

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°: 7219

TIPO DE BECA Doctoral 1er AÑO (ex Estudio 1er. año)
31/03/2017

PERIODO 01/04/2016 -

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: SÁNCHEZ

NOMBRES: María Clara

Dirección Particular: Calle:

Localidad: Mar del Plata CP: 7600 Tel:

*Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):
maclarasanchez@gmail.com*

2. TEMA DE INVESTIGACION (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Detección y caracterización de aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* en plantaciones de kiwi de la provincia de Buenos Aires.

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) Actinidia deliciosa Cancro bacteriano del kiwi
Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DOCTORAL 1º AÑO (ex ESTUDIO 1º AÑO): *Fecha inicio:* 01/04/2016

BECA DOCTORAL 2º AÑO (ex ESTUDIO 2º AÑO): *Fecha inicio:*

BECA DOCTORAL 3º AÑO (ex PERFECCIONAMIENTO 1º AÑO): *Fecha inicio:*

BECA DOCTORAL 4º AÑO (ex PERFECCIONAMIENTO 2º AÑO): *Fecha inicio:*

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Mar del Plata

Facultad: Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento: Dpto. Producción Vegetal, Suelos e Ingeniería rural

Cátedra: Patología Vegetal

Otros: Unidad Integrada Balcarce (FCA, UNMDP - EEA INTA Balcarce)

Dirección: Calle: Ruta 226 km 73.5 N°: CC276

Localidad: Balcarce CP: 7620 Tel: 02266 439 100

5. CARGO UNIVERSITARIO (si existe, especificar categoría, dedicación, condición de ordinario, regular o interino):

Docente adscripta Cátedra Patología Vegetal, dedicación simple, interino (OCA n°1652/16)

6. CARGOS EN OTRAS INSTITUCIONES:

7. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Ridao, Azucena del Carmen

Dirección Particular: Calle:

Localidad: Balcarce CP: 7620 Tel:

Dirección electrónica: ridao.azucena@inta.gob.ar

8. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Durante primavera y otoño de 2016 se monitorearon 16 plantaciones de kiwi del norte y sudeste de la provincia de Buenos Aires. Se recolectaron 200 muestras de hojas, brotes y flores, de órganos con síntomas y asintomáticos, y se obtuvieron 196 aislamientos bacterianos. Las características bioquímicas y metabólicas de los aislamientos se evaluaron a través de las pruebas: Reacción de Gram, prueba de Óxido/Fermentación y producción de levan y de pigmentos fluorescentes. La identidad de los aislamientos cuyas características coincidían con las de *Pseudomonas syringae* fue confirmada mediante PCR. Para diferenciar los patovares *syringae* y *actinidiae* (*Psa*) se realizó una PCR-duplex que amplifica segmentos específicos para *Psa*. De los 196 aislamientos, 80 fueron Gram negativos y aeróbicos y se seleccionaron como *Pseudomonas spp.*. Veinticuatro aislamientos fueron elegidos como *P. syringae* y se sometieron a PCR-duplex. Todas las reacciones resultaron negativas, por lo que *Psa* estuvo ausente en las muestras analizadas.

9. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Actividades desarrolladas

*Toma de muestras: Durante primavera y otoño de 2016 se monitorearon plantaciones de kiwi ubicadas al norte y sudeste de la provincia de Buenos Aires. El monitoreo consistió en un recorrido sistemático y completo de cada lote, siguiendo un diseño en forma de "U". Se observaron la totalidad de las plantas de un interfilas cada tres, y se tomó una muestra de una planta cada diez de la fila izquierda. Se colectaron muestras de hojas, brotes y flores, considerando aquellos órganos que presentaban síntomas como también los que eran asintomáticos. Todas las muestras fueron acondicionadas en el laboratorio para su análisis.

Durante abril y mayo se tomaron muestras de ocho plantaciones: dos pertenecientes al partido de La Plata, cinco de Gral. Pueyrredón y una de Balcarce. Durante octubre y noviembre se visitaron trece plantaciones: dos ubicadas en La Plata, tres del partido de Gral. Alvarado, siete de Gral. Pueyrredón y una de Balcarce.

