, 2023.