



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados



ESTRÍA ROJA EN CAÑA DE AZÚCAR CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR DEL AGENTE ETIOLÓGICO

Ing. Agr. Paola Daniela Fontana

Tesis
Para optar al Grado Académico de
Magister en Ciencias Agropecuarias
Mención: Protección Vegetal

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias

Córdoba, 2010
Argentina

**ESTRÍA ROJA EN CAÑA DE AZÚCAR:
CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS MOLECULAR
DEL AGENTE ETIOLÓGICO**

Paola D. Fontana

Comisión Asesora de Tesis

Director: Ing. Agr. (M.Sc) Jorge A. Mariotti
Co-director: Ing. Agr. (M.Sc) Alejandro Rago
Asesora: Biol. (Mgter) Laura Torres Maldonado

Tribunal Examinador de Tesis

Dra. María de la Paz Gimenez de Pecci
Ing. Agr. (Mgter.) Analía Ruth Salvatore
Biól. (Mgter.) Laura Torres Maldonado

Presentación formal académica

26 de Noviembre de 2010

AGRADECIMIENTOS

- Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), por el otorgamiento de la beca necesaria para concretar este trabajo.
- A la Universidad Nacional de Córdoba y la Facultad de Ciencias Agropecuarias por haberme brindado la posibilidad de realizar esta tesis.
- A la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por sus eficientes labores y cordial trato.
- A mi Director de Tesis, el Ing. Jorge Mariotti quién apoyo mi trabajo brindándome total libertad y confianza.
- A mi co-director de tesis, el Ing. Alejandro Rago por acompañarme en todo momento y por brindarme sus conocimientos y su experiencia.
- A Laura Torres Maldonado, Bióloga (Mgter) miembro asesor de la Comisión de Tesis por sus acertados consejos y su buena predisposición.
- A la Dra. Graciela Vignolo, Investigadora del CERELA quién me brindo generosamente su colaboración, el conocimiento y las herramientas necesarias para la realización de este trabajo.
- A mi Director de Beca, el Ing. Roberto Sopena, Jefe del grupo caña de azúcar de INTA Famaillá, por su permanente apoyo y buenos consejos.
- Al Prof. Pier Sandro Cocconcelli, quién me recibió calidamente en su laboratorio y a todos los compañeros y amigos que tuve la oportunidad de conocer en el Centro Ricerche Biotecnologiche, de la Università Católica del Sacro Cuore, Cremona, Italia.
- A los Dres. Raúl Raya y Fernando Sesma por los importantes aportes científicos y el trato ameno que me brindaron en CERELA.
- A todas las amigas/compañeras del CERELA con quienes compartí gratos momentos de trabajo como también charlas y anécdotas divertidas.
- Al Sr. Martín Zumarraga, del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, por su valiosa colaboración para el análisis estadístico de los datos obtenidos en este trabajo.
- A todos mis amigos y compañeros de diferentes ámbitos (INTA, FAZ-UNT y otros) que me brindaron su apoyo y su cariño, alentándome para cumplir con mis metas.

-A todos mis compañeros del Grupo Caña de Azúcar de la EEA INTA Famaillá, por su cálida compañía y por hacer de nuestro lugar de trabajo un grato espacio de discusión y charlas entretenidas.

-A mi madre, quien me enseñó a valorar la vida y cada acción que en ella emprendía, con su ejemplo de esfuerzo y valentía puestos a diario a lo largo de nuestras vidas.

-A mis hermanos, Cecilia A. Fontana, quién me acompañó y me guió permanentemente brindándome todo su cariño y su experiencia, y Baltazar Fontana por estar siempre presente apoyándome y colaborando en todos los momentos que lo necesité.

-A todas las personas, familiares, amigos y colaboradores, especialmente a la Sra. Gladis Pérez, quien supo cuidar con dedicación, amor y cariño a mis hijos durante mis horas de cursos y viajes de trabajo.

-A Mariano Garmendia, mi compañero de vida, por apoyarme incondicionalmente, por darme la seguridad y la confianza necesarias en todo momento y por sobre todo por el amor y la comprensión que me entrega cada día.

-A Dios... por contar con todo lo mencionado anteriormente y por iluminar y fortalecer mi vida cada día.

*A mi hijos...
Marcos y Luciano*

RESUMEN
Estría Roja en Caña de Azúcar
Caracterización y Análisis Molecular del Agente Etiológico

La estría roja es una enfermedad bacteriana de la caña de azúcar ocasionada por *Acidovorax avenae*. Esta enfermedad ha adquirido mayor relevancia en los últimos años, en todas las zonas cañeras de Argentina, registrando pérdidas de hasta 30% de tallos molible y afectando además la calidad de los jugos. Por otro lado la elevada presión de inóculo que se genera en los sitios de selección produce la eliminación de clones avanzados obtenidos con programas de mejoramiento genético. Debido a esto, es necesario determinar las características del agente causal para contar con un diagnóstico seguro y preciso que permita diseñar estrategias de manejo más efectivas. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización del agente responsable de la estría roja en caña de azúcar proveniente de diferentes zonas productoras de Tucumán y Salta. Mediante la combinación de técnicas de microbiología clásica y métodos moleculares como PCR especie-específica, REP-PCR, RAPD y ARDRA se logró aislar, identificar y caracterizar genéticamente a *Acidovorax avenae* a partir de hojas de caña de azúcar sintomáticas. La identificación fenotípica, como así también la caracterización molecular mediante PCR especie-específica, brindaron datos contundentes confirmando la identidad del agente causal. El análisis molecular de la diversidad genética mediante REP-PCR y RAPD permitió detectar la presencia de al menos cuatro biotipos diferentes entre los aislamientos analizados. La existencia de diversidad genética resulta un dato más que importante para el diseño de estrategias de control mediante el uso de variedades resistentes, o para la obtención de variedades que evidencien elevada tolerancia a las cepas predominantes mediante programas de mejoramiento genético. Los resultados obtenidos constituyen la primera caracterización realizada en la región cañera de Argentina para esta patología.

Palabras claves: *Acidovorax*, REP-PCR, RAPD, ARDRA, diversidad genética

ABSTRACT
Red Stripe of Sugar Cane
Characterization and Molecular Analysis of the etiological agent

The red stripe is a bacterial disease of sugarcane caused by *Acidovorax avenae*. This disease has become more important in recent years in all sugarcane areas of Argentina causing losses of up to 30% of the milling stems and also affecting the quality of the juices. On the other hand, the high inoculum pressure generated in the screening sites leads to the elimination of advanced clones obtained in the breeding programs. In this sense, it is necessary to determine the characteristics of the etiologic agent to have a safe and accurate diagnosis and for the design of more effective management strategies of the disease. The aim of this study was to characterize the agent causing red stripe of sugarcane in Argentina in different producing areas of Tucuman and Salta. By means of combining classical microbiological techniques and molecular methods such as species-specific PCR, REP-PCR, ARDRA and RAPD it was possible to isolate, identify and characterize genetically *Acidovorax avenae* from sugar cane leaves showing symptoms of red stripe. The phenotypic, as well as the molecular characterization provided substantial information confirming the identity of the pathogenic agent. Molecular analysis of genetic diversity by means of RAPD and REP-PCR allowed to detect the presence of at least four different biotypes of the bacteria among the isolates analyzed. The existence of genetic diversity is an important factor to be considered in the design of control strategies using resistant varieties as well as the selection of clones tolerant to the predominant strains. The results presented constitute the first characterization of this pathogen in the sugarcane area of Argentina.

Key words: *Acidovorax*, REP-PCR, RAPD, ARDRA, genetic diversity

Tabla de Contenido

Lista de Figuras	10
Lista de Tablas	14
Lista de abreviaturas y/o símbolos	15
Capítulo I	
INTRODUCCIÓN GENERAL	17
Sector Cañero	17
La caña de azúcar	20
Descripción	20
Productos y subproductos de la caña	21
Proceso de industrialización	21
Aspectos generales del cultivo en Tucumán	22
El sistema productivo en Salta y Jujuy: características generales	25
Enfermedades en el cultivo de caña	26
Estría roja: Descripción de la enfermedad y del patógeno	27
Incidencia de la estría roja en el cultivo	29
Detección y análisis genético de fitopatógenos	31
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
Diseño de cebadores o “primers”	34
Determinación de la variabilidad genética en fitopatógenos	35
Aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico de enfermedades de caña de azúcar	36
Capítulo II	
MATERIALES Y MÉTODOS	39
Muestreo de plantas	39
Obtención de aislamientos	42
Medios de cultivo	42
Componentes, esterilización y determinación de pH	42
Tampones y Soluciones	45
Conservación de las cepas	46
Caracterización de las cepas por técnicas microbiológicas clásicas	46
Caracterización Molecular	47

Obtención de ADN cromosómico a partir de cepas aisladas	47
Extracción de ADN total de las muestras	48
Detección e identificación de <i>Acidovorax avenae</i> mediante PCR	49
Optimización de las condiciones de PCR	50
Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR	51
Preparación de los fragmentos amplificados para reacciones de secuenciación	52
Análisis de la diversidad genética en <i>A. avenae</i>	53
ARDRA “Amplified Ribosomal ADN Restriction Analysis” (Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado)	53
RAPD “Random Amplified Polymorphic ADN” (Análisis de ADN polimórfico amplificado al azar)	54
Rep-PCR (Amplificación de fragmentos repetitivos del genoma mediante PCR)	56
Pruebas de patogenicidad de las cepas de <i>A. avenae</i>	57
Capítulo III	
RESULTADOS	60
Aislamiento e identificación preliminar de las cepas de <i>A. avenae</i>	60
Caracterización molecular	64
Extracción de ADN bacteriano a partir de las muestras	64
Detección e identificación de <i>A. avenae</i> por PCR especie-específico	65
Caracterización genética de cepas de <i>A. avenae</i>	69
Estimación de la diversidad entre los aislamientos mediante RAPD	69
Evaluación de la variabilidad genética de los aislamientos mediante rep-PCR	72
Análisis de la diversidad genética de cepas de <i>A. avenae</i> mediante ARDRA	77
Análisis filogenético de las cepas de <i>A. avenae</i> en base a la secuencias del gen	82
ARNr 16S	
Ensayos de patogenicidad de las cepas de <i>A. avenae</i>	85
Capítulo IV	
DISCUSIÓN	88
Capítulo V	
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	97
Índice de publicaciones y/o presentaciones a Congresos	108

Lista de Figuras

Figura 1.1	Esquema de fabricación de azúcar.	22
Figura 1.2	Distribución porcentual de la superficie ocupada con las principales variedades cultivadas en la provincia de Tucumán. (Fuente: Encuesta a productores realizada por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres de Tucumán para las zafras 2007/2008).	24
Figura 2.1	a-Síntoma severo de estría roja en plantin joven de caña, b- lesión típica en hoja joven.	41
Figura 2.2	c-Mapa de Tucumán con detalle del área ocupada por caña de azúcar y d-imagen satelital de Tucumán (1) y Salta (2) donde se indica en rojo el área cañera.	41
Figura 2.3	a y b: Macetas con plantines jóvenes de caña de azúcar acondicionados para su inoculación; d y c: frotado de las hojas con la suspensión bacteriana.	59
Figura 3.1	Colonias obtenidas sobre placas de Petri como resultado de los aislamientos en medios de cultivo: agar nutritivo-AN (a, d, e y f), Sorbitol rojo neutro-SNR (b) y Extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio-YDC (c). En este último las colonias correspondientes a <i>Acidovorax</i> , se observan color beige claro, mientras que en los otros medios siempre se presenta color blanco-crema.	61
Figura 3.2	Pruebas bioquímicas para la caracterización microbiológica clásica: (a) test de oxidasa, (b) tinción de gram vista al microscopio, coloración rosada típica de gram negativos, (c) y (d), pruebas de movilidad en agar blando.	62
Figura 3.3	Electroforesis en gel de agarosa. PCR especie-especifica de aislamientos de <i>A. avenae</i> : las columnas 1,2,3,10,12,13,15,17, indican reacción positiva, donde se observa el fragmento de 550 pb amplificado con los cebadores oaf1/oar1. En la columna 19 se encuentra en marcador de peso molecular de 100 pb. El resto de las columnas sin señal corresponden a aislamientos PCR negativo.	67
Figura 3.4	Electroforesis en gel de agarosa. PCR especie-especifica de aislamientos de <i>A. avenae</i> : todas las columnas muestran reacción positiva donde se observa el fragmento de 550 pb amplificado con los cebadores oaf1/oar1. En la columna 8 se encuentra en marcador de peso molecular de 100 pb.	67

Figura 3.5	Electroforesis en gel de agarosa. PCR especie-especifica de aislamientos de <i>A. avenae</i> : columnas 1,3,6,11,13,14,15,17,19 reacción positiva donde se observa el fragmento de 550 pb amplificado con los cebadores oaf1/oar1. En la columna 20 se encuentra en marcador de peso molecular de 1 Kb. Resto de columnas PCR negativo.	68
Figura 3.6	(a y b) Electroforesis en gel de agarosa. PCR especie-especifica para la detección de <i>A. avenae</i> a partir de ADN total de hojas de caña de azúcar sintomáticas. 2,3,4,5,6,7,8 y 9: Fragmento de 550 pb correspondiente a la región intergénica 16s-23s amplificado con los cebadores oaf1/oar1. 1 y 10: marcador de peso molecular de 100 pb.	68
Figura 3.7	Electroforesis en gel de agarosa. RAPD <i>fingerprints</i> obtenidos de los aislamientos pertenecientes a <i>A. avenae</i> usando el cebador M13. Los cuatro perfiles dominantes fueron “a” y “b” correspondientes a Tucumán y “c” y “d” a las cepas de Salta. M: marcador de peso molecular de 100 pb.	70
Figura 3.8	Dendograma construido empleando en Programa <i>Bio Numerics</i> , con el cebador RAPD M13 para los aislamientos de <i>Acidovorax</i> analizados. La matriz de similitud fue calculada utilizando el coeficiente de similitud de Dice mientras que el dendrograma fue construido por el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).	71
Figura 3.9	Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados por el cebador REP 1, para 19 cepas de <i>A. avenae</i> analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, C: blanco y M: marcador de peso molecular de 100 pb. Las letras asignadas a los perfiles corresponden a las diferencias obtenidas mediante RAPD.	73
Figura 3.10	Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados por el cebador REP 1, para 22 cepas de <i>A. avenae</i> analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, M: marcador de peso molecular de 100 pb.	73
Figura 3.11	Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados por el cebador REP 2, para 20 cepas de <i>A. avenae</i> analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, M: marcador de peso molecular de 50 pb y M2: marcador de peso molecular de 100 pb.	74

Figura 3.12	Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados por el cebador REP 2, para 20 cepas de <i>A. avenae</i> analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, M: marcador de peso molecular de 100 pb.	74
Figura 3.13	(a y b): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados con el par de cebadores ERIC, para 19 (a) y 22 (b) cepas de <i>A. avenae</i> analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, C: blanco y M: marcador de peso molecular de 100 pb.	75
Figura 3.14	(a y b): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados con el cebador BOX, para 20 (a) y 20 (b) cepas de <i>A. avenae</i> analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, C: blanco, M: marcador de peso molecular de 50 pb y M2: marcador de peso molecular de 100 pb.	76
Figura 3.15	(a) Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenido por la digestión de las enzimas <i>Hinf</i> I (a) y <i>Taq</i> I (b) para distintas cepas de <i>A. avenae</i> de Tucumán, columnas 12 y 24 corresponden al marcador de peso molecular de 50 pb.	78
Figura 3.15	(b) Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenido por la digestión de las enzimas <i>Hinf</i> I (a) y <i>Taq</i> I (b) para distintas cepas de <i>A. avenae</i> de Tucumán, columnas 12 y 24 corresponden al marcador de de peso molecular de 50pb.	79
Figura 3.16	(a) Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima <i>Taq</i> I para distintas cepas de <i>A. avenae</i> de Tucumán y de Salta. La calle 51, con perfil de restricción diferente al de <i>A. avenae</i> , corresponde a otro género.	79
Figura 3.16	(b) Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima <i>Taq</i> I para distintas cepas de <i>A. avenae</i> de Tucumán y de Salta. Las calles 31, 51, 72 y LR con perfil de restricción diferente al de <i>A. avenae</i> corresponden a otros géneros	80
Figura 3.17	(a) Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima <i>Hae</i> III para distintas cepas de <i>A. avenae</i> de Tucumán y de Salta. La calle 51, con perfil de restricción diferente al de <i>A. avenae</i> , corresponde a otro género	80

Figura 3.17	(b) Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima <i>Hae</i> III para distintas cepas de <i>A. avenae</i> de Tucumán y de Salta. Las calles 31, 51, 72 y LR con perfil de restricción diferente al de <i>A. avenae</i> corresponden a otros géneros	81
Figura 3.18	Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima <i>Hinc</i> II. No se observan diferencias en los perfiles de restricción entre las calles 31, 51, 72 y LR, correspondiente a otros géneros y el resto de las calles con cepas de <i>A. avenae</i> .	81
Figura 3.19	Árbol filogenético construido con confianza <i>bootstrap</i> estimadas utilizando el método de agrupamiento <i>Weighbor</i> y corrección de la distancia de <i>Jukes-Cantor</i> , para las cuatro secuencias de aislamientos propios <i>A. avenae</i> (T10_59, T8_23, S13_11 y S12_5), con 27 secuencias de <i>Acidovorax</i> proveniente de la base de datos de GenBank. El árbol incluye los resultados de una prueba de <i>bootstrap</i> con 100 repeticiones. <i>Bootstrap</i> valores superiores a 50% se destacan.	83
Figura 3.20	Árbol filogenético construido con confianza <i>bootstrap</i> estimadas utilizando el método de agrupamiento <i>Weighbor</i> y corrección de la distancia de <i>Jukes-Cantor</i> , para las cuatro secuencias de aislamientos propios de <i>A. avenae</i> (T10_59, T8_23, S13_11 y S12_5), con cuatro secuencias de cepas “type” de <i>Acidovorax</i> asiladas en otros cultivos. El árbol incluye los resultados de una prueba de <i>bootstrap</i> con 100 repeticiones. <i>Bootstrap</i> valores superiores a 50% se destacan.	84
Figura 3.21	(a y b) Inoculaciones artificiales en plantines jóvenes de caña de azúcar.	86
Figura 3.22	(a y b): Síntomas iniciales del desarrollo de la enfermedad en hojas tiernas de caña de azúcar inoculadas con cepas de <i>Acidovorax avenae</i> . (c y d): Síntomas avanzados desarrollados en hojas tiernas de caña de azúcar inoculadas con cepas de <i>Acidovorax avenae</i> .	87

Lista de Tablas

Tabla 1.1	Valores de incidencia expresada en porcentaje de tallos enfermos y tallos muertos, para las dos variedades analizadas en distintas zonas de Tucumán.	30
Tabla 2.1	Detalle de las localidades donde se realizó la recolección y las variedades muestreadas.	40
Tabla 2.2	Medios de cultivos generales y semiselectivos para el aislamiento de <i>Acidovorax</i> .	45
Tabla 2.3	Cebadores usados para la identificación de <i>Acidovorax avenae</i> .	49
Tabla 2.4	Combinaciones de cebadores y ciclos de amplificación.	50
Tabla 2.5	Componentes y concentraciones de las mezclas de PCR.	51
Tabla 2.6	Cebadores y ciclos de amplificación para las reacciones de RAPD.	55
Tabla 2.7	Cebadores y ciclos de amplificación para las reacciones de REP-PCR.	56
Tabla 2.8	Escala de valor para evaluación de síntomas de estría roja, causados por <i>Acidovorax avenae</i> .	58
Tabla 3.1	Aislamientos obtenidos según localidad y variedad: T: Tucumán, S: Salta, el primer número coincide con la localidad y el segundo número hace referencia al número de identificación de la colonia aislada a excepción de la cepa OP.	63
Tabla 3.2	Caracterización de colonias aisladas discriminadas según los resultados en las pruebas de identificación bioquímica y molecular.	65
Tabla 3.3	Resumen de los fragmentos amplificados y secuenciados para las diferentes cepas analizadas.	66
Tabla 3.4	Resumen del número de sitios de corte en la secuencia del gen ARNr16S de <i>A. avenae</i> extraída de la base de datos de Genbank.	77

Lista de Abreviaturas y/o Símbolos

°C	Temperatura en grados centígrados
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico copia
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
M	Metro
cm	centímetros
csp	cantidad suficiente para
dNTPs	desoxinucleósidos trifosfato
ha	hectárea
g	gramos
h	horas
kg	Kilogramos
L	Litro
M	Molar
min	minutos
seg	segundos
mL	mililitro
mm	milímetro
ITS	Región espaciadora 16S-23S
o.n.	over night
MERCOSUR	Mercado Común del Sur

NOA	Noroeste Argentino
PBI	Producto Bruto Interno
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RDP	Ribosomal Data Project
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
REP-PCR	Repetitive sequence based polymerase chain reaction
USDA	United States Department of Agriculture
FAO	Food and Agriculture Organization
TA	Temperatura de annealing
Taq polimerasa	<i>Thermus aquaticus</i> ADN polimerasa
Pb	pares de bases
hab	habitante
HR	Humedad Relativa
Tm	Melting Temperature
tn	toneladas
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
µg	microgramo
µL	microlitro
µm	micrómetros
µM	micromolar

Capítulo I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Sector cañero

En el mundo se producen alrededor de 155 millones de toneladas de azúcar anualmente, de las cuales el 76% corresponde a azúcar de caña. Un poco más del 70% se consume dentro de los propios países que lo producen, mientras que el 30% es comercializado en mercados preferenciales o en el mercado libre de excedentes. Brasil lidera la producción y la exportación de azúcar, ya que produce 25,7 millones de tn/año y exporta unos 15,5 millones. Le siguen como países productores India, la Unión Europea, China y Estados Unidos de Norteamérica (FAO, 2008, USDA, 2010).

El consumo de azúcar en el mundo crece de manera sostenida y paralela con la producción, aunque a una tasa levemente superior. En los últimos doce años la producción se incrementó en un promedio de 1,69 millones de tn/año, mientras que el consumo lo hizo a razón de 1,75 millones de tn/año, presentando una distribución sumamente heterogénea según regiones y aún entre países dentro de regiones. El promedio mundial se ubica en 21,6 kg/hab/año, pero presenta como casos extremos a Cuba, con más de 60 kg.hab/año y China con 7,5 kg/hab/año (Ríos, 2008).

Argentina produce anualmente alrededor de 2 millones de toneladas de azúcar por un valor de aproximadamente \$ 2.100 millones, (Dirección Nacional de Agroindustria-SAGPyA, 2007) cifra que incluye la cadena de insumos, fletes, comercialización e impuestos. A este valor deben agregarse otros \$ 100 millones derivados de la producción de alcoholes (167 millones de L/año) (Centro Azucarero Argentino, 2009). No se consignan en estos valores otros productos derivados como el papel o el valor energético del bagazo que se aprovecha en las fábricas azucareras. Este nivel de producción que puede variar entre años por la incidencia de diversos factores, desde climáticos a políticos o económicos, ha tenido una clara tendencia de crecimiento en los últimos diez años. Por otro lado, el precio del azúcar en el mercado interno después de un período de depresión e

inestabilidad de los mercados, se ha consolidado y estabilizado en los últimos años, particularmente a partir de 2001 (com. pers¹).

El principal destino de la producción de azúcar es el mercado interno que absorbe 1,45 millones de tn (91%), lo que representa un consumo por habitante de 38 kg/año, similar al de países desarrollados (EE.UU. y UE), aunque marcadamente inferior al de otros países productores en la región como Brasil (59 kg/hab/año). Aproximadamente el 60% del consumo nacional es industrial (gaseosas, dulces, golosinas, etc), mientras que el 40% restante se consume de manera directa. El azúcar excedente del consumo interno debe exportarse para sostener el precio y asegurar estabilidad en la provisión del mercado nacional. Parte del producto excedente, unas 240 mil tn en 2009, se comercializa en mercados con precios preferenciales (EE.UU. y Chile) y el remanente en el mercado internacional, con precios menos atractivos. Los excedentes de producción y los stocks acumulados resultan ser fuertemente determinantes de los precios internos del producto. En el año 2009 se exportaron más de 700 mil tn de azúcar, crudo y blanco (400 mil tn y 340 mil tn en 2008 y 2007 respectivamente), pero se estima que en los próximos años y en condiciones normales de producción, seguirá incrementándose la producción nacional de azúcar, lo que dejará saldos exportables similares o superiores (Centro Azucarero Argentino, 2009).

Como consecuencia de una alta sensibilidad y vulnerabilidad de los mercados, el sector agroindustrial azucarero debió atravesar frecuentemente por períodos críticos determinados por altas producciones, bajos precios internos, desorden del mercado nacional y una fuerte reticencia de base especulativa para exportar equitativamente los excedentes a menores precios. A esto debe agregarse una significativa presión y latente potencial amenaza derivada de varios intentos para flexibilizar la comercialización del azúcar en el ámbito del MERCOSUR, desfavorable para la agroindustria nacional en razón del marco de fuertes asimetrías entre las producciones de Argentina y Brasil. El azúcar hasta ahora se ha excluido de la nómina de productos de libre comercialización en los

¹ Ing.Agr. Jorge A. Mariotti, 2008. Coordinador Nacional Cultivos Industriales, INTA Famaillá (Tucumán)

países del MERCOSUR lo que se fundamentó en los subsidios indirectos que benefician a la agroindustria de la caña de azúcar en Brasil (Mariotti, 2008).

La agroindustria de la caña de azúcar en la Argentina se encuentra mayoritariamente concentrada en las provincias del NOA ocupando una superficie de aproximadamente 300.000 ha (Centro Azucarero Argentino, 2009), representando una de las principales actividades económicas de la región. La actividad constituye el 1,5% del PBI agropecuario nacional, pero con fuerte representación en los PBI agropecuarios de las provincias de la región (58,5% en Jujuy, 50% en Tucumán, 25,6% en Salta) (Ríos y Delgado Cordomi, 2008). Tiene además un fuerte impacto y repercusión social, ya que ocupa directamente cerca de 90.000 personas. Es también fuertemente generadora de una importante demanda laboral indirecta. Se estima que por cada posición de ocupación directa por la agroindustria azucarera, se generan cinco posiciones de ocupación laboral indirecta, principalmente a través de los servicios requeridos. Es una de las actividades más importantes del sector agrícola e industrial en las regiones productoras. En la mayor parte de ellas llega a representar niveles de importancia social, cultural, política y económica de especial relevancia siendo un sector determinante para el desarrollo agroempresarial (Mariotti, 2008).