*Aislamiento del patógeno: Los aislamientos se realizaron desde extractos de tejido vegetal por dilución seriada a la décima sobre Agar Nutritivo Sacarosa (ANS). Las placas se incubaron durante dos días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y las colonias fueron repicadas nuevamente sobre los medios ANS y King B (KB). Sobre el medio ANS se observaron características macroscópicas de las colonias, tamaño, forma, agrupamiento y producción de Levan. Sobre el medio de cultivo KB se evaluó la producción de pigmentos fluorescentes de las colonias.

Se obtuvieron 196 aislamientos bacterianos que provenían tanto de muestras de órganos con síntomas como asintomáticos, colectadas en las distintas plantaciones visitadas en otoño y primavera. Los síntomas correspondieron a manchas pequeñas, necróticas y angulares en las hojas, algunas con presencia de halo clorótico, botones florales con manchas necróticas y acuosas en los sépalos, tizón de flores y pétalos necrosados.

*Identificación preliminar: Las características bioquímicas y metabólicas de todos los aislamientos bacterianos se evaluaron a través de las pruebas bioquímicas y fisiológicas: Reacción de Gram, basada en solubilidad en hidróxido de potasio (KOH) 3%, prueba de Óxido/Fermentación (test de Hugh y Leifson) y presencia de la enzima Citocromo Oxidasa.

Para todos los aislamientos se llevaron a cabo la Reacción de Gram y la prueba de Óxido/fermentación, lo que permitió una primera clasificación de los mismos.

*Determinación por PCR: La identidad de los aislamientos cuyas características bioquímicas y fisiológicas coincidían con las de la especie *Pseudomonas syringae* fue confirmada mediante PCR. Para diferenciar los patovares *syringae* (Pss) y *actinidiae* (Psa) se realizó una PCR-duplex propuesta por Gallelli et al. (2011), que amplifica segmentos específicos para Psa. La reacción utiliza dos pares de iniciadores dirigidos a distintas regiones cromosómicas (KN-F/R, obtenido por análisis de RAPD y RFLP, y Avr/DdxF/R para la secuencia del gen AvrD1).

Resultados y discusión

Las bacterias del género *Pseudomonas* se diferencian mediante las pruebas LOPAT: producción de Levan, reacción de la enzima Citocromo Oxidasa, podredumbre de Papa, Arginina dehidrolasa y reacción de hipersensibilidad en Tabaco (Goszczyńska et al., 2000). Takikawa et al. (1989) y Scortichini (1994) identifican a Psa y Pss con un perfil LOPAT (+---+). Estas pruebas son suficientes para una primera caracterización de los aislamientos, pero insuficientes para discriminar Psa de Pss. Ferrante y Scortichini (2009) y Everett et al. (2011) entre otros, describen la morfología de las colonias de Psa en medio ANS como: lisas, convexas, redondas de borde definido, nacaradas de color blanquecino. *P. marginalis* presenta un perfil LOPAT (++++-), mientras que *P. viridiflava* (--+-) (Mansilla y Abelleira, 1999; Gonzales y Rodicio, 2007). Las colonias de esta última especie son blanco-amarillas, medianas y mucoides, con centros verde oscuros en medio ANS (Wilkie et al., 1973; Balestra y Varvaro, 1997).

