



Cáncer Bacterial del Cerezo: Epidemiología de la enfermedad y estrategias de control

Editor: Gamalier Lemus S.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Boletín INIA / N° 420

ISSN07 -4829





Cáncer Bacterial del Cerezo: Epidemiología de la enfermedad y estrategias de control

Editor:
Gamaliel Lemus S.
Ing. Agrónomo, M.Sc.
INIA-Rayentué

Boletín INIA / N° 420
INIA, Rengo 2020

ISSN07-4829



Financia

"Estrategia Regional de Innovación, un paso hacia el futuro"

Proyecto financiado a través del Fondo de Innovación para la Competitividad del Gobierno Regional de O'Higgins y su Consejo Regional, enmarcado en la Estrategia Regional de Innovación

Editores:

Gamalier Lemus Sepulveda
Ing. Agrónomo, M.Sc. INIA Rayentué.

Autores:

Gamalier Lemus S.; Andrés France I.; Paz Millas O.; María Francisca Beltrán G.; Boris Sagredo D.; Valeria Osorio N.; Jaime Otárola A.; Francisco Correa S.; José Manuel Donoso C.

Revisión textos:

Valeria Osorio Núñez, ingeniero agrónomo, INIA Rayentué.
Alejandra Catalán Farfán, encargada de comunicaciones, INIA Rayentué.

Directora Responsable:

Sofía Felmer Echeverría
Ing. Agrónomo
Directora Regional INIA Rayentué.

Boletín INIA N° 420

ISSN 0717-4829

Este boletín fue editado por el Centro Regional de Investigación INIA Rayentué, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, con financiamiento del Proyecto FIC: "Transferencia Control de Cáncer Bacteriano en Huertos de Cerezos", financiado a través del Fondo de Innovación para la Competitividad del Gobierno Regional de O'Higgins y su Consejo Regional, enmarcado en la Estrategia Regional de Innovación, ejecutado por INIA Rayentué.

Permitido su reproducción total o parcial citando la fuente y autores.

Cita Bibliográfica:

Lemus, G., France, A., Millas, P., Beltrán, M., Sagredo, B., Osorio, V., Otárola, J., Correa, F. y Donoso, J. CÁNCER BACTERIAL DEL CERZO: EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD Y ESTRATEGIAS DE CONTROL. Boletín INIA N°420. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación Rayentué. Rengo, Chile. 68 pág.

Diseño y diagramación: Raúl Muñoz Oviedo

Impresión: A Impresores S.A.

Cantidad de ejemplares: 750

Rengo, Chile, 2020.

Indice

| | |
|--|----|
| Agradecimientos | 7 |
| Introducción | 8 |
| Capítulo 1 | |
| Situación del cáncer bacterial en Chile | 9 |
| Agente Casual | 9 |
| Ciclo de la enfermedad | 11 |
| Sintomatología | 14 |
| Etiología y Manejo | 16 |
| Capítulo 2 | |
| Identificación y caracterización del agente causal del cáncer bacterial en cerezo | 19 |
| Colecta de muestras y obtención de aislamientos | 21 |
| Caracterización morfo/bioquímica | 22 |
| Caracterización molecular | 23 |
| Pruebas de PCR (Polymerase Chain Reaction) | 24 |
| Secuenciación de genes de referencia y análisis multilocus (MLST) | 25 |
| Desarrollo del método para la detección molecular de <i>Pss</i> mediante HRM (High Resolution Melting) | 27 |
| Identificación de otras especies de <i>Pseudomonas</i> a través de HRM | 29 |
| Análisis HRM vs MLST (Multilocus Sequence Typing), para identificación de <i>Pss</i> | 30 |
| Capítulo 3 | |
| Situación del cáncer bacterial en la Región de O'Higgins | 31 |

Capítulo 4

| | |
|---|-----------|
| Resistencia–Susceptibilidad al cobre de aislamientos bacterianos asociados al cáncer bacterial | 38 |
| Suelos de la Región de O'Higgins presentan altas concentraciones de cobre..... | 40 |

Capítulo 5

| | |
|--|-----------|
| Poblaciones epífitas de <i>Pseudomonas syringae</i> en cerezo | 42 |
| Conclusiones..... | 46 |

Capítulo 6

| | |
|---|-----------|
| Detección en campo y alternativas de control | 48 |
| Tratamientos de follaje | 49 |
| Curación de canchros | 55 |
| Estudio de curación de canchros | 57 |

Capítulo 7

| | |
|--|-----------|
| Oportunidades para la mejora genética del cerezo dulce | 63 |
| Antecedentes | 63 |
| Mejora genética del cerezo diversidad y origen | 63 |
| Objetivos del mejoramiento genético actual..... | 64 |
| Mejora genética para enfermedades | 66 |
| Mejora genética para Cáncer bacterial (<i>Pseudomonas</i> spp.) | 66 |
| Nuevas aproximaciones para enfrentar la mejora genética ante estreses bióticos | 69 |

Agradecimientos

A los productores de la Región de O'Higgins, quienes permitieron evaluar en sus predios la distribución y la severidad del cáncer bacterial en el cerezo. En especial, a quienes facilitaron sus predios para la realización de los ensayos de campo: Agrícola Montenegro; Vivero Corcolén; Agrícola EU Ltda.; Agrícola Garcés y Agrícola Panagro y a los productores Ingeborg Engels y Juan Henríquez Marich.

A las empresas que pusieron sus programas a disposición de este estudio: Bayer Crop Science, Chile; Bioinsumos Nativa; Fitological Ltda.; Stoller Chile S. A. y Tavan Chile S. A.

A los productores, técnicos y profesionales que colaboraron con su participación y opiniones, en las actividades de Transferencia Tecnológica realizadas en este Proyecto.

Al Fondo de Innovación para la Competitividad, del Gobierno Regional de O'Higgins, por el financiamiento de este Proyecto.

Gamaliel Lemus S.

Director del Proyecto

Introducción

La producción de cerezas de exportación es una industria relevante para la Región de O'Higgins. La superficie regional del cerezo es la mayor dentro de los frutales y las plantaciones tienen un sostenido crecimiento desde, al menos, dos décadas.

Por su importancia, es necesario mantener la productividad, calidad y sanidad de la fruta, en los más altos estándares, para mantener la competitividad en los mercados.

Existen más de 50 enfermedades descritas que afectan al cerezo (*Prunus avium*) y guindo (*P. cerasus*) que son producidas por hongos y pseudohongos, bacterias, virus, fitoplasmas, nemátodos y plantas parásitas. Sin embargo, el número de problemas patológicos reconocidos en Chile es relativamente bajo y sólo 12 de estas enfermedades tienen real importancia económica para nuestro país (Latorre, 2008).

Dentro de las enfermedades con importancia económica, el cáncer bacterial es la más frecuente y severa que afecta a la especie en Chile. Por esto la Región de O'Higgins tomó el desafío de trabajar en la biología de la enfermedad, su distribución regional, el alcance de su presencia y las alternativas de control.

El cáncer bacterial es causado por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, los que son patógenos para más de 180 especies de plantas, incluyendo frutales de hueso y de pepita (Bradbury, 1986).

Este documento entrega la información obtenida en tres años de investigación, realizada por INIA, con la colaboración de productores, empresas de agroquímicos y con el soporte económico del Fondo de Innovación y Competitividad del Gobierno Regional de O'Higgins. Este fondo busca promover las mejoras en el área agrícola de la Región, para dar soporte al desarrollo productivo de los emprendimientos regionales.

Referencias

Bradbury, J. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. Slough, United Kingdom: CAB International Farnham Royal, Slough UK.

Latorre, B. A. 2008. Cerezos saludables. Agronomía y Forestal N°34: 8 – 11.

Capítulo 1.

Situación del cáncer bacterial en Chile

Andrés France I.

Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.
Fitopatólogo/ INIA Quilamapu
afrance@inia.cl

Paz Millas O.

Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs.
Fitopatóloga/ INIA Quilamapu
pmillas@inia.cl

El cáncer bacterial del cerezo es producido por una bacteria de amplia distribución y se caracteriza por ser el principal problema sanitario de los huertos de cerezos en Chile. Prácticamente se presenta en todos los huertos, excepto en algunos de los más nuevos, pero que igualmente tendrán la enfermedad durante su desarrollo. Sin control la enfermedad atizona tejidos productivos y la planta puede llegar a morir, disminuyendo en este proceso el rendimiento, calidad de la fruta y la pérdida de árboles, que deja al huerto económicamente inviable. Su control no es fácil, por lo cual se requiere que el agricultor conozca bien la enfermedad, que no la confunda con otras patologías y que intervenga en los momentos oportunos y con las mejores alternativas posibles.

Agente Causal

La enfermedad es producida por la bacteria *Pseudomonas syringae*, especie de distribución mundial que se disemina en forma endémica en cursos de agua, suelo, sobre plantas huéspedes y no huéspedes, en gotas de lluvia y granizo. Esta especie posee más de 50 patovares o variantes patológicas que le dan características de patogenicidad y especificidad hacia diferentes huéspedes. En el caso del cerezo es afectado por dos patovares: *syringae* y *morsprunorum*, en Chile sólo se encuentra presente el primero, pero recientemente se ha detectado el segundo, en un primer reporte. Esta habilidad que tiene la especie de adaptarse a diferentes ambientes explica la facilidad con la cual se infectan las plantas de cerezo y la imposibilidad de impedir que el patógeno ingrese al huerto (capítulo 2).

Pseudomonas syringae es una bacteria con forma de bastón y que posee flagelos polares, lo que le permite movilizarse por sí misma dentro de una película de agua, de manera de llegar hasta las fuentes de alimento (Figura 1). La bacteria puede vivir sobre las plantas de cerezo sin causar daños, a expensas de secreciones de nutrientes que afloran por la epidermis de hojas y tallos tiernos. Sobre estos tejidos *P. syringae* forma colonias estructuradas que se denominan “quorum sensing” y que al igual que un coro armónico, cada individuo cumple una función dentro de la colonia, tales como protección por aquellas que se encuentran en la superficie de la colonia, alimentación en aquellas que están junto al huésped, transporte de nutrientes u oxigenación en aquellas que se encuentran en el centro de la colonia. Estos quorum son una forma exitosa de sobrevivir a condiciones adversas y es una de las causas de la dificultad de control que tiene la enfermedad.

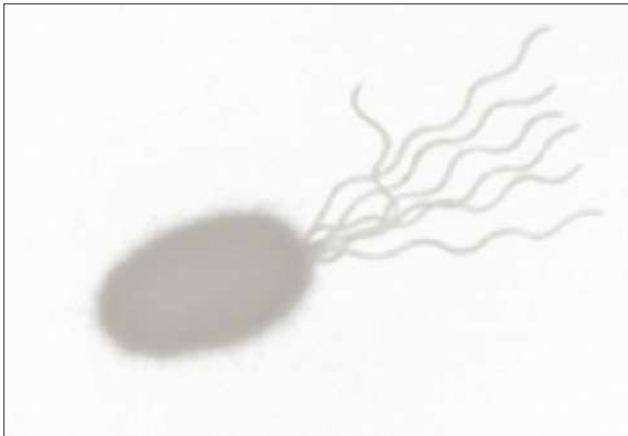


Figura 1. Estructura física de *Pseudomonas syringae*

Los principales reservorios de bacterias son los tejidos enfermos, canchales, dardos y ramas afectadas por la enfermedad (Figura 2). Otros reservorios son las yemas, el interior de los árboles enfermos y la superficie de la planta. Desde esos lugares, la bacteria se moviliza ayudada por sus flagelos, siempre y cuando exista agua libre sobre ella, hacia aberturas naturales o artificiales que tenga la planta, iniciando el proceso de patogénesis. A diferencia de los hongos fitopatógenos, las bacterias no tienen los mecanismos para ingresar directamente a través de un tejido sano, por lo cual tienen que usar estas aberturas.



Figura 2. Reservorio de bacterias **A)** Dardos atizonados **B)** Bajo la corteza.

Ciclo de la enfermedad

Los principales puntos de ingreso de la bacteria al interior de la planta son las heridas, causadas por podas, injertación, daño de alambres, clavos, inducción de yemas, incluso las heridas químicas que producen los herbicidas de amplio espectro en plantas nuevas. De todas estas heridas, la más compleja es el corte de poda, por lo severo que resulta y lo lento que es la cicatrización, permitiendo un tiempo prolongado para el ingreso de bacterias u otros patógenos de madera (Figura 3). Otra herida compleja y que facilita el ingreso de bacterias son las amarras de alambres, ya sea por ortopedia o por sistemas de conducción que obligan a relizar amarras severas, como ocurre con los sistemas UFO o KGB.

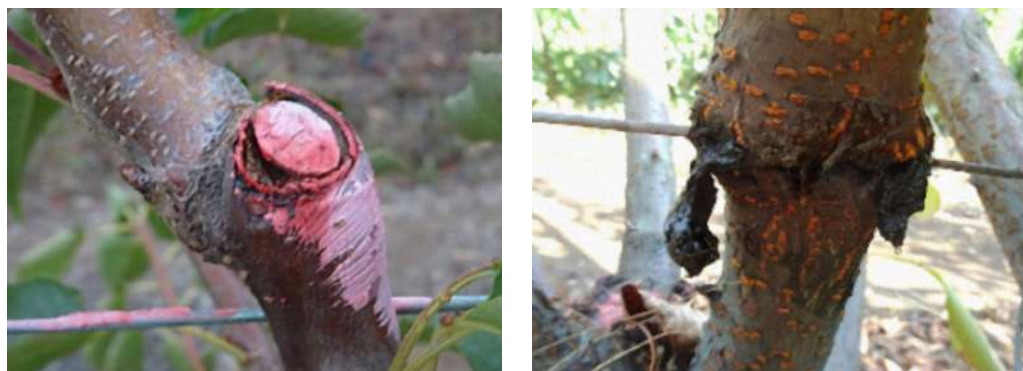


Figura 3. Daños mecánicos. Puntos de ingreso de la bacteria *Pseudomonas syringae*.

En estos sistemas los alambres mantienen una herida permanente, sobre todo cuando no tienen protección, debido al movimiento que hace el árbol cada vez que corre viento. En general, los sistemas de conducción que más deforman el crecimiento normal del árbol, tienen más cáncer bacterial que aquellos que crecen sin ortopedia y conducción. Por consiguiente, en zonas con mucha presión de la enfermedad, desde el punto de vista sanitario, no se recomiendan estos sistemas de conducción.

Otras vías de ingreso comunes para la bacteria, y no menos importantes, son las heridas naturales, como la caída de hojas y la brotación, con el agravante de que ambas ocurren en periodos de alta presión de inóculo, por lo cual es obligatorio el control en ambos estados. Como estos eventos fenológicos no ocurren en forma concentrada, las aplicaciones preventivas deben ser repetidas hasta que concluya la caída de hojas y la brotación de yemas.

También se puede considerar como heridas naturales aquellas causadas por el granizo y las heladas, éstas últimas pueden ser particularmente complicadas dependiendo de lo severo que sea la baja de temperatura y la condición en la cual esté la planta en ese momento, siendo más complejo cuando la helada ocurre con la planta ya brotada, en lugar de estar en receso invernal. En el primero de los casos el control preventivo es obligatorio y debe realizarse el mismo día de la helada.



Figura 4. Cambio de color de la madera en punto de ingreso donde antes había una hoja.

Una vez dentro de la planta la bacteria coloniza en forma localizada alrededor del punto de ingreso hasta alcanzar el sistema vascular, el cual la moverá a distancia dentro del árbol. La planta, por su lado, trata de impedir el avance de la bacteria produciendo gomas y compuestos fenólicos, estos últimos le dan el color oscuro a la madera y la gomas secretadas (Figura 5). Si la planta es exitosa en su defensa puede dejar encerrada a la bacteria y detener la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de las veces no lo es, producto que las plantas se encuentran muy forzadas en crecer y dar fruta, con excesos de nutrientes y estimulantes de crecimiento, lo cual crea una planta suculenta que mueve muchos nutrientes, principalmente



Figura 5. Coloración oscura de la madera y reacción de la planta con producción de goma.

nitrogenados, y se vuelve un sustrato ideal para ser colonizado por patógenos. Los principales tejidos colonizados por la bacteria son el

cortex bajo la corteza y el floema, donde se pueden observar las zonas necrosadas y el borde de avance de la enfermedad. Esta coloración se ha usado tradicionalmente para realizar podas sanitarias y usar la necrosis como referencia para eliminar ramas enfermas, sin embargo, no es el único lugar donde se puede localizar la bacteria la cual, eventualmente, puede estar en forma sistémica si ha alcanzado el floema o xilema (Figura 6).

Los tejidos que desarrollan síntomas de la enfermedad, como canchales y dardos muertos, se vuelven fuentes de inóculo de nuevas bacterias, las que serán diseminadas con las lluvias y vientos hasta alcanzar nuevos tejidos y continuar con el ciclo de la enfermedad.



Figura 6. Avance sistémico de las bacterias, bajo la corteza.