Desde la selección misma de los terrenos mas apropiados, la optimización de materiales vegetales, aplicación de técnicas de manejo cultural eficientes y sostenibles, los servicios de cosecha e industrialización de la materia prima, pasando por el uso adecuado de los recursos naturales en concordancia con la conservación del medio ambiente y todas las relaciones políticas y económicas alrededor de la comercialización local, regional y mundial, definen una red de factores que involucran vastos sectores de población afectada directa o indirectamente por las decisiones y orientaciones que se tomen en cada uno de los eslabones que forman la cadena de valor de la caña de azúcar (Ferrari y Macera., 2008).

La caña de azúcar

Descripción

La caña de azúcar, *Saccharum officinarum* (L.) constituye el cultivo sacarífero más importante del mundo, responsable del 70% de la producción total de azúcar. Originario de Nueva Guinea, sudeste de Asia, donde se cultiva desde épocas remotas (Agrobyte, 2002). Este cultivo se extiende actualmente a lo largo de los trópicos y subtropicos, entre los 36,5° de latitud norte, hasta los 31° de latitud sur. (Romero *et al.*, 2009). Pertenece a la familia *Poaceae*, tribu *Andropogonaceae*. Las variedades actualmente cultivadas son el resultado de hibridaciones interespecíficas que involucran a las especies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, y *S. robustum* entre otras (Nóbrega y Dornelas, 2006). Actualmente se encuentra distribuida en extensas áreas, presentando un mejor comportamiento en regiones tropicales debido a la ocurrencia de dos estaciones diferentes: una caliente y húmeda para una mejor germinación y otra más fría y seca para favorecer la maduración y acumulación de sacarosa (Alvarez *et al.*, 1995). La importancia de este cultivo puede ser atribuida a su múltiple utilización, siendo principalmente empleada como materia prima para la producción de azúcar y alcohol.

La caña de azúcar es una planta plurianual cuya renovación en plantaciones comerciales se produce alrededor de los cinco años de implantada, siendo este lapso mayor o menor según el nivel de rendimiento que presente el cañaveral. Crece formando matas constituidas por varios tallos macizos sin ramificar y con un sistema subterráneo formado por raíces y rizomas (Mozambani *et al.*, 2006). El tallo es el órgano que interesa desde el punto de vista de la producción de azúcar, ya que en él se almacena la sacarosa que pasa a constituir alrededor del 12% del peso fresco del mismo. Los tallos poseen entre 20 y 25 entrenudos o “canutos”, de color, diámetro y longitud variables según las condiciones de crecimiento y las características varietales. Sus hojas se originan en los nudos y están constituidas por la vaina que envuelve al tallo y la lámina que tiene una longitud de aproximadamente 1 m y un ancho de 5 a 7 cm (Nóbrega y Dornelas, 2006). La caña de azúcar se propaga asexualmente partiendo de brotaciones de las yemas que contiene el tallo, denominándose “caña semilla” al trozo de tallo que se coloca en el surco de

plantación. La brotación inicial origina un tallo primario, de las yemas basales de éste salen los tallos secundarios y de sus yemas los tallos terciarios, conformando en su conjunto el "macollaje" de la caña (Mozambani *et al.*, 2006).

Productos y subproductos de la caña

El azúcar es el principal producto de la cadena, mostrando la dependencia que el sector tiene con este elemento. El alcohol es el derivado mas importante después del azúcar, con excepción de Brasil donde es el destino principal ya que 55% de la caña cultivada se destina a la producción de etanol (USDA, 2010), aunque en la actualidad este producto tiene una importancia creciente en gran parte de los países productores. La caña de azúcar puede también ser utilizada como fuente de fibras y carbohidratos en la alimentación de animales dada sus características de alta biomasa por unidad de superficie. Los subproductos de la transformación, más importantes, son:

- Melaza: se usa para la elaboración de alcohol y como alimento para el ganado. Se pueden obtener entre 11 y 32 L/tn de caña.
- Cachaza: se obtiene de la extracción y filtración del jugo y se utiliza como alimento y fertilizante (abono orgánico). Se obtienen 0,04 tn/tn de caña molida.
- Bagazo: se clasifica en meollo y fibra. La primera se puede hidrolizar y obtener alimento animal (40% del bagazo) y la segunda sirve como combustible y para otras aplicaciones como la obtención de furfural que tiene amplias utilidades en diferentes procesos industriales. También se han implementado importantes industrias alrededor de la utilización de bagazo en la fabricación de pulpa de papel, de tableros aglomerados y por supuesto en la generación de energía eléctrica (Ríos y Delgado Cordomi., 2008).

Proceso de industrialización

El proceso de elaboración de azúcar (Fig.1.1) comprende las etapas que se describen a continuación. La caña llega al ingenio, se pesa y se hace una medición del contenido de sacarosa para determinar la calidad. Luego se conduce por sucesivos molinos (trapiches) para extraer el jugo. Se separa así la fibra (bagazo) del jugo. La fibra en su

mayoría es quemada en calderas para generar vapor. El jugo, posteriormente pasa por distintos procesos de clarificación, decantación y evaporación produciendo el melado, el cual se cocina para generar los granos que luego se cristalizan y separan de la miel por centrifugación. El excedente de miel se vuelve a procesar para obtener más azúcar. Por último los granos son secados y embolsados o fraccionados (Centro Azucarero Argentino).

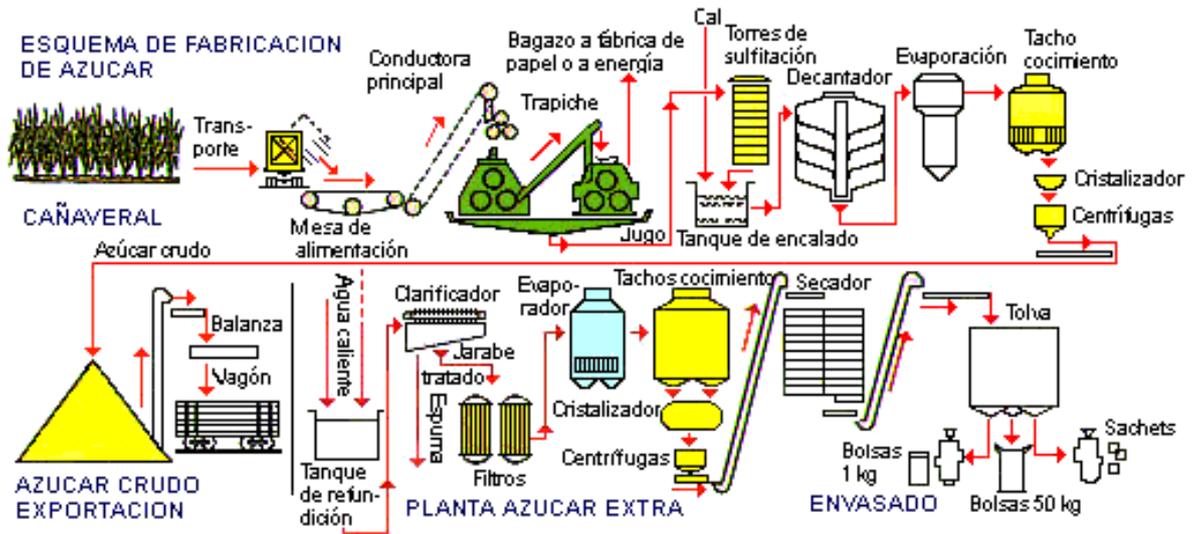


Fig. 1.1 Esquema de fabricación de azúcar. Fuente: Centro Azucarero Argentino.

Aspectos generales del cultivo en Tucumán

En Argentina la caña de azúcar se cultiva en las provincias de Tucumán, Jujuy, Salta, Santa Fe y Misiones, siendo la provincia de Tucumán la principal productora.

En el año 2009 se produjeron 2.122.000 tn de azúcar, 2.286.700 y 2.047.760 en 2008 y 2007 respectivamente (Centro Azucarero Regional Tucumán, 2009), de los cuales el 66% corresponde a Tucumán (1.354.169 tn), 32% a las provincias de Salta y Jujuy y 2% a las provincias del litoral.

Tucumán presenta buenas condiciones climáticas y edáficas para el crecimiento de la caña de azúcar; históricamente la superficie cañera en esa provincia, osciló entre

225.000 y 250.000 ha, lo que representa cerca del 50% de la superficie cultivable provincial (Romero *et al.*, 2009).

Su expansión territorial se encuentra limitada al norte y al oeste por el relieve serrano; al este y al sur por la disminución de las precipitaciones (isoyeta de 700 mm), el aumento del número de días con heladas y la presencia de suelos salinos. La superficie cultivada se circunscribe a las regiones agroecológicas del Pedemonte, donde compite con cultivos cítricos y hortícolas, y de las Llanuras Deprimida y Chacopampeana (Sanzano y Fadda, 2009).

La producción de la caña de azúcar se basa en el cultivo de distintas variedades que se distribuyen en la provincia según su adaptación a las diferentes regiones agroecológicas. Para la campaña 2007/2008 la distribución porcentual de las principales variedades cultivadas en las distintas zonas cañeras de Tucumán se presenta en la Fig.1.2.

El área cañera se encuentra bajo un régimen monzónico de lluvias cuyos valores anuales medios, variables entre los 800 y 1.500 mm, se incrementan a medida que se acercan a los cerros del oeste. Durante el periodo de frío y sequía, que va de mayo a agosto, se producen heladas moderadas (0°C a -4°C); estas condiciones de frío y sequedad interrumpen abruptamente el crecimiento de la caña, acortando la estación de crecimiento con respecto a las provincias de Salta y Jujuy, lo que permite una adecuada maduración del cultivo y facilita la zafra.

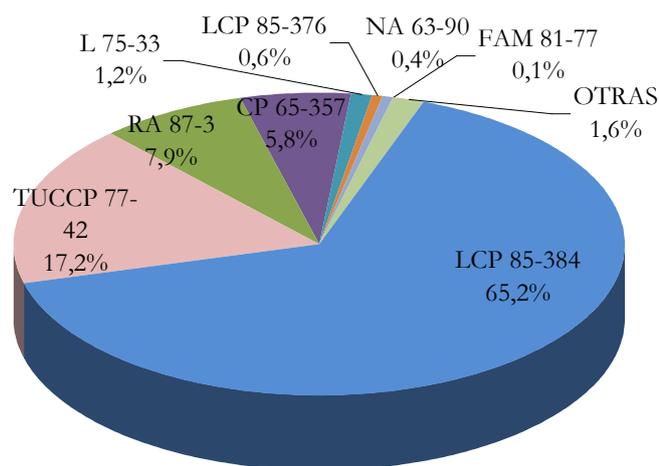


Fig. 1.2 Distribución porcentual de la superficie ocupada con las principales variedades cultivadas en la provincia de Tucumán. (Fuente: Encuesta a productores realizada por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres de Tucumán para las zafas 2007/2008).

Los suelos en el área de cultivo en general poseen buen drenaje con excepción de los localizados en la Llanura Deprimida, donde son afectados por fenómenos de revenimiento (ascenso de niveles freáticos y salinización de niveles edáficos). El terreno presenta una pendiente general suave hacia el sudeste y su topografía no presenta mayores impedimentos para la mecanización del cultivo (Sanzano y Fadda, 2009).

La producción industrial de azúcar tiene en la provincia de Tucumán más de 120 años, con una significativa influencia en la historia política, económica y social, contribuyendo con el 37% al Valor Agregado Industrial de la Provincia (Gutiérrez *et al.*, 2000). Esta actividad, produce en quince ingenios localizados en la provincia, las 2/3 partes del azúcar argentino, que le genera una suma aproximada de \$ 750.000.000 con lo que se convierte en uno de los principales componentes del PBI agropecuario (Dirección Nacional de Agroindustria-SAGPyA, 2007). El cultivo más la actividad industrial de los ingenios, emplean a no menos de 25.000 personas por año, destacándose, además, la presencia de pequeños y medianos productores, en número no inferior al 70% del total, que obtienen su sustento gracias a este cultivo. Por otro lado, el efecto multiplicador por cada

peso que se genera en la producción de caña, se generan 7 pesos en la economía circundante (Mariotti, 2008).

El sector agropecuario tucumano es impensable sin la actividad azucarera lo que determina la importancia y necesidad de llevar a cabo una intensa actividad de investigación y experimentación, tendiente a lograr en el mediano plazo, condiciones de productividad competitiva. En consecuencia, es necesario destinar recursos de investigación y transferencia tecnológica para la obtención de variedades de caña de azúcar genéticamente mejoradas, que evidencien una elevada tolerancia a diversos factores bióticos y abióticos que inciden sobre la producción.

El sistema productivo en Salta y Jujuy: características generales

El sector azucarero de las provincias de Salta y Jujuy posee una estructura muy diferente a la de Tucumán. La principal disparidad es el mayor tamaño de las explotaciones, puesto que el 85% de la caña es propiedad de cinco ingenios. Esta situación favorece un mejor manejo de la cosecha, que se suma a importantes inversiones en genética y a maquinarias más avanzadas, factores derivados de la mayor disponibilidad de capital que tienen estas firmas con respecto a los cañeros independientes.

Pese a que no registraron marcas tan espectaculares como Tucumán, las provincias de Salta y Jujuy también tuvieron incrementos productivos importantes. La producción de 2005 que alcanzó 792.066 toneladas superó en 31% a la de 1990 y fue un 10% mayor que de 2004. Además, en el último año se alcanzaron rendimientos fabriles promedio de 12,09% de azúcar sobre peso de caña, 6% más que en 1990 y 2,2% superior a la marca de 2004 (Ferrari y Macera, 2008).

Los rendimientos culturales promedio de los ingenios norteños son notablemente superiores a los que obtienen en las mismas provincias los cañeros independientes. Según

estimaciones del INTA, los rindes de los cañaverales de los ingenios alcanzan las 93,5 tn/ha, frente a los 75,4 de los independientes (Ferrari y Macera, 2008).

Las variedades más utilizadas en la región son: NA 85-1602, CP 65-350, CP 72-370, CP 70-1133, NA 76-639, TUCCP 77-42, TUC 72-16 y NA 84-3920.

La mecanización de la cosecha está generalizada en toda la región. La mayoría de los ingenios aplican un sistema de mecanización integral, en tanto que 40% de los cañeros independientes cuentan con mecanización completa y el 60% restante aplica el sistema semi-mecanizado (Volante *et al.*, 2004).

Como las lluvias son menores a las requeridas para el adecuado rendimiento de la caña, la utilización del riego es necesaria. Los ingenios aplican tecnologías avanzadas que permiten un aprovechamiento racional del agua, en tanto que los restantes poseen sistemas menos eficientes (Volante *et al.*, 2004).

Enfermedades en el cultivo de caña de azúcar

Numerosos factores externos intervienen en el crecimiento y desarrollo del cultivo de la caña de azúcar los cuales, condicionan la producción de caña y el rendimiento, incidiendo sobre el resultado productivo. Entre estos factores, los fitosanitarios ocupan un lugar preponderante, siendo las enfermedades una limitante en la productividad del cultivo. Más de cien enfermedades fueron descritas en caña de azúcar (Rott y Davis, 2000) siendo responsables de las mismas diversos tipos de patógenos como virus, hongos y bacterias, que ocasionan distintas lesiones, que afectan el desarrollo del cultivo reduciendo considerablemente la cantidad y/o calidad del producto. Al menos diez de estas enfermedades son consideradas de gran significancia ya sea por su importancia actual o potencial según sea que causen un perjuicio directo o que constituyan una amenaza futura, respectivamente (Maccheroni y Matsuoka, 2006).

En nuestro país existen antecedentes que confirman la importancia de las enfermedades en el cultivo de la caña de azúcar. Así se pueden mencionar, las “crisis del mosaico” en el año 1920 y “del carbón” en 1940, que pusieron en riesgo a toda la agroindustria azucarera argentina, debido a la elevada susceptibilidad de las variedades que se cultivaban en esos años. Las enfermedades en la caña de azúcar influyen sobre la producción y la calidad fabril y además causan la pérdida de las variedades en cultivo obligando a sustituirlas periódicamente. De igual manera, afectan a materiales que se encuentran en proceso de selección, eliminando clones avanzados, que evidencian un quiebre en su resistencia (com. pers.)².

Algunos patógenos varían en su capacidad para producir enfermedad, adaptándose a condiciones particulares del cultivo, introducción de nuevas variedades o prácticas de manejo del cultivo. Estos factores generan un sistema dinámico, en donde la correcta identificación de los agentes causales de las enfermedades es fundamental para conocer el comportamiento del cultivo frente a los patógenos más comunes (Rago, 2003).

De las enfermedades de mayor importancia para el cultivo, al menos tres son causadas por bacterias: “raquitismo de las socas” (*Leifsonia xyli* subsp.*xyli*), “estría roja” (*Acidovorax avenae*) y “escaldadura de las hojas” (*Xanthomonas albilineans*).

Estría roja: Descripción de la enfermedad y del patógeno

La estría roja es una enfermedad bacteriana de la caña de azúcar cuyo agente causal es *Acidovorax avenae* (Manns, 1909; Willems *et al.*, 1992; Schaad *et al.*, 2008). Es una bacteria de origen asiático distribuida en las principales regiones cañeras del mundo. La estría roja fue reportada por primera vez en 1922 por Lyon, en Hawai, como una enfermedad de las hojas de caña de azúcar y se conoce también como “podredumbre del cogollo o del brote terminal” (Edgerton, 1959) ya que sus síntomas, como estrías rojas

² Ing.Agr.Roberto Sopena, 2009. Jefe División Cultivos Industriales-Investigador Mejoramiento Genético de caña de azúcar-INTA Famaillá (Tucumán)

finas con longitud de cinco a 60 cm de largo o pudrición del ápice de la planta, pueden mostrarse juntos o aislados (Rott y Davis, 2000). En las hojas, los primeros síntomas son estrías acuosas que gradualmente toman la coloración rojiza. En las lesiones nuevas es común observar exudados de la bacteria. Posteriormente los síntomas se extienden hacia el meristema apical que se vuelve húmedo como consecuencia de la muerte de los tejidos, causando podredumbre del brote. Si las condiciones fueran favorables, la podredumbre del brote se extiende por todo el tallo causando grietas por donde escurre líquido de olor intenso. Esta podredumbre puede alcanzar los nudos basales en variedades altamente susceptibles. Cañaverales así afectados generan un olor característico perceptible a varios metros de distancia (Maccheroni y Matsuoka, 2006).

Lee *et al.*, (1925) demostraron que la estría roja estaba causada por una bacteria. En Australia, Cottrell-Dormer (1926, 1932) demostró que la misma bacteria causaba tanto la estría roja como la pudrición del cogollo de la caña de azúcar. En nuestro país, Spegazzini (1895) la describió por primera vez como “gangrena húmeda” o “polvillo” y determinó en sus trabajos de aislamiento como agente causal a una bacteria que denominó *Bacillus sacchari*. Luego en 1922, Fawcett en base a aislamientos sugirió también que se trataba de una bacteria. Posteriormente este microorganismo fue clasificado como *Xanthomonas rubrilineans* (Lee *et al.*, 1925), mientras que Hayward (1962), en base a investigaciones sistemáticas de bacterias patógenas que afectan la caña de azúcar, propuso el nombre *Pseudomonas rubrilineans* para reemplazar a *Xanthomonas rubrilineans*.

En Tucumán, Ramallo (1970), demostró mediante aislamientos, la presencia de esta bacteria en hojas infectadas de caña de azúcar que exhibían síntomas típicos de estría roja. Este microorganismo, considerado como una *Pseudomonas* no fluorescente (“*non fluorescent pseudomonas*”) se encuentra estrechamente relacionado con otras *Pseudomonas* que causan enfermedad en un amplio rango de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Schaad *et al.*, 2000). Hu *et al.*, en 1991, la reclasificó en base a análisis numéricos y genómicos como *Pseudomonas avenae* en referencia a la bacteria causal de “leaf blight” descrita por primera vez en avena por Manns (1909). Posteriormente, el grupo de *Pseudomonas* no fluorescentes, incluyendo *P.*

avenae (Manns, 1909), *P. cattleyae* (Savulescu, 1947), *P. pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*, 1978) y *P. rubrilineans* (Lee *et al.*, 1925) fueron reubicados en el grupo de las nuevas “*acidivorans*” como *A. avenae* subsp *avenae*, *A. avenae* subsp *cattleyae* y *A. avenae* subsp *citrulli*, respectivamente, en base a resultados de hibridaciones DNA-DNA, DNA-rRNA, electroforesis de proteínas y análisis numérico de test de asimilación de carbón (Willems *et al.*, 1992).

En trabajos recientes se propuso desagrupar las *Acidovorax* fitopatógenas de caña y de arroz, hasta el momento identificadas como *A. avenae* subsp *avenae* y elevarlas a nivel de especie quedando de esta manera como *A. avenae*, el agente causal de estría roja en caña de azúcar, mientras que para las cepas de *Acidovorax* aisladas a partir de arroz se adoptó la denominación *A. oryzae* (Schaad *et al.*, 2008).

A. avenae presenta células de 0,6-0,8 x 1,5-1,9 µm, es Gram-negativo, móvil y posee un flagelo polar. Las colonias son circulares, translúcidas, de coloración blanco-crema, convexas y aplanadas. La infección entre plantas se realiza por salpicaduras de lluvia y viento, y es favorecida por pequeñas heridas producidas por el roce entre las hojas. La diseminación a largas distancias es realizada por el viento que desprende y transporta pequeñas plaquetas de exudados bacterianos adheridas a las hojas. El uso de variedades resistentes es el medio más efectivo de control, así, en las regiones donde las condiciones climáticas favorecen la ocurrencia de epifitias, no se pueden cultivar variedades susceptibles (Almeida, 2008).

➤ **Incidencia de la estría roja en el cultivo**

En Argentina, la estría roja causa grandes pérdidas económicas en las principales regiones cañeras de las provincias del norte, en las que se ha detectado en los últimos años un sensible crecimiento en la incidencia de la enfermedad y severidad de síntomas en lotes de variedades comerciales cultivadas (Pérez Gómez *et al.*, 2010). Pérdidas de hasta un 30% en tallos molibles fueron reportadas en un área productora de la provincia de Jujuy,

(com.pers)³ a causa de la elevada incidencia detectada. De las variedades cultivadas en Tucumán, la denominada TucCP 77-42 es la más afectada en la zona productora de los departamentos de Burruyacú y Cruz Alta. Eventualmente, también otras variedades con alta susceptibilidad son utilizadas en otras zonas productoras. La variedad RA 87-3 se registra como moderadamente resistente. En la tabla 1.1 se presentan valores de la incidencia de la enfermedad como, porcentaje de tallos enfermos (con síntomas en hojas) y de tallos muertos (con podredumbre apical descendente).

Tabla 1.1: Valores de incidencia expresada en porcentaje de tallos enfermos y tallos muertos, para las dos variedades analizadas en distintas zonas de la provincia de Tucumán (Pérez Gómez *et al.*, 2010).

Localidad	TucCP 77-42		RA 87-3	
	Tallos enfermos (%)	Tallos muertos (%)	Tallos enfermos (%)	Tallos muertos (%)
La Ramada	13,7	4,1	0,6	0,4
Macomita	46,0	15,0	0,0	0,3
Overa Pozo	50,2	30,1	13,0	4,8
Ranchillos	17,6	6,6	20,9	1,2

La estría roja, considerada como una enfermedad secundaria, hasta hace pocos años, ha demostrado su potencial peligrosidad sobre cultivos comerciales y no comerciales generando, de esta manera, una elevada presión del inóculo sobre variedades resistentes y moderadamente resistentes tornándolas vulnerables a la enfermedad, produciendo un patosistema altamente riesgoso, ocasionando no sólo pérdidas a nivel productivo, sino también afectando a materiales pertenecientes a programas de mejoramiento que se desarrollan en la región, obligando a eliminar clones promisorios en proceso de selección (com. pers.)⁴.

Sin embargo y a pesar de lo significativo que resultan los datos aportados, es poco lo que se conoce sobre esta enfermedad debido a los escasos estudios realizados hasta ahora, no existiendo hasta el momento, una caracterización ni un método de diagnóstico

³Informes internos, Dpto técnico-Ingenio Ledesma e Ingenio Tabacal

⁴ Ing. Agr. Alejandro Rago. 2009. Investigador-Fitopatólogo en caña de azúcar, INTA Famaillá (Tucumán)

precisos para la detección e identificación correcta de este microorganismo. Esto es mas preocupante aún, dada la proximidad con Brasil, ya que en ese país la caña de azúcar es afectada actualmente por una nueva enfermedad llamada “falsa estría roja” (Gigliotti *et al.*, 1999, Gigliotti y Matsuoka, 2000) con sintomatología similar a la estría roja, causada por un microorganismo diferente identificado como *Xanthomonas* sp.

Detección y análisis genético de fitopatógenos

El diagnóstico oportuno de una determinada patología en plantas así como el conocimiento de la diversidad genética del agente causal es fundamental para desarrollar medidas de control efectivas, optimizar los recursos y reducir los efectos negativos en el medio ambiente (Barnes, 1994). El diagnóstico de enfermedades vegetales requiere integrar el conocimiento tanto del agente etiológico como la función de todos los factores que determinan el desarrollo de una enfermedad.

Los métodos de diagnóstico tradicional como el aislamiento, la microscopía, el uso de plantas diferenciales y otros, siguen usándose rutinariamente. Sin embargo las técnicas modernas han permitido una detección más eficiente de variantes patogénicas. Un ejemplo es el caso de la serología (Clark, 1981; Hampton *et al.*, 1990) con métodos de uso común de los cuales uno de los más precisos y ampliamente utilizado es el ensayo de inmunosorbencia unidos a enzimas o ELISA (Landegren *et al.*, 1988). La utilidad y aplicación de las técnicas de inmunodetección son variadas, siendo mas aplicables al estudio de virus y bacterias, que a hongos fitopatógenos, en estudios de taxonomía, fisiología de la enfermedad, ecología de patógenos y estudios epidemiológicos (Barnes, 1994).