De los 196 aislamientos obtenidos, 80 fueron Gram negativos y de reacción oxidativa (o aeróbicos) por lo que se seleccionaron como posibles *Pseudomonas* spp. (Goszczyńska et al., 2000). Los aislamientos que presentaron producción de levan en medio ANS y fueron fluorescentes o no en medio KB, se eligieron como posibles *P. syringae* (Takikawa et al., 1989; Scortichini, 1994). La fluorescencia no fue utilizada como criterio de clasificación, ya que a nivel mundial se han citado cepas de Psa fluorescentes y no fluorescentes en KB (Everett et al., 2011; Vanneste et al., 2011; Froud et al., 2015). Veinticuatro de los 80 aislamientos, que provenían de las muestras recolectadas en otoño, presentaron características de las colonias coincidentes con lo citado para Psa (Ferrante y Scortichini, 2009; Everett et al., 2011; EPPO, 2014). Éstas eran color grisáceo, nacaradas, convexas, redondas, de borde definido. Los 24 aislamientos bacterianos elegidos como posibles *P. syringae* fueron sometidos a PCR-duplex para confirmar si se trataba de aislamientos de Psa. Se utilizó como templado colonias lisadas y se incluyeron un control positivo de ADN de Psa y un control negativo (sin templado). Todas las reacciones resultaron negativas, es decir, no se encontró Psa en las muestras analizadas.

La identificación del resto de los aislamientos asociados a manchas necróticas en hojas, manchas en sépalos y tizón de flores será realizada consiguientemente a través de las correspondientes pruebas.

Los recientes resultados obtenidos en este estudio demuestran la ausencia de Psa en las muestras analizadas. Esto avala la condición de Argentina como país libre de esta bacteria, aporta herramientas para un manejo sustentable del cultivo de la zona y contribuye a incrementar la competitividad de la producción de kiwi de la provincia de Buenos Aires.

Bibliografía

- BALESTRA, G.M. y VARVARO, L. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. *Journal of Phytopathology*. 145(8-9): 375-378.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO). 2014. PM 7/120 (1) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Boletín* 44 (3), 360-375.
- EVERETT, K.R.; TAYLOR, R.K.; ROMBERG, M.K.; REES-GEORGE, J.; FULLERTON, R.A.; VANNESTE, J.L.; MANNIN, M.A. 2011. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australasian Plant Pathology Society Inc.* 6:67-71.

- FERRANTE, P. y SCORTICHINI, M. 2009. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy. *Journal of Phytopathology*, 157(11-12):768-770.
- FROUD, K.J.; EVERETT, K.R.; TYSON, J.L.; BERESFORD, R.M.; COGGER, N. 2015. Review of the risk factors associated with kiwifruit bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Insects and diseases in apple and kiwifruit. New Zealand Plant Protection* 68: 313-327.
- GALLELLI, A; L´AURORA, A y LORETI, S. 2011. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *Journal of Plant Pathology* 93 (2), 425-435.
- GONZÁLES, A. J. y RODICIO, M.R. 2007. Caída del botón floreal en kiwi causada por *Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas syringae* en el Principado de Asturias. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*. 33(4): 517-526.
- GOSZCZYNSKA, T.; SERFONTEIN, J.J.; SERFONTEIN, S. 2000. Introduction to Practical Phytobacteriology. Bacterial Diseases Unit, ARC-PPRI, South Africa SDC, Swizerland. 83 p.
- MANSILLA, J P. y ABELLEIRA, A. 1999. Detección de *Pseudomonas marginalis* (Brown)Stevens en plantaciones de kiwi (*Actinidia deliciosa*) en la provincia de Pontevedra. I Congreso Ibérico de Cincias Hortícolas. Lisboa (Portugal).380-384.
- SCORTICHINI, M. 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology*, 43(6): 1035-1038.
- TAKIKAWA, Y.; SERIZAWA, S; ICHIKAWA, T; TSUYUMU, S y GOTO, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55: 437-444.
- VANNESTE, J.L.; GIOVANARDI, D.; YU, J.; CORNISH, D.A.; KAY, C.; SPINELLI, F. 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit pollen samples. *New Zealand Plant Protection* 64, 246-251
- WILKIE, J.P.; DYE, D.W.; WATSON, D.R.W. 1973. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16(3): 315-323.

10. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

10.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se haya hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada ya que no será tomada en consideración. A cada trabajo asignarle un número e indicar el nombre de los autores, en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, lugar donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde. En cada trabajo que el becario presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación. Asimismo, en cada caso deberá indicar si el trabajo se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

10.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que aparecen en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el becario deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el*

desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.