Sintomatología

Los síntomas que produce el cáncer bacterial están, en parte, relacionados a los mecanismos de defensa de la planta, como son la secreción de gomas y necrosis de la madera. En general el cerezo es una planta que se caracteriza por producir grandes cantidades de goma, como un mecanismo de defensa frente a diferentes condiciones que afecten físicamente la planta, como son las heridas mecánicas, ortopedia, daño de insectos y las enfermedades. No todas las secreciones de gomas se deben relacionar con cáncer bacterial, situación que es muy común entre los agricultores, por lo cual es bueno diferenciar las gomas buenas de aquellas que produce esta enfermedad. Cuando la secreción de gomas es producto de la colonización de *P. syringae* pv. *syringae*, éstas son oscuras, opacas, con olor a fermentado o tonos ácidos y que se generan en torno a una lesión oscura de la madera. Mientras que las gomas no relacionadas con cáncer son de tonos claros, transparentes, sin olores ácidos o de fermentación y no necesariamente tienen relación con necrosis en la madera (Figura 7). Sobre esto último, es importante mencionar que existe una enfermedad fungosa denominada “cancro común”, el cual también produce necrosis de la madera y secreciones de goma, pero en estos casos no hay olores a fermentación y las gomas son más bien claras y transparentes.



Figura 7. Goma de color claro. Madera sin cambio de color. Síntomas no atribuibles a cáncer bacterial.

La necrosis de la madera es otro de los síntomas importantes del cáncer bacterial, esto se produce por acumulación de fenoles por parte del árbol en las zonas que la bacteria está colonizando, si bien es un mecanismo de defensa, ésta no le sirve mucho al árbol ya que no alcanza el nivel de toxicidad para matar las bacterias, además, este microorganismo se las arregla para moverse por debajo de la corteza, más allá de la zona necrosada. Producto de esta necrosis, los tejidos dejan de crecer mientras que el resto del tallo no colonizado lo sigue haciendo, esto termina por crear una zona hundida que se desprende de la corteza, la cual en algún momento se termina partiendo, producto de que no hay un tejido subyacente que la alimente. Esta partidura de la corteza se conoce como cancro y es lo que le da el nombre a la enfermedad (Figura 8). Los cancrios se pueden producir en dardos,



Figura 8. Cancro. Herida y zona colonizada por la bacteria.

ramillas, ramas y tronco principal, mientras más grueso es el tallo con canchros, mayor es el daño en la planta.

Incluso los canchros en el eje principal pueden terminar quebrando el árbol y causarle la muerte.

Otro síntoma que produce el cáncer bacteriano son las pústulas foliares, las cuales se caracterizan por ser más o menos circulares, con el centro necrosado y un halo clorótico alrededor de la necrosis (Figura 9). Este síntoma es producto de un sistema eficiente de defensa de las hojas, las cuales necrosan la zona de colonización de la bacteria y producen un borde de abscisión que termina por desprender el tejido alrededor de la lesión, dejando la hoja perforada. Si bien estéticamente no se ve bien la hoja perforada, el objetivo de eliminar el patógeno se logra completamente y se evita que se disemine dentro de la lámina foliar.



Figura 9. Pústulas foliares como mecanismo de defensa de la planta.

Etiología y Manejo

Controlar bacterias en plantas es difícil, las condiciones favorables para su desarrollo son numerosas y los controles en general son incompletos. Además, estos microorganismos tienen la facilidad de formar colonias complejas que permiten que parte de sus individuos puedan sobrevivir a los tratamientos. También se debe considerar que cuando este patógeno alcanza el interior de la madera se escapa a todos los tratamientos superficiales, ya que ahora se encuentra protegido por la corteza e inmerso en un tejido poco accesible a los productos que la controlan. Por consiguiente, la mejor medida es la prevención, de manera de evitar en lo posible que el patógeno ingrese a la planta.

Las primeras fuentes de inóculo para un huerto nuevo son las plantas de vivero, las que ya pueden venir contaminadas con bacterias en sus hojas. Este tipo de contaminación mueve poblaciones de bacterias a grandes distancias, producto del traslado de plantas enfermas, incluso dejando instalada una población de *Pseudomonas* que ya puede traer resistencia a cobre y antibióticos, producto de las repetidas aplicaciones de estos productos que puede estar realizando el vivero. Si no son las plantas de vivero, el huerto igualmente se va a contaminar si existen otros cerezos o especies frutales hospederos de la bacteria, cercanos, o con las lluvias y vientos que trasladan estas bacterias. Por consiguiente, no es necesario esperar a que existan síntomas para iniciar un programa de control, éste debe iniciarse incluso antes de plantar.

En general, cualquier condición que estrese a la planta favorece la colonización de *Pseudomonas*, por lo cual se debe evitar el plantar en suelos con problemas, como texturas arcillosas, con mal drenaje, con poblaciones de nemátodos fitoparásitos, entre otras condiciones desfavorables. Al elegir el sistema de conducción se debe tener claro que mientras más se fuerce la planta a crecer con sistemas ortopédicos deformantes, mayores son las posibilidades de terminar con el huerto plagado de cáncer bacterial. En este sentido sistemas como UFO o KGB son complejos de manejar en zonas de mayor desarrollo de la enfermedad, como aquellas donde hay mayores precipitaciones.

Como medida de prevención, en los huertos ya establecidos, están la oportunidad y protección de las heridas, como aquellas causadas por podas, inducción de yemas, ortopedia, etc. Las labores que producen heridas se debieran hacer, de preferencia, cuando el clima no es favorable para la bacteria, como es el verano donde la alta radiación ultravioleta y temperaturas no dan posibilidades a que las bacterias sobrevivan en superficie. Además, en verano las heridas cicatrizan

más rápido que en invierno, siendo un momento ideal para todas aquellas podas y ortopedias de ramas más gruesas. Más aún, heridas que se hacen fuera del verano se deben proteger con mayor premura (ver el capítulo 6, Detección en campo y opciones de control. - Curaciones de canchros).

Las heridas naturales, como caída de hojas, brotación y daño por heladas, deben ser protegidas a medida que se van produciendo. De todas éstas, la más compleja es la caída de hojas, ya que no se produce en un solo evento y obliga a realizar varias aplicaciones para cubrir dicho periodo. Los productos que obligan a la caída de hojas son importantes para disminuir la ventana de infección. La brotación es otro periodo importante de protección, y que tampoco se produce en una sola fecha, pero al menos es más corta que la caída de hojas y normalmente se cubre con dos aplicaciones a intervalos de 7 a 10 días, dependiendo de las temperaturas y avance de la brotación.

En estos periodos de caída de hojas y brotación normalmente se utilizan productos a base de cobre, con los cuales existe toda una confusión respecto a cuál formulación es la que se debe usar. La efectividad de los productos basados en cobre pasa por la velocidad en la cual entregan el ion Cu^{+2} y el tamaño de la partícula que contiene este cobre, mientras más pequeña mayor es la liberación. También el pH contribuye a esta liberación, ya que mientras más ácido mayor es la entrega. No siempre la liberación rápida es deseable, por ejemplo en la caída de hojas es mejor dejar un depósito de cobre sobre las plantas, para que éste se vaya liberando lentamente mientras ocurre esta caída. Por el contrario, ante el evento de una helada se necesita actuar rápido ya que se están generando heridas que requieren ser protegidas. Otra de las confusiones que generan algunos proveedores es la forma y cantidad de ingrediente activo, ya que se informa o publicita el contenido de la molécula que contiene el cobre, con lo cual se logran altos porcentajes, en lugar de indicar sólo el contenido del cobre metálico, que es en última instancia el que hará el control.

Respecto a las recomendaciones de cobre existen demasiadas que no tienen ningún respaldo científico y se basan en conceptos erróneos como que el cobre no produce resistencia, o que se debe aplicar cada vez que llueve, con lluvias sobre 10 mm, o cada 20 días, etc. Nada de esto es cierto, ya que la bacteria no necesita una lluvia para iniciar su ciclo, sólo agua libre que puede ser proporcionada por el rocío, neblina o lluvias. Además, la frecuencia excesiva ha generado poblaciones de *Pseudomonas* resistentes al cobre (ver capítulo 4, resistencia-Susceptibilidad al cobre de aislamientos bacterianos asociados al cáncer bacterial), perdiéndose un producto importante para el control de esta

enfermedad, además de contaminaciones indeseables del suelo y agua. Otro mito es que el cobre es un fungicida de amplio espectro que elimina bacterias y hongos, lo cual no es efectivo ya que existen algunos hongos que son resistentes o necesitan dosis muy altas para ser controlados, y que producto de las aplicaciones repetidas van quedando sin competencia microbiana y terminan siendo un problema patológico mayor. Al respecto vale la pena mencionar el caso del cancro común, el cual se desarrolla en forma descontrolada en huertos que abusan del cobre y que terminan matando las plantas. Esta enfermedad causa síntomas parecidos al cáncer bacterial, por lo cual la muerte de plantas se termina atribuyendo erróneamente a esta última enfermedad. Lamentablemente esta confusión es muy frecuente sobre todo hacia la zona sur.

Durante caída de hojas y brotación hay recomendaciones que incluyen los antibióticos, estos productos que no están permitidos por los países Europeos, tienen la facilidad de ser sistémicos y moverse por la planta, por lo cual la mejor época para su uso es cuando existen hojas que puedan absorber y traslocar. Es importante seguir las recomendaciones de las etiquetas y no repetir más de dos veces en la temporada ya que generan resistencia con mucha facilidad, por lo cual hay que elegir muy bien en qué momento se deben aplicar.

Dentro del manejo de la enfermedad está la eliminación de canchales, ya que son una importante fuente de inóculo. Al respecto existen buenas alternativas que ayudan a eliminar la bacteria de estas heridas, con pastas a base de productos químicos o biológicos. Lo importante en el control de canchales es que se deben hacer todos los veranos (ver capítulo 6, detección en campo y opciones de control). Junto con la limpieza y curación de canchales se debe hacer la poda sanitaria, eliminando todas las ramas y árboles muertos o débiles. Estos materiales deben ser quemados o "chipeados" y compostados, y nunca dejarlos sobre el suelo, aunque sea distante del huerto, ya que son fuentes de inóculo que las lluvias y viento reintroducirán al huerto.

Durante el otoño es importante pintar los troncos hasta una altura de 60 centímetros, con sulfato de cobre, se prefiere este producto por su mayor tenacidad y persistencia ante las lluvias. La finalidad de esta pintura es proteger la base de los árboles de salpicaduras de bacterias desde el suelo producto de las lluvias. No es conveniente pintar a mayor altura, como se puede ver en algunos huertos, donde incluso los pintan completos, ya que facilitan el ingreso de hongos de madera resistentes al cobre.

Capítulo 2.

Identificación y caracterización del agente causal del cáncer bacterial en cerezo

María Francisca Beltrán G.

Ingeniera en Biotecnología Vegetal, M. S
Biotecnóloga/ INIA Rayentué
francisca.beltran@inia.cl

Boris Sagredo D.

Bioquímico. Biólogo Celular y Molecular, Ph. D.
Biotecnólogo/ INIA Rayentué
bsagredo@inia.cl

Paz Millas O.

Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs.
Fitopatóloga/ INIA Quilamapu
pmillas@inia.cl

Andrés France I.

Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.
Fitopatólogo/ INIA Quilamapu
afrance@inia.cl

El cáncer bacterial, como se ha indicado, es una enfermedad que afecta al cerezo, generando pérdidas significativas de rendimiento, calidad y población de plantas, sin lugar a dudas es la principal amenaza al potencial productivo de esta especie en Chile. En los frutales de carozo - como el cerezo - el agente causal de esta enfermedad son variantes genéticas de la bacteria *Pseudomonas syringae* conocidas como patovares, y que corresponden a *P. syringae* pv. *syringae* (Pss) y *P. syringae* pv. *morsprunorum* razas 1 y 2 (Psm1 y Psm2), estas últimas sólo se han descrito en Europa y EE.UU., mientras que en Chile son consideradas cuarentenarias por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), sin embargo, se realizó recientemente la primera detección del patovar *morsprunorum* en Osorno (Resolución 8948 EXENTA del SAG). Este patógeno, en su fase epífita, normalmente se encuentra en la superficie de hojas y tallos de la planta, así como

en malezas y flora asociada al huerto. De esta forma sobrevive y se multiplica hasta alcanzar el potencial de penetrar en la planta por estomas, grietas de crecimiento, cicatrices por caídas de hojas y heridas. Se han descrito dos factores que aumentan la capacidad de la bacteria para causar la enfermedad, estos son: la producción de una poderosa toxina, llamada syringomicina, que destruye los tejidos de la planta a medida que las bacterias se multiplican en la herida, y la liberación de una proteína que actúa como un núcleo de formación de hielo, aumentando las heridas por heladas y favoreciendo la colonización y expansión de la bacteria. Los síntomas característicos generados por Pss incluyen: canchales que exudan goma, atizamiento de flores, muerte de ramillas, lesiones en frutos y hojas, disminución de los rendimientos, entre otros.

Actualmente, el control del cáncer bacteriano se basa en un enfoque preventivo, ya que no existen controles curativos efectivos que permitan erradicar la enfermedad una vez que la bacteria colonizó endófitamente la planta. En este control preventivo se utilizan principalmente compuestos antimicrobianos basados en cobre (CABC), combinado con prácticas culturales, que consisten en la eliminación de ramas secas y tejido infectado, extirpación de canchales y protección de heridas con pasta biocida. El control químico se basa en tratamientos foliares y protección de troncos con CABC (óxido de cobre, caldo bórdales, oxiclورو de cobre, hidróxido de cobre), que representan el 80 % de los productos con autorización vigente en Chile (www.sag.gob.cl, marzo 2020). Sin embargo, el uso de estos productos para el control de esta enfermedad no está resultando efectivo en algunas zonas de plantación de cerezo.

Para una prevención más efectiva del cáncer bacteriano es necesario conocer con mayor detalle las características que determinan el desarrollo de la enfermedad y cómo se conjugan los factores ambientales, del hospedero y el patógeno. Existen pocos estudios en Chile que aborden todos estos aspectos, la mayoría de ellos ponen énfasis en la validación de productos para el control de la enfermedad. Los principales trabajos de caracterización del agente causal del cáncer bacteriano en frutales de carozo, datan de los años 70'- 80', en los que mediante la utilización de pruebas fisiológicas y bioquímicas identificaron a Pss como el agente causal. Estudios relacionados con la diversidad/identidad genética de las poblaciones, niveles de virulencia y presencia de resistencia a compuestos de cobre se han realizado en otros países, pero no en Chile.

Parte de estas interrogantes fueron abordadas en el proyecto FIC Regional "Transferencia Control Cáncer Bacteriano en Huertos de Cerezos". Uno de los objetivos del proyecto, consistió en establecer un sistema rápido, eficaz y de

alta sensibilidad para identificar al agente causal del cáncer bacterial en plantas de cerezo, incluyendo sus características de resistencia/susceptibilidad al Cu^{+2} . La colaboración con huertos productivos de la Región de O'Higgins que facilitaron la obtención de muestras de cerezo con síntomas del cáncer bacterial y posterior aislamiento de bacterias, fue determinante en el cumplimiento de este objetivo.

Hoy en día se cuenta, en INIA-Rayentué, con un grupo de aislamientos bacterianos asociados al cáncer bacterial provenientes de diferentes comunas de la región, diferentes variedades y zonas climáticas. Este grupo de aislamientos fue el material base para el desarrollo de un método de identificación molecular, y también para establecer la presencia de bacterias resistentes al cobre en huertos de cerezo de la región de O'Higgins.

Colecta de muestras y obtención de aislamientos

Los aislamientos bacterianos se obtuvieron de yemas, trozos de corteza y hojas tomados desde plantas con síntomas de la enfermedad en huertos de cerezo de 10 comunas de la Región. Plantas de cerezo con canchros visibles, exudación de goma y corteza más oscura fueron seleccionadas para la toma de muestra, siempre considerando muestrear la zona de avance de la enfermedad (Figura 1).



Figura 1. Síntomas de cáncer bacterial en corteza (A y C) y hoja (B y D) de cerezo. Flechas indican zona con síntoma

Caracterización morfo/bioquímica

Todos los aislamientos bacterianos fueron sometidos a pruebas morfo/bioquímicas que consistieron en la visualización de fluorescencia en medio de cultivo B de King bajo luz UV y las pruebas tipo LOPAT, que permiten distinguir especies del género *Pseudomonas* del tipo fluorescentes (Tabla 1). Las pruebas LOPAT fueron: producción del polisacárido Levan en medio agar-nutriente suplementado con sacarosa, reacción oxidasa, pudrición de tubérculos de papa, actividad de arginina dehidrolasa y reacción de hipersensibilidad (HR) en hojas de tabaco. Para evaluar HR en hojas de tabaco, estas se inocularon con la suspensión del aislamiento bacteriano mediante infiltración y los síntomas se evaluaron mediante análisis visual luego de 1, 2 y 3 días post inoculación (Figuras 2 y 3).

Tabla 1. Pruebas LOPAT en especies de *Pseudomonas* fluorescentes

| | <i>P.syringae</i> | <i>P.viridiflava</i> | <i>P.cichorii</i> | <i>P.agarici</i> | <i>P.marginalis</i> | <i>P.tolaasi</i> |
|--------------------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|------------------|---------------------|------------------|
| Fluorescencia | + | + | + | + | + | + |
| Oxidasa | - | - | + | + | + | + |
| Arginina dihidrolasa | - | - | - | - | + | + |
| Levan | + | - | - | - | + | - |
| Pudrición en papa | - | + | - | - | + | - |
| Reacción hipersensibilidad en tabaco | + | + | + | - | - | - |

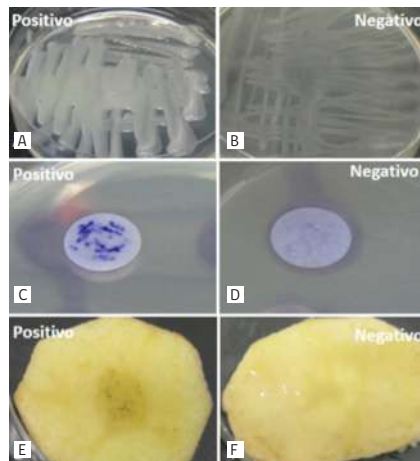


Figura 2. Criterio visual utilizado para evaluar los test de producción de levan (A y B), presencia de oxidasa (C y D) y pudrición en tubérculos de papa (E y F).