Utilizando métodos moleculares de tipificación se puede obtener información que va mas allá del biotipo y el serotipo, pudiendo incluso identificar si diferentes aislamientos corresponden a una misma cepa (Farber, 1996). Una cepa puede definirse como el aislamiento o grupo de aislamientos que pueden diferenciarse de otros pertenecientes al

mismo género y especie utilizando características fenotípicas y/o genotípicas (Tenover *et al.*, 1995).

Estas técnicas poseen un enorme potencial y se emplean en forma efectiva en la microbiología de alimentos, diagnóstico de enfermedades humanas, exámenes forenses y cada vez mas en la fitopatología (Chet, 1994).

Por otro lado, la tecnología basada en el análisis de ácidos nucleicos ha incrementado exponencialmente su empleo para la detección de variantes patogénicas, principalmente mediante el empleo de marcadores genéticos (Lewin, 1994, Michelmore y Hulbert, 1987). Técnicas como los marcadores moleculares y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tienen cada vez mayor uso y aceptación. Más recientemente, el advenimiento de la taxonomía polifásica estimuló la integración de datos e información de orden fenotípicos, genotípicos y filogenéticos (Fontana *et al.*, 2005).

Existen una serie de variantes tanto en las técnicas como así también en sus aplicaciones.

➤ **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La amplificación específica de secuencias de ácido nucleico mediante PCR (o algunas de sus variantes, RT-PCR, BIO-PCR, real-time-PCR) es uno de los métodos de mayor uso y eficiencia en el diagnóstico e identificación de patógenos vegetales (Mumford *et al.*, 2006). Permite la detección de un patógeno aún cuando éste se encuentre en muy bajas concentraciones en el tejido vegetal. Se ha empleado mucho en detección de patógenos de semillas, cultivo de tejidos, plantas propagadas vegetativamente, etc. (Henson y French, 1993, Schaad *et al.*, 1995). Una de sus principales ventajas es que resulta altamente específico, sensible y rápido y que utiliza insumos de relativamente fácil acceso y de bajo costo (Li *et al.*, 2008). Además no existe necesidad de cultivar los organismos antes de la detección.

La amplificación del ácido ribonucleico (ARN) se ha conseguido con el desarrollo de técnicas como la PCR de transcripción reversa (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), (Kwoh *et al.*, 1989). Estas técnicas están basadas en la conversión inicial del ARN mensajero o ARN viral en ADN copia (ADNc) mediante la transcriptasa reversa. En el caso de la RT-PCR, el ADNc se amplifica mediante una PCR estandar, mientras que en las otras técnicas la amplificación se realiza mediante una transcripción *in vitro* del ADNc por acción de una ARN polimerasa. Las técnicas más utilizadas para la amplificación del ADN y el ARN son la PCR y la RT-PCR, respectivamente.

La comparación de la PCR con los métodos tradicionales de cultivo, respecto a la detección de microorganismos patógenos, indica que la PCR es la técnica de mayor sensibilidad (Allmann *et al.*, 1995, Mumford *et al.*, 2000, 2006).

La alternativa de mayor éxito en PCR cuantitativa es la PCR en tiempo real en la que el producto de la amplificación es detectado a medida que se va acumulando. La cantidad de producto generado es proporcional al incremento en la señal que se produce ciclo tras ciclo y puede ser monitoreado. Sin embargo no hay disponibles todavía, demasiados cebadores o sondas fluorescentes para PCR en tiempo real para el diagnóstico de patógenos de plantas, encontrándose esta área actualmente en pleno desarrollo (Schaad y Frederick, 2002). La PCR se basa en la repetición cíclica de tres etapas:

✓ **Desnaturalización del ADN.** La doble cadena de ADN se abre y se separa en dos cadenas sencillas. La desnaturalización se consigue aplicando temperaturas superiores a 90°C, habitualmente 94 o 95°C (Innis y Gelfand, 1990).

✓ **Unión específica de los cebadores o “primers”.** La unión se produce por complementariedad de bases. La temperatura a la que se realiza la unión (T_A) es crítica para controlar la especificidad de la reacción (Innis y Gelfand, 1990).

✓ **Extensión.** La ADN-polimerasa es una enzima que reconoce la unión de cebadores a la cadena de ADN de la muestra. La actividad de estas enzimas requiere la presencia de iones magnesio (Mg^{2+}), la concentración de este ión es un parámetro

importante para la optimización de la PCR (Innis y Gelfand, 1990). En la PCR se generan 2^n copias de la secuencia de ADN blanco, siendo n el número de ciclos de proceso; una amplificación típica de 20 a 40 ciclos, generará entre 1 millón y 1 billón de copias del fragmento de ADN blanco que existe en la muestra original.

Diseño de cebadores o “primers”

Un punto clave en la detección de patógenos por PCR es la disponibilidad de cebadores específicos. En la actualidad, gracias a los avances de las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos y al desarrollo de los equipos y reactivos para la síntesis rápida de oligonucleótidos, es posible conseguir cebadores específicos para los diferentes microorganismos. En función de la especificidad deseada (de género, de especie o de cepa) se pueden usar diferentes regiones del genoma como blanco. La elección del mejor blanco para la identificación de taxones específicos depende de la heterogeneidad que existe dentro del taxón y la distancia filogenética con los otros taxones (Rijpens y Herman, 2002).

Aunque las zonas altamente conservadas de los genes 16S y 23S del ARN ribosomal (ARNr) se han utilizado para el estudio de las relaciones filogenéticas entre taxones alejados, son las regiones variables de estos genes las más útiles para la diferenciación de género y en ocasiones también de especie (Rijpens y Herman, 2002). En el desarrollo de sondas específicas para la detección de microorganismos muy próximos filogenéticamente, son preferibles las regiones intergénicas 16S-23S del ADNr, no codificantes que están bajo una presión selectiva mínima durante la evolución y por lo tanto presentan mucha más variación que los genes que tienen roles funcionales (Barry *et al.*, 1991). En los últimos años, la región espaciadora 16S-23S ADNr se ha utilizado con éxito como fuente de sondas de ADN específicas (Rijpens y Herman, 2002). Song *et al.*, (1997, 2003) han diseñado cebadores para la identificación de especies y subespecies de *Acidovorax*.

➤ **Determinación de la variabilidad genética en fitopatógenos**

Existen numerosas técnicas basadas en el análisis del ADN, para detectar la variabilidad genética o cambios en el genoma y han sido muy útiles en estudios de taxonomía, y filogenia de fitopatógenos (Barnes, 1994). A continuación se describen las que se emplearon en este trabajo de tesis:

•**RAPD** (Random Amplified Polymorphic ADN), análisis de ADN polimórfico amplificado al azar. Consiste en amplificar al azar mediante PCR, regiones del ADN extraído de los microorganismos. Los cebadores se escogen al azar, por lo que no es necesario contar con información sobre secuencias específicas del microorganismo a tipificar. Se utilizan temperaturas de *annealing* (T_A), bajas, de manera que se permita la unión de los cebadores a pesar de la no coincidencia de una o dos bases. Después de la separación mediante electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación, se obtienen patrones simples de fragmentos de ADN de diferentes tamaños (*fingerprintig*). El problema de esta técnica es su sensibilidad a las condiciones de reacción, por lo que es difícil en ocasiones obtener una reproducibilidad inter-laboratorio adecuada. Son útiles para estudios de taxonomía, de variación patogénica en microorganismos, en estudios epidemiológicos y de genética de poblaciones. Se pueden emplear para detectar marcadores asociados a genes de resistencia a enfermedades (Williams *et al.*, 1990, Demek y Adams, 1994).

•**rep-PCR**. Se basa en la presencia en el genoma bacteriano de secuencias altamente conservadas y repetidas (Gilson *et al.*, 1991). La disposición de esta secuencia repetida se conserva en cada especie bacteriana, por lo tanto la distribución de estas secuencias de ADN permitiría la identificación a nivel de cepa. Los perfiles que se obtienen son similares a los obtenidos con el RAPD, la diferencia radica en el tipo de cebadores usados. En rep-PCR se utilizan cebadores cortos (18 pb) y degenerados, conteniendo inosina en sustitución de una de las 4 bases. Esta característica permite una mayor posibilidad de unirse a los sitios blancos. Se ha reportado su uso en diversas caracterizaciones de

fitopatógenos (Versalovic *et al.*, 1994, Louws *et al.*, 1995, 1997, 1998, Clark *et al.*, 1998, Silva, 2005).

•**ARDRA** (Amplified Ribosomal ADN Restriction Analysis), análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado. Se basa en la obtención de ADNr mediante amplificación por PCR usando cebadores universales, el producto se digiere con enzimas de restricción y los fragmentos se analizan en geles de agarosa (Liu *et al.* 1997).

Con estas metodologías se obtienen patrones de bandas o “huellas digitales” de cada microorganismo, siendo las diferencias entre éstos (presencia o ausencia de bandas) las bases para la construcción de agrupamientos en árboles ó dendrogramas. Para identificar un organismo en particular es conveniente incluir en el análisis cepas de referencia o identificar cepas representativas de cada grupo mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S. Generalmente se utilizan enfoques de taxonomía polifásica, incluyendo además de éstos otros métodos de clasificación y de identificación tradicionales.

➤ **Aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico de enfermedades de caña de azúcar**

Durante los últimos veinte años, los avances en la aplicación de herramientas moleculares al estudio de fitopatógenos en caña, brindó información sumamente valiosa permitiendo ampliar el conocimiento de algunas patologías hasta entonces poco exploradas. Esto indudablemente posibilitó la aplicación de técnicas más efectivas en el control de determinadas enfermedades y de manejo del cultivo orientando asimismo los programas de mejoramiento genético hacia la búsqueda y obtención de variedades que evidencien una mejor respuesta a las principales enfermedades.

Una de las primeras aplicaciones de análisis molecular al diagnóstico de fitopatógenos en caña, se describió para *Xanthomonas albilineans*, agente causal de la escaldadura de las hojas o “*Sugarcane leaf scald*” desarrollándose un protocolo para la detección de la misma mediante PCR (Pan *et al.*, 1997). Luego se extendió el desarrollo de

estas técnicas y sus variantes, BIO-PCR, RT-PCR, PCR en tiempo real (Song *et al.*, 2004) a otros patógenos tales como el virus del mosaico de la caña SCMV “*Sugarcane mosaic virus*” (Yang y Mirkov, 1997) y el SCSMV “*Sugarcane streak mosaic virus*” (Fernandez *et al.*, 2006) donde además del empleo de PCR para la detección (Grisham *et al.*, 2006) se aplicaron técnicas de análisis de las variantes genéticas para determinar si estos virus y microorganismos reportaban o no diversidad. Algunas de las técnicas que se han descrito hasta el momento son el RFLP, RAPD, para el carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea*) (Singh *et al.*, 2005) y microsatélites (Raboin *et al.*, 2006), AFLP y REP-PCR para *X. albilineans* por (Skaik *et al.*, 2009, Silva, 2005) y para *Xanthomonas* sp, responsable de la falsa estría roja (de Souza, 2004). También para virus nuevos como es el caso del amarillamiento (*Sugarcane yellow leaf virus*), se describió la reciente aplicación de PCR en tiempo real para la detección de esta virosis (Korimbocus *et al.*, 2002, Abu Ahmad *et al.*, 2006, Girard *et al.* 2008) y también para la bacteria responsable del raquitismo de las socas (RSD) *Leifsonia xyli* subsp *xyli*. Del mismo modo se lograron importantes avances en el estudio e identificación de genes involucrados en los mecanismo de patogenicidad de *Xanthomonas albilineans* (Champoiseau *et al.*, 2006, Hoarau *et al.*, 2008), como así también en la caracterización de genes de resistencia a roya marrón (*Puccinia melanocephala*) (Garsmeur *et al.*, 2009).

Hipótesis

En base a las consideraciones expuestas en este capítulo, para el presente trabajo de tesis se formula la siguiente hipótesis:

La estría roja, considerada una enfermedad secundaria en el cultivo de caña de azúcar hasta hace relativamente poco tiempo, ha mostrado un sensible incremento en la incidencia sobre cultivos comerciales, ocasionado considerables mermas en el rendimiento cultural (tncaña/ha). Debido a esto es necesario implementar estrategias de manejo para lo cual el primer paso es contar con una caracterización correcta de esta bacteriosis. La detección, identificación y consecuente diferenciación del agente causal, como así también la correlación entre diversidad genética y patogenicidad, brindarán una amplia caracterización de este microorganismo, que permitirán avanzar tanto sobre aspectos epidemiológico-evolutivos como también de manejo a nivel regional de esta importante enfermedad.

Objetivos

Objetivo General: Caracterizar el agente causal de estría roja de la caña de azúcar mediante técnicas de microbiología clásica y moleculares.

Objetivos Específicos:

-Aislar al agente causal de la estría roja en caña de azúcar de las principales áreas cañeras de las provincias de Tucumán, Jujuy, Salta y Santa Fe e identificarlo mediante técnicas de microbiología clásica y moleculares.

-Determinar la diversidad genética de los aislamientos de *Acidovorax avenae* obtenidos en distintas áreas de cultivo y correlacionarla con su patogenicidad.

Capítulo II MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de plantas

El muestreo se realizó sobre hojas de caña con síntomas típicos de estría roja (Fig.2.1 A y B), las que fueron recolectadas en tres diferentes regiones de la provincia de Tucumán (Norte, Centro y Sur) (Fig.2.2 A y B). También se tomaron muestras en la Chacra Experimental Agrícola Colonia Santa Rosa y en Tabacal, ambos en la provincia de Salta. (Tabla 2.1).

La toma de muestras, que también contemplaba una recolección en las Provincias de Santa Fé y Jujuy, no pudo realizarse, debido a la ausencia de material sintomático en las localidades donde se realizó la búsqueda. Esta situación obedece a fenómenos de tipo climático que afectaron al cañaveral, y que además, generaron condiciones no favorables para el desarrollo de la enfermedad. La ocurrencia de fuertes heladas seguidas de una prolongada sequía fueron determinante para la no evolución de esta patología en esas regiones.

Se seleccionaron preferentemente las plantas más jóvenes ya que es donde los síntomas de la enfermedad se observan en progreso (Fig.2.1 A), con el frente de avance claramente visible.

Las muestras se acondicionaron en bolsas plásticas tipo “ziploc” con papel absorbente, para su conservación hasta el momento de ser procesadas. Por un lado se fraccionaron hojas en sobres de papel para ser refrigerados entre 4 a 7° C para su uso mas inmediato y por otro lado se colocó otra fracción a -20°C para su conservación a mayor plazo. También se desecaron hojas con la finalidad de confeccionar un herbario.

La variedad que se utilizó para el muestreo es la considerada más susceptible en la provincia de Tucumán, denominada TucCP 77-42. En las zonas donde esta variedad no se encontraba en cultivo o no presentaba síntomas, se optó por aquellas que presentaban síntomas al momento del muestreo. En la provincia de Salta la variedad muestreada fue NA 85-1602, caracterizada como la más susceptible en esa región. Ambas variedades se encuentran ampliamente difundidas en toda el área de cultivo comercial de caña de azúcar y representan un porcentaje elevado en la distribución varietal de toda la región.

Tabla 2.1: Detalle de las localidades donde se realizó la recolección y las variedades muestreadas.

Número de muestra	Variedad	Localidad-Región	Provincia
1	TucCP 77-42	Louisiana-norte	Tucumán
2	TucCP 77-42	Los Ralos-norte	Tucumán
3	TucCP 77-42	Ranchillos-norte	Tucumán
4	Fam 89-686	La Trinidad-sur	Tucumán
5	TucCP 77-42	La Trinidad-sur	Tucumán
6	Fam 91-209	Cruz Alta-centro	Tucumán
7	TucCP 77-42	Agua Dulce-centro	Tucumán
8	TucCP 77-42	Las Piedritas-centro	Tucumán
9	TucCP 77-42	Macomita-norte	Tucumán
10	Fam 89-686	Famaillá-centro	Tucumán
11	NA 85-1602	Col.Sta Rosa	Salta
12	NA 02-2320	Tabacal	Salta
13	NA 85-1602	Col.Sta.Rosa	Salta
14	RA 87-3	Obera Pozo-centro	Tucumán
15	TucCP 77-42	La Ramada-Norte	Tucumán



Fig. 2.1: A-Síntoma severo de estría roja en plantin joven de caña, B-lesión típica en hoja joven.

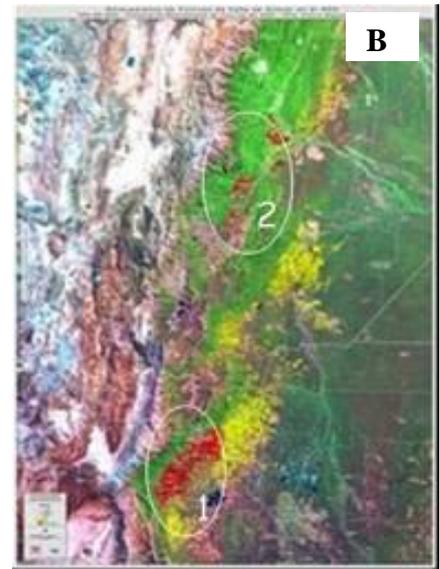


Fig. 2.2: A-mapa de Tucumán con detalle del área ocupada por caña de azúcar y B-imagen satelital de Tucumán (1) y Salta (2) donde se indica en rojo el área cañera.

Obtención de aislamientos de *Acidovorax avenae*

Para el aislamiento de la bacteria se utilizó el procedimiento microbiológico clásico para aislamiento de microorganismos patógenos. Algunos protocolos específicos como así también las fórmulas de medios de cultivo y soluciones fueron extraídos de la Guía de Laboratorio para la Identificación de Bacterias Patogénicas de Plantas (Schaad *et al.*, 2001).

El material de partida fueron hojas refrigeradas mantenidas por no más de 15 días en heladera entre 4 y 7 °C. Este material fue seccionado en pequeños trozos y desinfectado mediante dos tratamientos de 1 min con alcohol 70% y un lavado de 1 min con agua estéril. A continuación el material (aproximadamente 0,5g) fue macerado manualmente en tubos estériles tipo Eppendorf utilizando como diluyentes distintas soluciones estériles. El sobrenadante obtenido se utilizó como primera dilución y a partir de éste se realizaron sucesivas diluciones decimales para realizar los plaques sobre diferentes medios de cultivos.

Se realizaron observaciones cada 24 h para evaluar el desarrollo de colonias. A partir de los cultivos en placas de entre 48 h y 72 h se hicieron sucesivos repiques al medio líquido LB y nuevos plaques hasta obtener las colonias individuales y puras para su conservación y posterior identificación mediante pruebas preliminares. Algunos de los medios que se emplearon, como así también las soluciones diluyentes y las condiciones de cultivo, se describen a continuación.

➤ Medios de cultivo

Componentes, esterilización y determinación de pH

Los componentes en gramos (g) para preparar 1 litro (L) de cada uno de los medios de cultivo usados en este trabajo de tesis se describen a continuación. Salvo indicaciones

especiales, todos fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos (min) a 121°C. El pH de los medios fue ajustado adicionando soluciones de NaOH 10 M. Las medidas de pH se efectuaron con un peachímetro Altronix modelo TPX I.

1-Agua peptona. Medio base comercial (Merck) al que se añaden carbohidratos e indicadores para estudios de fermentación. En este trabajo se utilizó para algunos de los aislamientos en la homogeneización y dilución de las muestras.

Componentes	g/L
Peptona	10,0
NaCl	5,0
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	9,0
KH ₂ PO ₄	1,5
	pH: 7,0± 0,2

2-Solución Fisiológica. Se utilizó para la homogeneización y preparación de diluciones en la mayoría de los aislamientos. 9,0 g de NaCl disueltos en 1 L de H₂O dest., ajustar el pH en 7,0± 0,2.

3-Agar nutritivo, Medio de uso general. Fue el medio más empleado por su simplicidad y fácil composición.

Componentes	g/L
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
NaCl	3,0
Agar	17,0
H ₂ O csp	1 L
	pH: 7

4-Agar extracto de carne y levadura (*Beef-yeast extract*). Medio diferencial.

Componentes	g/L
Extracto de carne	1,0
Extracto de levadura	2,0
Agar	20,0
H ₂ O csp	1 L
	pH: 7,4

5-Agar extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC). Medio Diferencial.

Componentes	g/L
Extracto de levadura	10,0
Glucosa	20,0
Carbonato de calcio	20,0
Agar	15,0
H ₂ O csp	1 L
	pH: 6,9± 0,2

6-Sorbitol Rojo Neutro (SNR). Medio semiselectivo.

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	3,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
NaH ₂ PO ₄	1,0
KNO ₃	1,0
Rojo neutro (0.2%)	10ml
Agar	15,0
Cicloheximida (100mg/ml 75% etanol)	2,0ml
D-sorbitol (10%)	50ml
H ₂ O csp	1 L
	pH: 6,9± 0,2

7-Caldo Luria-Bertaini (LB). Este medio se utilizó para el crecimiento de la bacteria en condiciones de aerobiosis, en los repiques entre plaques y también para su conservación y obtención de cultivos de células puras.

Componentes	g/L
Extracto de levadura	5,0
Tripteína	10,0
NaCl	7,5
H ₂ O csp	1 L
	pH: 7,4± 0,2

En la Tabla 2.2 se detallan los diferentes medios de cultivo generales y semiselectivos con las respectivas condiciones de incubación.

Tabla 2.2. Medios de cultivos generales y semiselectivos para el aislamiento de *Acidovorax avenae*.

Medio de cultivo	Condiciones de incubación
Agar Nutririvo	48 h a 37°C
Agar BY extract	48 h a 30°C
YDC	48 h a 30°C
SNR	48 h a 30°C
LB	48 h a 30°C /aerobiosis con agitación

➤ Tampones y soluciones

1-Tampón TE (Tris-EDTA)

Componentes	Concentración final
EDTA (Genbiotech)	1 mM
Tris (Genbiotech)	10 mM
	pH: 8,0

2-Solución de dodecil sulfato sódico (SDS)

Componentes	Concentración final
Dodecil sulfato sódico (Sigma)	20%
Tris (Roche Diagnostics)	50 mM
EDTA (Roche Diagnostics)	20 mM
	pH 8,0

3-Tampón TAE 50x (Tris-Acetate-EDTA)

Componentes	Concentración final
Tris (Roche Diagnostics)	242 g
EDTA (Roche Diagnostics)	0,5 M
Acido acético glacial (Sigma)	57,1 ml
	pH 8.0

4-Tampón TBE 10x (Tris-Borate-EDTA)

Componentes	Concentración final
Tris (Genbiotech)	108 g
EDTA (Genbiotech)	0.5 M
Acido bórico (Genbiotech)	55 g
	pH 8.0

➤ Conservación de las cepas

Los aislados obtenidos a partir de los medios de cultivo indicados fueron propagados en el medio líquido LB. Esto se realizó a 30°C y con agitación permanente para crear condiciones aeróbicas ya que se trata de un organismo que tiene un metabolismo aerobio estricto. Un cultivo de 16 h aprox., se repartió en viales, recuperándose las células por centrifugación y resuspendiéndolas en medio fresco con 20% de glicerol estéril (agente crioprotector). Las mismas se almacenaron a -80°C hasta la identificación y caracterización fenotípica y genotípica de cada aislamiento.

Caracterización de las cepas por técnicas microbiológicas clásicas

Las cepas aisladas a partir de hojas de caña de azúcar afectadas por estría roja fueron caracterizadas en forma preliminar mediante técnicas de taxonomía clásica:

- (i) observación microscópica: para la determinación de la morfología de las células bacterianas se empleó un aumento 100X en aceite de inmersión.
- (ii) reacción de Gram: se utilizó el kit de Britania para tinción. A partir de un cultivo de células de 24 h en caldo LB, se colocó sobre portaobjeto 100 µL de la suspensión, se dejó secar en cámara de flujo laminar y se procedió de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante.
- (iii) actividad oxidasa: se emplearon discos de papel reactivo de Britania. En este caso también se empleó un cultivo de células como en el punto anterior. El

cambio de coloración en el disco en contacto con las células bacterianas, indica si la reacción es positiva o negativa.

- (iv) pruebas de movilidad: se realizó en tubos de ensayo con medio agar nutritivo semisólido (0,7% agar), se sembró el inóculo con palillo estéril en el fondo del tubo, se incubó a 37 °C y se observó el crecimiento a las 48 h.

Caracterización molecular

El estudio molecular de los aislamientos (identificación y caracterización) se realizó mediante PCR especie-específica, amplificación del gen ARNr 16S por PCR, RAPD-PCR, REP-PCR y ARDRA.