10.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que ha sido enviado. Adjuntar copia de los manuscritos.*

10.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

10.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

Taller de Productores y Asesores Frutihortícolas del Cinturón hortícola de Mar del Plata.
Fecha: 27/05/2016. Lugar: Agencia de extensión INTA Mar del Plata.

Charla a productores de kiwi de la zona. Tema: Plagas de kiwi.
Fecha: 24/06/2016. Lugar: Miramar.

Jornada de actualización para productores de kiwi de la zona. Tema: Desarrollo de investigaciones en el cultivo de kiwi.
Fecha: 10/08/2016. Lugar: UIB (FCA, UNMdP - EEA INTA Balcarce)

10.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

Asesora de Tesis de Grado para optar por el título de Ingeniero Agrónomo de Ignacio Castellani (Acta 870/2016).

Título: Enfermedades prevalentes en plantaciones de kiwi del sudeste de la provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP.

Fecha: 31/10/2016

11.2 DIVULGACIÓN

11.3 OTROS

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

12. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

III Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la provincia de Buenos Aires. La Plata. 1° de septiembre, 2016.

Participación: Asistente, Expositor de póster.

Título del trabajo: Detección de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* en Buenos Aires. SÁNCHEZ, M.C.; CLEMENTE, G.E.; YOMMI, A.K.; ALIPPI, A.M.; RIDAO, AdelC.

13. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc, y si se realizó algún entrenamiento.*

* Curso de Posgrado: Epidemiología y Control de Fitoenfermedades. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP - 8641 (OCA 050-92).

Duración: Horas totales: 85

Clases (totales T + P + TP): 18

14. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

No consigna

15. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

16. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Docente Adscripción Patología Vegetal - dedicación de 25% (OCA 1652/16)

17. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES. *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

*Fuentes de financiamiento del presentado trabajo de investigación:

-Proyecto Universidad Nacional de Mar del Plata: AGR517/16.

Coordinadora: Azucena del Carmen Ridao.

-Proyecto INTA PNFRU 1105083 "Nuevas tecnologías para el mantenimiento de la calidad en la cosecha, acondicionamiento y logística de frutas frescas". Período 2013-2019.

Coordinadora: María Laura Rivero.

-Proyecto INTA BASUR 1272103.

*Resúmenes enviados a Congresos y aún no aceptados:

Abstract enviado al IX International Symposium on Kiwifruit. Porto, Portugal, 6 al 9 de septiembre del 2017.

Report of the absence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit leaves and flowers from Buenos Aires Province, Argentina. M.C. Sanchez^{1,2}, G.E. Clemente¹, A.K. Yommi³, A.M. Alippi^{2,4}, AdelC. Ridao¹

Unidad Integrada (1FCA/3INTA); 2Comisión de Investigaciones Científicas, CIC; 4Universidad Nacional de La Plata.

Resumen y trabajo ampliado enviado al 4° Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza, 5 al 7 de abril del 2017.

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas* PATÓGENAS DE KIWI EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES. Sánchez M.C.^{1,2}, Clemente G.E.¹, Yommi A.K.³, Alippi A.M.^{2,4}, Ridao AdelC.¹

Unidad Integrada Balcarce (1FCA-UNMdP/3INTA EEA Balcarce); 2Comisión de Investigaciones Científicas, CIC; 4UNLa Plata.sanchez.mariaclara@inta.gov.ar

*Dificultades encontradas en la realización del estudio:

Se presentaron inconvenientes a la hora de conseguir el contacto con productores de kiwi, para poder acceder a sus plantaciones, especialmente en la zona norte de la provincia de Buenos Aires (La Plata, Baradero, San Pedro y Mercedes).

Por otro lado, la realización de algunas de las pruebas bioquímicas se vio retrasada debido a la falta de disponibilidad de las drogas, como el reactivo para desarrollar la prueba de

Citocromo Oxidasa y también a la demora en el crecimiento de los tabacos para efectuar la RHT.