Figura 3. Inoculación de plantas de *Nicotiana tabacum* variedad Santi mediante infiltración con una suspensión bacteriana (19B) y con medio de cultivo (control). Evaluación visual de síntomas a los 3 días post inoculación.

Además, estas pruebas fueron complementadas con pruebas de patogenicidad en frutos inmaduros de cerezos. En este caso los frutos se inocularon con una suspensión de bacterias con ayuda de una jeringa y los síntomas se evaluaron diariamente hasta el día 10 (Figura 4).



Figura 4. Síntomas de patogenicidad observados en frutos inmaduros de cerezos. (A) y (B) Típica lesión café oscuro causada por Pss con diferentes intensidades (C) Control de inoculación con medio de cultivo sin bacteria.

Caracterización molecular

La caracterización molecular consiste en detectar a nivel de ADN ciertas secuencias que son características y que permiten clasificar especies dentro de los organismos, método muy útil para realizar taxonomía e identificación de bacterias del género *Pseudomonas*.

Pruebas de PCR (Polymerase Chain Reaction)

Una de las pruebas moleculares más simples corresponde a la amplificación de un fragmento de ADN (amplicón) que sea característico del género y/o especie, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La prueba de PCR se diseña a partir de una secuencia de ADN conocida, de tal forma que el amplicón obtenido con la PCR sea un marcador de identidad del género y/o especie de la bacteria bajo estudio. Basados en la literatura, se utilizaron los genes *rpoD* y *cts* como marcadores del género *Pseudomonas* y los genes *syrB* y *syrD* como marcadores de *Pss*. Una vez obtenido el ADN genómico de cada aislamiento bacteriano asociado al cáncer bacterial procedente de huertos de cerezo de la Región d O'Higgins, se realizaron las pruebas de PCR, que generaron los amplicones específicos del género *Pseudomonas* y la especie de *Pss* según el aislamiento. Como controles positivos se utilizó el ADN de los patovares *syringae* y *monsprunorum* obtenido en DMSZ (Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms) de Alemania. Como control negativo se utilizó ADN de bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Los amplicones de ADN se pueden separar por tamaño mediante electroforesis (i.e. geles de agarosa) y visualizar mediante fluorescencia (Tabla 2, Figura 4).

Tabla 2. Marcadores de PCR para *rpoD*, *cts*, *syrB* y *syrD* en aislamientos de bacterias fluorescentes

| Codigo Aislamiento | Comuna Región O'Higgins | Variedad Cerezo | Fluorescencia | Amplicon de genes obtenidos por PCR | | | |
|--------------------|-------------------------|-----------------|---------------|-------------------------------------|------------|-------------|-------------|
| | | | | <i>rpoD</i> | <i>cts</i> | <i>syrB</i> | <i>syrD</i> |
| A1M3 | Rengo | Sin Infor. | + | + | + | + | + |
| A1M95 | San Fernando | Bing | + | + | + | - | - |
| A1M96 | San Fernando | Bing | + | + | + | - | - |
| A2M96 | San Fernando | Bing | + | + | + | - | - |
| A2M103 | San Vicente | Sweet heart | + | + | + | - | - |
| A2M126 | Rengo | Lapins | + | - | + | - | - |
| A1M129 | Rengo | Lapins | + | + | + | + | + |
| A2M129 | Rengo | Lapins | + | + | + | - | - |
| A1M135 | Requinoa | Santina | + | + | + | - | - |
| A1M140 | San Fernando | Bing | + | + | + | + | + |
| A1M157 | San Vicente | Royal Dawn | + | + | + | - | - |
| A1M158 | San Vicente | Royal Dawn | + | + | + | - | + |
| A1M160 | San Vicente | Royal Dawn | + | + | + | - | - |
| A1M163 | San Vicente | Bing | + | + | + | + | + |
| A1M164 | San Vicente | Bing | + | + | + | - | - |
| A1M168 | Rengo | Bing | + | - | + | - | - |
| A1M171 | Malloa | Stella | + | + | + | + | + |
| A2M176 | Malloa | Bing | + | + | + | - | - |
| A2M178 | Las Cabras | Lapins | + | + | + | - | - |
| A1M191 | San Fernando | Lapins | + | + | + | - | - |

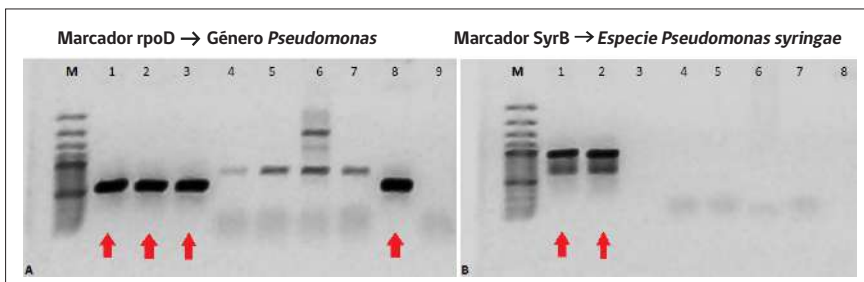


Figura 4. Amplificación marcadores *rpoD* y *syrB*. Los aislamientos de los carriles 1 y 2 positivos para *rpoD* y *SyrB* corresponden a *Pseudomonas syringae*, y los aislamientos 3 y 8 positivos solo para *Rpo* corresponden a aislamientos del género *Pseudomonas*.

Los marcadores basados en PCR, como los antes descritos, resultan simples y rápidos para la identificación de Pss. Sin embargo, a menudo estas pruebas de PCR resultan útiles sólo dentro de las poblaciones de bacterias en las cuales se basó el estudio original que desarrolló los marcadores; en este caso corresponden a poblaciones de Europa y EE.UU. Es posible que pequeñas variaciones en la secuencia del ADN que se busca amplificar, sean distintas a las de poblaciones de otras áreas geográficas, lo que influye en la especificidad de la prueba de PCR y reduzcan la efectividad de estos marcadores. Esto es muy importante a considerar ya que existe la probabilidad de variantes genéticas propias de una zona como es la Región de O'Higgins.

Secuenciación de genes de referencia y análisis multilocus (MLST)

La obtención de las secuencias nucleotídicas del ADN de genes relativamente conservados entre las bacterias, llamados genes de referencia, permite establecer similitudes o diferencias entre individuos y agruparlos según sus relaciones taxonómicas, e identificar la especie a la cual pertenecen. Este análisis conocido Multilocus Sequence Typing (MLST), es considerado la técnica genética más robusta para la caracterización taxonómica de bacterias y microorganismos en general.

En el caso del género de *Pseudomonas* que es considerado un grupo altamente complejo y difícil de clasificar en especies, la taxonomía moderna recomienda utilizar siete genes de referencia para los análisis MLST, que son *acnB* (aconitate hydratase B), *gltA* (citrate synthase), *gyrB* (gyrase), *pfk* (phosphofructokinase), *pgi* (phosphoglucoisomerase), *rpoD* (encoding sigma factor 70) y *gapA*

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Actualmente, se cuenta con bases de datos internacionales de secuencias de ADN de genes de referencia de varios cientos de individuos, de diferentes especies del género *Pseudomonas* que hacen posible estos análisis MLST.

En el proyecto FIC Regional “Transferencia Control Cáncer Bacteriano en Huertos de Cerezos”, se seleccionaron 22 aislamientos bacterianos para ser caracterizados mediante MLST (Tabla 3). Esta selección consideró los resultados previos de las pruebas morfo/bioquímicas y moleculares de acuerdo a los siguientes criterios; (i) Todos los aislamientos fueron aislados desde zonas con lesiones en el árbol asociadas a síntomas de cáncer bacterial. (ii) Todos los aislamientos correspondieron al género *Pseudomonas*, lo que fue corroborado con el marcador molecular *rpoD* y la secuenciación parcial del gen 16S de ARNr. (iii) Se privilegió aislamientos de diferentes zonas geográficas a fin de maximizar la diversidad existente. El árbol filogenético obtenido con los siete genes secuenciados, muestra claramente el grupo taxonómico al cual pertenecen los aislamientos obtenidos en la Región de O´Higgins (Figura 5).

Tabla 3. Pruebas bioquímicas y moleculares de 10 aislamientos bacterianos seleccionados.

| Código Aislamiento | Pruebas bioquímicas | | | Pruebas moleculares | | | |
|--------------------|---------------------|-------|--------------------------|---------------------|-----------|-----------------------|------------------------|
| | Fluorescencia | LOPAT | Daño en frutos inmaduros | rpoD/cts | syrB/syrD | HRM | MLST |
| A1M3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pss | Pss |
| A1M25 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pss | Pss |
| A2M126 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | Otro | <i>P. azotoformans</i> |
| A1M129 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pss | Pss |
| A1M140 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pss | Pss |
| A1M158 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | Otro | <i>Pseudomonas spp</i> |
| A1M160 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>P. viridiflava</i> | <i>P. viridiflava</i> |
| A1M163 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pss | Pss |
| A1M171 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pss | Pss |
| A2M176 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>P. viridiflava</i> | <i>P. viridiflava</i> |
| A1M197 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pss | Pss |
| A1M198 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pss | Pss |

altamente conservados entre individuos de la misma especie, existen cambios en la secuencia de ADN entre patovares. Se diseñaron partidores de PCR que independiente del patovar de *Pseudomonas* (Pss, Psm 1 o Psm 2) generaran amplicones que contienen SNP discriminadores entre estos patovares, los cuales pueden ser detectados por cambios en la curva de fusión de los productos de PCR generados (Figura 7).

Posteriormente, se realizó un experimento de HRM, que comparó dos muestras de ADN de Pss, una muestra de ADN de Psm y una muestra de otra *Pseudomonas* no patogénica. Se obtuvieron cuatro tipo de marcadores HRM según la cantidad relativa del amplicón del gen respectivo y su temperatura de fusión (Tm); aquellos que sólo amplificaron las muestras Pss (Tipo A), igual amplicón en muestras Pss y Psm, pero se diferencian por la Tm (Tipo B), amplicón de Pss y Psm no diferenciables, pero diferentes con la *Pseudomonas* no patogénica (Tipo C) y amplicón igual en todas las muestras (Tipo D) (Figura 7). Luego, el total de marcadores de tipo B que permiten discriminar entre los patovares *syringae* y *morsprunorum* se utilizaron para analizar un total 96 muestras de ADN de los aislamientos disponibles en el laboratorio. Finalmente se seleccionó un grupo de ocho marcadores HRM los cuales permiten identificar Pss de otros patovares con la misma certeza que la prueba MLST (Tabla 3).



Figura 6. Esquema de sitio polimórfico entre la secuencia de Pss (*P. syringae* pv. *syringae*) y Psm (*P. syringae* pv. *morsprunorum*). La zona de columnas azules representa la secuencia conservada entre todos los patovares. La columna blanco-celeste corresponde a un polimorfismo de un nucleótido. Se indica la zona que va a ser amplificada (verde) y la posición de los partidores para HRM-PCR.

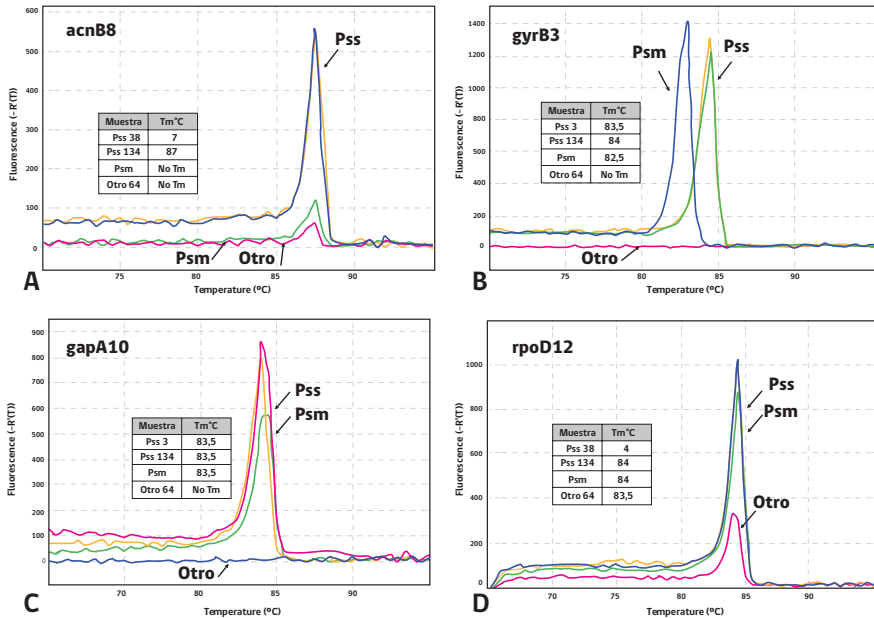


Figura 7. Curvas de fusión (Raw/derivative) HRM de productos de PCR, muestra los cuatro posibles resultados encontrados para los pares de partidores analizados.

Identificación de otras especies de *Pseudomonas* a través de HRM

La secuencia completa de los genes de referencia *acnB5*, *rpoD9*, *gapA6*, *gapA7*, *gltA2*, *gltA3* y *gyrB3* que se utiliza en los análisis MLST, permite identificar taxonómicamente las especies de *Pseudomonas*. Por otro lado, la prueba de HRM de identificación de Pss desarrollada en nuestro laboratorio se basa en la obtención de amplicones de PCR que contiene pequeñas zonas de estos genes de referencia conteniendo SNP, los cuales generan curvas de HRM específicos para Pss y las variantes patogénicas Psm 1 y Psm 2. Sin embargo, otras especies de *Pseudomonas* también podrían ser identificadas con estos ocho marcadores de HRM. En nuestro laboratorio hemos observado que todos los aislamientos de la especie *Pseudomonas viridiflava*, obtenidas desde plantas de cerezo y que fueron identificadas por análisis de MLST, poseen un perfil HRM único (Tabla 3). A futuro, a medida que aumente el tamaño de la colección de aislamientos de *Pseudomonas* spp. asociadas a cáncer bacterial en cerezo, junto con realizar más pruebas de MLST se irán validando los perfiles de HRM para otras especies de *Pseudomonas* patogénicas y no patogénicas.

Análisis HRM vs MLST, para identificación de Pss.

Sin duda los análisis MLST que comparan la secuencia de ADN completa de los siete genes *acnB5*, *rpoD9*, *gapA6*, *gapA7*, *gltA2*, *gltA3* y *gyrB3*, propuestos por la comunidad de taxónomos moleculares, son los más robustos e informativos. Sin embargo, por su alto costo relativo por muestra, alto grado de complejidad de la técnica, que requiere servicios de secuenciación de ADN externos con tiempos de respuesta considerables, es difícil que se constituya en una técnica de rutina en el corto plazo. Por otro lado, la técnica HRM aunque está limitada a ciertas especies de *Pseudomonas* para la cuales fue diseñada (Pss, Psm1 y Psm2) y también *P. viridiflava*, es menos costosa, puede realizarse todo el proceso de una vez en un laboratorio de mediana complejidad, y las respuesta es casi inmediata. Por lo tanto, se recomienda esta prueba de HRM para laboratorios medianamente equipados (termociclador con HRM) que apoyen sistemas de control del cáncer bacterial en cerezo que requieran identificar las variantes patogénicas Pss, Psm 1 y/o Psm 2.

Referencias

- Gasic, K, A. Prokic, M. Ivanovic, N. Kuzmanovic and A. Obradovic. 2012.** Differentiation of *Pseudomonas syringae* pathovars originating from stone fruits. *Pesticidi i fitomedicina* 27:219-229. doi:10.2298/PIF1203219G
- Lelliott, R. A. and D. E. Stead. 1987.** Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Gardan, L, H. Shafik, S. Belouin , R. Broch and G.P. Grimont. 1999.** DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology* 49(2): 469-478.
- Hulin, M.T., J.W. Mansfield, P. Brain , X. Xu, R.W. Jackson and R.J. Harrison. 2018.** Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum. *Plant Pathology* 67:1177-1193
- Kaluzna, M, J.D. Janse and J.M. Young. 2012.** Detection and identification methods and new tests as used and developed in the framework of COST 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts *Pseudomonas syringae* pathovars. *Journal of Plant Pathology* 94:117-126
- Latorre, B.A. and M.E. Waissbluth. 1979.** Caracterización de *Pseudomonas syringae*, Van Hall presentes en cerezo. *Agricultura técnica* 39:87-94

Capítulo 3.

Situación del cáncer bacterial en la Región de O'Higgins.

Valeria Osorio N.

Ingeniero Agrónomo/ INIA Rayentué
Valeria.osorio@inia.cl

Jaime Otárola A.