➤ Obtención de ADN cromosómico a partir de cepas aisladas

Se ensayaron diferentes métodos y kits para la obtención rápida de ADN a partir de cultivos puros de las cepas aisladas. Los que mostraron mejores resultados fueron:

- Microlysis (LABOGEN, UK), se obtiene ADN puro para ser usado en reacciones de PCR únicamente, se adiciona 1-2 µL de una suspensión celular o.n., o bien a partir de una colonia obtenida directamente de la placa de agar con 18-19 µL de microlysis 20x.
- Lisis al microondas, se obtiene ADN para ser utilizado en screening directo de colonias mediante PCR. Se pican colonias individuales a tubos de PCR con 5 µL de agua bidestilada. Se realizan dos ciclos de cinco minutos cada uno a potencia máxima.
- Método de Ausubel *et al.*, (1992): Con este método se obtiene ADN bacteriano en cantidad y calidad suficientes para reacciones de PCR especie-específica y para otras técnicas de caracterización molecular como REP-PCR y RAPD. El procedimiento seguido se describe a continuación:

A partir de no más de 3 mL de un cultivo bacteriano en fase logarítmica se siguen los siguientes pasos:

- Centrifugar a 10000 rpm durante 2 min
- Descartar el sobrenadante
- Resuspender el pellet en 567 μ L de buffer TE (Tris 10mM + EDTA 1mM) + 30 μ L de SDS 10% + 3 μ L de proteinasa k (20 mg/mL)
- Incubar 1h a 37 °C
- Agregar 100 μ L de solución NaCl 5M y 80 μ L de buffer CTAB 10% (10 gr de CTAB 10%, 14 mL de NaCl 5M, en un vol. final de 100 mL)
- Incubar 10min a 65°C
- Agregar 800 μ L de cloroformo:isoamílico (24:1)
- Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min
- Transferir la fase superior y agregar igual volumen de cloroformo:isoamílico (24:1)
- Centrifugar a 10000 rpm durante 5 min
- Transferir la fase superior y adicionar 2 vol. etanol
- Mantener a -20°C durante 2 h
- Centrifugar a 10000rpm durante 5min y descartar el sobrenadante
- Lavar el pellet adicionando 600 μ L de etanol al 70%
- Centrifugar a 10000 rpm durante 5min y descartar el sobrenadante
- Lavar el pellet adicionando 300 μ L de etanol al 70%
- Centrifugar a 10000 rpm durante 5 min
- Dejar secar el pellet
- Resuspender en 50 μ L de buffer TE + RNasa (10/1)
- Almacenar a -20°C

➤ **Extracción de ADN total de las muestras**

Para la obtención de ADN cromosómico directamente a partir de hojas de caña de azúcar con síntoma de estría roja se usó Genomic DNA from Plant/Tissue Kit siguiendo las instrucciones descritas en el kit (Macherey-Nagel- www.mn-net.com). El material se acondicionó moliendo las hojas con síntomas en nitrógeno líquido hasta polvo fino. Se obtuvo ADN de alta pureza y buena concentración, que fue analizado a través de una

cuantificación electrónica con Qubit® (INVITROGEN) y visualizado por electroforesis en gel de agarosa (ver condiciones de electroforesis en pagina 51 de este capítulo). Este ADN se empleó sólo para la reacción de PCR especie-específica.

➤ **Detección e identificación de *A. avenae* mediante PCR**

La reacción de PCR especie-específica fue conducida de acuerdo con el procedimiento descrito por Song *et al.*, (2003) empleando el par de cebadores Oaf1/Oar1 (Song *et al.*, 2003) que amplifican un fragmento de 550pb correspondiente a la región ITS 16S-23S.

La técnica de PCR se usó además para amplificar y secuenciar parcial (500pb) o completamente (1500pb), dependiendo del producto que se pretendía obtener, el gen ARNr 16S. El análisis de las secuencias obtenidas en cada caso, se empleó para la identificación de algunos de los aislamientos. El gen ARNr 16S completo se amplificó además para la realización de la técnica de ARDRA.

Los cebadores usados y las condiciones de amplificación para cada combinación se detallan en la Tabla 2.3 y Tabla 2.4, respectivamente.

Tabla 2.3. Cebadores usados para la identificación de *Acidovorax avenae*.

Nombre	Gen blanco	Secuencia (5'→3')	Referencia
P0f	16S (primer universal)	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1
P6r	16S (primer universal)	CTACGGCAACCTTGTTACGA	1
Plb	16S (primer universal)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	2
Mlb	16S (primer universal)	GGCTGCTGGCACGTAGTTAG	2
Oaf1	Espécie-específico	5'GTCGGTGCTAACGACATGG-3'	3
Oar1	Espécie-específico	5'AGACATCTCCGCTTTCTTTCAA-3'	3

f-cebador directo; r-cebador reverso; 1- Klijn *et al.* (1991); 2-Hebert *et al.*(2000); 3-Song *et al.* (2003)

Tabla 2.4. Combinaciones de cebadores y ciclos de amplificación.

Cebadores	μM	N° de ciclos	Annealing	Extensión	pb
P0-P6	0.5	35	58°C 30''	2'	1500
Plb-Mlb	0.5	30	52°C 30''	45''	500
Oaf1-Oar1	0.2	25	55°C 30''	1'	550

Optimización de las condiciones de PCR

Los termocicladores utilizados para la realización de la PCR fueron los modelos 2400 y el GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), el Apollo ATC201 y el BioRad modelo MyCyclerTM (Munich, Alemania). El programa de amplificación típico consistió en:

⇒ Fase de desnaturalización inicial: 5 min a 94°C

⇒ Fase cíclica: se repite un número apropiado de ciclos a una temperatura de “annealing” (T_A) y extensión adecuada optimizado para cada reacción

- Desnaturalización: 1 min a 94°C.
- Hibridación de los cebadores (*annealing*): 30 seg-1 min a la temperatura de “annealing” adecuada (T_A), según la pareja de primers utilizada.
- Extensión: 72°C, el tiempo necesario de acuerdo a los pares de bases (pb) del fragmento que se desea amplificar.

⇒ Extensión final: 7 min a 72°C

La mezcla standard de PCR que se utilizó se detalla en la Tabla 2.5.

Para esta reacción también se probó una “mix” comercial de Promega, PCR Master Mix, cuya composición 2X es la siguiente: taq ADN polimerasa (50u/ml), dNTPs (400uM) y MgCl_2 (3mM). Se empleó en una concentración 1X, tanto en la PCR especie-específica como en la amplificación de gen ARNr 16S. La optimización de las condiciones de PCR para los diferentes análisis realizados supuso, en ocasiones, la modificación de las condiciones estándares descriptas dentro del rango indicado en la tabla 2.5.

Tabla 2.5. Componentes y concentraciones de las mezclas de PCR.

Componentes	Concentración Stock	Concentración final
Tampón de PCR	10x	1x
MgCl ₂	25 mM	1,5-3,5 mM
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP, dTTP)	10 mM	200 µM c/u
Cebador directo e inverso	10-30 µM c/u	0,1-3,0 µM c/u
Taq ADN polimerasa	5 U/ µL	0,1-0,5 U
ADN muestra	-----	10-20 ng
Agua bidestilada estéril csp	25 ó 50 µL	

El tampón de PCR 10x provisto con la Taq polimerasa contiene: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) la concentración final de estos componentes en la mezcla de PCR fue de: 50 mM KCl y 10 mM Tris-HCl.

Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa. Se utilizaron concentraciones de agarosa al 2% para la resolución de fragmentos menores de 200 pb, 1,8% para fragmentos entre 200 y 300 pb, 1,5% para fragmentos entre 300 y 500 pb y 1% para aquellos fragmentos mayores de 500 pb. En el caso de RAPD se usaron concentraciones de agarosa entre el 2,5 y 3%. El gel se preparó con agarosa (Genbiotech y BioRad, Munich, Alemania) y tampón TAE 1x o TBE 5x calentándose hasta la fusión y completa disolución de la agarosa. Una vez atemperada (aproximadamente a 60°C) se añadió una solución 1/10 de colorante Gel Red (Genbiotech) y se dejó solidificar en un molde adecuado. Para la siembra, al ADN amplificado se le añadió 1 ó 2 µL del colorante indicador del frente de corrida. Los marcadores de peso molecular utilizados para la estimación del tamaño de los fragmentos de ADN fueron: 1 kb DNA ladder, 100 pb DNA ladder y 50 pb (Promega y Genbiotech), dependiendo del caso. Las electroforesis se realizaron en tampón 1x TAE o TBE 5x y el gel se visualizó con luz UV en un transiluminador.

➤ **Preparación de los fragmentos amplificados para reacciones de secuenciación**

Cuando en la PCR se obtuvo un fragmento de tamaño único, éste se purificó directamente con el kit ExoSAP-IT (Amersham USB Corporation) que consiste en el tratamiento del producto de PCR con dos enzimas Exonuclease I y Shrimp Alkaline Phosphatase, en sus respectivos tampones, dos enzimas que degradan los residuos de ADN de simple cadena (cebadores) y dNTPs que no fueron usados durante la PCR. La reacción consiste en 15 min de incubación a 37°C para que actúen las enzimas y luego una inactivación a 80°C por 15 min.

Otros kits usados para purificar los amplicones a partir del gel de agarosa fueron: -GFX™ PCR DNA y Gel Band Purification kit (GE Healthcare Companies).

En todos los casos se siguieron las indicaciones del fabricante. Los amplicones purificados fueron secuenciados en la Universidad de La Plata, Buenos Aires, Argentina y resecuenciados o corroborados por CRIBI, Università degli Studi di Padova, Italia.

La secuenciación de los fragmentos obtenidos, tanto en la PCR especie-específica, como también en la amplificación del gen ARNr 16S, constituyen parte de las diferentes estrategias aplicadas con el fin de obtener una identificación y caracterización fehacientes de la especie en estudio. Los cebadores empleados en las reacciones y los respectivos tamaños de fragmentos se encuentran descriptos en la tabla 2.4.

Las cepas a secuenciar se seleccionaron en base a una caracterización preliminar mediante pruebas microbiológicas clásicas, además de PCR, y considerando que fueran de aislamientos de distintas variedades de caña de azúcar de Tucumán y Salta. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó por comparación usando el programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU), con secuencias depositadas en el banco de datos del *Genbank*.

Las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas fueron también analizadas usando el programa RDP Tree Builder “*Ribosomal Database Project*” (<http://rdp.cme.msu.edu/>), para la elaboración de un árbol filogenético que permita ubicar taxonómicamente la secuencias de los aislamientos en estudio, comparándolos con otras especies de *Acidovorax*, aisladas en otras partes del mundo. Para este caso, se utilizó el fragmento de 1500pb el cual fue amplificado con el par de cebadores P0/P6 (Klijn *et al.*, (1991).

El RDP Tree Builder permite crear un árbol filogenético con confianza bootstrap estimadas utilizando el método de agrupamiento Weighbor. El árbol puede contener una mezcla de secuencias de RDP y los datos propios. El RDP Tree Builder utiliza las secuencias alineadas con el alienador RDP. Una matriz de distancia se genera usando el modelo corregido Jukes-Cantor de la distancia. Al generar la matriz de distancia, solamente se utilizan las posiciones modelo de la alineación, no se consideran las partes movibles de la alineación y la posición comparable mínima es 200. El árbol se crea usando Weighbor donde la diferencia de nucleótidos se considera para la distancia con el tamaño 4 del alfabeto y el tamaño 1000 de la longitud.

Análisis de la diversidad genética en *A. avenae*

La caracterización genética de las cepas de *Acidovorax* de caña de azúcar se realizó mediante REP-PCR, ARDRA y RAPD-PCR para todos los aislamientos. Los protocolos fueron puestos a punto en el laboratorio para poder ser adaptados a las condiciones de trabajo como así también a las características propias de las especie en estudio para automatizar al máximo el análisis.

ARDRA “Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis” (análisis de restricción de DNA ribosomal amplificado)

Esta metodología fue empleada para la diferenciación de cepas dentro del género *Acidovorax* y/o para obtener un perfil único de la especie en estudio con la que se pueda identificar y eventualmente diferenciar de otros géneros contaminantes presentes en los

aislamientos como falsos positivos. Consistió básicamente en la amplificación mediante PCR del gen ARNr 16S completo (aprox 1500 pb) y la digestión de los amplicones con diferentes enzimas de restricción (seleccionadas luego de un análisis *en sílico* de los posibles sitios de corte en la secuencia del gen ARNr 16S de las especies bacterianas a diferenciar y/o caracterizar). Se probaron las siguientes enzimas: *TaqI*, *HincII*, *HaeIII*, *HindI*.

El protocolo de ARDRA usado fue:

- 1- Amplificación mediante PCR del ADNr 16S a partir del ADN obtenido de las cepas aisladas usando la combinación de cebadores P0-P6 con el ciclo de amplificación ya descrito (Tabla 5). La mezcla de reacción fue: tampón de PCR (1x); MgCl₂ (1,5 mM); dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (200 μM c/u); cebador P0-P6, (0,5 μM); Taq ADN polimerasa (0,1 U); ADN muestra (10 ng) y agua bidestilada estéril (csp 50 μL).
- 2- Control y visualización del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.
- 3- Preparación de la mezcla para la digestión del producto de ADN obtenido como se detalla a continuación: tampón de la enzima (1x); enzima de restricción (5-10 U); 16S ADNr amplificado (300 ng) y agua bidestilada estéril (csp20 μL).
- 4- La digestión se lleva a cabo en un baño a 37°C durante 1-3 horas.
- 5- La digestión se controla mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2,5-3% con un marcador de bajo peso molecular (50 pb ladder/100pb ladder).
- 6- Se compara el perfil de restricción con los perfiles obtenidos con el análisis *en sílico* de las especies de referencia.

RAPD “Random Amplified Polymorphic DNA” (amplificación polimórfica del ADN al Azar)

El genotipado mediante RAPD se realizó usando 2 cebadores, considerando su capacidad para discriminar entre cepas de la misma especie y su reproducibilidad. Los cebadores fueron:(i) M13 (Huey y Pasillo, 1989) y (ii) RAPD2 (Cocconcelli *et al.*, 1995).

Las diferentes condiciones usadas en los experimentos de amplificación para cada uno de los cebadores se describen en la Tabla 2.6.

Las imágenes obtenidas como producto de la amplificación de los diferentes fragmentos fueron analizadas con ayuda del programa *Bio Numerics* (www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm). La matriz de similitud fue calculada utilizando el coeficiente de similitud de Dice mientras que el dendrograma fue construido por el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

El programa *Bio Numerics*, pudo ser empleado para este análisis por gentileza del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, que adquirió la licencia para el uso exclusivo del mismo en el mencionado instituto. El análisis se pudo realizar sólo en los casos en que la calidad fotográfica de la imagen fue la requerida para ser leída por el programa.

Tabla 2.6. Cebadores y ciclos de amplificación para las reacciones de RAPD.

Cebadores	Secuencia (5'→3')	Desnatu- ralización	Annealing	Extensión	Ciclos
M13	GAG GGT GGC GGT TCT	94°C, 1'	45°C, 20''	72°C, 2'	40
		94°C, 1'	29°C, 1'*	72°C, 2'	20
RAPD2	AGC AGC GTG G	94°C, 20''	55°C, 30''	72°C, 30''	45

* rampa de 1' 30'' para pasar de 29°C a 72°C. El ciclo de amplificación de RAPD2 consiste en dos etapas como se describe en la tabla 10; una con 20 ciclos y otra de 45 ciclos.

La mezcla de reacción optimizada para ser usada con cada uno de los cebadores fue: tampón de PCR (1x); MgCl₂ (3,5 mM); dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (200 µM c/u); cebador (1,0 µM); Taq ADN polimerasa (0,1 U/ µL); ADN muestra (15-20 ng); agua bidestilada estéril (csp 50 µL).

Tanto los protocolos de RAPD como de ARDRA, fueron conducidos en base a las condiciones y metodologías descriptas por Fontana *et al.*, (2005, 2010) y optimizada para la especie en estudio.

REP-PCR (Amplificación de fragmentos repetitivos del genoma mediante PCR)

La caracterización mediante REP se realizó utilizando cinco cebadores con el objeto de detectar el mayor nivel de polimorfismo entre cepas. La ocurrencia de estos polimorfismos demuestra la variabilidad existente entre los diferentes aislados. Los cebadores utilizados fueron: Rep-Eric y Box (Versalovic *et al.*, 1994). Las diferentes condiciones usadas en los experimentos de amplificación para cada uno de los cebadores se describen en la Tabla 2.7.

Los componentes de la reacción y las concentraciones usadas fueron las descritas por Silva (2005) y optimizadas para ser empleadas con cada uno de los cebadores, lo cual en algunos caso llevó a modificar las condiciones iniciales: tampón de PCR (1x); MgCl₂ (3 mM); dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (400 μM c/u); cebador (3,0 μM); Taq ADN polimerasa (0,1 U/ μL); ADN muestra (15-20 ng); agua bidestilada estéril (csp 25 μL). Por otro lado se probaron mezclas comerciales de Labogen, para esta reacción: MegaMix-blue 2x buffer de reacción (6 mM MgCl₂ y 400 μM dNTPs). Se emplearon a una concentración 1x, la cual resulta en una concentración final de 3 mM MgCl₂.

Tabla 2.7. Cebadores y ciclos de amplificación para las reacciones de REP-PCR.

Cebadores	Secuencia (5'→3')	Desnatu- ralización	Annealing	Exten- sión	Ciclos
REP1R	IIIICGICGICATCIGGC	94°C, 1'	42°C, 1'	65°C, 8'	30
REP2	ICGICTTATCIGGCCTAC	94°C, 1'	42°C, 1'	65°C, 8'	30
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGA TTCAC	94°C, 1'	44°C, 1'	65°C, 8'	30
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGT GAGCG	94°C, 1'	44°C, 1'	65°C, 8'	30
BOX	CTACGGCAAGGCGACGC CTGACG	94°C, 1'	43°C, 1'	65°C, 8'	30

Pruebas de patogenicidad de las cepas de *A. avenae*

Los ensayos de inoculaciones artificiales se realizaron con dos finalidades. Por un lado, en una primera etapa como parte de las pruebas de identificación, donde el objetivo fue reproducir experimentalmente los síntomas de la enfermedad para tener una confirmación más de la asociación entre ésta y la bacteria. Por otro lado, verificar las diferencias en la patogenicidad y/o agresividad de los distintos aislamientos de la bacteria. Para el primer caso se utilizaron cepas que se identificaron preliminarmente por pruebas bioquímicas y mediante PCR especie-específica. Se emplearon cepas PCR (+) y PCR (-). Las cepas PCR (-) se emplearon para determinar si resultaban patogénicas para caña de azúcar en las condiciones del ensayo.

Para el segundo caso y con el fin de evaluar diferencias en el grado de virulencia de los distintos biotipos encontrados luego del análisis de la diversidad genética, se escogieron 4 cepas, dos de Tucumán (T10_59 y T8_23) y dos de Salta (S12_5 y S13_11) en base a los resultados obtenidos en la caracterización de las mismas por RAPD y REP-PCR. En ambos casos el procedimiento para la inoculación fue el mismo.

Se utilizaron tres variedades de caña de azúcar, TucCP 77-42, RA 87-3 y LCP 85-384, susceptible, intermedia y resistente respectivamente. Plantines jóvenes de caña de azúcar de aproximadamente un mes de emergencia se colocaron en macetas con tierra y mantillo en una proporción 70/30 (Fig.2.3 A y B). Se consideró representativo un número de 40 plantines para las evaluaciones a realizar (com.pers.)⁵. Los ensayos se realizaron en invernáculo controlando las condiciones de temperatura (25°-30°C) y humedad elevadas. Para la inoculación se siguió el procedimiento descrito por Jones *et al.*, (2001), modificado para caña de azúcar. Se utilizó una suspensión 1×10^8 UFC/ml a la cual se añadió Carburo de Silicio (carburundum) 500 mesh (como agente abrasivo) y tween 20 (como tensoactivo). Como control negativo se empleó en todos los casos agua desionizada-

⁵ Ing. Agr. (MSc). Alejandro M. Rago. Fitopatólogo, Grupo Caña de Azúcar-INTA Famaillá, Tucumán.

bidestilada a la cual se añadió sólo carburundun y tween 20. Las hojas se frotaron manualmente con esta suspensión (Fig.2.3 C y D).

Posteriormente se cubrieron con una bolsa de nylon durante 72 h para mantener elevada la humedad relativa (HR) del ambiente promoviendo la condensación de agua sobre las hojas para favorecer la infección.

Se realizaron observaciones cada 24 h para determinar la evolución de los síntomas, estableciéndose una escala de valor del 1 al 4 según el grado de avance de las lesiones (Tabla 2.8).

Una vez concluido el período de observación, se conservaron las hojas de los plantines inoculados, en heladera entre 4° y 7°C para ser empleados en los re-aislamientos, complementando así los ensayos de patogenicidad. Para ello se procedió de la misma manera que en los aislamientos generales tal como se describió en el apartado “Obtención de aislamientos” de este capítulo.

Tabla 2.8: Escala de valor para evaluación de síntomas de estría roja, causados por *Acidovorax avenae*.

Escala	Síntomas
1	Sin síntomas
2	Infección localizada y estrías leves en menos de 3 hojas
3	Infección avanzada y estrías generalizadas en mas de 3 hojas
4	Muerte de brote apical



Fig. 2.5: A y B: macetas con plantines jóvenes de caña de azúcar acondicionados para su inoculación; C y D: frotado de las hojas con la suspensión bacteriana.

Capítulo III RESULTADOS

Aislamiento e identificación preliminar de las cepas de *Acidovorax avenae*

Todos los medios de cultivo utilizados resultaron efectivos para el aislamiento, sin embargo ninguno fue totalmente selectivo para *A. avenae* ya que en todos los casos se observaron siempre dos tipos predominantes de colonias (Fig.3.1), unas de color blanco-crema, circulares, traslucidas, de bordes lisos, que respondían a la morfología típica descrita en bibliografía para *Acidovorax*, y otras amarillas, circulares, de bordes lisos y uniformes, morfología similar a algunas especies de *Xanthomonas*.

Ambos tipos de colonias resultaron muy difíciles de separar en colonias individuales ya que generalmente crecían superpuestas. Luego de sucesivos repiques fueron aisladas y sujetas a diferentes análisis a los fines de identificarlas taxonómicamente. Cada colonia pura fue conservada como se describe en el Cap.II Materiales y Métodos, asegurando así la supervivencia hasta su identificación..

La tabla 3.1 muestra los aislamientos obtenidos, identificados por localidad y por variedad. Un total de 40 cepas de Tucumán y 22 cepas de la provincia de Salta fueron caracterizadas en forma preliminar mediante observación microscópica (morfología de la célula), seguida de reacciones de Gram. Esto se realizó tanto para colonias blancas como para las amarillas, determinando de este modo, que se trata de bacilos cortos, dispuestos singularmente o en cadenas cortas de a dos, gram negativos (Fig.3.2).

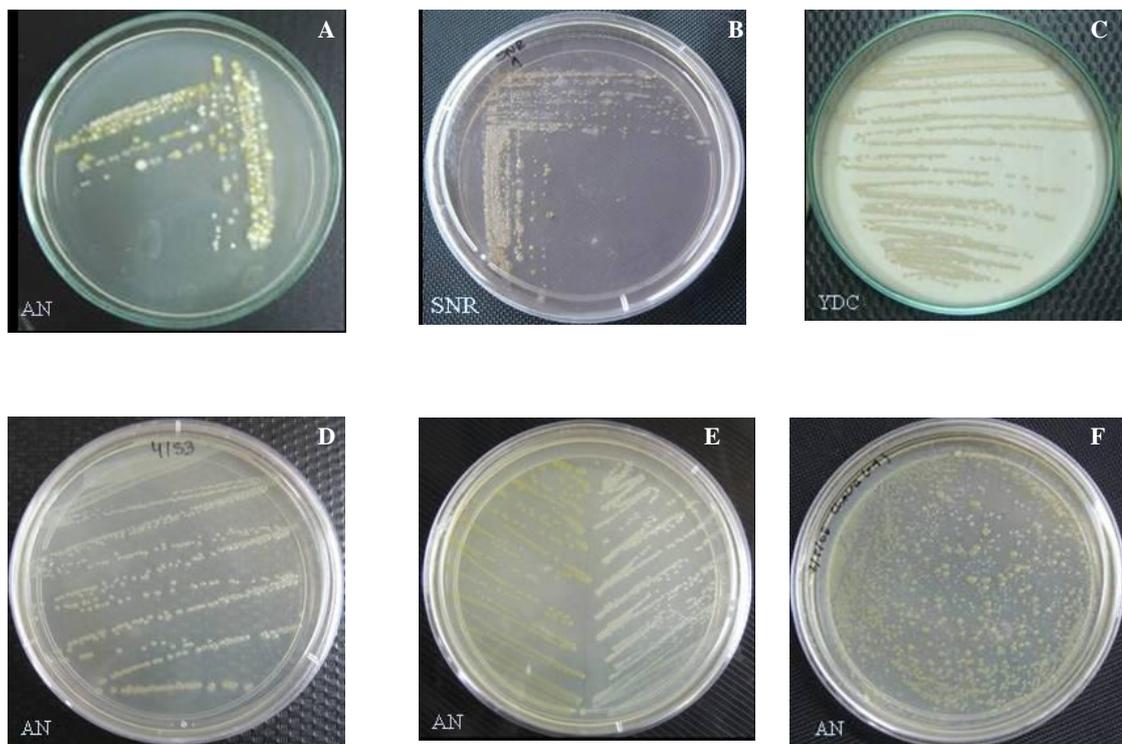


Fig. 3.1 Colonias obtenidas sobre placas de Petri como resultado de los aislamientos en medios de cultivo: Agar nutritivo-AN (A, D, E y F), Sorbitol rojo neutro-SNR (B) y Extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio-YDC (C). En este último las colonias correspondientes a *Acidovorax*, se observan color beige claro, mientras que en los otros medios siempre se presenta con blanco-crema.

Para las colonias blanco-crema, típicas de *Acidovorax*, se realizaron además las pruebas de movilidad y el test de actividad oxidasa, comprobándose que se trata de bacilos móviles y oxidasa positivos tal como se describe para esta especie en la bibliografía consultada (Fig.3.2).

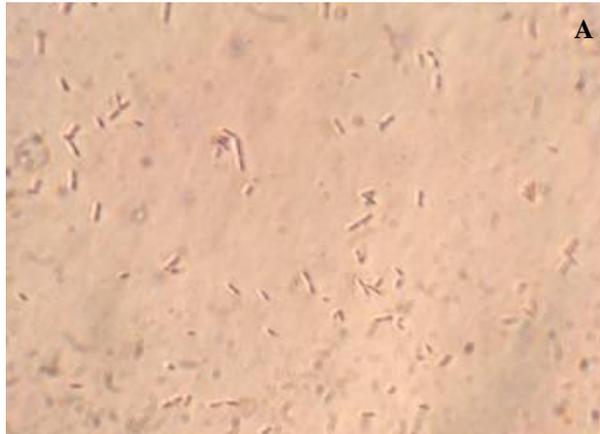


Fig. 3.2 Pruebas bioquímicas para la caracterización microbiológica clásica: (a) tinción de gram vista al microscopio, coloración rosada típica de gram negativos, (b) y (c), pruebas de movilidad en agar blando.