El análisis de la variabilidad intra-especie, así como la determinación de la prevalencia en el área como porcentaje de plantaciones con resultado positivo de Psa, sobre el total de plantaciones consideradas en el estudio no pudo ser realizada puesto que hasta el momento no se ha identificado ningún aislamiento como Psa.

18. DESCRIPCIÓN DEL AVANCE EN LA CARRERA DE DOCTORADO.

Debe indicarse los logros alcanzados en la carrera de Doctorado en relación a los requisitos particulares de la misma (cursos, seminarios, trabajos de campo, etc), así como el porcentaje estimado de avance en la tesis.

Actualmente alumna regular de la Carrera de Maestría en Producción Vegetal (horas requeridas cumplimentadas). Recientemente inscripta a la Carrera de Doctorado en Ciencias Agrarias de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP.

19. TÍTULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PRÓXIMO PERÍODO. *Deberán indicarse claramente las acciones a desarrollar.*

Caracterización de especies de *Pseudomonas* y *Phomopsis* patógenas de kiwi en Argentina

Introducción

Actualmente, se estima que existen 800 hectáreas implantadas de kiwi en Argentina, de las cuales 600 están en producción (SINAVIMO, 2014). La provincia de Buenos Aires concentra el 90% de la superficie total plantada con este cultivo. El sudeste bonaerense ha duplicado la superficie dedicada al kiwi y se ha convertido en la zona más importante del país al producir la mitad del volumen nacional (Yommi, 2014).

Las enfermedades constituyen uno de los principales factores limitantes para el desarrollo del cultivo de kiwi. Entre ellas, las de origen bacteriano son una de las causas de mayores pérdidas en la producción a nivel mundial (Gubler y Conn, 1994). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss), *P. syringae* pv. *actinidiae* (Psa), *P. viridiflava* y *P. marginalis* son bacterias patógenas que afectan al cultivo. Han sido reportadas causando manchas necróticas y angulares en hojas, tizón de flores, caída de botones florales y canchales en ramas (Wilkie et al., 1973; Young et al., 1988; Takikawa et al., 1989; Balestra y Vavaro, 1997; Argibay y Vazquez, 1999; Mansilla y Abelleira, 1999; Gonzales y Rodicio, 2007; Balestra et al., 2009; Gallelli et al., 2011; EPPO, 2014). Por otro lado, patógenos fúngicos como *Phomopsis* sp. han sido reportados causando lesiones foliares y podredumbre de frutos (Sommer y Beraha, 1975; Hawthorne et al., 1982; Pintos Varela et al., 2000; Jeong et al., 2008). Thounon Islas y Montoya (2010) realizaron la primera detección de *Phomopsis* sp. en kiwi en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, y al igual que lo hallado por Pintos Varela et al. (2000), determinaron que *Phomopsis* fue el único hongo aislado consistentemente de necrosis de nervaduras foliares, lesiones circulares plateadas, hojas abarquilladas y tallos oscurecidos. En 2016, Castellani et al. encontraron que *Phomopsis* sp. fue el patógeno mayormente aislado desde hojas, flores y frutos, de cinco plantaciones ubicadas en el sudeste bonaerense.

Considerando que en el país no existen trabajos de diagnóstico e identificación fehaciente sobre los mencionados patógenos, y que estos podrían convertirse en una seria limitante para la producción de kiwi, resulta imprescindible generar conocimientos sobre los mismos, profundizar en su etiología y caracterizar los aislamientos locales. Para ello se propone: detectar, aislar, identificar y caracterizar bacterias patógenas del género *Pseudomonas* provenientes de plantaciones de kiwi. Asimismo, coleccionar aislamientos de *Phomopsis* de distintos órganos y plantaciones de kiwi.

Se plantean las siguientes hipótesis:

- Especies patógenas del género *Pseudomonas* se encuentran presentes en plantaciones de kiwi de Argentina.