Ingeniero Agrónomo, M.Cs. / INIA Rayentué
Jaime.otarola@inia.cl

Francisco Correa S.

Bioinformático/ INIA Rayentué

Gamalier Lemus S.

Ingeniero Agrónomo, M.Cs. / INIA Rayentué
glemus@inia.cl

En las regiones centro-sur de nuestro país, el cáncer bacterial en huertos de cerezos es un problema constante y grave durante la vida productiva del huerto. Los árboles que presentan síntomas visibles, como canchros, sólo pueden prolongar su vida productiva por un periodo corto de tiempo, significando que entre un 3 y 20% de árboles son arrancados en un periodo de 10 años (Lemus & Osorio, 2019). Si el ataque de esta bacteria afecta a un huerto joven, la incidencia puede ser tan alta que el nivel de mortandad puede alcanzar hasta un 40%.

Durante la ejecución del proyecto FIC: "Transferencia Control de Cáncer Bacteriano en Huertos de Cerezos de la Región de O'Higgins", se realizó un levantamiento y análisis de información de incidencia de esta enfermedad en cerezos, en diferentes zonas productivas de la Región de O'Higgins. Dicha información se obtuvo a través de un conteo visual a combinaciones Variedad/ Portainjerto, para tener una estadística del grado de incidencia del cáncer bacterial, según sean dichas combinaciones.

Se establecieron niveles de susceptibilidad a la enfermedad, tanto en la variedad como en el portainjerto, en las zonas analizadas.

Con la información recolectada se creó un mapa de la Región de O'Higgins, que muestra los puntos de cada huerto productivo de cerezos evaluado en el transcurso del proyecto. Este mapa aprovecha la tecnología satelital, de tal manera que permite al productor visualizar de forma clara y directa las condiciones de presión de la enfermedad, definida en grados de: Sana, Leve, Moderada y Severa, según una escala colorimétrica.

Para cuantificar las lesiones causadas por *Pseudomas syringae* pv. *syringae*, que representen la condición del huerto, se evaluó la severidad de la enfermedad en una escala arbitraria diseñada de 0 a 3. La condición del árbol indica un valor 0 para plantas sanas, 1 para leves, 2 para moderadas y 3 para plantas severamente enfermas.

Con la finalidad de analizar los datos obtenidos, se empleó una fórmula que determina el daño causado por la enfermedad, donde el ataque varía en su intensidad y su resultado está dado por el índice de infección propuesto por McKinney (1923) y adaptada a las condiciones de la enfermedad:

$$\text{Índice de severidad} = \frac{(\text{Leve} \times 2) + (\text{Moderado} \times 5) + (\text{Severo} \times 10)}{\text{Total} \times 10} \times 100$$

Donde:

- Leve: N° de plantas evaluadas con daño leve
- Moderado: N° de plantas evaluadas con daño moderado
- Severo: N° de plantas evaluadas con daño severo
- Total: N° de plantas evaluadas totales

Estos datos están sistematizados en un mapa como el que se muestra en la Figura 1. Los datos obtenidos constituyen la base de la información virtual completa, disponible en www.cancerbacteriano.cl

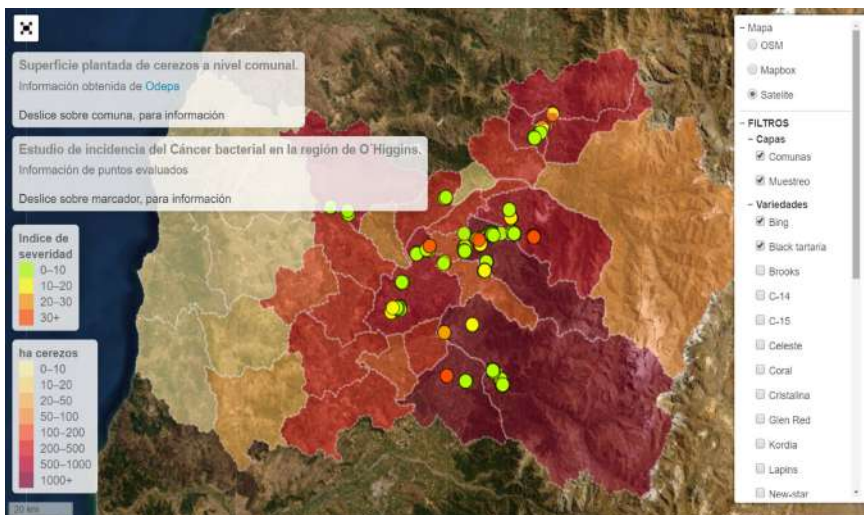


FIGURA 1. Ejemplo de mapa con campos evaluados y grados de incidencia de la enfermedad.

Los huertos analizados pertenecen a las principales comunas de producción de cerezo de la Región de O'Higgins: Chimbarongo, Codegua, Coltauco, Graneros, Las Cabras, Malloa, Quinta de Tilcoo, Rengo, Requínoa, San Fernando y San Vicente de Tagua-Tagua. En cada comuna se evaluaron al menos cinco huertos comerciales de cerezo y todas las variedades en cada uno de ellos.

En relación a las comunas, éstas presentaron distintos niveles de severidad, las cuales pueden ser agrupadas mediante una herramienta estadística denominada análisis de conglomerados, por nivel de severidad, independiente de la variedad, portainjerto, edad o sistema de conducción. De acuerdo a la Figura 2A, existen cuatro grupos de zonas que comparten una severidad similar: un grupo de severidad baja (bajo un 10% de incidencia en Las Cabras, Graneros y Coltauco), un grupo de severidad media baja (un 20% de incidencia en San Vicente, Quinta de Tilcoo y Malloa), un grupo de severidad media alta (un 40% de incidencia en San Fernando y Chimbarongo) y un grupo de severidad alta (sobre un 50% de incidencia en Requínoa, Rengo y Codegua).

Por otra parte, con los datos obtenidos se pudo estudiar si existe una relación entre la variedad y la susceptibilidad al cáncer bacterial. Por ejemplo, la variedad Bing presentó un alto índice de severidad (con una incidencia superior al 70%), seguido de otras variedades menos susceptibles como 'Rainier', 'Van', 'Summit' y 'Black Tartarian' con incidencia superior al 50% de daño. Existen variedades de susceptibilidad media, como 'Regina', 'Royal Dawn', 'Sweetheart',

'Kordia', 'Lapins', entre las más importantes (con una incidencia en torno al 40%), mientras que existe una baja severidad en variedades como 'Celeste', 'Santina', 'Glen Red', 'Skeena', 'Coral', 'Tulare' (incidencia menor al 10%) (Figura 2B).

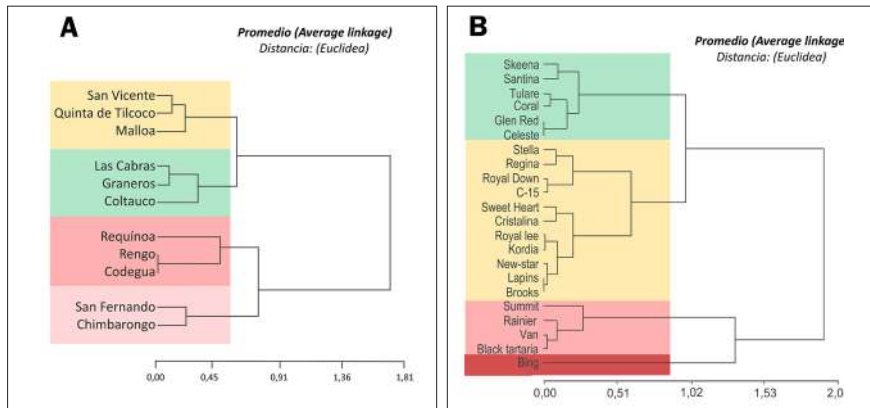


Figura 2. A) Dendrograma asociado al análisis de conglomerados de la severidad por comuna y B) por variedad. Color verde indica severidad baja, amarillo indica severidad media y rojo severidad alta.

El portainjerto, independiente de la variedad y de la edad del huerto, presentó un efecto diferencial de la susceptibilidad, observándose una menor severidad en plantas con patrón MaxMa - 14, Colt, Guindo ácido y Cab-6P (Figura 3A). Por otro lado, las plantas sobre portainjerto Gisella presentaron una alta severidad, probablemente por tratarse de plantas menos vigorosas. Los portainjertos Mericier y Mahaleb presentaron una condición intermedia (Figura 3).

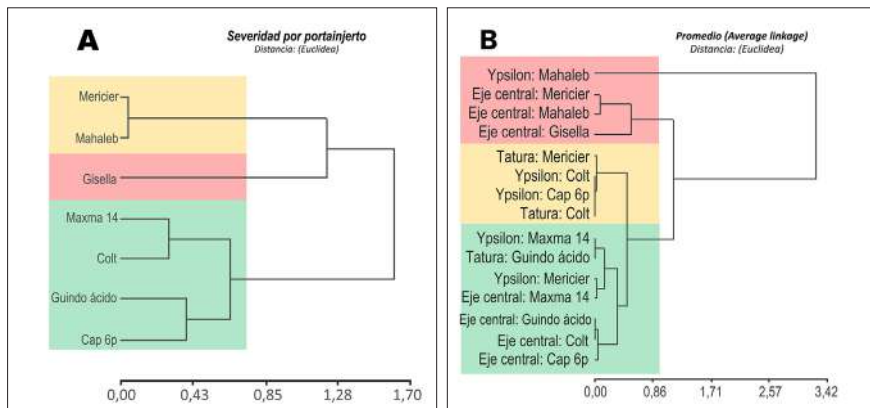


Figura 3. A) Dendrograma asociado al análisis de conglomerados de la severidad por portainjerto y B) por efecto del sistema de conducción. Color verde indica severidad baja, amarillo indica severidad media y rojo severidad alta.

En otro contexto, la severidad, además de asociarse a la zona, variedad y portainjerto, se relacionó directamente con las heladas que ocurren el mes de septiembre desde el año 2013 al año 2018 (Figura 4A). En este sentido, en la medida que se incrementan las horas bajo 0 °C, se incrementa la severidad del daño. Es por este motivo que las comunas de Rengo, Requínoa y Codegua, zona en que recurrentemente ocurren eventos de heladas en septiembre, presentaron un mayor índice de severidad, mientras que, en Graneros, Quinta de Tilcoco y San Vicente, se observó una menor severidad asociado a una menor acumulación de horas bajo 0 °C. Por otro lado, se observó que huertos de mayor edad presentaron una mayor severidad de daño (Figura 4B), ya que han estado sometidas por más tiempo a distintas condiciones de estrés climáticos.

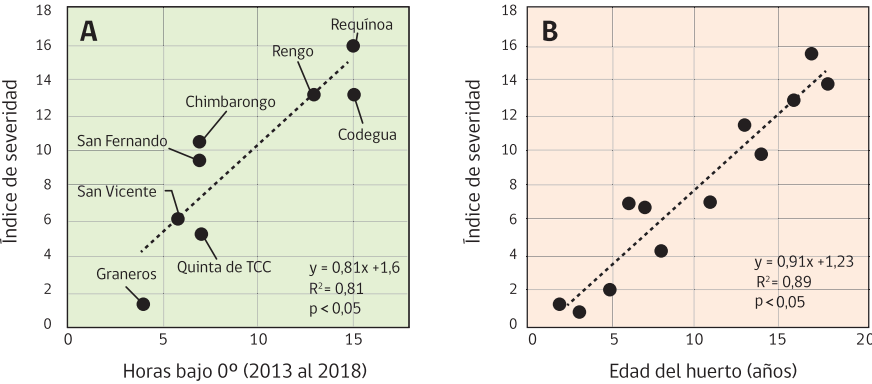


Figura 4. A) Regresión lineal entre la acumulación de horas bajo 0 °C y el índice de severidad y B) regresión lineal entre la edad del huerto y el índice de severidad. p<0,05 indica correlación significativa entre ambas variables.

Huertos implementados con cubiertas plásticas presentaron una menor severidad que huertos sin el uso de cubiertas, sin embargo, el uso de esta herramienta es relativamente nuevo. Entonces, para determinar el efecto de la cubierta es importante considerar la edad de plantación.

Para entender el efecto de la cubierta plástica, se realizó un análisis multivariado de componentes principales (CP) el cual indica el grado de asociación entre algunas variables y entre observaciones (Figura 5). En este caso, las variables se encuentran descritas en vectores (triángulos amarillos) y corresponden a: plantas sanas (Sana), plantas con daño leve (Leve), plantas con daño moderado (moderada), plantas con daño severo (Severa) y el índice de severidad. Por otro lado, las observaciones (puntos azules) corresponden a las distintas variedades

con y sin cubierta (C/ y S/). Para silenciar el efecto de la edad de plantación, se realizó un análisis únicamente para plantaciones nuevas (< 10 años) con el fin de determinar el efecto de la cubierta y la variedad.

De acuerdo a esto, fue posible identificar que la cubierta presentó un grado de protección ante la severidad de los síntomas, lo cual queda demostrado específicamente en la variedad Bing, la cual presentó una alta proporción de plantas sanas en huertos con el uso de cubiertas, mientras que sin cubierta existió un alto nivel de daño moderado, severo y, en consecuencia, un alto índice de severidad.

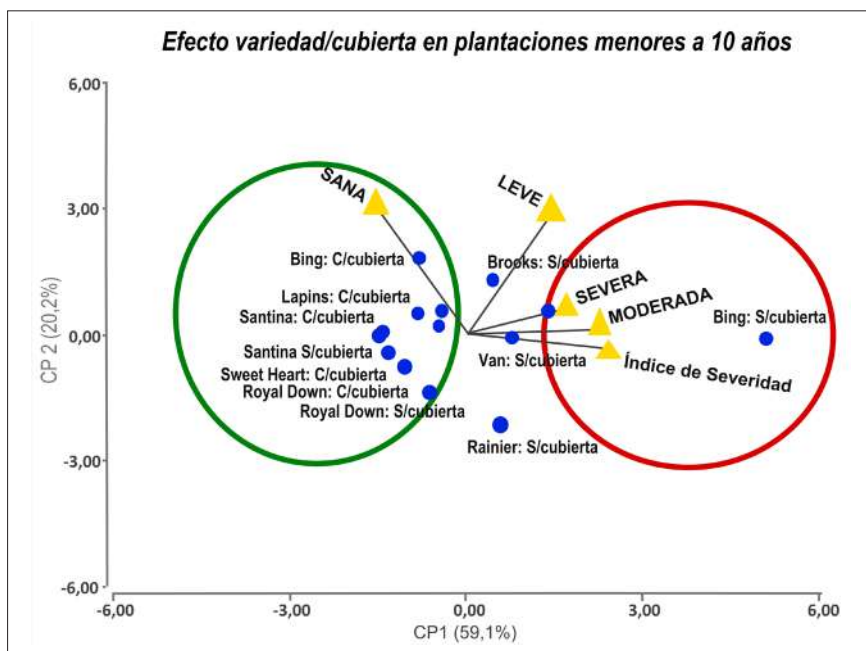


Figura 5. Bi-plot realizado para evaluar el comportamiento de la variedad/cubierta asociada a distintos niveles de daño en plantaciones menores a 10 años.

De los antecedentes recolectados, se puede inferir que:

- La enfermedad está ampliamente distribuida en el área de cultivo del cerezo en la Región de O'Higgins.
- Las zonas cercanas a la pre-cordillera presentan síntomas más severos que otras zonas de la Región. Esto puede atribuirse, entre otras razones, a la mayor frecuencia de heladas invernales y de primavera que en otras áreas.

- A medida que los huertos envejecen se aprecian mayor incidencia de la enfermedad.
- Es necesario conocer la sensibilidad varietal y de los portainjertos para, en la medida de lo posible, decidir una plantación.
- Aspectos de manejo, como el uso de cubiertas plásticas en los huertos, resulta una estrategia complementaria adecuada, para el efecto de los programas fitosanitarios.

Referencias

Lemus, S. G., & Osorio, N. V. (2019). Cáncer bacteriano en cerezo: Opciones de control de cancos. Informativo N°67. Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias.

McKinney, H.H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seed-lings by *Helminthosporium sativum*. J. Agric. Res. 26: 195-218

Capítulo 4.

Resistencia–Susceptibilidad al cobre de aislamientos bacterianos asociados al cáncer bacterial

María Francisca Beltrán G.

Ingeniera en Biotecnología Vegetal, M. S
Biotecnóloga/ INIA Rayentué
francisca.beltran@inia.cl

Boris Sagredo D.

Bioquímico. Biólogo Celular y Molecular, Ph. D.
Biotecnólogo/ INIA Rayentué
bsagredo@inia.cl

Paz Millas O.

Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs.
Fitopatóloga/ INIA Quilamapu
pmillas@inia.cl

Andrés France I.

Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.
Fitopatólogo/ INIA Quilamapu
afrance@inia.cl

Actualmente existen alrededor de 33 productos registrados en el Servicio Agrícola y Ganadero para control de cáncer bacterial en cerezo, la composición de estos plaguicidas se basa principalmente en compuestos que tienen cobre, que representan más del 80 % de los productos con autorización vigente (www.sag.gob.cl, marzo 2020); siendo 24 productos basados en cobre, cinco basado en microorganismos, y otros cuatro productos que incluyen un antibiótico.