Tabla 3.1: Aislamientos obtenidos según localidad y variedad: T: Tucumán, S: Salta, el primer número coincide con la localidad y el segundo número hace referencia al número de identificación de la colonia aislada a excepción de la cepa OP.

Número de muestra	Variedad	Aislamientos	Localidad-Región	Provincia
1	TucCP 77-42	T1_41, T1_42 T1_67	Louisiana-norte	Tucumán
2	TucCP 77-42	T2_6, T2_57 T2_58, T2_65 T2_66	Los Ralos-norte	Tucumán
3	TucCP 77-42	T3_29, T3_31 T3_35, T3_55 T3_56, T3_69	Ranchillos-norte	Tucumán
4	TucCP 77-42	T4_53, T4_54 T4_68, T4_69	La Trinidad-sur	Tucumán
5	TucCP 77-42	T5_12, T5_51 T5_52, T5_72	La Trinidad-sur	Tucumán
6	Fam 91-209	T6_44, T6_50 T6_71	Cruz Alta-centro	Tucumán
7	TucCP 77-42	T7_47, T7_48 T7_63, T7_64	Agua Dulce-centro	Tucumán
8	TucCP 77-42	T8_23, T8_25 T8_45, T8_70	Las Piedritas-centro	Tucumán
9	TucCP 77-42	T9_43, T9_67 T9_73	Macomita-norte	Tucumán
10	Fam 89-686	T10_59, T10_61 T10_62	Famaillá-centro	Tucumán
11	NA 85-1602	S11_1, S11_2 S11_3, S11_4	Col.Sta Rosa	Salta
12	NA 02-2320	S12_5, S12_6b	Tabacal	Salta

Cont. Tabla 3.1

Número de muestra	Variedad	Aislamientos	Localidad-Región	Provincia
13	NA 85-1602	S13_6, S13_7 S13_8, S13_9 S13_10 ,S13_11 S13_12 ,S13_13 S13_17 ,S13_18 S13_19 ,S13_20 S13_21 S13_22 S13_23 S13_24	Col.Sta.Rosa	Salta
14	RA 87-3	OP	Obera Pozo-centro	Tucumán
15	TucCP 77-42	LR	La Ramada-Norte	Tucumán

Caracterización molecular

Se aplicaron técnicas moleculares dependientes e independientes de cultivo para la detección e identificación de la bacteria a partir de tejidos afectados como así también para la determinación de la variabilidad genética presente entre los distintos aislamientos. Estos procedimientos mostraron diferentes niveles de discriminación en su capacidad para identificar y diferenciar los biotipos presentes. La caracterización molecular de los aislamientos se realizó mediante PCR especie-específica, amplificación del gen ARNr 16S por PCR, RAPD-PCR, REP-PCR y ARDRA.

➤ Extracción de ADN bacteriano a partir de las muestras

El primer paso para la caracterización molecular aplicando técnicas dependientes de cultivo fue la obtención del ADN a partir de los cultivos puros de las cepas aisladas, para lo cual se ensayaron diferentes protocolos además de kits de extracción rápida, a fin de seleccionar el apropiado para cada caso. En todos los casos se obtuvo ADN de alta pureza y buena concentración que fue usado tanto en las reacciones de PCR especie-específica y en las técnicas de RAPD y REP para el estudio de la diversidad genética, siendo para estas

últimas el mas apropiado el obtenido con el método de Ausubel *et al.*, (1992), mientras que los métodos rápidos fueron usado para reacciones PCR especie-específica. Se extrajo además el ADN total directamente de las hojas sintomáticas para ser analizado mediante técnicas de detección directas independientes de cultivo (PCR especie-específica).

En todos los casos descriptos el ADN obtenido fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa y cuantificado electrónicamente con Qubit® (INVITROGEN).

➤ **Detección e identificación de *A. avenae* por PCR especie -específica**

A partir de las colonias aisladas ya identificadas preliminarmente en base a ensayos de microbiológicos, se efectuaron reacciones de PCR con cebadores específicos para *Acidovorax avenae*. Esto permitió la separación de los aislamientos de la manera que se presenta en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Caracterización de colonias aisladas discriminadas según los resultados en las pruebas de identificación bioquímica y molecular.

Morfología de colonias	Reacción de GRAM	Producto de PCR
colonias blanco-crema	Gram negativo	PCR especie-específica (+)
colonias blanco-crema	Gram negativo	PCR especie-específica (-)
colonias amarillas	Gram negativo	PCR especie-específica (-)

Del total de cepas analizadas con ambos tipos de morfología de colonia, un 50% presentó señal positiva para la PCR especie-específica (Fig.3.3, 3.4 y 3.5), indicando que existen otros géneros o especies bacterianas asociados de alguna manera a la infección causada por *A. avenae* debiendo determinarse la identidad de los mismos como parte de las pruebas de evaluación y confirmación del patosistema caña de azúcar-*acidovorax*-estría roja.

Para las cepas PCR (+), se realizó el secuenciamiento del producto obtenido y el analisis por comparación con secuencias ya depositadas en el banco de datos del *Genbank*,

usando el programa *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU), confirmándose una identidad de >99% con *Acidovorax*.

El grupo de aislamientos que dió reacción negativa a la PCR especie–específica, tanto de colonias amarillas como colonias blanco-crema, fue identificado mediante amplificación por PCR, en forma parcial (500 pb) o total (1500 pb) el gen ARNr 16S empleando el par de cebadores Plb/Mlb y P0/P6, respectivamente (condiciones de amplificación en Tablas 2.3 y 2.4 en Cap. II Materiales y Métodos). Mediante el análisis de las secuencias obtenidas y por comparación con secuencias presentes en la base de datos *GenBank* se encontró más de 99% de identidad con los géneros *Erwinia* y *Pantoea*, respectivamente para ambos tipos de colonias. En ningún caso se identificó *Xanthomonas* sp. responsable de la falsa estría roja en Brasil (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Resumen de los fragmentos amplificados y secuenciados para las diferentes cepas analizadas.

Aislamientos	PCR especie-específica	Cebadores	pb
T10_61*	+	Oaf1-Oar1/ Plb-Mlb	550/500
T8_45*	+	Oaf1-Oar1/ Plb-Mlb	550/500
T4_69*	+	Oaf1-Oar1	550
T10_59*	+	P0- P6	1500
T8_23*	+	P0- P6	1500
S12_5*	+	P0- P6	1500
S13_11*	+	P0- P6	1500
S11_1*	+	Oaf1-Oar1	550
T3_31**	-	P0- P6	1500
T2_6**	-	Plb-Mlb	500

*cepas empleadas como testigos positivos >99% de identidad con *Acidovorax*, ** cepas controles negativos >99% de identidad con *Erwinia/Pantoea*

Tomando como molde el ADN total obtenido de hojas de caña de azúcar afectadas con estría roja, y a fines de detectar la presencia del patógeno mediante técnicas moleculares independientes de cultivo, se utilizó la par de cebadores Oaf1/Oar1 específico de la especie en la reacción de PCR. La cantidad y calidad de ADN extraídos fueron óptimas, obteniéndose señal positiva para las muestras analizadas como se muestra en la Fig.3.6.

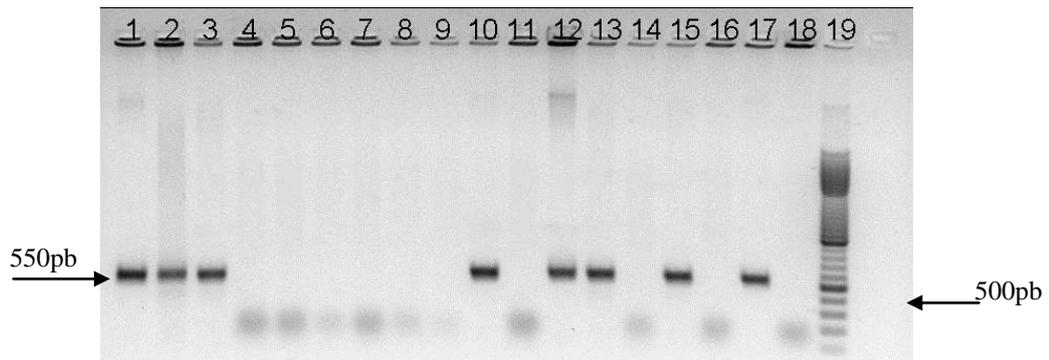


Fig. 3.3 Electroforesis en gel de agarosa. PCR especie-específica de aislamientos de *A. avenae*: las columnas 1, 2, 3, 10, 12, 13, 15, 17, indican reacción positiva, donde se observa el fragmento de 550 pb amplificado con los cebadores oaf1/oar1. En la columna 19 se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pb. El resto de las columnas sin señal corresponden a aislamientos PCR negativo.

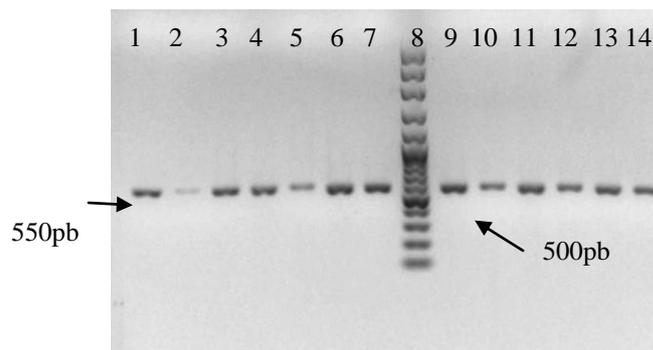


Fig. 3.4 Electroforesis en gel de agarosa. PCR especie-específica de aislamientos de *A. avenae*: todas las columnas muestran reacción positiva donde se observa el fragmento de 550 pb amplificado con los cebadores oaf1/oar1. En la columna 8 se encuentra en marcador de peso molecular de 100 pb.

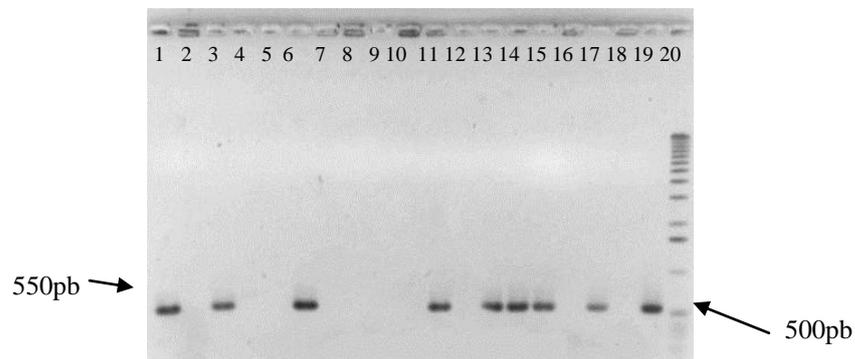


Fig. 3.5 Electroforesis en gel de agarosa. PCR especie-específica de aislamientos de *A. avenae*: columnas 1, 3, 6, 11, 13, 14, 15, 17, 19 reacción positiva donde se observa el fragmento de 550 pb amplificado con los cebadores oaf1/oar1. En la columna 20 se encuentra en marcador de peso molecular de 1 Kb. Resto de columnas PCR negativo.

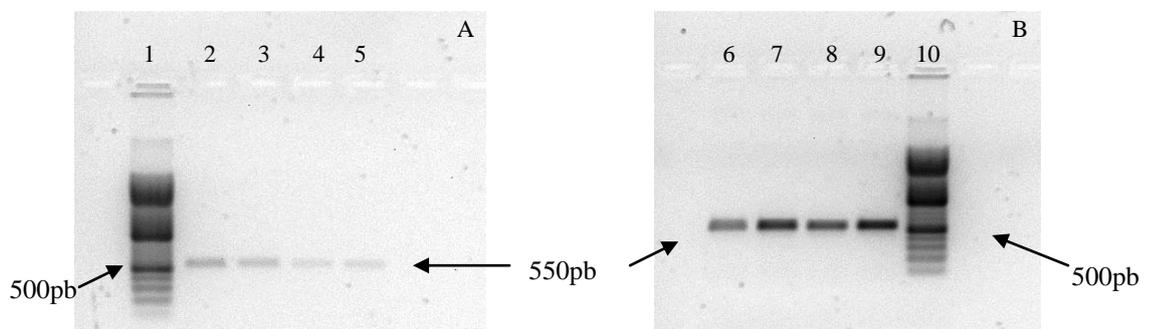


Fig. 3.6 (A y B). Electroforesis en gel de agarosa. PCR especie-específica para la detección de *A. avenae* a partir de ADN total de hojas de caña de azúcar sintomáticas. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9: Fragmento de 550 pb correspondiente a la región intergénica 16s-23s amplificado con los cebadores oaf1/oar1. 1 y 10: marcador de peso molecular de 100 pb.

➤ **Caracterización genética de cepas de *A. avenae***

Los aislamientos preliminarmente caracterizados como bacilos móviles, Gram negativos, oxidasa y PCR especie-específica positivos, fueron analizados mediante RAPD, REP-PCR y ARDRA. Con esta metodología se obtuvieron patrones de bandas o “*fingerprints*” (huellas digitales) de cada aislamiento, permitiendo realizar una estimación de la diversidad existente entre las distintas cepas.

Estimación de la diversidad genética entre los aislamientos mediante RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

El protocolo de RAPD fue optimizado para el análisis de los distintos aislamientos. Para la realización de esta técnica se utilizó ADN obtenido a partir de un cultivo puro de las colonias aisladas. De los diferentes cebadores ensayados se obtuvieron los mejores resultados con el cebador M13. La Fig.3.7 muestra el análisis de 41 cepas, usando el cebador M13. Puede observarse la presencia de cuatro perfiles dominantes “a”, “b”, “c” y “d” en los aislamientos provenientes de las muestras de Tucumán y Salta.

Los resultados obtenidos indican que el cebador M13, permitió realizar una rápida discriminación entre los aislamientos provenientes de las distintas zonas de muestreo. Los perfiles generados evidenciaron un importante polimorfismo dentro de las cepas de Tucumán, permitiendo además distinguir a éstas del resto de los aislamientos de Salta. El análisis de los perfiles electroforéticos realizado con el software *BioNumerics*, puso de manifiesto estas diferencias dando como resultado el agrupamiento que se muestra en la Fig.3.8.

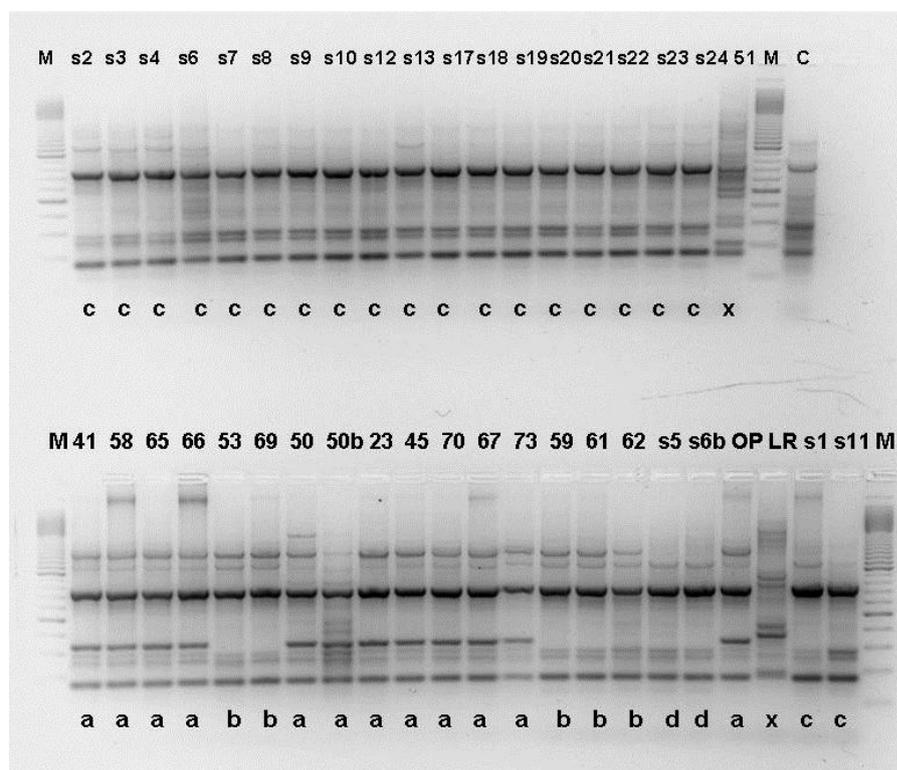


Fig. 3.7 Electroforesis en gel de agarosa. RAPD *fingerprints* obtenidos de los aislamientos pertenecientes a *A. avenae* usando el cebador M13. Los cuatro perfiles dominantes fueron “a” y “b” correspondientes a Tucumán y “c” y “d” a las cepas de Salta. M: marcador de peso molecular de 100pb.

El dendograma generado por el programa *BioNumerics* (Fig.3.8), considerando un 85% de similitud entre los perfiles, pone en evidencia la existencia de 2 *clusters* mayores, el *cluster* 1 que contiene el biotipo “a”, y el biotipo “b”, ambos pertenecientes a cepas aisladas de hojas de caña de zonas cañeras de Tucumán y el *cluster* 2 donde se ubican los biotipos “d” y “c”, que corresponden a aislamientos obtenidos de hojas de caña provenientes de Salta. Estos grupos, están asociados con diferentes genotipos de caña de azúcar, y no con la distribución geográfica de patógeno. El biotipo “a” se encuentra presente en las variedades TucCP 77-42 y en la Fam 91-209, el “b” solo se aisló de la variedad Fam 89-686, cultivadas en Tucumán. Los biotipos “c” y “d” se encuentran presentes en las variedades NA 02-2320 y NA 85-1602, respectivamente, de la provincia de Salta.

Dice (Opt:1.00%) (Tol 2.0%-2.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
RAPDs

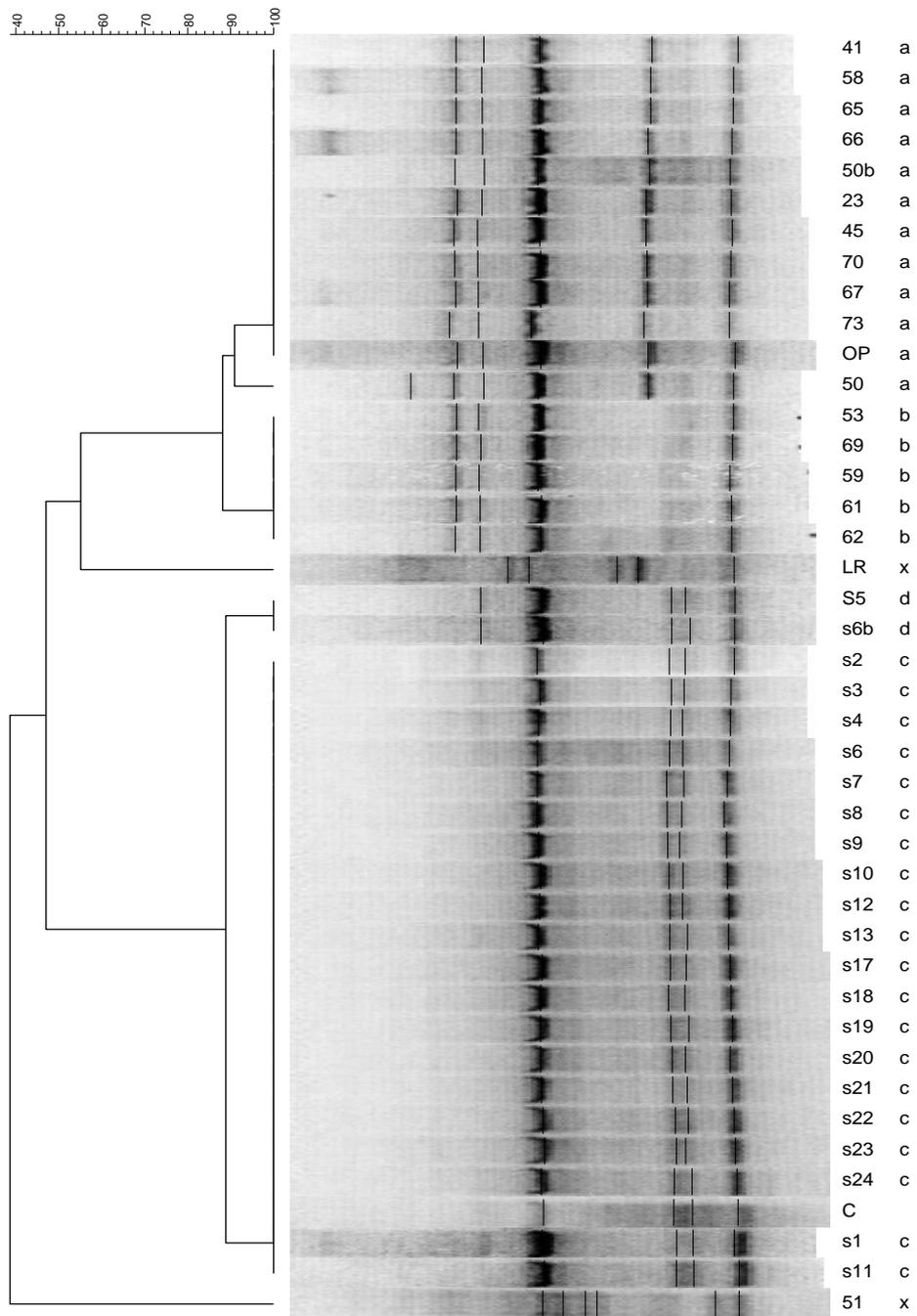


Fig. 3.8 Dendrograma construido empleando en Programa *Bio Numerics*, con el cebador RAPD M13 para los aislamientos de *Acidovorax* analizados. La matriz de similitud fue calculada utilizando el coeficiente de similitud de Dice mientras que el dendrograma fue construido por el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Evaluación de la variabilidad genética de los aislamientos con rep-PCR (Amplificación de fragmentos repetitivos del genoma por PCR)

Todos los aislamientos fueron analizados utilizando la técnica de rep-PCR, empleando los cebadores, REP 1, REP 2 y BOX en forma individual y el par ERIC (1 y 2) en forma conjunta. Para la realización de esta técnica se utilizó ADN obtenido a partir de un cultivo puro de las cepas aisladas. El procedimiento para la extracción de ADN y las condiciones para cada uno de los cebadores, mezcla de reacción, condiciones de amplificación y secuencias se describen en el Cap.II Materiales y Métodos.

Los perfiles electroforéticos generados por la amplificación de estas secuencias conservadas y repetitivas resultó en múltiples productos con variados tamaños y peso moleculares, mostrando así mismo, diferentes niveles de discriminación en su capacidad para diferenciar las distintas cepas de *A. avenae*, siendo en este sentido los cebadores REP los que dieron los mejores amplificadores. (Fig.3.9 a 3.12).

El análisis de los patrones de bandas polimórficos obtenidos con cebador REP1, reveló la ocurrencia de diversidad genética entre los aislados, pudiéndose observar la presencia de al menos 2 biotipos diferentes para Tucumán, mientras que para los aislamientos de Salta la discriminación no fue lo suficientemente clara como la que se evidenció en el análisis por RAPD.

La aplicación de esta técnica para evaluar la variabilidad genética presente entre los aislamientos de *A. avenae* de caña de azúcar, resultó eficiente mostrando perfiles polimórficos para las distintas cepas. La calidad de amplificación fue variable para cada cebador y según la muestra, observándose mejores resultados con el uso de cebador REP1.

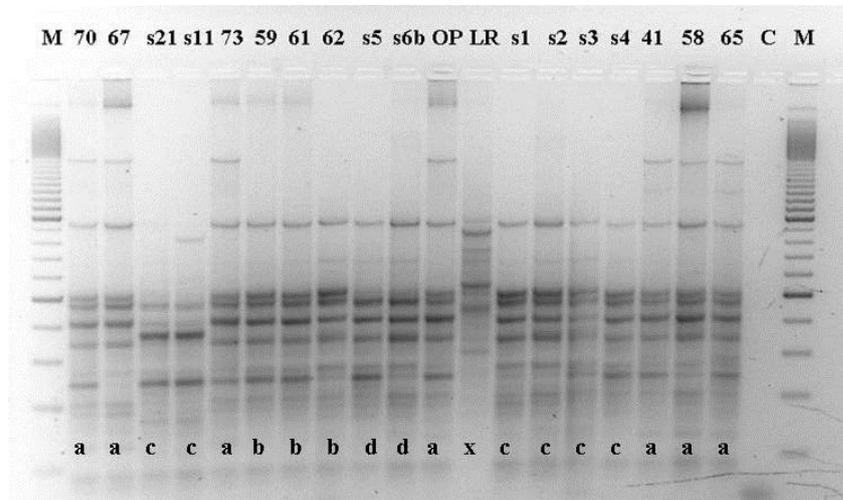


Fig. 3.9 Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados por el cebador REP 1, para 19 cepas de *A. avenae* analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, C: blanco y M: marcador de peso molecular de 100 pb. Las letras asignadas a los perfiles corresponden a las diferencias obtenidas mediante RAPD.

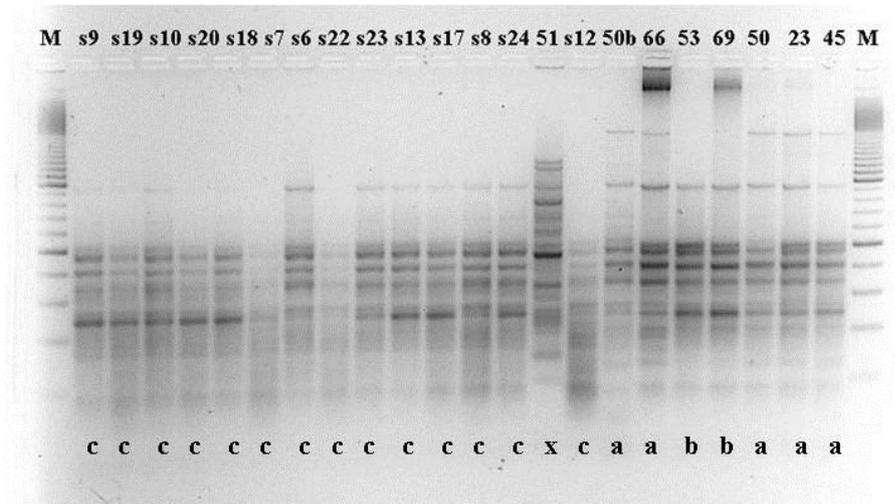


Fig. 3.10 Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados por el cebador REP 1, para 22 cepas de *A. avenae* analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, M: marcador de peso molecular de 100 pb.