- Entre las especies patógenas de *Pseudomonas* presentes en plantaciones de kiwi, está *P. syringae* pv. *actinidiae*.
- *Phomopsis* es el género fúngico patógeno que se presenta con mayor frecuencia en las plantaciones de kiwi de Argentina.

Objetivos:

- a. Caracterizar aislamientos bacterianos del género *Pseudomonas*, por morfología, pruebas bioquímicas y fisiológicas y PCR.
- b. Calcular la prevalencia de las especies patógenas del género *Pseudomonas* presentes en plantaciones de kiwi de Argentina.
- c. Colectar y determinar la frecuencia de aislamientos de *Phomopsis* de distintos órganos de kiwi.

Actividades y metodologías

*Toma de muestras: Se recolectarán muestras de diferentes plantaciones de kiwi ubicadas principalmente en la provincia de Buenos Aires, aunque también serán consideradas otras plantaciones del país. Las muestras que se tomarán constarán de hojas y brotes con manchas y/o lesiones necróticas, flores con tizón y frutos con pudriciones. Además se colectarán partes de troncos, cargadores, ramas y tallos que presenten canchales u otro tipo de lesiones, y polen. El material colectado será transportado en bolsas dentro de una conservadora refrigerada desde el campo hasta la cámara fría, para ser conservado a 4 °C. Luego las muestras serán acondicionadas en el laboratorio para su análisis.

*Aislamientos de los patógenos: Los aislamientos bacterianos se realizarán desde extractos de tejido vegetal por dilución seriada a la décima sobre Agar Nutritivo (AN). Las placas se incubarán durante dos días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y las colonias serán repicadas nuevamente sobre los medios de cultivo Agar Nutritivo enriquecido con sacarosa (ANS) y King B (KB), antes de proseguir con su identificación. Sobre el medio ANS se observará la producción de levan por las colonias, y sobre el medio KB se evaluará la producción de pigmentos fluorescentes de las colonias.

Para realizar el aislamiento de hongos desde material vegetal sintomático, se procederá a desinfectar el tejido en hipoclorito de sodio comercial al 1% durante un minuto, y posterior enjuague con agua destilada estéril. Consiguientemente, los segmentos serán colocados en cajas de Petri con medio Agar Papa Dextrosa (APD), y las placas se incubarán a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad procediendo luego de tres o cuatro días a la purificación de los microorganismos aislados.

*Identificación y caracterización: Las bacterias del género *Pseudomonas* se diferenciarán mediante las pruebas LOPAT: producción de Levan, reacción de la enzima Citocromo Oxidasa, podredumbre de Papa, Arginina dehidrolasa y reacción de hipersensibilidad en Tabaco (Goszczyńska et al., 2000). Estas pruebas son suficientes para una primera caracterización de los aislamientos, pero insuficientes para discriminar entre patovares de una misma especie. Takikawa et al. (1989) y Scortichini (1994) identifican a *P. syringae* con un perfil LOPAT (+---+). *P. marginalis* presenta un perfil LOPAT (++++-) (Mansilla y Abelleira, 1999), mientras que *P. viridiflava* (--++), aunque también se han citado cepas de *P. viridiflava* con un perfil LOPAT atípico (Gonzales et al., 2003).

Adicionalmente, las características bioquímicas y metabólicas de todos los aislamientos bacterianos serán evaluadas a través de las siguientes pruebas:

- Reacción de Gram.
- Prueba de Fermentación (test de Hugh y Leifson), para caracterizar el metabolismo de las bacterias aisladas, evaluando si las mismas utilizan carbohidratos vía oxidación o vía fermentación.
- Hidrólisis de Almidón, Arbutina, Gelatina y Esculina.

Según los resultados de las pruebas los aislamientos serán sometidos a reacciones de PCR con el objetivo de confirmar su identidad.

Los aislamientos que presenten características macroscópicas (morfológica, color y apariencia de la colonia) similares a las del género *Phomopsis* se expondrán durante 15 días a ciclos de alternancia de 12 horas de luz UV/12 horas de oscuridad y a una temperatura de 20° C. De esta manera se favorecerá la fructificación del hongo y se podrá evaluar la presencia y distribución de estromas, picnidios y distintos tipos de conidios observados al microscopio óptico.