Los principios activos de estas formulaciones pertenecen a una clase general de productos conocidos como compuestos antimicrobianos basados en cobre (CABC), que no sólo se utilizan como protectores de contacto para el control del cáncer bacterial, también se usan por su efecto biocida de amplio espectro para controlar otros patógenos de plantas, entre los que se incluyen: bacterias, hongos, oomicetes. Así en muchas zonas agrícolas donde se han utilizado

intensivamente estos CABC se advierten complicaciones para la salud humana y la biodiversidad, donde la fitotoxicidad y el desarrollo de cepas bacterianas resistentes al cobre son los problemas más conocidos.

En el marco del proyecto FIC Regional “Transferencia Control Cáncer Bacteriano en Huertos de Cerezos” se estudió la resistencia/susceptibilidad al cobre de 80 aislamientos bacterianos obtenidos de 10 comunas de la Región de O’Higgins, asociados al cáncer bacterial en cerezo. Se evaluó la resistencia a Cu^{+2} basados en el ensayo descrito por Cazorla et al. (2002) que utiliza distintas concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) entre 0,0 y 3,6 mM (0 y 225 ppm). Un aislamiento que crece a concentraciones menor o igual que 0,8 mM se considera sensible y aquellos que logran crecer a concentración mayor que 0,8 mM se califican como resistentes al sulfato de cobre. En la Figura 1 se ejemplifica resultados contrastantes en tres cepas. Para corroborar los resultados de desarrollo de colonias bacterianas en placas, se evaluó la presencia de los genes del operón cop (copABCD), que están asociados al mecanismo más frecuente de resistencia al cobre en bacterias. La acción de estos genes permite compartimentar y posteriormente eliminar el Cu^{+2} de la célula bacteriana.

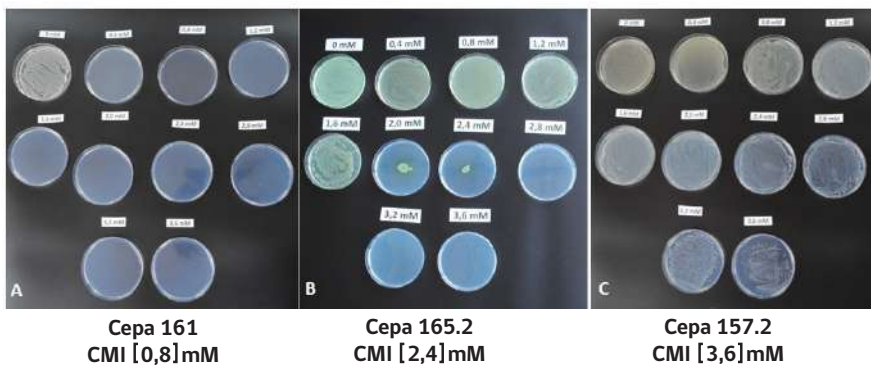


Figura 1. Evaluación de crecimiento bacteriano y concentración mínima inhibitoria (CMI) de sulfato de cobre en medio manitol–glutamato– extracto de levadura (MGY). Fotos tomadas luego de 72 horas de incubación en estufa a 26 °C.

Los resultados indicaron que un 80% de los aislamientos evaluados presentaron un alto grado de resistencia al sulfato de cobre, con valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) entre 0,8–3,6 mM (equivalente a 50 - 225 ppm de cobre), como muestra la Figura 2. En la mayoría de los casos la resistencia se correlaciona con la existencia de determinantes génicos pertenecientes al

operón copABCD. Un grupo de 12 aislamientos correspondieron al agente causal del cáncer bacterial: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Los altos niveles de resistencia al Cu^{+2} de las comunidades bacterianas asociadas al cáncer bacterial, incluidos los del agente causal, nos debería hacer dudar sobre la efectividad de los productos CABC en el control de la enfermedad.

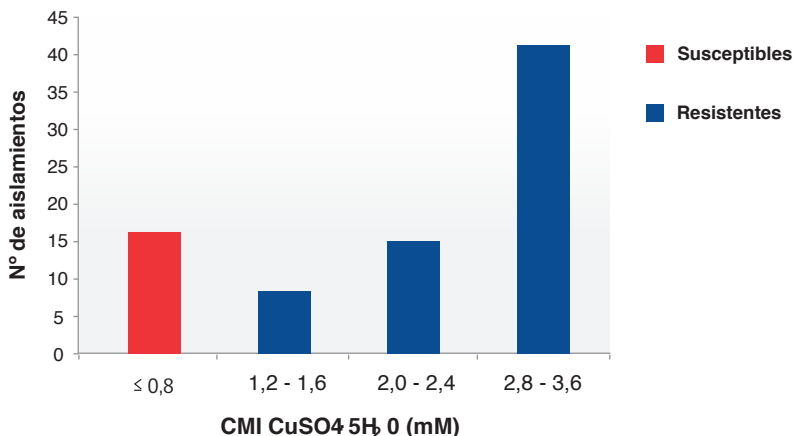


Figura 2. Gráfico de frecuencia de aislamientos sensibles y resistentes según concentración mínima inhibitoria al sulfato de cobre.

Suelos de la Región de O'Higgins presentan altas concentraciones de cobre

Un estudio previo realizado en la Región de O'Higgins (Burgos, 2017) evidenció altas concentraciones de Cobre (Cu) en el suelo, con un promedio de 176 mg kg^{-1} (50 puntos muestreados). En la Figura 3, se puede apreciar que los niveles de Cu tienden a aumentar hacia la zona de la Cuenca de Rancagua, incluyendo dos sitios al suroeste de esta ciudad con niveles superiores al resto de la Región, donde los niveles pueden alcanzar los 675 mg kg^{-1} de cobre. Cabe destacar que la extensa zona que cubre la franja de color amarillo ($86,3 - 294 \text{ mg kg}^{-1}$), además de los territorios de color naranja y naranja oscuro, equivalen a concentraciones entre 294 y 675 mg kg^{-1} . Por lo tanto, gran parte del área en estudio presentaría concentraciones que podrían considerarse como suelos contaminados por cobre (Burgos, 2017). Estos suelos corresponden principalmente a zonas de cultivos anuales, frutales, viñas y parronales, además de la presencia de la industria del cobre (Fundición Caletones y la División El Teniente de Codelco). A nivel internacional, niveles elevados de cobre desde fuentes naturales e industriales también han sido reportados en varios países productores de cobre como Chile,

China, Indonesia, Rusia, Zambia y Australia (De Gregori et al. 2003, Altimira et al. 2012). En países de la UE para evitar estos problemas, los compuestos cuya sustancia activa es cobre se encuentran en la lista de candidatos a ser substituidos, de acuerdo a la regulación (EC) N° 1107/2009.

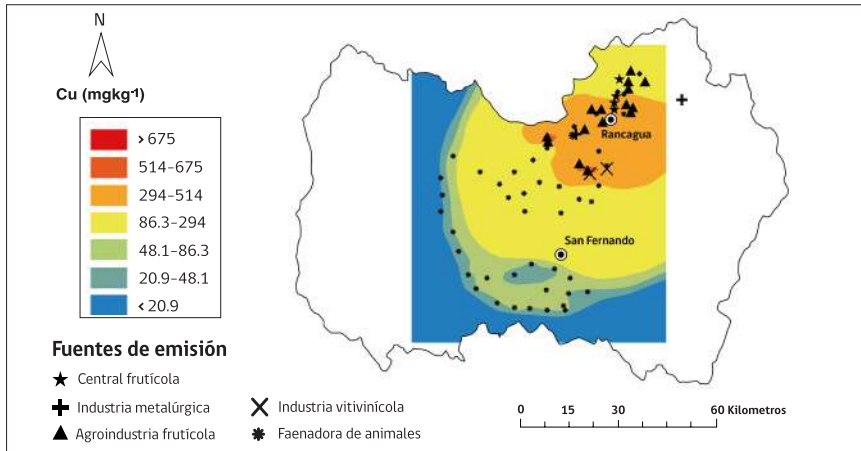


Figura 3. Distribución de contenidos de cobre en suelos recolectados de la Región de O'Higgins, según Burgos, 2017.

Referencias

Altimira, F., C. Yáñez, G. Bravo, M. González, L.A. Rojas, et al. 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiology* 12(1): 193. doi: 10.1186/1471-2180-12-193

Burgos, O. 2017. Distribución y evaluación de As, Cd, Cu, Ni, Pb, Se y Zn, en suelos agrícolas de la zona central de Chile. Informe de proyecto para optar al título de Ingeniero Civil. Universidad Católica de la Santísima Concepción. 300 p.

Cazorla, F.M., E. Arrebola, A. Sesma, A. Pérez-García, J.C. Codina, et al. 2002.

Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from Mango is encoded mainly by plasmids. *Phytopathology* 92(8): 909-916. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.8.909.

De Gregori, I., E. Fuentes, M. Rojas, H. Pinochet, and M. Potin-Gautier. 2003. Monitoring of copper, arsenic and antimony levels in agricultural soils impacted and non-impacted by mining activities, from three regions in Chile. *Journal of Environmental Monitoring* 5(2): 287-295

Puig, S., E.M. Rees and D.J. Thiele. 2002. The ABCDs of periplasmic copper trafficking. *Structure* 10(10):1292-5.

Capítulo 5.

Poblaciones epífitas de *Pseudomonas syringae* en cerezo

Paz Millas O.

Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs.
Fitopatóloga/ INIA Quilamapu
pmillas@inia.cl

Andrés France I.

Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.
Fitopatólogo/ INIA Quilamapu
afrance@inia.cl

A nivel mundial se han determinado varios patovares (pv.) de *P. syringae* causando cáncer bacterial, entre estos destacan *P. syringae* pv. *syringae* (Pss), de común ocurrencia en Chile, y también se señalan *P. syringae* pv. *morspronorum* (Psm) y *P. syringae* pv. *persicae*, ambos patógenos cuarentenarios ausentes para Chile (SAG Resol. 2396/2018). Pero, como se indicó en el Capítulo 2, según Resolución 8948 EXENTA del SAG, ya se realizó la primera denuncia de *P. syringae* pv. *morspronorum* en un huerto de cerezo de la comuna de Osorno.

La enfermedad, cáncer bacterial, se produce cuando la bacteria entra al árbol y se mueve sistémicamente dentro de éste, causando, entre otros síntomas: necrosis en la madera, canchales, muerte de dardos, ramas e incluso del árbol completo. Porque el cáncer bacterial del cerezo no tiene control curativo, la obtención de variedades menos susceptibles y el control preventivo de la enfermedad son de fundamental importancia para el manejo de la enfermedad. Dentro de las opciones de manejo, están las aplicaciones preventivas de productos en base a cobre (Cu⁺²), combinando con prácticas culturales, que involucra principalmente la eliminación de ramas enfermas y extirpación de canchales.

Pseudomonas syringae es una bacteria Gram negativa, flagelada, del filo Proteobacteria, que vive de forma epífita en numerosas plantas silvestres o cultivadas, pero también en cualquier lugar donde hay agua, como nubes, gotas de lluvia, granizo, o nieve, suspendida en aerosoles de agua; cursos de agua superficial o subterránea, sobre plantas e incluso superficialmente en insectos. Su asociación al agua y a los fenómenos de solidificación del hielo, han hecho

pensar que esta bacteria originalmente estaría asociada al ciclo del agua y que evolucionó, posteriormente, a convertirse en un importante patógeno de numerosas plantas (Morris et al., 2013).

Estas bacterias en su fase epífita, normalmente se encuentran en la superficie de hojas y tallos de la planta, así como en malezas y flora asociada al huerto. De esta forma sobreviven y se multiplican hasta alcanzar altas poblaciones. A medida que aumenta la densidad poblacional, aumenta la producción de unas moléculas que utilizan como señal en un sistema de comunicación denominado "quorum sensing" (QS).

Pseudomonas syringae y muchas otras bacterias Gram negativas usan como señal de QS la molécula N-acil homoserina lactona (AHL) (Quiñones, 2005). Los niveles elevados de AHL, resultantes de altas densidades de población, están relacionados a la expresión de factores de virulencia y procesos fisiológicos, tales como bioluminiscencia, esporulación, competencia, producción de antibióticos, secreción de compuestos de virulencia y formación de biopelículas (Rutherford y Basses, 2012). La formación de biopelículas, le permite a las bacterias sobrevivir y crecer bajo condiciones ambientales desfavorables (Costerton et al., 1999), además las hace resistente a muchos antibióticos.

La fase endofítica, comienza cuando la bacteria penetra en la planta por micro heridas causadas por heladas, grietas de crecimiento, cicatrices por caídas de hojas, heridas de podas, etc. Una vez dentro de la planta, la bacteria se mueve sistémicamente por el sistema vascular y donde no pueden llegar los productos químicos.

El control preventivo está enfocado en evitar que las poblaciones de la bacteria que se encuentran sobre hojas, yemas o flores (epífitas) puedan entrar al árbol. Para esto se realizan aplicaciones preventivas de productos en base a cobre (Cu^{+2}). Normalmente los productores hacen repetidas aplicaciones de cúpricos durante la temporada, incluyendo el periodo invernal. Algunas de estas aplicaciones no serían necesarias, ya que las poblaciones no se encuentran presentes o lo están a muy bajas poblaciones, como ocurre en algunos períodos de muy bajas o altas temperaturas y baja humedad. Conocer las fluctuaciones poblacionales de la bacteria dentro de la temporada permite reducir algunas aplicaciones, lo que es fundamental para evitar resistencia a cobre de *P. syringae* y disminuir la toxicidad en planta y suelo por este compuesto.

En huertos de la Región de O'Higgins se han encontrado aislados resistentes al cobre asociados al cáncer bacterial, una evaluación de 96 aislamientos realizadas en el marco del proyecto FIC muestran que cerca del 80% de los aislamientos resultó ser resistente al cobre en diferentes grados (ver capítulo 4).

Determinar poblaciones epífitas y conocer los meses con mayor presencia de inóculo sobre la planta, es información relevante para decidir cuándo es necesario realizar aplicaciones con productos cúpricos y cuando no hacerlas.

El método más usado para determinar poblaciones epífitas es el "plaqueo" de diluciones seriadas. Tiene la desventaja de que no se puede determinar la ubicación de la bacteria en la hoja y el procedimiento es un tanto laborioso y lento. Sin embargo, tiene las ventajas de enumerar por separado las colonias de bacterias y aislar para pruebas adicionales, si se desea.

Las poblaciones epífitas son muy variables de un árbol a otro e incluso de una hoja a otra, ejemplos de evaluaciones de poblaciones de *P. syringae* pv. *morsprunorum* estimadas en cada una de 60 hojas de cerezo sanas, variaron desde no detectables hasta 153.500 unidades formadoras de colonias (u.f.c) por hoja (Crosse, 1959). Debido a esta variabilidad en la población, se estima que se necesitarían 192 hojas por muestra para comparar significativamente las poblaciones del patógeno en la superficie de la hoja.

Estas variaciones poblacionales se deben, en parte, a que el entorno físico que rodea a los microorganismos de la filósfera cambia continuamente con ciclos diarios de temperatura, radiación, humedad relativa, velocidad del viento y humedad de las hojas. Los cambios climáticos estacionales imponen todavía un ciclo más largo. Las características físicas y fisiológicas de las hojas cambian a medida que se expanden, maduran y senescen y a medida que cambia la fenología del huésped.

A pesar de la gran variabilidad que existe, las estimaciones de las poblaciones de bacterias epífitas son útiles para algunos propósitos, como por ejemplo determinar presencia/ausencia u obtener una estimación aproximada del tamaño medio de la población. Un ejemplo de lo anterior fueron las evaluaciones realizadas en dos huertos de la Región de O'Higgins (Rengo y Requínoa) y árboles caseros en la Región de Ñuble (Quilamapu), en diferentes fechas y durante tres temporadas, para observar la dinámica de las poblaciones a través de la temporada. Para realizar la estimación de las poblaciones de *P. syringae* sobre hojas en los huertos, se hicieron muestreos de hojas y/o yemas de 10 árboles por unidad experimental, donde se evaluaron 20 hojas o 20 yemas. Los resultados muestran que las primeras apariciones de *Pseudomonas* fueron en el mes de junio en los tres años evaluados, posteriormente se observó presencia de la bacteria en julio y agosto en la temporada 2017 y 2018, sin embargo, durante el 2019 no se detectaron poblaciones de *Pseudomonas* ni en julio ni agosto.

Durante octubre se detectaron poblaciones en todas las temporadas evaluadas. Y desde octubre en adelante no se detectan poblaciones a excepción del año 2019, donde se detectaron poblaciones en ambas localidades de la Región de O'Higgins (Figura 1).

La presencia de poblaciones epífitas entre junio y octubre probablemente está relacionada con las lluvias que son diseminadoras de las bacterias y el contenido de humedad sobre las hojas que les permite movilizarse en la superficie.

Según Bultreys y Kaluzna (2010), el clima frío y humedad en primavera y las heladas son favorable para la infección de brotes y flores emergentes causada por Pss y sus subsecuentes infecciones de ramas. Eventos de heladas seguidos por descongelamiento, favorecen la multiplicación y la progresión de Pss a lo largo de los tallos. Por su parte, Psm es más eficiente en la infección de tejidos corticales de las ramas a temperaturas de 15 °C y no se favorece con las heladas (Bultreys y Gheysen 1999). Esto se relaciona probablemente con que Pss a diferencia de Psm, es nucleadora de hielo activa, esto significa que Pss y otras especies de *Pseudomonas* tales como *P. fluorescens* y *P. viridiflava*, son capaces de inducir la formación de hielo a partir de agua súper fría. No todos los strains dentro de estas especies tienen la capacidad de nuclear el hielo. Por ejemplo, los *strain* de Pss, frecuentemente exhiben esta característica, pero ningún *strain* dentro Psm o *P. syringae* pv. *tomato* son nucleadoras de hielo activas, por lo que ha sido usado entre otras características para distinguir entre patovares (Hirano y Upper, 2000).