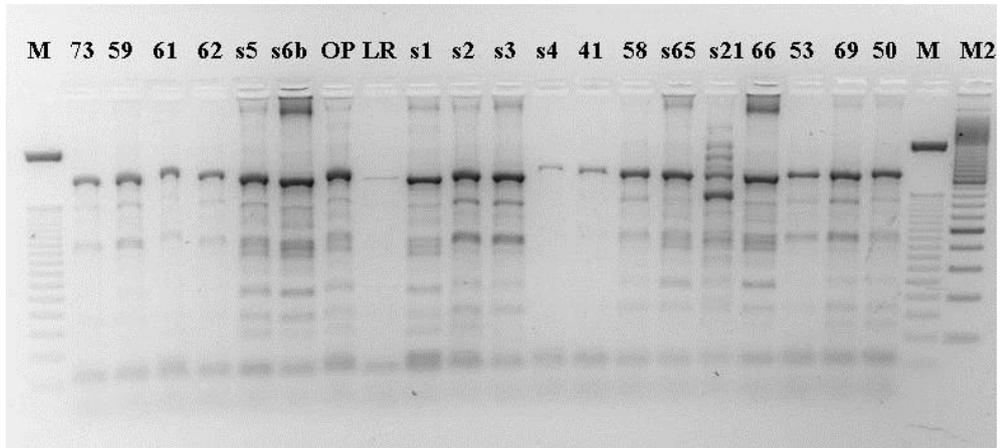


Figura 3.11 Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados por el cebador REP 2, para 20 cepas de *A. avenae* analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, M: marcador de peso molecular de 50pb y M2: marcador de peso molecular de 100 pb.

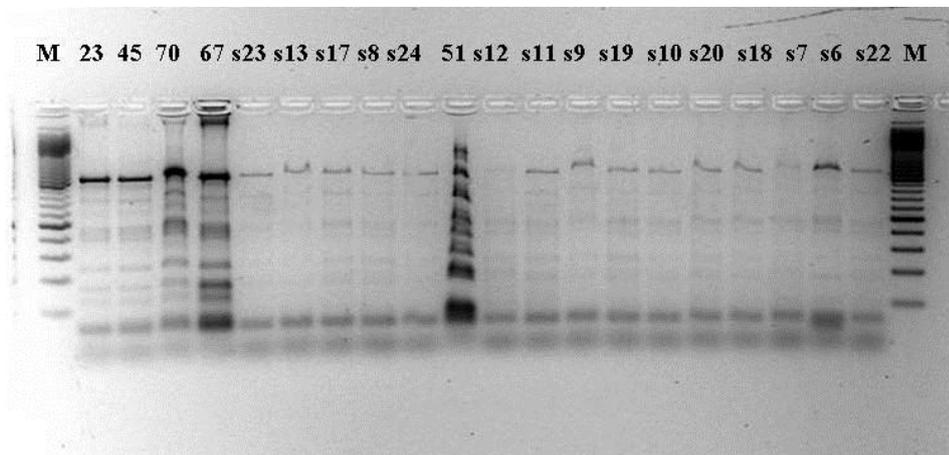


Fig. 3.12 Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados por el cebador REP 2, para 20 cepas de *A. avenae* analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, M: marcador de peso molecular de 100 pb.

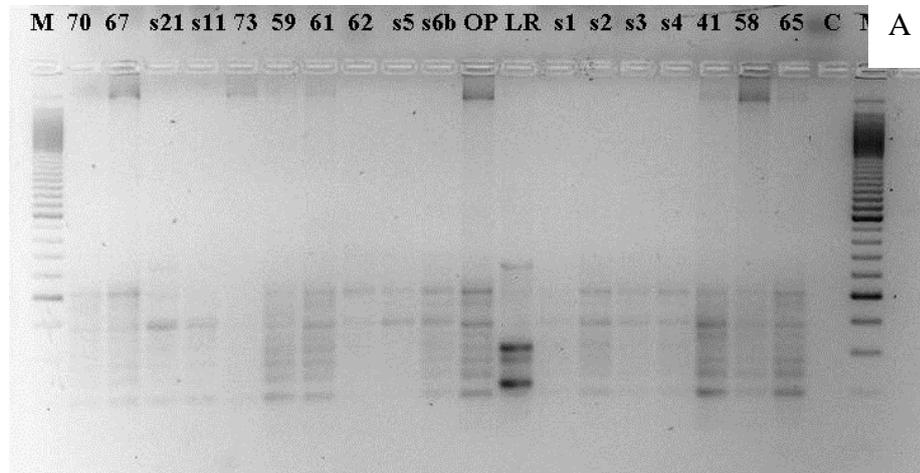


Fig. 3.13 (A): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados con el par de cebadores ERIC, para 19 cepas de *A. avenae* analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, C: blanco y M: marcador de peso molecular de 100 pb.

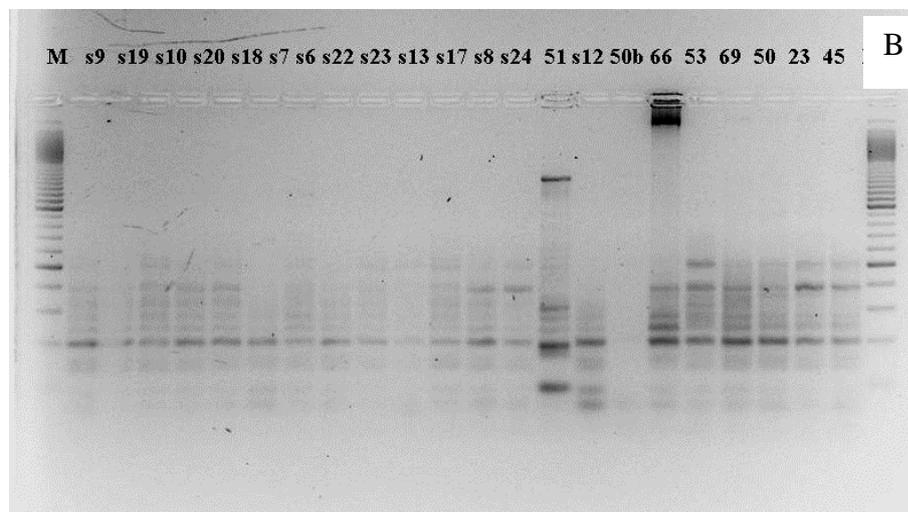


Fig. 3.13 (B): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados con el par de cebadores ERIC, para 22 cepas de *A. avenae* analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, C: blanco y M: marcador de peso molecular de 100 pb.

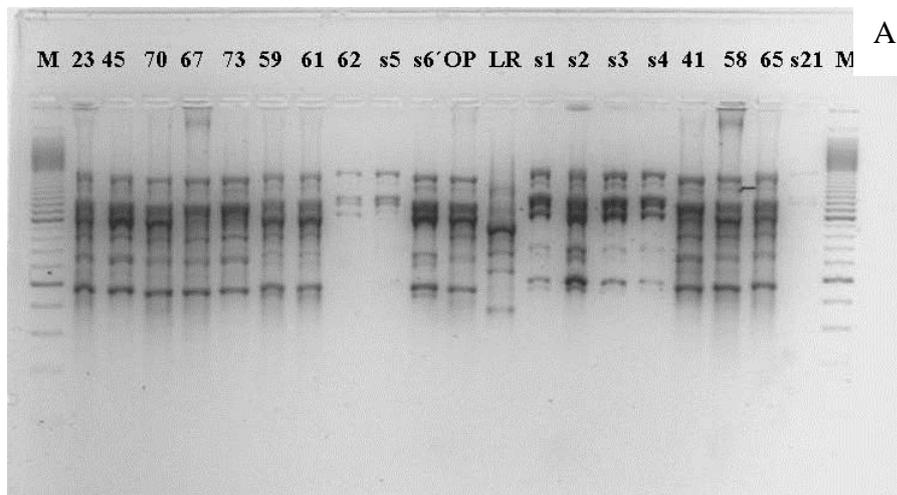


Fig. 3.14 (A): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados con el cebador BOX, para 20 cepas de *A. avenae* analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, C: blanco, M: marcador de peso molecular de 50 pb y M2: marcador de peso molecular de 100 pb.

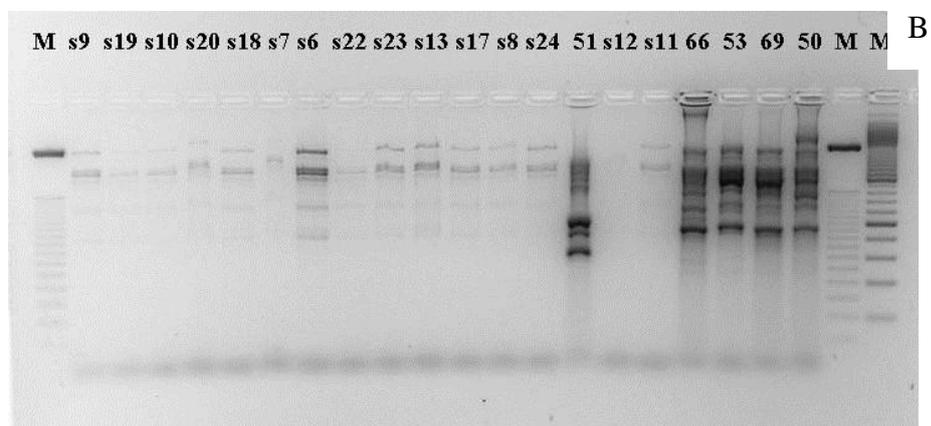


Fig. 3.14 (B): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles generados con el cebador BOX, para 20 cepas de *A. avenae* analizadas, la denominación “s” mas el número corresponde a aislamientos de Salta, números solos cepas de Tucumán, C: blanco, M: marcador de peso molecular de 50 pb y M2: marcador de peso molecular de 100 pb.

Análisis de la diversidad genética de cepas de *A. avenae* mediante ARDRA “Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”

Para el estudio de la diversidad genética de los aislamientos de *A. avenae*, obtenidos a partir de las diferentes zonas productoras de caña de azúcar, se empleó además la técnica de ARDRA. La misma fue desarrollada mediante la digestión enzimática de fragmentos de 1500 pb correspondientes al gen 16S ARNr y amplificados por PCR a partir de los cebadores P0/P6.

Las enzimas de restricción fueron seleccionadas luego de un análisis *in silico* con el programa *BioEdit* para determinar los posibles sitios de corte en la secuencia del gen ARNr 16S de *Acidovorax avenae*, ya publicadas en la base de datos *Genbank*. A continuación se detallan los números de sitios de corte obtenidos en el análisis para las diferentes enzimas de restricción usadas en este trabajo: *TaqI*, *HincII*, *HaeIII*, *HinfI* (Tabla 3.4).

Tabla 3.4: Resumen del número de sitios de corte en la secuencia del gen ARNr 16S de *A. avenae* extraída de la base de datos de *Genbank*.

Especie	<i>TaqI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HincII</i>	<i>HinfI</i>
<i>Acidovorax avenae</i> (“type” o cepa tipo del banco de secuencias)	4	5	3	3

Los resultados obtenidos mostraron un nivel de discriminación bajo. Esto podría ser debido al mismo fundamento de la técnica (amplificación del gen ribosomal 16S y posterior digestión con enzimas de restricción), es decir, resultaría muy difícil la diferenciación de especies que presentan una alta homología en la secuencia del gen ARNr 16S aún dentro de biotipos distintos.

El análisis de los perfiles electroforéticos generados por la digestión con las enzimas *TaqI*, *HincII*, *HaeIII*, *HinfI*, deja en evidencia que todos los patrones resultaron idénticos entre sí, para las distintas cepas analizadas, por lo tanto en este estudio, los

aislamientos de *A. avenae* resultaron indistinguibles, no siendo posible con esta técnica detectar variabilidad genética. Sin embargo y habiendo utilizado en todas las digestiones como un control negativo de cada reacción, cepas de otras especies bacteriana endofíticas aisladas junto con *Acidovorax* a partir de material sintomático con las enzimas *TaqI* y *HaeIII*, se pudo discriminar perfectamente las cepas de *A. avenae* de otros géneros aislados como *Pantoea* y *Erwinia*, que mostraron perfiles claramente distintos (Fig.3.15B, 3.16 y 3.17). Mientras que con las enzimas *HinfI* y *HincII*, los perfiles fueron siempre idénticos aún para los distintos géneros analizados (Fig.3.15A y 3.18).

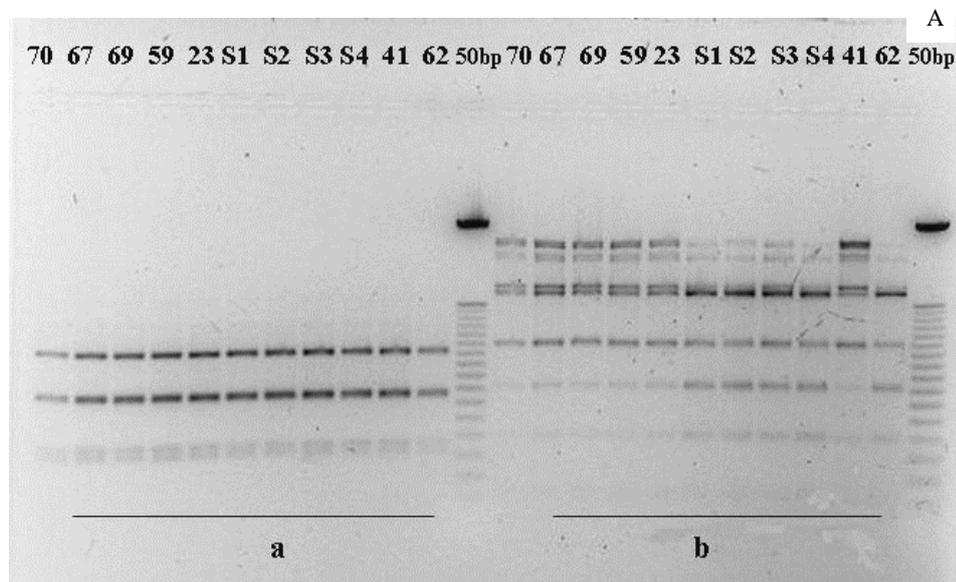


Fig. 3.15 (A): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos por la digestión de las enzimas *Hinf I* (a) y *Taq I* (b) para distintas cepas de *A. avenae* de Tucumán, columnas 12 y 24 corresponden al marcador de peso molecular de 50 pb.

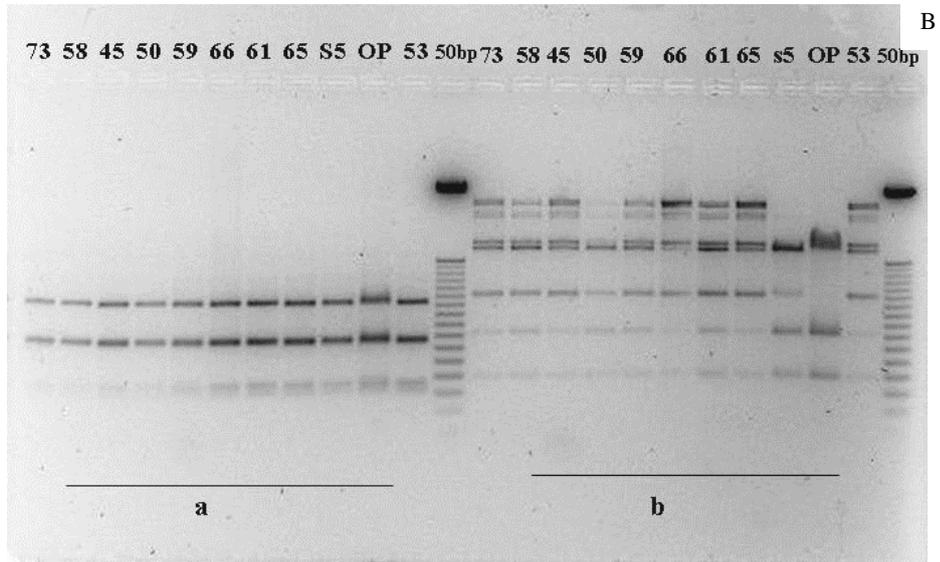


Fig. 3.15 (B): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos por la digestión de las enzimas *Hinf* I (a) y *Taq* I (b) para distintas cepas de *A. avenae* de Tucumán, columnas 12 y 24 corresponden al marcador de de peso molecular de 50 pb.

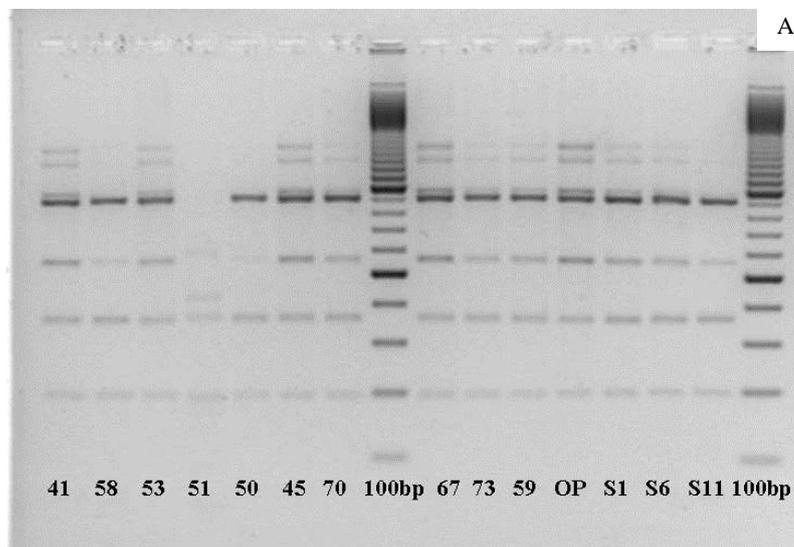


Fig. 3.16 (A): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima *Taq* I para distintas cepas de *A. avenae* de Tucumán y de Salta. La calle 51, con perfil de restricción diferente al de *A. avenae*, corresponde a otro género.

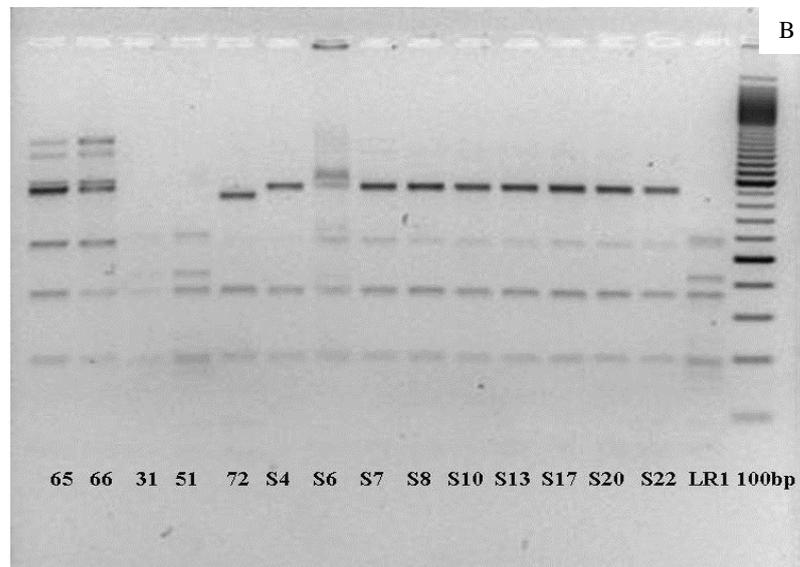


Fig. 3.16 (B): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima *Taq* I para distintas cepas de *A. avenae* de Tucumán y de Salta. Las calles 31, 51, 72 y LR con perfil de restricción diferente al de *A. avenae* corresponden a otros géneros.

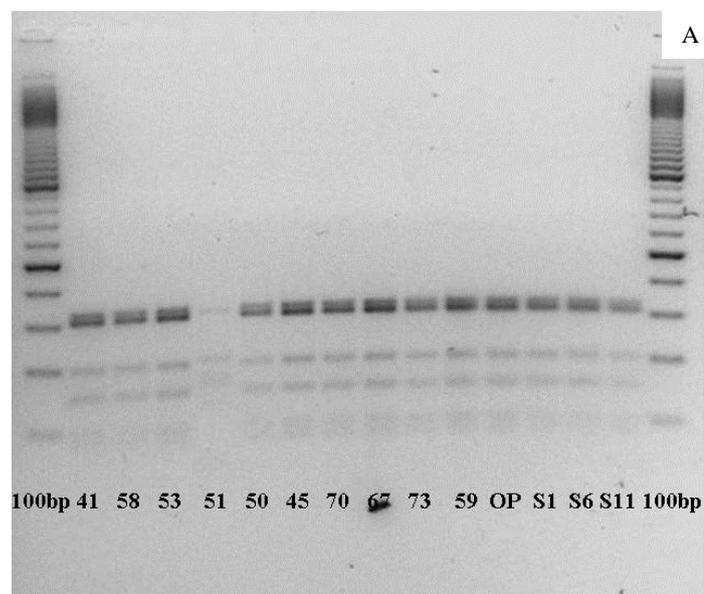


Fig. 3.17 (A): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima *Hae*III para distintas cepas de *A. avenae* de Tucumán y de Salta. La calle 51, con perfil de restricción diferente al de *A. avenae*, corresponde a otro género.

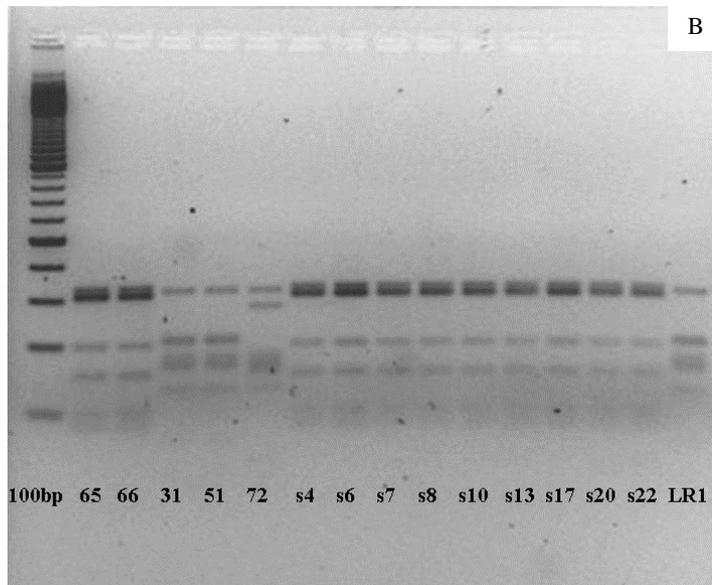


Fig. 3.17 (B): Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima *HaeIII* para distintas cepas de *A. avenae* de Tucumán y de Salta. Las calles 31, 51, 72 y LR con perfil de restricción diferente al de *A. avenae* corresponden a otros géneros.

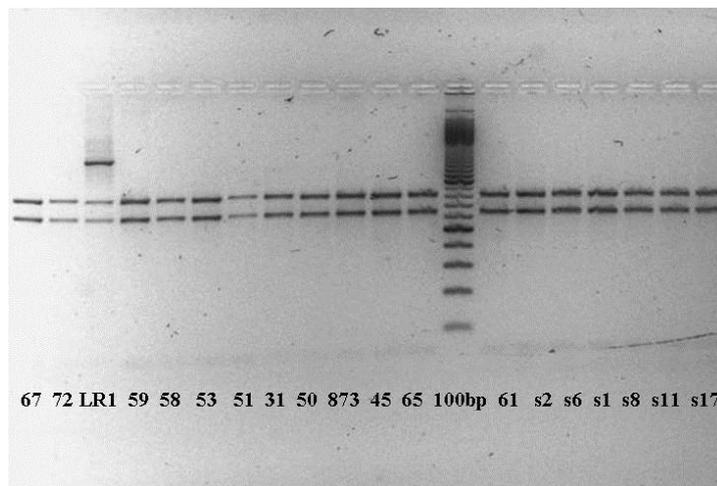


Fig. 3.18: Electroforesis en gel de agarosa. Perfiles obtenidos empleando la enzima *HincII*. No se observan diferencias en los perfiles de restricción entre las calles 31, 51, 72 y LR, correspondiente a otros géneros y el resto de las calles con cepas de *A. avenae*.

➤ **Análisis filogenético de las cepas de *Acidovorax avenae* en base a las secuencias del gen ARNr 16S**

En base a los resultados obtenidos mediante el análisis de la biodiversidad de *A. avenae* efectuado con las técnicas descriptas, se seleccionaron 4 biotipos diferentes, dos provenientes de muestras de Tucumán (T10_59, T8_23) y dos de Salta (S13_11 y S12_5) de los cuales se analizó la secuencia del gen ARNr 16S obtenida, usando el programa *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>), con el propósito de construir un árbol filogenético es decir, una representación gráfica de las relaciones genealógicas entre los taxa, en este caso las secuencias de los aislamientos en estudio, respecto de otras especies de *Acidovorax*, aisladas en otras partes del mundo. El método estadístico empleado por el programa RDP se menciona en el cap.II Materiales y Métodos.