*Determinación por PCR: Con el fin de corroborar la identidad de las especies de *Pseudomonas* aisladas, se realizará una PCR con primers específicos, utilizando como templado colonias lisadas e incluyendo controles de ADN positivos y negativos para cada una de las especies estudiadas.

Para aquellas colonias que resulten Gram negativas y oxidativas, y se clasifiquen como *Pseudomonas* spp., se procederá a validar y optimizar el protocolo propuesto por Widmer et al. (1998). Este utiliza dos pares de iniciadores: Ps-for y Ps-rev.

Para diferenciar entre los patovares de *P. syringae* (*syringae* y *actinidiae*) se realizarán dos reacciones de PCR que amplifican segmentos específicos para cada uno de ellos. Para la amplificación de segmentos específicos de *Psa* se utilizará una PCR-duplex propuesta por Gallelli et al. (2011), que utiliza dos pares de iniciadores dirigidos a distintas regiones cromosómicas (KN-F/R, obtenido por análisis de RAPD y RFLP, y Avr/DdxF/R para la secuencia del gen AvrD1). Luego, para afirmar la identidad de los aislamientos de *Pss*, es decir, los que resulten negativos en la reacción de PCR-duplex, se utilizarán los primers B1 y B2, citados en Hassan et al. (2014).

Para comprobar la identidad de los aislamientos que según las pruebas LOPAT se seleccionen como *P. viridiflava* se usarán los primers PsV-F y Ps-V, propuestos en el protocolo de Alimi et al. (2011).

Por último, los aislamientos que resulten positivos en la reacción de PCR con primers específicos para *Pseudomonas* spp. y negativos en el resto de las reacciones de PCR, se clasificarán como *P. marginalis* complementando esto con el resultado obtenido en las pruebas LOPAT.

*Determinación de la prevalencia: la prevalencia en el área de estudio se calculará para cada una de las bacterias patógenas como el número de plantaciones con resultado positivo, en función del número total de plantaciones consideradas.

Además se contabilizarán la cantidad de aislamientos del género *Phomopsis* de cada plantación, con respecto al total de aislamientos fúngicos obtenidos, para registrar su frecuencia.

*Pruebas de patogenicidad: Se verificará el cumplimiento de los postulados de Koch para las especies de *Pseudomonas* y los aislamientos del género de *Phomopsis* que se obtengan, inoculando plantas sanas de kiwi cv 'Hayward' de tres meses.

Bibliografía

ALIMI, M; RAHIMIAN, H; HASSANZADEH, N; DARZI, M T; AHMADIKHAH, A; HEYDARI, A; BALESTRA, G M. 2011. First detection of *Pseudomonas viridiflava*, the causal agent of blossom blight in apple by using specific designed primers. *African Journal of Microbiology Research*, 5(26), 4708-4713.2

ARGIBAY, A.A. y VÁZQUEZ, J.P.M. 1999. Presencia de *Pseudomonas marginalis* y *P. viridiflava* sobre kiwi en Galicia. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 25(2): 175-180.

BALESTRA, G.M. y VARVARO, L. 1997. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causal agent of disease on floral buds of *Actinidia deliciosa* (A. Chev) Liang et Ferguson in Italy. *Journal of Phytopathology*. 145(8-9): 375-378.

BALESTRA, G.M.; PERESTRELO, L.; MAZZAGLIA, A.; ROSSETTI, A. 2009. First report of blossom blight caused by *Pseudomonas syringae* on kiwifruit plants in Portugal. *Journal of Plant Pathology*, 91(1): 231-240.

CASTELLANI, I. Enfermedades prevalentes en plantaciones de kiwi del sudeste de la provincia de Buenos Aires. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. 50p.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (OEPP/EPPO). 2014. PM 7/120 (1) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Boletín 44 (3), 360-375.