Existen métodos de identificación fisiológica y bioquímica de especies y/o patovares de *P. syringae* basados en visualización de fluorescencia en medio B de King, pruebas LOPAT y de hipersensibilidad en plantas de tabaco, entre otros, no obstante, la discriminación de especies es difícil y no siempre acertada. Actualmente, las técnicas moleculares permiten identificar tanto la especie, basándose en la amplificación de los genes (*rpoD*) y citrate synthase (*cts*), como el patovar *syringae*, con genes específicos para la detección como los que codifican la fitotoxina syringomicina (*syrB* y *syrD*).

Dentro del trabajo desarrollado en este proyecto, fue posible diseñar un marcador específico que permite diferenciar Pss de Psm (capítulo 2, Identificación y caracterización del agente causal del cáncer bacterial en cerezo), esta técnica además de diferenciar ambos patovares, podría implementarse para determinar las poblaciones de cada uno de los patovares en el campo, a través de técnicas como PCR de tiempo real.

Esta metodología permite determinar el tamaño de las poblaciones de *Pseudomonas* con límites de detección más bajos y con mayor precisión de lo que hoy es posible con el conteo de diluciones seriales en placas, lo que sería un importante aporte en el conocimiento de las poblaciones epífitas de ambos patovares en los huertos.

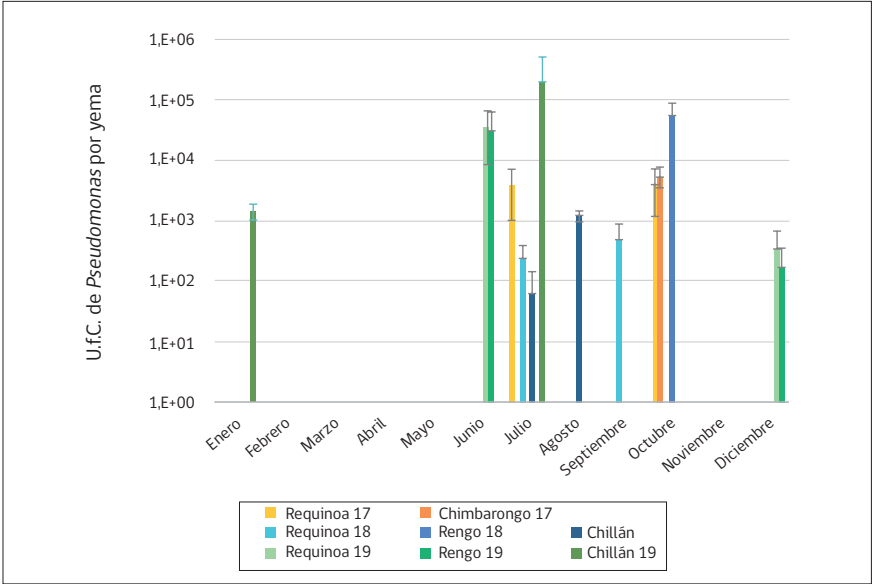


Figura 1. Población de *Pseudomonas* promedio (u.f.c. por yema), evaluadas entre los meses de enero a diciembre para las temporadas 2017, 2018 y 2019 en distintas localidades.

Conclusiones

El cáncer bacterial es la enfermedad más importante del cerezo y conocer la dinámica de las poblaciones de bacterias que causan esta patología, permiten tener un control más ajustado a los periodos en que realmente se necesitan hacer tratamientos (ver capítulo 6). Una forma racional de hacer controles en los momentos correctos, es a través del estudio de las poblaciones epífitas de *P. syringae*, lo cual se puede hacer a través de mediciones de esta bacteria en yemas u hojas, mediante métodos de cultivo en medios artificiales o usando técnicas de PCR. El control de *Pseudomonas* de acuerdo al monitoreo y población de la bacteria, permite disminuir el uso indiscriminado de cobre que se hace en la actualidad, ya que el exceso no ayuda a prevenir la enfermedad al favorecer el desarrollo de cepas resistentes, además de crear problemas de contaminación ambiental.

Referencias

Bultreys, A., & Gheysen, I. (1999). Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1904-1909.

Bultreys, A., & Kaluzna, M. (2010). Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. *Journal of Plant Pathology*, S21-S33.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284: 1318-1322

Crosse, J. E. (1959). Bacterial canker of stone-fruits. IV. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. *Annals of Applied Biology*. 47:306-17.

Hirano S.S., Upper C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 624-653.

Morris, C. E., Monteil, C. L., & Berge, O. (2013). The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. *Annual review of phytopathology*. 51: 85-104.

Quiñones, B., Dulla, G., & Lindow, S. E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant-microbe interactions*. 18: 682-693.

Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2(11), a012427

Capítulo 6.

Detección en campo y alternativas de control

Valeria Osorio N.

Ingeniero Agrónomo/ INIA Rayentué
Valeria.osorio@inia.cl

Paz Millas O.

Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs.
Fitopatóloga/ INIA Quilamapu
pmillas@inia.cl

Gamaliel Lemus S.

Ingeniero Agrónomo, M.Cs. / INIA Rayentué
glemus@inia.cl

Jaime Otárola A.

Ingeniero Agrónomo, M.Cs. / INIA Rayentué
Jaime.otarola@inia.cl

Andrés France I.

Ingeniero Agrónomo, M.Sc., Ph.D.
Fitopatólogo/ INIA Quilamapu
afrance@inia.cl

Como se indica en el capítulo 1, el reconocimiento de campo de una planta afectada por la bacteria *Pseudomonas syringae* es por la presencia de tejidos tiernos atizonados, pústulas necróticas en las hojas, canchales en la madera, presencia de goma, etc. Sin embargo, la fluctuante población de la bacteria, durante la temporada, debe mantenerse bajo el umbral de daño, a través del uso de herramientas bactericidas. Esto obliga a tener un programa de aplicaciones al huerto.

Como es sabido, las alternativas de control tanto químicas como biológicas no han sido lo suficientemente eficaces para el control de la enfermedad. Tampoco se conoce mucho la biología del patógeno durante las fases de su desarrollo, avance o incluso las resistencias a agroquímicos que este pudo haber generado en el tiempo.

Los bactericidas más comunes son los basados en cobre, sin embargo, el cobre cada vez presenta más limitaciones para su uso, por ejemplo: la fitotoxicidad, los residuos que dañan el ambiente, su limitada acción por ser sólo de contacto. Todo esto hace que su efecto en el tiempo y efectividad de control sea limitado (ver Etiología y Control en capítulo 1).

Actualmente existen productos biológicos que sí actúan de forma sistémica. Por ejemplo, bacterias como *Bacillus spp.*, que compiten con bacterias patógenas, por espacio y nutrientes, sin generar un daño al huésped. Pero, también su efecto está limitado a la época de aplicación, tanto para cuidar la sobrevivencia, como por la sensibilidad a las aplicaciones sanitarias del huerto. Entonces, los tratamientos para prevenir el cáncer bacterial deben planearse para hacer coincidir altas poblaciones iniciales de la bacteria presente en la planta, las condiciones ambientales adecuadas para los agentes preventivos y en una secuencia de aplicaciones que asegure el control de la población patogénica a lo largo del período de mayor sensibilidad.

Esto quiere decir que los programas propuestos contemplan una participación del cobre como un componente del manejo de la enfermedad aprovechando su acción bactericida, pero, su efectividad depende de que se aplique en los momentos fenológicos precisos. Por ejemplo, las aspersiones de cobre durante el otoño, los cuales van dirigidos a poblaciones epifitas y como protector de la cicatriz de la hoja, han sido eficaces para mantener baja las poblaciones de bacterias (Olson & Jones, 1985).

Para los períodos de desarrollo de la planta, cuando el cobre presenta alguna de las limitaciones señaladas, este proyecto evaluó diferentes compuestos que se explican a continuación.

Tratamientos al follaje

Se evaluó, durante las tres temporadas del proyecto, los programas fitosanitarios propuestos por algunas empresas, para analizar las fortalezas de cada uno y/o algunas eventuales limitaciones, pero por sobre todo, los momentos de aplicación de cada tratamiento, en función de la fenología, la carga de población bacteriana y las condiciones climáticas en cada localidad. El Cuadro 1 muestra los programas evaluados la temporada 2017-18

Cuadro 1. Programas evaluados en Fundo La Morera, Codegua.

| Programas fitosanitarios 2017/18 | | | | | |
|----------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|-----------------|
| Fecha | Productor | Bionativa | Bayer | Tavan | Stoller |
| 27-abr. | | Nacillus | Agrocopper | | Hidróxido de Cu |
| 09-may. | Oxicup | Oxicup | | | |
| 24-may. | | | | | Hidróxido de Cu |
| 05-jun. | Oxicup | | | | |
| 13-jun. | | | | | Hidróxido de Cu |
| 28-jun. | Oxicup | Nacillus | Agrocopper | Wert + Ph4 | |
| 12-jul. | Oxicup | Oxicup | Serenade | | |
| 18-jul. | | | Agrocopper | Wert + Ph4 | |
| 03-oct. | | | | Wert + Ph4 | |
| 04-oct. | | | Serenade | | |
| 10-oct. | Oxicup | Nacillus | Agrocopper | | Rezist |
| 06-nov. | | | | Wert + Ph4 | |
| 21-nov. | Oxicup | Nacillus | Agrocopper | | Rezist |
| 29-nov. | | | Agrocopper | | |
| | | | | | |
| Nº aplicaciones | 6 | 6 | 8 | 4 | 5 |

Luego de la estricta aplicación de los programas descritos, se procedió a evaluar los efectos a través del recuento de unidades formadoras de colonias (u.f.c.), dentro de las primeras 48 horas de realizado cada tratamiento; esto significó el envío de muestras desde mayo a noviembre. Durante el invierno la muestra consistió en una ramilla, de cada uno de los 10 árboles por tratamiento, con dos repeticiones por tratamiento. En primavera la muestra correspondió a cinco hojas por planta, con la misma metodología de muestreo ya descrita.

En el laboratorio de microbiología de INIA - Quilamapu, se realizó, para cada muestra, un recuento de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Con los resultados se calculó el número de colonias por yemas o por centímetro cuadrado de hojas.

Al analizar los resultados, considerando que esa temporada no tuvo el tratamiento "Testigo absoluto", se debe indicar lo siguiente:

- En general todos los programas funcionaron adecuadamente.
- La enfermedad está ampliamente distribuida en el área de cultivo del cerezo en la Región de O'Higgins.
- Las zonas cercanas a la pre-cordillera presentan síntomas más severos que otras zonas de la Región. Esto puede atribuirse, entre otras razones, a la mayor frecuencia de heladas invernales y de primavera que en otras áreas.
- Para el programa de BioNativa no hubo presencia de colonias detectables, en las muestras analizadas.
- El programa de TAVAN se detectaron en dos épocas de registro: Julio y octubre.
- El programa de Bayer y el programa del campo presentaron una baja detección de colonias en la temporada, excepto en el mes de octubre (Figura 1).

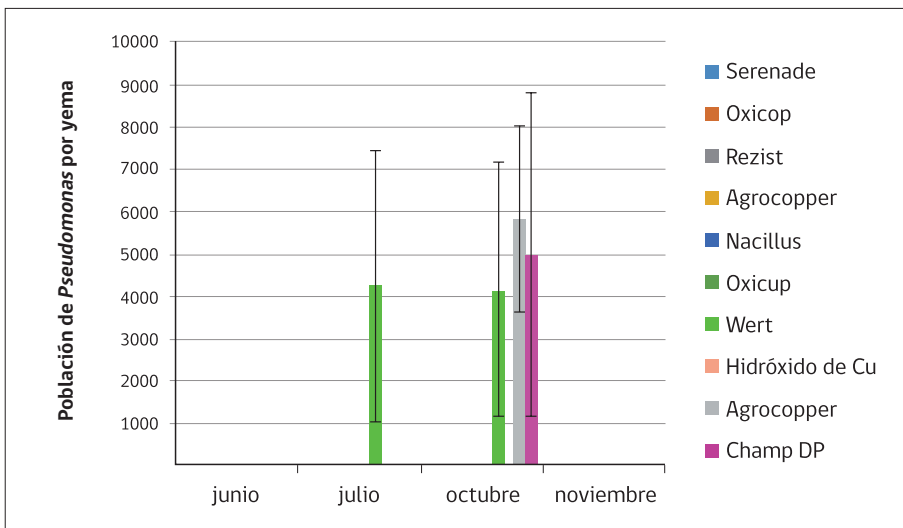


Figura 1. Poblaciones bacterianas fluorescentes, en tratamientos preventivos de la temporada 2017 - 2018.

Cuadro 2. Programas de muestreos y aplicaciones de tratamientos para cáncer bacterial. Temporada 2018 - 2019.

| Programas fitosanitarios 2017/19 | | | | | |
|----------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------------|----------|
| Fecha | Productor | Bionativa | Bayer | Tavan | Stoller |
| 14-may. | | Nacillus | Agrocopper | Wert + Ph4 | Kocide |
| 17-may. | Nordox | | | | |
| 23-may. | | Kocide | | | Kocide |
| 33-may. | | Kocide | | | |
| 05-jun. | Nordox | Kocide | | | Kocide |
| 13-jun. | | Kocide | | | Kocide |
| 20-jun. | | Nacillus | | | |
| 4-jul. | Nordox | | | | |
| 10-jul. | | Nacillus | | | Kocide |
| 31-jul. | | | | Wert + Ph4 | |
| 9-ago. | | Kocide | | | |
| 14-ago. | | Nacillus | | | |
| 20-ago. | Nordox | | | | |
| 27-sep. | | Nacillus | | | |
| 8-oct. | | | | Bactofus-V6-Ph4 | |
| 17-oct. | | | | Bactofus-V6-Ph4 | |
| 30-oct. | | | | | Rezist |
| 06-dic. | | | | | Rezist |
| | | | | | |
| Nº aplicaciones | 5 | 10 | 11 | 4 | 7 |

Esta temporada, cuando se incorporó el tratamiento Testigo Absoluto, los resultados obtenidos fueron como se señala a continuación.

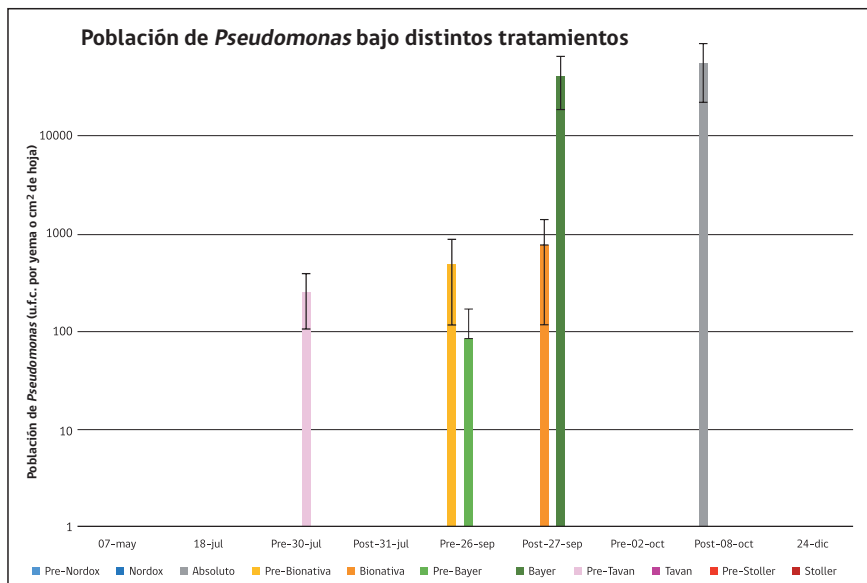


Figura 2. Poblaciones bacterianas fluorescentes, en tratamientos preventivos de la temporada 2018 - 2019.

Como se muestra en la Figura 2, en mayo y junio, no se detectó presencia de la bacteria, para ningún tratamiento. A partir de los resultados que se muestran en la Figura 2, se pueden destacar las siguientes observaciones:

- En julio se tuvo una detección pre aplicación de un nivel bajo de inóculo (250 u.f.c./yema).
- En septiembre sólo se detectó 500 y 83 u.f.c./yema, en algunos tratamientos, niveles tan bajos que, incluso en el testigo absoluto no hubo registros.
- En septiembre post-aplicación de los tratamientos de BioNativa y de Bayer se detectaron 750 y alrededor de 30.000 u.f.c./flor, respectivamente. Los niveles del testigo absoluto alcanzaron alrededor de 30.000 u.f.c./flor.
- En septiembre, post aplicación, se registraron 750 y 41.000 u.f.c./cm², por yema, para los programas de Bio- Nativa y Bayer, respectivamente.
- En octubre sólo el testigo absoluto mostró 55.200 u.f.c./cm² de hoja.