Se seleccionaron 27 secuencias depositadas en el Banco de datos correspondiente sólo a cepas aisladas de distintas especies de *Acidovorax*. Se incluyeron las secuencias obtenidas de los 4 aislamientos propios, T10_59; T8_23; S12_5; S13_11. En la Fig.3.19 puede observarse como los aislamientos de *A. avenae* obtenidos en este trabajo fueron ubicados en *clusters* diferentes en base a la homología que presentaron con las otras secuencias. La secuencia del gen ARNr 16S de la cepa T10_59 proveniente de la variedad tucumana Fam 89-686 fue ubicada en el mismo cluster que la cepa proveniente de Salta S13_11 a partir de la variedad NA 85-1602; mientras que la cepa T8_23 aislada a partir de la variedad tucumana TucCP 77-42 se ubica en un cluster diferente junto a la cepa S12_5 de la variedad NA 02-2320 de la provincia de Salta (Fig.3.19). En la Fig.3.20 se muestra el árbol generado cuando se compararon 4 cepas “*type*” de *Acidovorax* con los aislamientos obtenidos en este trabajo: se puede observar que las cepas de Salta se agrupan juntas cercanas a las cepas tucumanas T8_23 y T10_59, aunque esta última se aleja del *cluster*, similar comportamiento que adopta en la Fig.3.19.

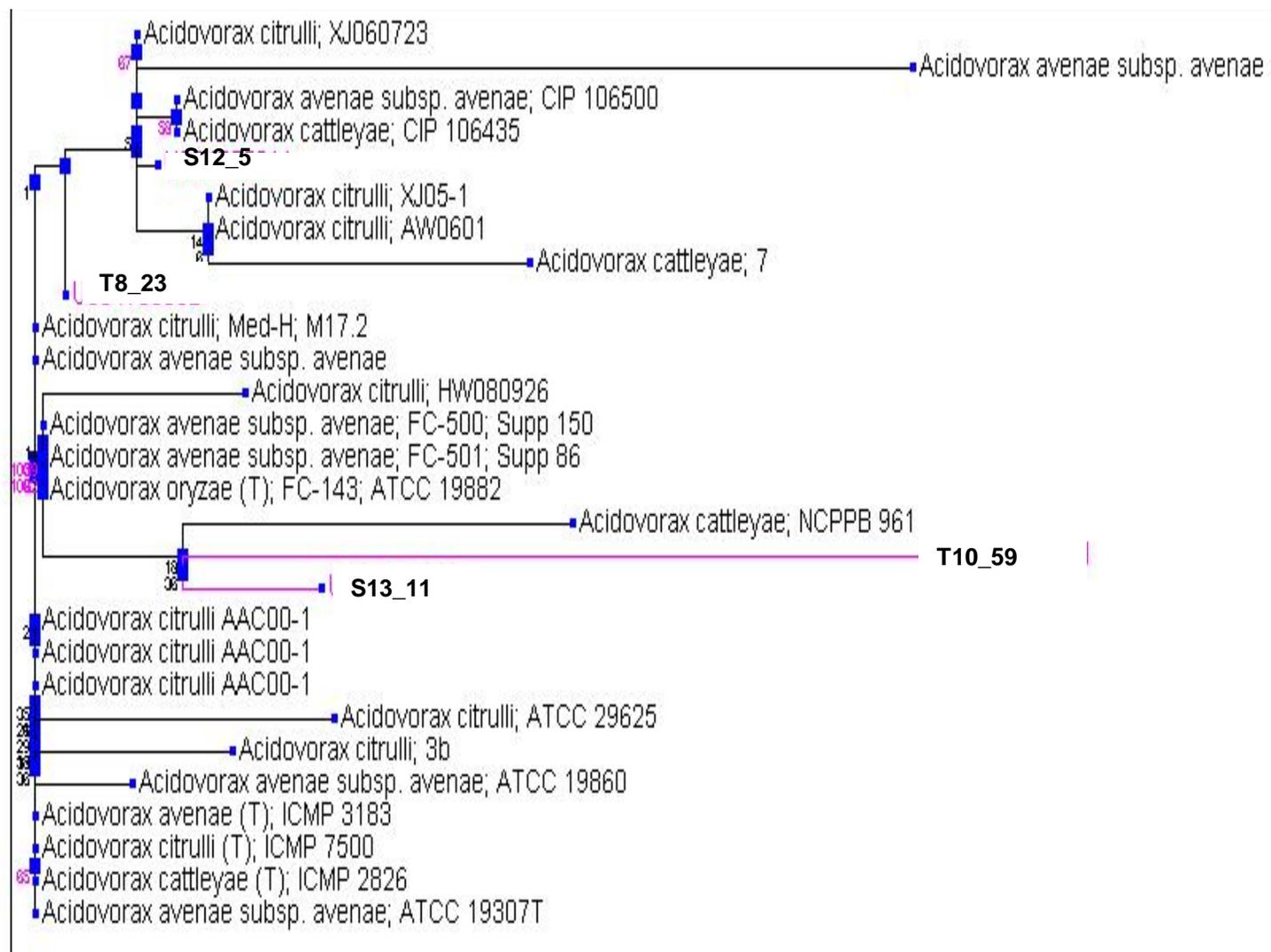


Fig.3.19: Árbol filogenético construido con confianza bootstrap estimadas utilizando el método de agrupamiento Weighbor y corrección de la distancia de Jukes-Cantor, para las cuatro secuencias de aislamientos de *A. avenae* propios (T10_59, T8_23, S13_11 y S12_5), con 27 secuencias de *Acidovorax* proveniente de la base de datos *GenBank*. El árbol incluye los resultados de una prueba de bootstrap con 100 repeticiones. Bootstrap valores superiores a 50% se destacan.



Fig.3.20: Árbol filogenético construido con confianza bootstrap estimadas utilizando el método de agrupamiento Weighbor y corrección de la distancia de Jukes-Cantor, para las cuatro secuencias de aislamientos de *A. avenae* propios (T10_59, T8_23, S13_11 y S12_5), con cuatro secuencias de cepas “type” de *Acidovorax* aisladas en otros cultivos. El árbol incluye los resultados de una prueba de bootstrap con 100 repeticiones. Bootstrap valores superiores a 50% se destacan.

Ensayos de patogenicidad de las cepas de *Acidovorax avenae*

Las inoculaciones se realizaron con aquellos aislamientos preliminarmente identificados por pruebas bioquímicas y PCR especie-específica, como *A. avenae* positivos. También se inocularon plantines con las cepas PCR (-), tanto de colonias amarillas como de blanco-crema, para evaluar efectivamente si se trataba sólo de bacterias endofíticas y/o contaminantes o si eran patogénicas por si mismas (Fig.3.21 A y B).

Los síntomas de la enfermedad fueron reproducidos exitosamente sólo con las cepas PCR+ que habían sido seleccionadas para el ensayo como *A.avenae* y que además habían sido identificadas mediante análisis de las secuencias del producto de PCR especie-específica como así también por la secuenciación del gen ARN 16S (Fig.3.22 A y B). Las inoculaciones con las otras cepas, PCR (-), no evidenciaron indicio alguno de la enfermedad en ninguno de los casos mencionados, coincidiendo estos resultados con lo esperado dado que el análisis de las secuencias del 16S ADN ribosomal para estas cepas, manifestaba una identidad mayor al 98% con los géneros *Erwinia* y *Pantoea* las cuales no están descriptas como patogénicas en caña de azúcar, aunque sí como contaminantes endofíticas.

Los síntomas desarrollados en hojas de plantines inoculados para evaluar diferencias en el grado de virulencia de los distintos biotipos encontrados, no evidenciaron la existencia de diferencias en la patogenicidad o agresividad para cada uno de ellos sobre las variedades evaluadas. Sin embargo cuando se inocularon variedades tucumanas con la cepa de Salta, S13_11, se observó un desarrollo de síntomas mas acelerado que cuando se realizó el ensayo inverso, es decir cuando se inoculó la variedad de Salta con la cepa de Tucumán T10_59.

La intensidad de las lesiones desarrolladas en hojas se encuadran dentro del nivel 3 en la escala de valores establecida para la evaluación (ver Cap.II de Materiales y Métodos).

En ningún caso se observó muerte de plantines a causa de la infección, como tampoco podredumbre de brote apical, que es otro de los síntomas que se observan en lesiones severas a campo, donde por lo general, se presenta una combinación de ambos, que en condiciones artificiales de infección difícilmente se observan.



Fig. 3.21: (A y B) Inoculaciones artificiales en plantines jóvenes de caña de azúcar.



Fig. 3.22: (A y B) Síntomas iniciales del desarrollo de la enfermedad en hojas tiernas de caña de azúcar inoculados con cepas de *Acidovorax avenae*. C y D: Síntomas avanzados desarrollados en hojas tiernas de caña de azúcar inoculadas con cepas de *Acidovorax avenae*.

Capítulo IV DISCUSIÓN

Acidovorax avenae es considerado como el agente causal de estría roja en las principales regiones cañeras del mundo, sin embargo en las áreas productoras de Argentina no existían datos que confirmen la asociación entre este organismo y la enfermedad, como tampoco una identificación precisa del mismo dentro del patosistema caña de azúcar-estría roja. Esto constituía una seria preocupación debido a la presencia en Brasil de una nueva enfermedad con sintomatología similar, la “falsa estría roja” de la caña de azúcar causada por otra especie bacteriana, *Xanthomonas* sp.

En el presente trabajo de maestría, se aisló e identificó por primera vez *Acidovorax avena* en hojas de caña de azúcar con sintomatología típica de estría roja, a partir de un relevamiento representativo realizado en diferentes zonas cañeras de Tucumán y de Salta. La identificación y caracterización del patógeno se llevo a cabo mediante la combinación de técnicas de microbiología clásica, tales como: observaciones al microscopio, pruebas bioquímicas y reacción de Gram, con métodos moleculares rápidos y eficaces.

Se determinó la presencia de dos tipos predominantes de colonias: unas de color blanco-crema, circulares, translúcidas, de bordes lisos, que respondían a la morfología típica descrita para *Acidovorax* (Jones *et al.*, 2001, Martin and Wismer, 1989) y otras amarillas, circulares, de bordes lisos y uniformes, morfología similar a algunas especies de *Xanthomonas* (Schaad *et al.*, 2001). Estas últimas, aunque no presentaban las características típicas de las colonias esperadas para la especie en estudio, se consideraron para posteriores determinaciones resultando de interés constatar la posible asociación de este patógeno con la enfermedad considerando el antecedente antes mencionado en relación a la falsa estría roja.

Estas determinaciones generaron información muy valiosa a la hora de especificar las características del agente causal de esta bacteriosis sobre la cual se tenía poco conocimiento en la región cañera del Noroeste Argentino, contando con pocos

antecedentes sobre el aislamiento y la identificación correcta de la misma. Algunos reportes datan de los años setenta, cuando se determinó la presencia de una bacteria, *Xanthomonas rubrilineans* en hojas de caña con síntomas de estría roja, en un trabajo llevado a cabo en Tucumán (Ramallo, 1970), sin embargo, hasta ese momento no se tenía una correcta clasificación de las bacterias fitopatógenas. Recién en la década del '80 con el desarrollo e implementación de técnicas moleculares, muchas de las especies pudieron ser reclasificadas utilizando diversos métodos comparativos (Vauterin *et al.*, 2000). Este es el caso de la reciente reclasificación de esta especie bacteriana como *Acidovorax avenae* subsp *avenae* denominada *Pseudomonas* del grupo de las “no fluorescentes” hasta hace relativamente poco tiempo (Willems *et al.*, 1992), y actualmente elevada al nivel de especie como *Acidovorax avenae* (Schaad *et al.*, 2008).

En estudios precedentes, (Schaad *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001) revelaron la dificultad en la identificación de bacterias patógenas de plantas a nivel de especie o subespecie empleando únicamente pruebas fenotípicas clásicas. Esto es especialmente aplicable para las especies de *Acidovorax*, pudiendo ser identificadas sólo con una combinación de pruebas fenotípicas y de patogenicidad los que insumen demasiado tiempo. Medios semiselectivos son empleados para una identificación preliminar, sin embargo son necesarios procedimientos más sensibles y específicos para confirmar la identidad de un organismo. Métodos serológicos están disponibles para la identificación de *A. avenae*, sin embargo estos no resultan específicos (Jones *et al.*, 2001, Shakya, 1987). Géneros tales como, *Erwinia* y *Pantoea*, junto a algunas especies de *Pseudomonas*, como *P. fluorescens* y *P. putida* han sido mencionados en algunos trabajos como bacterias epífitas que coexisten con los organismos en estudio dificultando seriamente su aislamiento, debiendo recurrir para su discriminación al uso de medios muy selectivos (Song *et al.*, 2000), no siempre disponibles para la especie en estudio y a pruebas de patogenicidad, que insumen mucho tiempo (Song *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta estos datos, y haciendo uso de los métodos más modernos disponibles, se empleó la PCR como una técnica de mayor sensibilidad en comparación con los métodos tradicionales de cultivo respecto a la detección de microorganismos

patógenos. Mediante el uso del par de cebadores específicos, descritos para esta especie (Song *et al.*, 2003) se optimizaron reacciones de PCR especie específica utilizando ADN proveniente de aislamientos como así también ADN obtenido directamente de las hojas con síntoma de estría roja. Estos cebadores han sido desarrollados para una rápida identificación de todas las especies de *A. avenae* y han sido ensayados en más de 46 cepas de *A. avenae* subsp *avenae* a partir de avena (*Avena sativa*), maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), caña de azúcar (*Saccharum spp*) y mijo (*Penicetum sp*) (Song *et al.*, 2003).

En base a nuestros resultados podemos afirmar que esta técnica representa una valiosa herramienta tanto para los diagnósticos de rutina, como así también para el monitoreo de la evolución o propagación natural de esta patología en la región cañera Argentina.

Un aspecto importante a tener en cuenta en la caracterización genética de un fitopatógeno, es la realización de estudios tendiente a obtener una estimación de la variabilidad genética presente en el organismo en estudio (Barnes, 1994). Esta información podría resultar de vital importancia en el manejo adecuado y eficaz de una patología en un cultivo determinado permitiendo además orientar los programas de mejoramiento genético y las estrategias de control mediante el uso de variedades que evidencien elevada tolerancia a las cepas o razas predominantes. Para caña de azúcar el único método de control efectivo para estría roja es el uso de variedades resistentes en aquellas regiones de cultivo donde esta patología se presenta como endémica (Almeida, 2008). Sin embargo, no se contaba hasta el presente, con reportes relacionados con la caracterización molecular y el análisis de diversidad genética de cepas de *Acidovorax avenae* de caña de azúcar. En este trabajo, mediante la aplicación de distintas técnicas de genotipado (REP-PCR, RAPD y ARDRA), se demostró que existe variabilidad genética real entre los aislados de Salta y de Tucumán.

Perfiles RAPD fueron ampliamente empleados para la diferenciación genética de diversos géneros de patógenos de plantas, incluyendo entre otros, distintos patovares del género *Xanthomonas* (Khoodoo y Fakir, 2006).

La combinación de PCR especie-específica como ensayo selectivo preliminar, seguido del análisis mediante perfiles de RAPD como método rápido y preciso para una correcta identificación de los aislamientos fue aplicada con éxito en el análisis de distintos patosistemas (Mannulis *et al.*, 1994, Pooler *et al.*, 1996). Por otro lado el uso de la técnica de RAPD para la generación de marcadores polimórficos fue descrito para la diferenciación de razas (Mesquita *et al.*, 1998), en la identificación y otros análisis genéticos en numerosas plantas (Devey *et al.*, 1996, Haley *et al.*, 1993) en distintos géneros de hongos (Assigbetse *et al.*, 1994, Kageyama *et al.*, 1998) y de bacterias (Khoodoo *et al.*, 2002, Parent *et al.*, 1996, Hilton y Penn, 1998).

Recientemente se mencionó para el carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea*) una de las principales patologías fúngicas que afectan al cultivo, la aplicación al diagnóstico de la técnica de PCR y estudios de variabilidad genética mediante RAPDs (Singh *et al.*, 2005). Esta técnica brindó una rápida y consistente discriminación, entre las cepas de *A. avenae* de caña de azúcar siendo éste el primer reporte de la aplicación de RAPD para la estimación de la diversidad genética de *Acidovorax avenae* de caña de azúcar en Argentina.

En cuanto al empleo de rep-PCR, la utilidad de esta técnica en estudios de diversidad genética ha sido ampliamente probada para numeroso patógenos tanto en plantas, como en otros sistemas, tales como análisis epidemiológicos de patologías humanas o diagnóstico de enfermedades infecciosas, mostrando su elevado poder discriminatorio y su potencial como herramienta de diagnóstico y en la determinación de variaciones evolutivas en distintos patovares (Louws *et al.*, 1994, 1995).

En caña de azúcar ha sido aplicada en estudios de identificación y diversidad genética para *Xanthomonas albilineans* (Lopes *et al.*, 2001, Silva, 2005), permitiendo separarla claramente de otras bacterias endofíticas de caña y revelando además la variación existente dentro de la propia especie. También se ha reportado su uso en la caracterización de la bacteria responsable de “falsa estría roja”, *Xanthomonas sp* (Giglioti *et al.*, 1999; Giglioti y Matsuoka, 2000; De Souza, 2004). Si bien no existen antecedentes sobre su uso

específico para estudios genéticos en *Acidovorax*, en el presente trabajo se pudo determinar que estas secuencias repetitivas, REP, ERIC y BOX se encuentran presentes en el genoma de las cepas analizadas confirmando y extendiendo las conclusiones de Versalovic *et al.*, (1991) sobre que estas secuencias se encuentran virtualmente ubicadas y dispersas en el genoma de diversas especies bacterianas (de Brujin, 1992, Lupski y Weinstock, 1992, Versalovic *et al.*, 1991 y 1994, Rademaker *et al.*, 1998).

La aplicación de la técnica de ARDRA, en cambio, no mostró poder discriminatorio dentro de las cepas evaluadas, pero sí para distinguir la especie en estudio, de especies bacterianas epifitas presentes en las muestras analizadas muchas veces como falsos positivos por la similitud de las colonias.

Resultados similares fueron obtenidos por Silva (2005), cuando analizó la variabilidad genética en aislados de *Xanthomonas albilineans* en Brasil, empleando distintas enzimas de restricción para la digestión de un fragmento de aproximadamente 350pb, correspondiente a la región espaciadora 16S-23S, no pudiendo de esta manera demostrar la diversidad genética existente. En tanto la técnica del análisis de restricción fue muy empleada y su utilidad probada en numerosos estudios de patógenos de caña de azúcar, tanto para *X. albilineans* (Davis *et al.*, 1997, Rott y Davis, 1996, entre otros), en la diferenciación de otras especie de *Xanthomonas* patogénicas de caña (Destéfano *et al.*, 2003), para *Puccinia melanocephala*, responsable de la roya marrón de la caña de azúcar (Cardona *et al.*, 2008), en estudios de fitoplasmas, como es el caso la hoja amarilla en caña (YLS) o “sugarcane leaf yellow phytoplasma” (Gaur *et al.*, 2008). Una aplicación muy reciente de esta técnica en la industrialización de la caña de azúcar fue la caracterización e identificación de algunas levaduras salvajes encontradas durante la producción de alcohol a partir de caña, capaces de producir en porcentaje muy cercano a las levaduras comerciales como *Saccharomyces cereviceae* (Buzon *et al.*, 2008).

Por otro lado, los resultados obtenidos en base al análisis filogenético de las cepas de *A. avenae* de caña de azúcar demuestran que podría existir una asociación muy fuerte entre un determinado biotipo bacteriano y el genotipo de caña de azúcar sobre el que se

desarrolla. Si bien en este trabajo se emplearon mayormente las variedades susceptibles TucCP 77-42 y NA 85-1602, de Tucumán y Salta respectivamente, en ausencia de éstas en las zonas relevadas, se utilizaron otras variedades disponibles en ese momento con síntomas típico de estría roja. Es probable que de no haber sido así, y se hubiese trabajado sólo con las variedades antes mencionadas, no habría sido posible encontrar variabilidad entre los aislamientos ya que se pudo determinar que la diversidad genética detectada no está asociada a las diferentes áreas cañeras. No se podría, sin embargo, afirmar la relación de que, exista un biotipo específico para cada variedad o genotipo de caña de azúcar, sino mas bien que un mismo biotipo se puede adaptar a más de una variedad. Tal es el caso de las cepas aisladas de la variedad TucCP 77-42, las cuales resultaron ser iguales a las cepas de la variedad Fam 91-209. Mientras que el otro biotipo presente en Tucumán, se observó sólo en la variedad Fam 89-686. Estos resultados coinciden con los análisis efectuados a través de las diferentes técnicas de genotipado que se emplearon en este trabajo. Esto es también coincidente con lo observado para los aislamientos de Salta, donde las técnicas aplicadas para el análisis de la diversidad genética con los cebadores utilizados en las mismas, demostraron la existencia de dos biotipos, cada uno a partir de variedades de caña de azúcar diferentes, obtenidas sin embargo de áreas geográficas muy cercanas.

Un resultado muy interesante fue también el modo en el cual se ubicaron los aislamientos de Tucumán respecto a los de Salta, dejando en evidencia que no existe una asociación concreta de un biotipo determinado circunscripto a una región, ya que de ser así se hubiese esperado que las cepas de Salta se ubicaran todas en un *cluster* y las de Tucumán de igual modo. Sin embargo, lo que se observó en la Figura 3.19, del Cap.III, es la formación de grupos mixtos donde se ubicaron juntos distintos biotipos provenientes de las dos provincias desde donde se obtuvieron los aislamientos.

En cuanto a las pruebas de patogenicidad conducidas para constatar, tanto la reproducción de los síntomas de estría roja en plantines inoculados de manera artificial, como así también para evaluar posibles diferencias en el grado de virulencia o agresividad de las cepas previamente caracterizadas como biotipos diferentes, se pudo determinar que todos los aislamientos identificados como *A. avenae* resultaron patogénicos para caña de

azúcar, no así, el resto de los aislados que habían resultado negativos para las diferentes pruebas de identificación. No se evidenciaron diferencias en la patogenicidad o agresividad entre los biotipos evaluados sobre las distintas variedades ensayadas. Sin embargo cuando se inocularon variedades tucumanas con la cepa de Salta, S13_11, se observó un desarrollo de síntomas mas acelerado que cuando se realizó el ensayo inverso, es decir cuando se inoculó la variedad de Salta con la cepa de Tucumán T10_59. En este sentido resulta un dato útil a la hora de evaluar las características de las variedades para las distintas áreas de la región cañera ya que se observó que la variedad tucumana TucCP 77-42 susceptible en Tucumán, muestra elevada tolerancia a la infección en Salta, mientras que lo mismo sucedió con la variedad salteña NA 85-1602, susceptible en esa provincia pero que no registra infección hasta el momento en Tucumán (com.pers.).⁶

El uso de métodos de identificación y caracterización basados en técnicas de biología molecular en combinación con métodos tradicionales de cultivo se evidencia como una técnica rápida y eficiente para detección de *Acidovorax avenae* tanto a partir de cultivos puros de la bacteria como de ADN total de hojas con síntomas de la enfermedad. El manejo adecuado de estas técnicas como así también de la información generada a partir de su implementación en estudios de patógenos de plantas, brindaría una herramienta sumamente valiosa si se tiene en cuenta el incremento registrado en los últimos años de la estría roja en toda la región cañera del país, adquiriendo mayor relevancia al momento de planificar estrategias regionales para el manejo de este patógeno.

⁶ Ing. Agr. (MSc). Alejandro M. Rago. Fitopatólogo, Grupo Caña de Azúcar-INTA Famaillá, Tucumán

Capítulo V

CONCLUSIONES

- A partir de hojas con síntomas típicos de estría roja se lograron aislar tres tipos de colonias bacterianas, pertenecientes a *Acidovorax avenae*, *Erwinia* y *Pantoea*, determinándose a *Acidovorax avenae* como único agente causal de estría roja de la caña de azúcar en Argentina.
- El uso de métodos de identificación y caracterización basados en técnicas de biología molecular se evidenciaron como herramientas rápidas y eficientes para la detección de *Acidovorax avenae* tanto a partir de cultivos puros de la bacteria como de ADN total de hojas con síntomas de la enfermedad.
- La identificación de algunos de los aislamientos realizados en este trabajo de Tesis, fue confirmada mediante secuenciación y análisis del gen codificante para el ARNr 16S. Estas secuencias se encuentran en proceso de incorporación al banco de datos NCBI (*GenBank*).
- Las técnicas moleculares RAPD y REP-PCR para la caracterización molecular y el estudio de la diversidad genética presentaron un elevado poder discriminatorio y de reproducibilidad.
- La aplicación de técnicas moleculares de manera combinada permitió determinar que *Acidovorax avenae* presenta variabilidad genética entre las muestras provenientes de las provincias de Salta y de Tucumán, la cual no está relacionada con la distribución geográfica de la bacteria, sino que existe una clara asociación con los diferentes genotipos de caña de azúcar.
- La variabilidad genética que se reporta en esta especie tiene un gran significado a la hora de realizar un manejo más efectivo del cultivo de caña de azúcar, pues el uso de variedades resistentes a las cepas predominantes es el único método de control descripto hasta el presente para esta patología.

- Los biotipos diferentes de *A. avenae* no evidenciaron diferencias en la virulencia y/o agresividad entre ellas.

Resultaría muy valioso continuar y profundizar los estudios de esta bacteriosis, extendiendo el análisis a nuevas regiones cañeras, tanto de nuestro país como del área de frontera, buscando determinar nuevas variantes genéticas del patógeno ampliando y reforzando de esta manera la caracterización del mismo, proponiendo la aplicación combinada de nuevas estrategias y técnicas moleculares. Entre ellas, la reciente aplicación de los MLST “*Multilocus Sequence Typing*” en especies emparentadas de *Acidovorax avenae* (Feng *et al.*, 2009) resulta una poderosa herramienta para estudios de identificación y *fingerprinting* de las cepas bacterianas, basándose directamente sobre diferencias en las secuencias nucleotídicas de cinco a diez genes presentes en el genoma bacteriano. Esta técnica permitiría además obtener información para un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en evolución de la enfermedad como así también avanzar sobre aspectos epidemiológico-evolutivos de esta patología en caña de azúcar.