GALLELLI, A; L'AURORA, A y LORETI, S. 2011. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *Journal of Plant Pathology* 93 (2), 425-435.

GONZALES, A.; RODICIO, M.R. y MENDOZA, M.C. 2003. Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, May 2003, p. 2936-2941 Vol. 69, No. 5.

GONZÁLES, A. J. y RODICIO, M.R. 2007. Caída del botón floreal en kiwi causada por *Pseudomonas viridiflava* y *Pseudomonas syringae* en el Principado de Asturias. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*. 33(4): 517-526.

GOSZCZYNSKA, T.; SERFONTEIN, J.J.; SERFONTEIN, S. 2000. Introduction to Practical Phytobacteriology. Bacterial Diseases Unit, ARC-PPRI, South Africa SDC, Switzerland. 83 p.

GUBLER, W. y CONN, K. 1994. Diseases in Kiwifruit: growing and handling. Hasey, J. Johnson, R., Grant, J and Reil. (Eds.) publication 3344. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 134 p.

HASSAN, W A; NERWEYI, F F; AL-DOSKI, J M. 2014. First Record of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Iraq using Conventional and Specific PCR Protocol.

HAWTHORNE, B.T.; REES-GEORGE, J.; SAMUELS, G.J. 1982. Fungi associated with leaf spots and post-harvest fruit rots of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*. 20(2): 143-150.

JEONG, I.H.; LIM, T.M.; KIM, H.G.; HAN, T.W.; KIM, H.C.; KIM, M.J; PARK, H.S; SHIN, S.H; HUR, J.; SHIN, J.S; KOH, Y.J. 2008b. Incidences of Leaf Spots and Blights on Kiwifruit in Korea. *The Plant Pathology Journal*. 24(2): 125-130.

MANSILLA, J P; ABELLEIRA, A. 1999. Detección de *Pseudomonas marginalis* (Brown)Stevens en plantaciones de kiwi (*Actinidia deliciosa*) en la provincia de Pontevedra. I Congreso Ibérico de Cincias Hortícolas. Lisboa (Portugal).380-384.

PINTOS VARELA, C.; GARCIA-JIMENEZ, J.P.; MANSILLA N.; CIURANA N.; SALES R.; ARMENGOL J. 2000. Presencia de *Diaporthe actinidiae* afectando al Kiwi (*Actinidia deliciosa*) en el noroeste de la península ibérica. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, España. 26 (3): 389-399.

SCORTICHINI, M. 1994. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology*, 43(6): 1035-1038.

Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SINAVIMO). 2014. Situación Fitosanitaria del Cultivo de Kiwi en Argentina. [En línea] <<http://www.senasa.gov.ar/>>

SOMMER, N. F. y BERAHA, L. 1975. *Diaporthe actinidiae*, a new species causing stem-end rot of Chinese gooseberry fruits. *Mycological Society of America. Mycologia* 67(3): 650-653.

TAKIKAWA, Y.; SERIZAWA, S; ICHIKAWA, T; TSUYUMU, S y GOTO, M. 1989. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: the causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55: 437-444.

THOUGNON ISLAS, A.J.; MONTOYA, M. 2011. Primera detección en Argentina de *Phomopsis* sp. afectando a kiwi. 2º Congreso Argentino de Fitopatología, Libro de Resúmenes. Junio de 2011, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. p. 126.

WIDMER, F; SEIDLER, R J; GILLEVET, P M; WATRUD, L S; DI GIOVANNI, G D. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2545-2553.

WILKIE, J.P.; DYE, D.W.; WATSON, D.R.W. 1973. Further hosts of *Pseudomonas viridiflava*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 16(3): 315-323.

YOMMI, A. 2014. Mar del Plata: kiwi certificado de primera calidad. INTA Informa. [En línea]< <http://intainforma.inta.gov.ar/>>

YOUNG, J M; CHEESMUR, G J; WELHAM, F V; HENSHALL, W R. 1988. Bacterial blight of kiwifruit. Annals of applied biology, 112(1), 91-105.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario

Condiciones de Presentación

A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.