Para la última temporada de evaluación, los recuentos bacteriales post-aplicación comenzaron en mayo 2019, estos se tomaron cada 15 días, después de la aplicación de los tratamientos que se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Programas de muestreos y aplicaciones de tratamientos para cáncer bacterial. Temporada 2019 - 2020.

| Programas fitosanitarios 2019/20 | | | | | |
|----------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------------|----------|
| Fecha | Productor | Bionativa | Bayer | Tavan | Stoller |
| 18-mar. | Nordox | | | | |
| 27-mar. | | Nacillus | Agrocopper | | |
| 3-abr. | | Kocide | | Wert + Ph4 | Kocide |
| 9-abr. | | Kocide | Serenade | | Kocide |
| 15-abr. | Nordox | | | | |
| 7-may. | | Kocide | Agrocopper | | Kocide |
| 3-jun. | Nordox | Kocide | Serenade | | Kocide |
| 10-jun. | Nordox | | | | |
| 26-jun. | | Kocide | Agrocopper | | |
| 15-jul. | Nordox | | | | |
| 18-jul. | | | Serenade | | |
| 7-ago. | | | Agrocopper | | |
| 12-ago. | Nordox | | | | |
| 14-ago. | | Mamull | Serenade | Wert + Ph4 | |
| 3-sep. | | Mamull | Agrocopper | | |
| 10-sep. | Nordox | | | | |
| 24-sep. | | | Agrocopper | | |
| 2-oct. | | Nacillus | Serenade | | |
| 9-oct. | | | | Bactofus-V6-Ph4 | |
| 23-oct. | | Nacillus | | Bactofus-V6-Ph5 | Rezist |
| 20-nov. | | | | | Rezist |
| 24-dic. | | | | | Rezist |
| Nº aplicaciones | 7 | 10 | 11 | 4 | 7 |

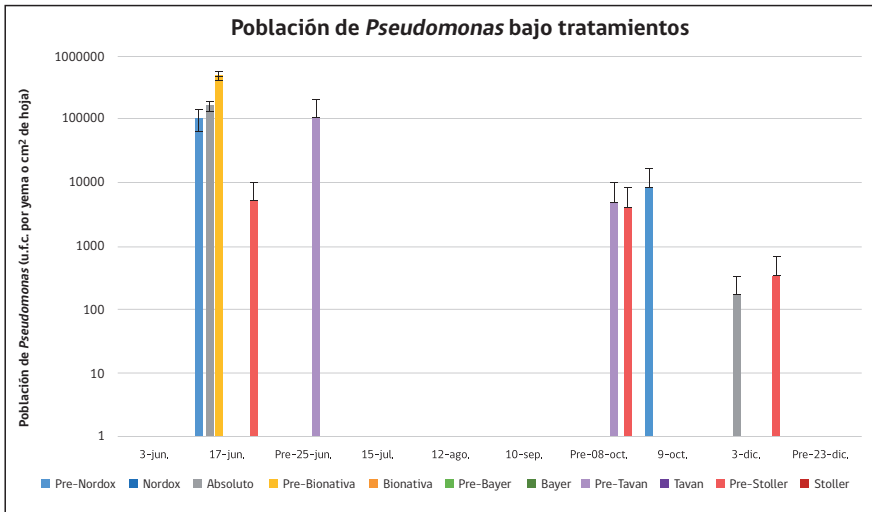


Figura. 3.- Poblaciones bacterianas fluorescentes, en tratamientos preventivos de la temporada 2019 - 2020.

- De los recuentos de *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* para la temporada 3 de ensayos, se detalla:
- Como se muestra en la Figura 3, la bacteria apareció en el mes de junio, antes de los tratamientos, con niveles de entre 5.000 y 49.000 u.f.c./yema.
- No hubo detección, a nivel de laboratorio, entre julio y septiembre.
- En octubre, previo a los tratamientos, se registraron entre 4.000 y 8.000 u.f.c./cm² de hoja. Estos son niveles muy bajos, atribuible, además de los tratamientos preventivos, a las condiciones climáticas que caracterizaron la temporada.
- En diciembre se detectan poblaciones muy bajas, de entre 175 a 350 u.f.c./cm² de hoja.

Conclusiones

La carga bacteriana depende de las condiciones climáticas imperantes y los oportunos tratamientos de control de la población.

Después de los tratamientos al follaje, desde inicios de caída de hojas, entre marzo y mayo, parece impropiciente realizar tratamientos en junio, por

la baja carga bacteriana registrada en esta investigación, durante las tres temporadas.

Lo recomendable es enviar muestras de ramillas a laboratorios que tengan la capacidad de hacer recuentos bacterianos, para saber cuándo, bajo las condiciones de cada predio y de cada temporada, se registra el alza poblacional de la bacteria, para comenzar el programa de prevención.

Resulta recomendable considerar el uso de controladores biológicos, para complementar la acción de las sales de cobre en el control de la enfermedad.

Curación de canchros

Existen prácticas culturales que permiten disminuir el grado de presión de las enfermedades dentro del huerto. Por ejemplo, comenzar la plantación con árboles sanos desde el vivero, evitar daños mecánicos, controlar apropiadamente las malezas, controlar el riego, para evitar estrés de la planta y tratar preventivamente los agentes causales, permite mantener a bajos niveles el inóculo de los patógenos.

No obstante, en la práctica, esta situación no siempre es fácil de conseguir y mantener a través del tiempo. Por ejemplo, daños de conejo, cortes de poda mal sellados, incisiones para inducir brotación de yemas mal selladas, y otros, son factores difíciles de controlar. Por esto, es frecuente tener presencia de canchros producidos por *Pseudomonas* spp. en huertos jóvenes y, especialmente, en la medida que avanzan en edad.

Las bacterias causantes de esta enfermedad se encuentran en el ambiente, y en la superficie de la planta, sobreviviendo de manera epífita, es decir, utilizando al árbol como albergue, sin causarle daño. Condiciones climáticas, como las heladas de invierno favorecen la penetración del inóculo, iniciando el proceso de patogénesis. También aberturas expuestas, como la cicatriz que deja la hoja al caer en otoño, o la acción mecánica de una rama, que, naturalmente o inducida por prácticas de manejo, sufre resquebrajaduras en el ángulo de inserción, dan la posibilidad a la bacteria de infectar. El desarrollo del patógeno en la madera termina produciendo una muerte del tejido, el que deja de crecer y se invagina a medida que el resto del tejido sano sigue creciendo, formando los que se conoce como canchros (ver capítulo 1, ciclo de la enfermedad).

La primera manifestación del problema es un cambio de coloración en la zona afectada (Figura 1A). A comienzos de primavera se observa exudación de goma de color ambarino a pardo (Figura 1B). Un nivel más avanzado de la enfermedad se manifiesta con la resquebrajadura de la corteza (Figura 1C). Si este daño involucra un alto porcentaje del perímetro de la rama o del tronco afectado, el órgano termina por morir.

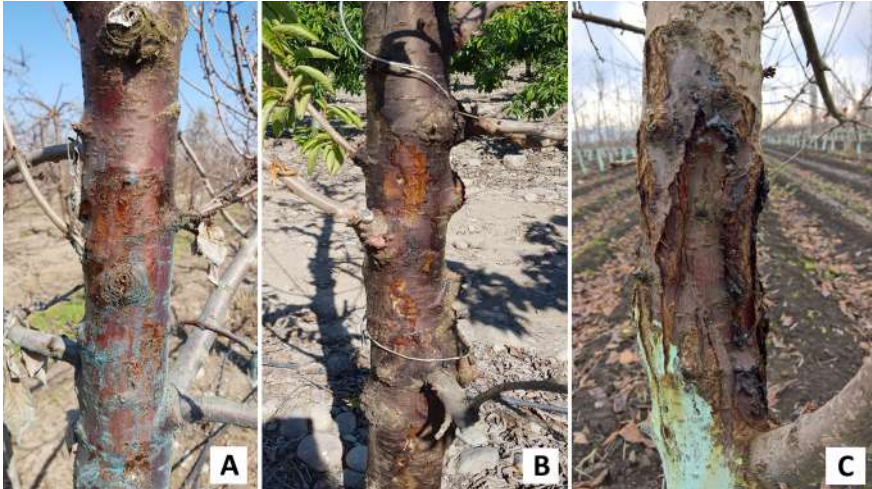


Figura 1. A) Cambio de color en la madera B) comienzo exudación de goma color ámbar oscuro C) quebradura de corteza y formación del cancro.

Pseudomonas syringae pv. *syringae* causa canchros en árboles frutales, como el cerezo, el durazno y el ciruelo. Estos, son limitantes para el desarrollo de la planta, su producción y calidad de la fruta, pues la madera infectada sufre interrupción del flujo de nutrientes y agua, provocando un efecto similar al de un violento “anillado”.

Un efectivo manejo de la enfermedad comienza con ayudar a la defensa de la planta a través de la eliminación de madera muerta o dañada, procurando así que el árbol prolongue lo más posible su vida, sin que se afecte la producción de fruta. Este procedimiento debe realizarse a fines de primavera, a comienzos de verano. Consiste en la remoción del tejido afectado, asegurándose que lo que permanece intacto no está contaminado con la zona de avance de la enfermedad (Figura 2).



Figura 2. Proceso de remoción de cancos presentes en el tronco.

Estudio de curación de cancos

Durante tres temporadas se comparó el efecto de distintos tratamientos, tendientes a eliminar el foco infeccioso. Se escogieron plantas con sintomatología de cáncer bacterial, específicamente con cancos visibles en el eje y ramas madres. Los cancos fueron extraídos con una sierra manual y, de inmediato, eliminados del campo. Los tratamientos consistieron en la aplicación de distintas formulaciones de productos en la zona que quedó descubierta después de la remoción del cancro (Cuadro 1). La curación fue realizada durante el mes de noviembre. Con una frecuencia de 15 días, se realizó un seguimiento a cada curación, evaluando el porcentaje de secado de la herida, el color de gosis y la abundancia de ésta. El porcentaje de secado fue determinado como el área de la herida seca respecto al área total de la herida.

Cuadro 1. Detalle de los tratamientos aplicados.

| Nombre Comercial | Composición | Dosificación |
|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Strepto Plus®/ Pasta poda | Estreptomicina | 60 g/L |
| Caldo bordelés WP/Agua | Sulfato cúprico | 120 g/L |
| Coraza® | Microorganismos colonizadores | Aplicación directa |
| Fitosil® | Extracto de Amaryllidaceas y Poaceas | Aplicación directa |
| Kanker® | Cu, Mn, Zn | Aplicación directa |
| Rezist®/pasta poda | Cu, Mn, Zn | 1 Litro Rezist/1L pasta poda |
| Control | ----- | ----- |

En la experiencia de la temporada 2017-18, el tratamiento control, consistente en la sola extirpación del cancro, sin posterior protección, mostró presencia de goma sin cicatrización, clara demostración de que la infección estaba activa.

Los mejores tratamientos resultaron ser el que incluye Coraza® y el que combina Strepto - Plus® con pasta sellante de poda. Se observó sellado del cancro, aunque a veces la exudación de goma persistió. Pero, la goma transparente o blanquecina constituye una señal de reacción a la herida, más no a la presencia activa de la bacteria.

El tratamiento con caldo bordelés indujo la mayor reaparición de goma de color oscuro, demostración de la reactivación de dichos cancos.

En la temporada 2018-19, cuando se realizaron dos ensayos en diferentes localidades, los tratamientos "control" tuvieron un comportamiento similar al de la temporada anterior.

El mejor sellado, evaluado a las tres semanas, se obtuvo con Coraza® y Kanker®. En un nivel ligeramente inferior se observó el comportamiento de Fitosil® y Strepto - Plus® + pasta poda (Figura 3A), mientras que productos basados en cobre, como Caldo Bordelés y Rezist®, disminuyeron el secado del cancro, incluso, por debajo de lo observado en el tratamiento control.

En la temporada 2019-20, en la variedad Bing, se repitieron los tratamientos, observándose un comportamiento similar a las temporadas anteriores. Después de 20 días posterior a la aplicación, el porcentaje de secado fue incrementado hasta un 70 a 90%, por varios tratamientos, a excepción del Caldo bordelés y Rezist® + pasta poda (40 a 50%), los cuales también presentaron un alto nivel de gomosis (Figura 4). Estas diferencias se mantuvieron en el tiempo, sin embargo, el testigo presentó una disminución progresiva del porcentaje de secado alcanzando 60% después de 100 días de la aplicación, sin diferenciarse estadísticamente de los demás tratamientos (Figura 3B). Después de 100 días de efectuada la aplicación, los tratamientos que mostraron mejor respuesta respecto del secado de la herida fueron Coraza®, Kanker® y Strepto plus® con pasta poda.

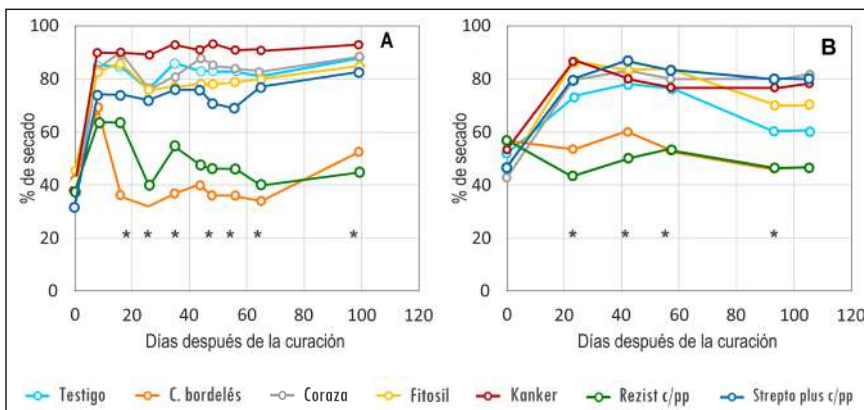


Figura 3. Evolución del porcentaje de secado observado en cada tratamiento durante la temporada 2018-2019 (A) y 2019-2020 (B).

Con respecto al color de la goma, este no estuvo asociado al porcentaje de secado, sin embargo, tuvo una tonalidad más oscura en los tratamientos que generaron un alto nivel de gomosis como el caso del Caldo bordelés y Rezist® + pasta poda (Figura 4).

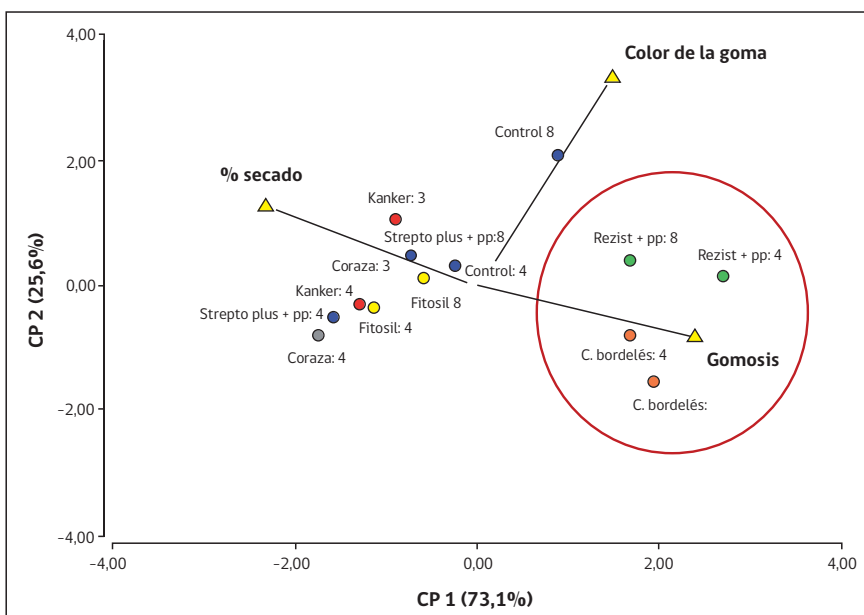


Figura 4. Análisis de componentes principales para determinar la asociación entre los distintos tratamientos y las tres variables evaluadas (4 y 8 indica el huerto evaluado)



Figura 5. Efecto sellante tratamiento en 120 días Coraza®. 0, 5, 60, 120 días y 1 año.



Figura 6. Efecto sellante tratamiento en 120 días Strepto plus® + Pasta poda. 0, 5, 60, 120 días y 1 año.



Figura 7. Efecto sellante tratamiento en 120 días Caldo bordelés®. 0, 5, 60, 120 días y 1 año.



Figura 8. Efecto sellante tratamiento en 120 días Rezist® +pasta poda. 0, 5, 60, 120 días y 1 año.



Figura 9. Efecto sellante tratamiento en 120 días Fitosil®. 0, 5, 60, 120 días y 1 año.



Figura 10. Efecto sellante tratamiento en 120 días KANKER®. 0, 5, 60, 120 días y 1 año.





Figura 11. Efecto Testigo, sólo con la remoción de la madera dañada. 0, 5, 60, 120 días y 1 año.

La consistencia encontrada en estos trabajos permite concluir lo siguiente:

Los cancos deben tratarse apenas se comienzan a manifestar, a través del proceso de extirpación y sellado con un producto o mezcla competente.

- La sola extirpación detiene la producción de goma por el período de verano. Sin embargo, el cancro se reinicia durante el otoño o el invierno siguiente.
- Los productos en base a cobre, aparentemente provocan una reacción fitotóxica que se manifiesta con una mayor producción de goma, respecto
- los otros tratamientos evaluados.

En nuestros ensayos sobresalieron Coraza®, Kanker® y Strepto - Plus® más pasta poda.