BIBLIOGRAFÍA

- Abu Ahmad Y., Royer M., Daugrois J-H., Costet L., Lett J-M., Victoria J.I., Girard J.C., and Rott. 2006. Geographical distribution of four *Sugarcane yellow leaf virus* genotypes. *Plant Disease* 90:1156-1160.
- Agrobyte,-2002.Cana-de-Acucar-(*Saccharum-hibridas*)-Disponible-en:
www.agrobyte.com.br/caña.htm. Activo julio 2007.
- Allmann M., Hofelein C., Koppel E., Lutly J., Meyer R., Niederhauser C., Wegmuller B., and Candrian U. 1995. Polimerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Res. Microbiol.* 146:85-97.
- Almeida I.M.G.de. 2008. Doenças causadas por Bactérias. En: Cana-de-açúcar. Eds. Miranda E., Vasconcelos A., Landell M. Campinas, São Paulo, Brasil. pp.437-450.
- Alvarez A.M., Schencks, S. and Benedict, A.A. 1995. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strain with monoclonal antibody reaction pattern and DNA fingerprint. *Plant Pathology*. Oxford UK V.46 N°2-358-366.
- Assigbetse K., Fernandez D., Dubois M., and Geiger J. 1994. Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races on cotton by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Mol. Plant Pathol.* 84:622-626.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston D., Moore D., Seldman J., Smith A., and Struhl K. 1992. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York. V.1.
- Barnes L.W. 1994. The role of plant clinics in disease diagnosis and education. A north American Perspective. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:622-626.
- Barry T., Colleran G., Glennon M., Dunican L., and Gannon F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify Eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1:51-56.
- Buzon K., Parrado D., Quevedo B., Guzmán M.L., and Avellaneda M.C. 2008. Isolation, selection and molecular characterization of wild yeast found in ethanol production at Providencia Sugarmil. IX Plant Pathology and VI Molecular Biology Workshop, Cali, Colombia. Session 1, n°1.
- Cardona L.M., Angel F., Lopez-Gerena J., Angel J.C., and Victoria J. 2008. Genetic variability of brown rust of sugarcane (*Puccinia melanocephala* H. and P. Sydow) in Colombia. IX Plant Pathology and VI Molecular Biology Workshop, Cali, Colombia. Session 10. n°35.

Centro Azucarero Argentino. Estadísticas. Datos disponibles en:
<http://www.centroazucarero.com.ar/frame1.html>-y
<http://www.centroazucarero.com.ar/zafra2009.html>. Activo diciembre 2009.

Champoiseau P., Daugrois J.-H., Royer M., and Rott P. 2006. Towards identification of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. IIIth ISSCT Pathology Workshop Petit-Bourg, Guadeloupe (FWI) Session 1: Pathogen variability, 1.6.

Chet I. 1994. Biotechnology in Plant Disease Control. Wiley-Liss. pp.321-339.

Clark M.F. 1981. Immunosorbent assay in plant pathology. Ann. Rev. Phytopathol. 19:83-106.

Clark C.A., Chen C., Ward-Rainey N., and Pettis G.S. 1998. Diversity within *Streptomyces ipomoeae* based on inhibitory, rep-PCR and plasmid profiles. Phytopathology 88:1179-1186.

Cocconcelli O., Porro D., Galandini S., and Senini L. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. Lett. Appl. Microbiol. 21:376-379.

Cottrell-Dormer W., 1926. Notes and observations on the red streak associated with Queensland top rot disease. Queensl. Agric. J., 25:406-414.

Cottrell-Dormer W., 1932. Res stripe disease of sugarcane in Queensland. Bull. Bur. Sugar Exp. Stn Div. Pathol. 3: 25-59.

Davis M.J., Rott P., Warmuth C.J., Chatenet M., and Baudin P. 1997. Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. Phytopathology, 87:316-324.

De Bruijn F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58:2180-2187.

Demek T., and Adams R.P. 1994. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution, in PCR Technology Current Innovations. Ed. By Hugh G., and Annette M. Griffin. CRC Press. pp.179-214.

De Souza L. 2004. Caracterizaco e diagnose molecular de *Xanthomonas* sp. Agente causal da falsa estria vermelha da cana de auar na Brasil. Tesis de Magister. Universidade Federal de São Carlo, Brasil. 100pp.

Destéfano S.A.L., Almeida I.M.G., Rodrigues Neto J., Ferreira M. and Balani D.M. 2003. Differentiation of *Xanthomonas* species pathogenic to sugarcane by PCR-RFPL analysis. Euro. Journal of Plant Pathol. 109:283-288.

- Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N., Neale D.B., and Moran G.F. 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFPL, RAPD and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 92:673-679.
- Dirección Nacional de Agroindustria-SAGPyA, 2007. Cadenas Alimentarias. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_33/cadenas/azucar_azucar.htm y http://www.alimentosargentinos.gov.ar/cadenas/Azucar_Sector_azucarero.htm. Activo diciembre 2009.
- Edgerton C.W., 1959. Sugarcane and its Diseases. Louisiana State University Press, Baton Rouge, pp.172-174.
- FAO *Food and Agriculture Organization*. 2008. Producción mundial de azúcar. Disponible en: <http://www.fao.org>
- Farber J. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *J. Food Prot.* 59:1091-1101.
- Fawcett G.L., 1922. Enfermedades de la Caña de Azúcar en Tucumán. *Rev. Ind. Agric. Tucumán*, 13 (1 -2): 5.
- Feng, J., Schuenzel, E. L., Li, J., and Schaad, N. W. 2009. Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology* 99:913-920.
- Fernandez E., Girard J.-C., Royer M., and Rott P. 2006. Molecular diagnosis and genetic diversity of the causal agents of mosaic and streak mosaic of sugarcane. IIIth ISSCT Pathology Workshop Petit-Bourg, Guadeloupe (FWI) Session 1: Pathogen variability, 1.4.
- Ferrari C. 2008. Nuevos Rostros para el azúcar. Perfiles productivos. Dirección Nacional de Alimentos. Documento disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_35_especial/cadenas/Azucar_nuevo_rostro.htm Activo diciembre 2009.
- Ferrari C. y Macera G. 2008. Azúcar: análisis de la cadena alimentaria. Dirección Nacional de Alimentos. Documento disponible en http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_33/cadenas/azucar_azucar.htm. Activo diciembre 2009.
- Fontana C.A., Coconcelli P.S., and Vignolo G. 2005. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Inter. Journal of Food Microbiolog.* 103:131-142.
- Fontana C.A., Cappa F., Rebecchi A., and Coconcelli P.S. 2010. Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. *Inter. Journal of Food Microbiolog.* 138:205-211.
- Gaur R.K., Rao G.P., and Marcone C. 2008. Molecular investigation and phylogenetic analysis of sugarcane leaf yellows phytoplasma (16SrII ribosomal group) in India. IX Plant Pathology and VI Molecular Biology Workshop, Cali, Colombia. Session 6. n°20.

- Garsmeur O., Le Cunff L., Royaert S., Zini C., Raboin L.M., Hoarau J.Y., Telismart H., Hervouet C., Nibouche S., Costet L., and D'Hont A.. 2009. Characterization of the Bru1 (brown rust resistance) locus: Distribution in modern sugarcane cultivars. W242, Intl. Consortium for Sugarcane Biotech. (ICSB). In: Abstracts of Plant and Animal Genomes XVII Conference, San Diego, CA (USA).
- Giglioti E.A., Almeida, I.M.G., Clerc, F., Rott, P., Chatenet, M., Beriam, L.O., Carvalho, M.L.V., Masuda Y., and Matsuoka, S. 1999. False red stripe: a new disease of sugarcane in Brazil. In: Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, 23, 1999, New Delhi, India Proceedings ISSCT, pp.382.
- Giglioti E.A., and Matsuoka S. 2000. False red stripe. In: Rott, P.; Bailey, R.A.; Comstock, J.C.; Croft, B.J. A guide to sugarcane diseases. Montpellier: Cirad Publications Service, pp.27-31.
- Gilson E., Saurin W., Perrin D., Bachellier S., and Hofnung M. 1991. Palindromic units are part of a new bacterial interspersed mosaic element (BIME). *Nucleic Acids Res.* 11, 19(7):1375-1383.
- Girard J.C., Fernandez E., Royer M., Daugrois J.H., Edon-Jock C., and Rott P. 2008. Improved detection of sugarcane yellow leaf based on genetic diversity studies of *Sugarcane yellow leaf virus*. IX Plant Pathology and VI Molecular Biology Workshop, Cali, Colombia. Session 7, n°25.
- Grisham M.P., Pan Y.-B., and Richard E.P Jr. 2006. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. *Plant Disease* 91(4):430-434.
- Gutiérrez J. I., Cerisola, J. A., Yañez, D. A., y Rollán P. 2000. Informe Estadístico N°19.- Nivel de actividad y ocupación de Tucumán (1990 - 1999)- Cátedra Estadística Facultad de Ciencias Exactas-Universidad Nacional de Tucumán.
- Haley S., Miklas P.N., Staveley J.R., Byrum J., and Nelly J.D. 1993. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 86:505-512.
- Hampton R., Ball E., De Boer S. 1990. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogen. St.Paul, MN: APS Press, 389pp.
- Hayward, A.C., 1962. Studies on bacterial pathogens of sugar cane. Differentiation, taxonomy and nomenclature of the bacteria causing red stripe and mottled stripe diseases. *Mauritius Sugar Ind. Res. Inst., Oc-cas. Pap.*, 13:13 -27.
- Hébert, E. M., R. R. Raya, P. Tailliez, and G. Savoy de Giori. 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 59:19-27

- Henson J.M., and French R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *A. Rev. Phytopathology* 31:81-109.
- Hilton A., and Penn C. 1998. Comparison of ribotyping and arbitrarily –primed PCR for molecular typing of *Salmonella enterica* and relationships between strains on the basis of these molecular markers. *J. Appl. Microbiol.* 85:933-940.
- Hoarau J.Y., Joubert C., D'Hont A., Roques D., and Daugrois J.H. 2008. Toward alleles tagging involved in *X. albilineans* leaf infection resistance. IX Plant Pathology and VI Molecular Biology Workshop, Cali, Colombia. Session 5, n°16.
- Hu F.P., Young J.M., and Trigg C.M., 1991, Numerical analysis and determination tests for non-fluorescent plant-pathogenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and reclassification of species related to *Pseudomonas avenae* Manns 1909. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:516-523.
- Innis M., and Gelfand D. 1990. Optimization of PCRs. En: PCR products. A guide to methods and applications. Eds. Innis M., Gelfand D., Sninsky J. and White T. Academic Press. San Diego, California EEUU. pp.3-12.
- Jones J.B., Gitaitis R., and Schaad N. 2001. *Acidovorax* and *Xylophilus*. En: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Eds. Schaad N., Jones J.B. and Chun W. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN. pp.121-137.
- Kageyama K., Uchino H., and Hyakumachi M. 1998. Characterization of the hyphal swelling group of *Pythium*: DNA polymorphism and cultural and morphological characteristics. *Plant Disease* 82:218-222.
- Khoodoo M.H.R., Issack M.I., and Jauferally-Fakim Y. 2002. Serotyping and RAPD profiles of *Salmonella enteric* isolates from Mauritius. *Lett. Appl. Microbiol.* 35:146-152.
- Khoodoo M.H.R., Jauferally-Fakim Y. 2006. RAPD-PCR Fingerprinting and Southern Analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains Isolates from differney aroid host and locations. *Plant Disease* 88(9):980-988.
- Klijn N., Weerkamp H., and de Vos W. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable region of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3390-3393.
- Korimbocus J., Coates D., Barker I., and Boonham N. 2002. Improved detection of *Sugarcane yellow leaf virus* using real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. *J. of Virolog. Methods* 103:109-120.
- Kwoh D., Davis G., Whitfield K., Chapelle H., DiMichelle L., and Gingeras T. 1989. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type I with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177.

- Landegren U., Kaiser R., Caskey C.T., and Hood L. 1988. DNA diagnostics-molecular techniques and automation. *Science* 242:229-237.
- Lee H.A., and Martin J.P., 1925. The cause of red-stripe disease of sugar cane. *Red-Stripe Disease Studies*. Hawaii. Sugar Plant. Assoc. Exp. Stn, Pathol. Dept. pp.83-93.
- Lee H.A., Purdy, H.A., Barnum, C.C., and Martin, J.P., 1925. A comparison of red-stripe disease with bacterial diseases of sugar cane and other grasses. *Red-Stripe Disease Studies*. Hawaii. Sugar Plant. Assoc. Exp. Stn, Pathol. Dept., pp.64-74.
- Lewin B. 1994. *Genes V*. Oxford University Press and Cell Press. New York. pp.81-106
- Li R., Mock R., Huang Q., Abad J., Hartung J., and Kinard G. 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods* 154:48-55.
- Liu W., Marsh T., Cheng H., and Forney L. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11):4516-4522.
- Lopes S.A., Damman K.E., and Grelen N.B. 2001. *Xanthomonas albilineans*. Diversity and Identification on Rep-PCR Fingerprints. *Current Microbiology* 42:155-159.
- Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., and de Bruijn F.J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequence and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2286-2295.
- Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., and de Bruijn F.J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85:528-536.
- Louws F.J., Schneider M., and de Bruijn F.J. 1997. Assessing genetic diversity of microbes using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). En: *Nucleic acid amplification methods for the analysis of environmental microbes*. Ed. E.G. Toronzos. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. pp.63-94.
- Louws F.J., Bell J., Medina-Mora C., Smart D., Opgenorth D., Ishimaru M., Hausbeck K., de Bruijn F.J., and Fulbright D.W. 1998. rep-PCR mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* 88:862-868.
- Lyon H.L., 1922. A leaf disease of the Tip canes. *Proc. Hawaii. Sugar Plant. Assoc.* pp.246
- Lupski J.R., and Weinstock. G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174:4524-4529.

- Maccheroni W., y Matsuoka S. 2006. Manejo das principais doenças da cana-de-açúcar. En: Atualização em produção de Cana-de-açúcar. Eds. Segato S., Pinto A. de Sene., Jendiroba E., y Nóbrega J.C.M. de. Piracicaba, Brasil. pp.239-280.
- Manns T.F. 1909. The blade blight of oats-a bacterial disease. *Ohio Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 210:91-167.
- Mannulis S., Valinsky A., Lichter A., and Gabriel D.W. 1994. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4094-4099.
- Mariotti J.A. 2008. Investigación e Innovación Tecnológica como bases para mejorar la productividad y competitividad de la Agroindustria de la Caña de Azúcar. En: Idia XXI Cultivos Industriales. Ed. Senigaliesi C., Arnozis P., y Mariotti J. Año VII-Nº10. Publicaciones nacionales INTA. Bs.As. Argentina. pp.119-122.
- Martin J.P., and Wismer C.A., 1989, Red Stripe. En: Diseases of Sugarcane..Eds. C. Ricaud, B.T. Egan, A.G. Gillespie, Jr., and C.G. Hughes. Elsevier, The New York, N.Y. pp. 80-91.
- Mesquita A., Paula T., Jr., Moreira M.A., and Barros E.G. 1998. Identification of races of *Colletotrichum lindemuthianum* with the aid of PCR-based molecular markers. *Plant Disease* 82:1084-1087.
- Michelmore R.W. and Hulbert S.H. 1987. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:383-404.
- Mozambani A., Pinto A., Segato S., y Mattiuz F.M. 2006. Historia e morfologia da cana-de-açúcar. En: Atualização em produção de Cana-de-açúcar. Eds. Segato S., Pinto A. de Sene., Jendiroba E., y Nóbrega J.C.M. de. Piracicaba, Brasil. pp.11-18.
- Mumford R., Walsh K., and Boonham N. 2000. A comparison of molecular methods for the routine detection of viroids. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 30:431-435.
- Mumford R., Boonham N., Tomlinson J., and Barker J. 2006. Advances in molecular phytodiagnostics-new solutions for old problems. *Eur. J. Plant Pathology* 116:1-19
- Nóbrega J. C.M. de., y Dornela M.C. 2006. Biotecnología e melhoramento da cana-de-açúcar. En: Atualização em produção de Cana-de-açúcar. Eds. Segato S., Pinto A. de Sene., Jendiroba E., y Nóbrega J.C.M. de. Piracicaba, Brasil. pp.39-56.
- Pan Y.B., Grisham M. P., and Burner D. M. 1997. A Polymerase Chain Reaction Protocol for the Detection of *Xanthomonas albilineans*, the Causal Agent of Sugarcane Leaf Scald Disease. *Plant Dis.* 81:189-194.
- Parent J.-G., Lacroix M., Pagé D., Vézina L., and Végiard S. 1996. Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Dis.* 80:494-499.

- Pérez Gómez S., Vallejo J., Fontana P., y Rago A. 2010. Evaluación de estría roja en los cañaverales de Tucumán. Resumen presentado en: XVI Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar. Tucumán, Argentina.
- Pooler M., Ritchie D., and Hartung J. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and Enterobacterial repetitive intergenetic consensus PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Appl. and Environ. Microbiol.* 62(9):3121-3127.
- Raboin L.M., Selvi A., Miranda Oliveira K., Paulet F., Calatayud C., Zapater M. F., Brottier P., Garsmeur O., Carlier J., and D'Hont A. 2006. Analysis of *Ustilago scitaminea* genetic diversity using microsatellite markers provides evidence of selfing and dispersal of a unique lineage over America and Africa. IIIth ISSCT Pathology Workshop. Petit-Bourg, Guadeloupe (FWI) Session 1: Pathogen variability, 1.2.
- Rademaker J.L., Louws F.J., and de Bruijn F.J. 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. En: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Chapter 3.4.3 pp.1-26
- Rago A.M. 2003. Caña de Azúcar. Guía de las enfermedades más comunes en Argentina. Ed. Mariotti J. y Fernández de Ullivarri R. Publicaciones INTA, Córdoba, Argentina.
- Ramallo Nilda E. V. 1970. La estría roja en caña de azúcar. *Revista industrial y agrícola de Tucumán* 47(1):13-16.
- Rios L. 2008. Mercado Mundial de Azúcar. Visión Global. En: *Idia XXI Cultivos Industriales*. Eds. Senigaglia C., Arnozis P., y Mariotti J. Año VII-Nº10. Publicaciones nacionales INTA. Bs.As. Argentina. pp.129-134.
- Rios L., y Delgado Cordomi M. 2008. Cadena de valor de la caña de azúcar. En: *Economía de los cultivos industriales: algodón, caña de azúcar, maní, tabaco, té y yerba mate*. Ed. Bongiovanni R., Córdoba, Argentina. pp.25-32.
- Rijpens N., and Herman L. 2002. Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogen. *J. AOAC Int.* 85:984-995.
- Romero E., Scandaliaris J., Digonzelli P., Leggio Neme M.F., Fernandez de Ullivarri J., Casen S., Tonatto J., y Alonso L. 2009. La Caña de Azúcar. Características y ecofisiología. En: *Manual del cañero*. Ed: Romero E., Dogonzelli P., y Scandaliaris J. Tucumán, Argentina. pp.13-21.

- Rott P., and Davis M.J. 1996. Recent advanced in research on variability on *Xanthomonas albilineas* causal agent of sugarcane leaf scald disease. En: International Society of Sugarcane Technologists Congress, 22., 1996. Cartajena Proceedings. Cali: Tecnicaña 2:498-503.
- Rott P., and Davis M.J. 2000. Red Stripe (Top rot). En: A guide to sugarcane diseases. Montpellier: Cirad Publications Service, p.60-62.
- Sanzano A., y Fadda G. 2009. Características de los suelos para caña de azúcar. Recomendaciones de manejo. En: Manual del cañero. Ed: Romero E., Dogonzelli P., y Scandaliaris J. Tucumán, Argentina. pp. 23-34.
- Savulescu T., 1947, Contribution a la classification des bacteriacees phytopathogenes. An. Acad. Romane Ser. III 22:135-160.
- Schaad N.W., Sowell Jr., G., Goth R.W., Colwell R.R., and Webb R.E., 1978, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citruilli* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 28:117-125.
- Schaad N.W., Cheong S., Tamaki S., Hatziloukas E., and Panopoulos N.J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* in bean seed extracts. Phytopathology 85:243-248.
- Schaad N.W., Song W.Y., and Hatziloukas E., 2000. PCR primers for detection of plant pathogenic species and species of *Acidovorax*. United States patent number 6:146-834.
- Schaad N.W., Jones J.B., and Chun W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3ª edición. St.Paul, Minnesota, EEUU.373pp.
- Schaad N.W. and Frederick R.D. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. Can. J. Plant Pathol. 24:250–258.
- Schaad N.W., Postnikova E., Sechler A., Claflin L., Vidaver A., Jones J.B., Agarkova I., Ignatov A., Dickstein E., and Ramundo B. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb.nov., *A. cotruilli* (Schaad et al., 1978) comb.nov., and proposal of *A. oryzae* sp.nov. Syst. And Appl Microb. 31:434-446.
- Shaik R., Pillay D., and Pillay B. 2009. Amplified fragment length polymorphisms reveal genetic differentiation among strains of *Xanthomonas albilineans*. Journal of Microbiological Methods 76:43–51.
- Shakya D.D. 1987. Rapid diagnostic of *Pseudomonas avenae* by pathogenicity and serology. Korean J. Pl. Path. 3:300 (Abst).
- Silva M.S. 2005. Caracterização serologica, molecular e patogênica de isolados de *Xanthomonas albilineas* (Ashby) Dowson agente causal da escaldadura da cana-de-açúcar. Tesis Magister. Universidade de São Paulo, Brasil, 61pp.

- Singh N., Somai B.M., and Pillay D. 2005. Molecular profiling demonstrates limited diversity amongst geographically separate strains of *Ustilago scitaminea*. FEMS Microbiology Letters 247:7–15.
- Song W.Y., Hatziloukas, E., Kim, H.M., and Schaad, N.W. 1997. Development of PCR primers for detection of *Pseudomonas avenae*. Phytopathology S92-S93.
- Song W.Y., Kang M.H., and Kim H.M. 2000. A New Selective Medium for Detecting *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in Rice Seeds. Plant Pathology Journal 16(4):236-241.
- Song W.Y., Kim H.M., and Schaad N.W. 2002. PCR primers for detection and identification of plant pathogenic species, subspecies, and strains of *Acidovorax*. United States patent number 6:423-499.
- Song W.Y., Sechler A.J., Hatziloukas E., Kim H.M., and Schaad N.W. 2003. Use of PCR for rapid identification of *Acidovorax avenae* and *A. avenae* subsp. *citrulli*. En: N.S. Jacobellis, et al. (Eds.), *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.531-544.
- Song W.Y., Kim H.M., Hwang, C.Y., and Schaad N.W. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR, J. Phytopathol. 152:667–676.
- Spegazzini C. 1895. La gangrena húmeda o polvillo en la caña de azúcar en Tucumán. Rev. Fac. Agronomía. La Plata. N°18.
- Tenover F., Arbeit R., Goering R., Mickelsen P., Murray B., Persing D., and Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33:2233-2239.
- USDA *United States Department of Agriculture*. Sugar: World Production Supply and Distribution. Foreign Agricultural Service USDA, 2010. Disponible en: <http://www.fas.usda.gov>. Activo febrero 2010.
- Vauterin L., Rademaker J., and Swings J. 2000. Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. Phytopathology 90:677-682.
- Volante J., Benedetti P., Paoli H., Moreno R., y Fernandez D. 2004. Monitoreo de Cultivos del Noroeste Argentino a partir de Sensores Remotos. Campaña Agrícola 2004-Caña de Azúcar. Disponible-en: http://www.inta.gov.ar/prorenea/zonadescarga/Cana04/INFORME_FINAL_CA%C3%91A_2004.pdf. Activo mayo 2010.
- Versalovic J., Koeuth T., and Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19:6823–6831.

- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F., and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5:25-40.
- Williams J.G.K., Kubelik A., Livak K.J., Rafalski J.A., and Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Ac. Res.* 18(22):6531-6535.
- Willems A., Goor M., Thielemans S., Gillis M., Kersters K., and De Ley J. 1992, Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 107-119.
- Yang Z.N., and Mirkov T.E. 1997. Sequence and Relationships of Sugarcane Mosaic and Sorghum Mosaic Virus Strains and Development of RT-PCR-Based RFLPs for Strain Discrimination. *Phytopathology* 87:932-939.

Lista de publicaciones y/o presentaciones en Congresos

Fontana P.D., Rago A., Sopena R., y Mariotti J. (2010). Estría roja en caña de azúcar: avances moleculares para el diagnóstico y tipificación de cepas presentes en Tucumán y Salta. XVIº Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar 29 y 30 de abril de 2010, Tucumán, Argentina (presentación oral).

Fontana P.D. (2009). Determinan el agente que causa la estría roja en Caña. Publicado en el Suplemento Rural del diario La Gaceta de Tucumán, Viernes 22 de Mayo de 2009. Sitio web: www.lagaceta.com.ar (artículo de divulgación masiva).

Fontana P.D. (2009). Una investigación del INTA confirma por primer vez la presencia de *Acidovorax avenae* como agente causal de estría roja de caña de azúcar en Argentina. Publicado en Boletín de Noticias N°25 de la EEA INTA Famaillá de Tucumán. <http://www.inta.gov.ar/famailla/info/boletinfamailla.htm> 12 de Mayo de 2009 (artículo de divulgación masiva).

Fontana P.D., Rago A.M. y Mariotti J.A (2009). Identificación molecular de *Acidovorax avenae* subsp *avenae*, como el agente causal de estría roja de caña de azúcar en Argentina. VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina-II Congreso Internacional REDBIO. 20 al 24 Abril de 2009, Rosario, Santa Fe, Argentina (póster).

Fontana P.D. (2009). Identificación del agente causal de la Estría Roja en caña de azúcar en la Argentina. Publicado en Boletín de Noticias N°4 de la EEA INTA Famaillá de Tucumán. <http://www.inta.gov.ar/famailla/info/boletinfamailla.htm>. 24 de Junio de 2008 (artículo de divulgación masiva).

Fontana P.D., Rago A., Pérez Gómez S., Vignolo G., y Mariotti J. (2008). Ensayos preliminares para la identificación del agente causal de la estría roja en caña de azúcar en argentina. I Congreso Nacional de Fitopatología. 28, 29 y 30 de Mayo de 2008, Córdoba, Argentina (póster).