- Si bien la recomendación es atacar el cancro en sus primeras manifestaciones, se observó respuesta, incluso en casos de cancos de
- gran tamaño y muy activos, al momento de intervenir.

Un alto porcentaje de los cancos bien tratados se mantienen sanos, a lo menos, dos temporadas más, como se observó en los tratamientos exitosos

- de la primera temporada, cada vez que se evaluaron a salidas de invierno.

Bibliografía

Lemus, G., Osorio V. y A. France. 2019. Cáncer bacteriano en cerezos: opciones de control de cancos. *Informativo N° 67*. Rengo, Chile: INIA Rayentué.

Olson, B. and A. Jones. 1985. Reductions *pseudomonas syringae* pv *morsprunorum* on Montrnorency soyrr cherry with copper and dynamics of the copper residues.

Capítulo 7.

Oportunidades para la mejora genética del cerezo dulce

José Manuel Donoso C.

Ingeniero Agrónomo M.Sc. Dr./ INIA Rayentué
jdonoso@inia.cl

La fruticultura moderna debe conciliar los crecientes requerimientos productivos, con la preservación de los recursos naturales y el cuidado medioambiental. Esta situación ha puesto de manifiesto necesidad de incorporar estrategias genéticas y biotecnológicas, con la finalidad de desarrollar las variedades frutales del futuro, las que puedan promover una agricultura sustentable, mediante la incorporación de resistencia natural ante plagas y enfermedades.

Antecedentes

La mejora genética, como parte de las ciencias biológicas, puede ser definida como “la aceleración y guía de la evolución de especies de interés, por y para el ser humano”. El mejoramiento genético es un proceso gradual, que utiliza los mismos principios que la naturaleza (mutación, recombinación, selección, poliploidización, interhibridación, entre otros), para incorporar o aumentar rasgos deseados y, por el contrario, disminuir o eliminar caracteres perjudiciales para el cultivo o indeseados por el hombre.

Mejora genética del cerezo diversidad y origen

Existen más de 30 especies de cerezo, en su mayoría nativas de Europa y Asia. Entre ellas, dos son ampliamente cultivadas por sus frutos: el cerezo dulce (*Prunus avium* L.) que se produce en más de 50 países, principalmente para consumo fresco y el cerezo agrio o guindo ácido (*P. cerasus* L.) que se cultiva mayormente en el hemisferio norte con fines industriales. Una tercera especie *P. fruticosa* es minoritariamente conocida y cultivada en algunos países de Europa como Rusia, siendo también utilizada como portainjerto, al igual como ocurre con algunas accesiones silvestres de *P. avium* conocidas como Mazzard, y las

especies silvestres *P. mahaleb* y *P. canescens*, entre muchas otras, dónde podría estar el acervo genético para incorporar la resistencia genética a enfermedades como el cáncer bacterial.

El origen geográfico de una especie cultivada en particular, es de profundo interés para la mejora genética, ya que en esos ambientes se encuentra el 'pool' genético que se ha perdido durante la domesticación y posterior proceso de selección genética. De hecho, el 'pool' genético del cerezo dulce cultivado actualmente, presenta un alto grado de consanguineidad, lo que significa que estos genotipos/cultivares modernos provienen de un pequeño conjunto de padres fundadores (Choi y Kappel, 2004), y estos mismos cultivares, provienen de unas pocas generaciones desde sus ancestros silvestres (Iezzoni et al., 2000). Esta característica dificulta el mejoramiento, pero, es un desafío científico que convoca a numerosas instituciones, públicas y privadas, en el mundo.

El inicio de la mejora "moderna" en América se remonta a los primeros colonos que trajeron semillas y estacas desde Europa, trasladándolas, posteriormente, en su proceso de colonización hacia el Oeste norteamericano. En particular, a mediados de 1800, los hermanos Lewelling viajaron de Iowa a Oregón con numerosos cerezos injertados. Seth Lewelling se interesó en cultivar plántulas de cerezo para su uso como polinizadores y para la selección de cultivares prometedores. De estas plántulas, seleccionó 'Bing', que sigue siendo una importante variedad en diversos lugares del mundo, incluido Chile, siendo, además, una de las variedades más importantes del mundo durante el siglo XX. Otros cultivares importantes que surgieron de este trabajo, son "Lambert" y "Republican", que también siguen siendo utilizadas, principalmente como polinizadores, en parte de Estados Unidos.

Diversas iniciativas de mejora genética del cerezo comenzaron en el hemisferio norte, siendo llevadas a cabo por institutos de investigación o por universidades. Muchos de ellos, corresponden a programas de larga data, como es el caso de algunos países de Europa del Este o Canadá, donde los mejoradores actuales han continuado el trabajo iniciado muchas décadas atrás. Con éxitos como, por ejemplo, la primera variedad comercial auto-compatible ('Stella').

Objetivos del mejoramiento genético actual

Se pueden definir tres grandes objetivos del mejoramiento genético del cerezo: calidad del producto (fruta y planta), adaptación medioambiental (flexibilidad biológica) y reducción de costos para los productores (productividad/costos). A

su vez, cada programa se sitúa en un contexto agroclimático y temporal que repercute en ciertas especificidades de cada iniciativa: Chile debe poner énfasis en resistencia a cáncer bacterial, los desórdenes fisiológicos y la conservación poscosecha. Sin embargo, existen un conjunto de objetivos que comparten la mayoría de los programas de mejoramiento genético del mundo:

Calidad de la fruta: Tamaño, firmeza, sabor y dulzor. El tamaño de la fruta influye en la percepción del consumidor asociado a una alta calidad, por lo que es un factor determinante del precio del producto.

Extensión del periodo de cosecha: La oferta de cerezas se ha concentrado en un breve período de tiempo y en una zona geográfica particular. Variedades desarrolladas en los últimos años han posibilitado la ampliación de la oferta en ambos extremos de la temporada.

Precocidad y productividad: la producción frutícola moderna requiere un rápido retorno de la inversión, variedades precoces y productivas son indispensables para conseguir este objetivo. El cerezo requiere un periodo juvenil que va desde los (2)3-7 años.

Autocompatibilidad: uno de los principales objetivos y, a la vez, uno de los mayores logros del mejoramiento genético del cerezo ha sido el desarrollo de variedades auto-compatibles (no requieren de polen de otras variedades para completar el proceso de fecundación, cuajado y desarrollo del fruto de forma efectiva).

Resistencia a la partidura de la fruta: cada año se registran inmensas pérdidas económicas cuando llueve durante el período de cosecha. La resistencia a la partidura es un objetivo recurrente de los programas. Algunas variedades han mostrado una cierta tolerancia a la partidura como: 'Summit', 'Regina', y 'Lapins'.

Resistencia a plagas o enfermedades: es uno de los objetivos que ha tomado más relevancia en los últimos años, debido al aumento de exigencias con el uso de agroquímicos en los mercados internacionales y al incremento de la conciencia ambiental entre los consumidores. Nuevas variedades con resistencia natural ante plagas y enfermedades son una necesidad en ciernes para la industria moderna del cerezo.

Mejora genética para enfermedades

En cerezo, el trabajo de los mejoradores para desarrollar variedades resistentes a enfermedades se ha centrado en: podredumbre parda (*Monilinia laxa*), cilindrosporiosis (*Blumeriella jaapii*), podredumbre de la corona de la raíz (*Phytophthora spp.*) y la causada por *Pseudomonas spp.*, conocidas como cancro o cáncer bacteriano (Sansavini and Lugli, 2008). Esta última es la de mayor incidencia en nuestro país, así como en Alemania y otros países del Centro-Norte de Europa, donde la gravedad del ataque bacteriano a menudo se ve reforzada por las heridas que sufren las plantas con las heladas invernales, granizo y cortes de poda, incluida la poda de raíces. La caracterización y etiología de esta enfermedad se presenta en detalle en el capítulo 1, situación del cáncer bacteriano en Chile.

Mejora genética para Cáncer bacteriano (*Pseudomonas spp.*)

La introducción de resistencia para la bacteria *Pseudomonas spp.*, en variedades cultivadas de cerezo, es un rasgo altamente deseado y que ha formado parte de los objetivos de diferentes programas de mejora genética en las últimas décadas (Quero-García et al., 2018).

Lamentablemente, hasta el día de hoy la incidencia de esta enfermedad afecta gravemente la producción de cerezos dulces en importantes centros productivos a escala mundial, incluido Chile.

Se ha determinado que dos patovares de *P. syringae* son responsables de la enfermedad: *P. syringae* pv. *morsprunorum* (Psm) y *P. syringae* pv. *syringae* (Pss). El primero de ellos, Psm, muestra una mayor relevancia en UK, mientras que en Chile actualmente prevalece el pv. *syringae* (Pss). Por el contrario, en Europa, USA y Sudáfrica, ambos patovares y un conjunto de formas intermedias son responsables de la enfermedad. Por tal razón, y coincidiendo con que la mayoría de esfuerzos en mejoramientos genéticos han sido llevados a cabo en el hemisferio norte: determinando la susceptibilidad/tolerancia/resistencia de variedades comerciales (Allen and Dirks, 1977) y accesiones silvestres (Vicente et al., 2004) a la enfermedad; poniendo a punto un protocolo para la evaluación in vitro de la respuesta a la inoculación artificial (Bedford et al., 2003; MgBechi-Ezeri, et al., 2018) y, desarrollando las primeras variedades que han mostrado resistencia en campo, 'Mermet' y 'Inge' (Jayasankar, S. y F. Kappel, 2011).

Considerando lo anterior, el mejoramiento genético moderno del cerezo puede utilizar el germoplasma identificado como resistente en la misma especie (intraespecífico), siguiendo por ejemplo el esquema propuesto en la Figura 1, en el cual se propone la utilización de un parental resistente a la enfermedad y un segundo parental, capaz de entregar excelentes caracteres de calidad de fruta a la progenie, así, pueden ser desarrolladas múltiples familias genéticas, donde se identificarán los mejores individuos para los rasgos primarios de mejora (productividad; calidad de fruta, condición viajera); luego, identificando en ellos, los que presentan la mejor condición de resistencia a la enfermedad, es posible combinar lo deseado por el consumidor y lo necesitado por el productor, una variedad resistente con buenos retornos económicos.

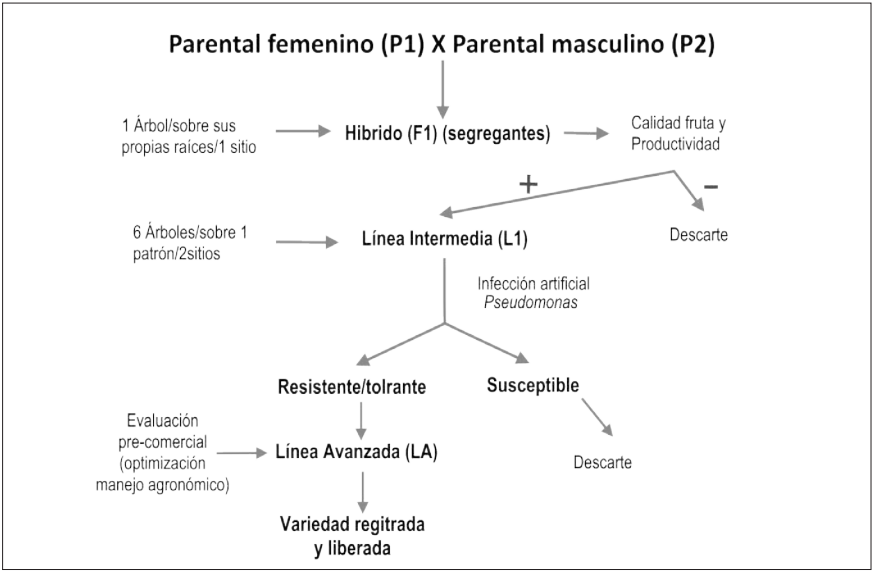


Figura 1. Flujo de un programa de mejoramiento genético para la obtención de variedades resistentes a *Pseudomonas* spp.

Al mismo tiempo que puede ser buscada la resistencia natural en el acervo ('pool') genético de la misma especie, es posible utilizar el cruzamiento entre dos especies cercanas genéticamente, para la búsqueda de la introgresión de resistencia a enfermedades de forma robusta en plantas cultivadas. Una forma dinámica de enfrentar éste gran desafío biológico en especies leñosas es la introgresión mediada por marcadores moleculares, utilizando como base la identificación de un híbrido interespecífico fértil desarrollado anteriormente;

como, por ejemplo, para el desarrollo de portainjertos, donde se utiliza la sinergia genética que se produce al cruzar individuos de especies diferentes, para lograr objetivos de rusticidad y resistencia. Luego, el híbrido se retrocruza con un parental de la especie cultivada, buscando desarrollar una primera familia de retrocruzamiento o 'Back Cross 1 (BC1)', buscando individuos con gran parte del genoma de la especie cultivada y los genes responsables de la resistencia otorgada en algunos descendientes de este primer retrocruzamiento. Para la generación de una familia posterior, es decir, el segundo retrocruzamiento o 'Back Cross 2', es posible utilizar aquellos individuos con los genes deseados y alta calidad de fruta como parental de las futuras variedades (Figura 2). El trabajo en extenso que provee la información original para el desarrollo de la estrategia anteriormente propuesta se encuentra en Serra et al. (2016).

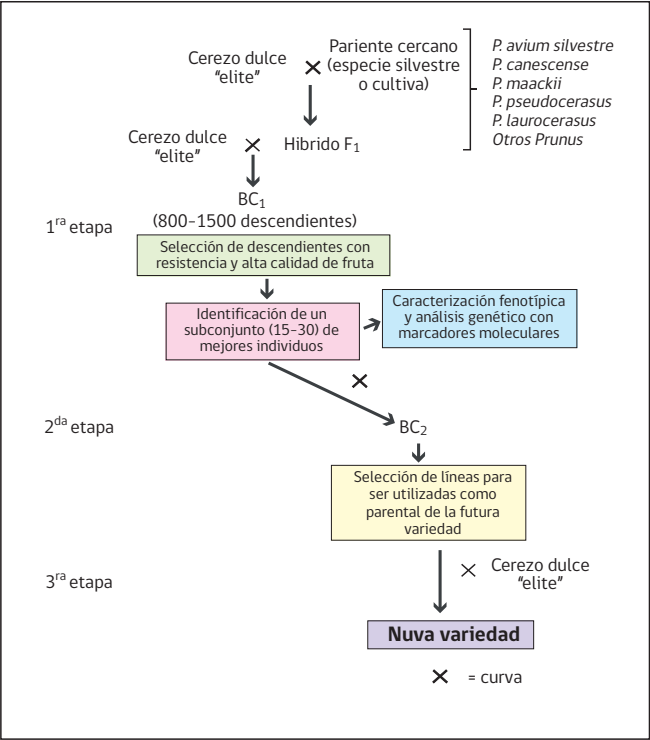


Figura 2. Esquema de mejora genética para la introducción de caracteres complejos desde especies relacionadas al cerezo dulce (adaptado de Serra et al., 2016).

Nuevas aproximaciones para la mejora genética de estreses bióticos

El camino de la ciencia y las revoluciones tecnológicas han permitido grandes avances en el conocimiento biológicos en las últimas décadas. La secuenciación de los primeros genomas vino a coronar una serie de descubrimientos y desarrollos tecnológicos de gran magnitud, situación que ha puesto a la humanidad en la disyuntiva ética de la capacidad de modular la vida misma, incluso su propia especie.

La revolución de la edición génica a manos de 'CRISPR/cas9', en conjunto con la secuenciación del genoma del cerezo (Shirasawa et al., 2017), cambiará; sin duda, la forma que concebimos la mejora genética, ya que permite alterar la unidad básica de la información genética de una forma nunca antes conocida. Por tal razón, los programas de mejora genética del cerezo que triunfen en las próximas décadas, serán aquellos que incluyan prematuramente las herramientas modernas de mejora; que ya se utilizan con éxito en otras especies vegetales de mayor relevancia alimentaria, conjuntamente con el conocimiento de mejora clásica, permitirán proveer de las nuevas variedades que se requerirán.

Referencias

Choi C., and F. Kappel (2004) Inbreeding, Coancestry, and Founding Clones of Sweet Cherries from North America. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129 (4).

Iezzoni A, Schmidt H, Albertini A (1990). Cherries (*Prunus*). In: Moore JN, Ballington JR Jr (eds) *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*, vol 1. pp 111-173.

Iezzoni A. (2008). Cherries. In: Hancock J.F. (Ed). *Temperate Fruit Crop Breeding*. Springer, New York, pp 151-175.

Jayasankar,S. and Kappel,F. (2011) Recent advances in cherry breeding. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 5, 63-67.

MgBechi-Ezeri, et al., (2018) Development of a protocol to phenotype sweet cherry (*Prunus avium L.*) for resistance to bacterial canker. *Crop protection* 112: 246 - 251.

Sansavini, S. & Lugli, S. (2008) Sweet cherry breeding programs in Europe and Asia. *Acta Hort.* 795, 41-58.

Serra, O. et al. (2016) Marker-assisted introgression (MAI) of almond genes into the peach background: a fast method to mine and integrate novel variation from exotic sources in long intergeneration species. *Tree Genet. Genomes* 12, 96.

Shirasawa K, et al. (2017) The genome sequence of sweet cherry (*Prunus avium*) for use in genomics-assisted breeding. *DNA Res.* 2017; 24(5):499-508.