



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE SANIDAD VEGETAL
Calle 110 no. 514 Esq. 5taB, Playa, C. de la Habana Teléfono: 2023720
E Mail: mstefanova@inisav.cu http: www.inisav.cu

MONOGRAFÍA

El fuego salvaje (*Pseudomonas syringae pv tabaci*) en el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) : etiología, epidemiología y medidas de control.

Elaborada por: Marusia Stefanova¹

Doctor en Ciencias Agrícolas, Investigador Titular del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal
mstefanova@inisav.cu

Con la colaboración de: Ariel Basulto,¹ Geraldo Oliveira² , Maribel Espino¹ y Armando García³ Instituto de Investigaciones del Tabaco¹, Cuba, Centro de Investigación y Desarrollo, S. Cruz², Brasil, Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal³, Cuba

Contenido

1. Resumen
2. Introducción
3. Síntomas y mecanismo de desarrollo de la enfermedad
4. Agente causal y su diagnóstico
5. Tabtoxina: Factor de virulencia de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*
6. Requerimientos bioecológicos para el desarrollo de la enfermedad
7. Comportamiento varietal y razas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*
8. Rango de hospedantes de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*
9. Características morfo-culturales, bioquímicas, serológicas, patogénicas y moleculares de cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de diferentes hospedantes
10. Medidas de control del fuego salvaje en semilleros y campo
11. Referencias

RESUMEN

El fuego salvaje (*Pseudomonas syringae* pv *tabaci*) es una de las enfermedades bacterianas más importantes en el cultivo del tabaco. El trabajo ofrece una información amplia sobre la enfermedad y su agente causal para los profesionales y técnicos relacionados con la producción y la protección fitosanitaria del tabaco. Se presentan los resultados de numerosas investigaciones ejecutadas desde la primera aparición de la enfermedad, se hace una descripción detallada de los síntomas en diferentes hospedantes, se analiza el mecanismo de desarrollo del fuego salvaje y los factores que influyen en la virulencia. Para el diagnóstico de la bacteria se exponen medios de

cultivos selectivos y técnicas serológicas y moleculares, que ejecutadas bajo procedimientos de laboratorio, amplían y fortalecen la vigilancia fitosanitaria. Se analizan los métodos de control empleados en las diferentes fases del cultivo, y otros, como el biocontrol, que se recomiendan como nuevas alternativa, y su integración en el manejo del tabaco para la prevención y lucha contra la enfermedad.

Palabras claves: tabaco, *Nicotiana tabacum*, fuego salvaje, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, diagnóstico, bacteria, tabtoxina.

INTRODUCCIÓN

Han transcurrido un poco más de nueve décadas desde que apareció en la revista *Science* el primer informe (Wolf y Foster, 1917), sobre una grave enfermedad en el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en Carolina del Norte en 1917, que por su repentina aparición, rápida diseminación y la severidad generalizada en los semilleros y campo fue denominada, por los propios productores, fuego salvaje. Aunque los primeros conquistadores de las actuales regiones tabacaleras norteamericanas en el año 1650 mencionaban, en sus cartas, enfermedades que afectaban la hoja del tabaco, no existe información sobre los orígenes de la enfermedad fuego salvaje con anterioridad a esta fecha.

Su agente causal resultó ser una bacteria, *Bacterium tabaci* (Wolf y Foster, 1918), cuyo nombre actual es *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Los daños devastadores la ubicaron entre las plagas agrícolas más destructoras de la época, tres años fueron suficientes para convertirse en azote en los principales estados norteamericanos que producen tabaco (Wolf y Foster, 1918; Chapman y Anderson, 1921; Chapman y Anderson, 1922; Clinton y Mc Cormick, 1922; Wolf, 1922; Lucas, 1975). Solamente en Virginia se registraron pérdidas producidas por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* de 22 millones de libras (Fromme and Wingard, 1922).

Todo parece indicar que a partir de 1920 empezó su diseminación mundial, la que alcanzó el hemisferio sur hasta Argentina, con fuertes afectaciones en Brasil; más tarde se describió en Alemania, Australia, Bélgica, Bulgaria, Canadá, China, Filipinas, Grecia, Holanda, Hungría, Italia, Japón, Francia, Kenya, Mozambique, Nueva Zelanda, Polonia, Rumania, Sudáfrica, Suiza, Turquía y la antigua Unión Soviética. Se puede decir que el fuego salvaje está distribuido en los cinco continentes, donde cubre las más importantes áreas productoras de tabaco (Shoemaker, 1990). Nombres tales como “fuego salvaje”, “fuego negro”, “fuego de campo”, “mancha angular de la hoja”, “quemazón” o “tizón” se han utilizado para describir la enfermedad (Lucas, 1975) en los diferentes países.

Numerosas investigaciones fueron ejecutadas a lo largo de estos años para contrarrestar estos impactos negativos, cuyos resultados valiosos trascienden hasta la actualidad.

Curiosamente, entre 1948 y 1951, esta enfermedad fue la más importante en la zona americana del tabaco Burley, lo que quizás motivó uno de los más grandes logros en el mejoramiento genético del cultivo, en este caso, en la Estación Experimental del Tabaco de la Universidad de Tennessee, cuando en 1955 liberó la variedad Burley 21 (Heggstad *et al.*, 1960), la cual constituye la primera y una de las más importante variedades resistentes al fuego salvaje. En la actualidad, esta variedad representa un punto de partida cuando se

realizan trabajos de mejoramiento genético con vista a introducir resistencia a *Pseudomonas syringae pv tabaci* en variedades comerciales de tabaco.

Tomar entonces los veinte años requeridos para lograr la variedad, los cientos de cruces genéticos y la cooperación entre varias estaciones experimentales y universidades, puede ser un ejemplo del esfuerzo que se requirió para combatir la enfermedad.

Cuba es probablemente el único país productor de la valiosa hoja que no tiene registrado el patógeno, debido posiblemente a que el mejoramiento genético siempre fue dirigido al rescate y la preservación del tabaco cubano de fama mundial, con muy poca introducción de semillas del exterior.

Recopilar la mayor información posible sobre el fuego salvaje y su agente causal para los profesionales y técnicos relacionados con la producción y la protección fitosanitaria del tabaco, como un aporte al conocimiento para la prevención y lucha contra esta plaga, fue el objetivo principal del presente trabajo. El documento será, sin duda alguna, una lectura útil también para los estudiosos en general que deseen profundizar en el campo de las plantas y las bacterias que las afectan.

SÍNTOMAS Y MECANISMO DE DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD.

La lesión inicial del fuego salvaje es casi puntiforme, de aspecto húmedo, circundada por una región de 2 a 3 mm de diámetro de tejido verde amarillo tenue (Figura 1).



Figura 1: Síntomas iniciales de la enfermedad vistas por el haz y el envés de la hoja.

En el transcurso de 24 - 48 horas el centro de las lesiones se torna necrótico mientras que el halo se hace prominente y más ancho (Wolf y Foster, 1917, 1918; Braun, 1955; Wannamaker y Rufty, 1989). En una misma hoja de la planta se pueden apreciar diferentes fases del desarrollo de la enfermedad (Figura 2).

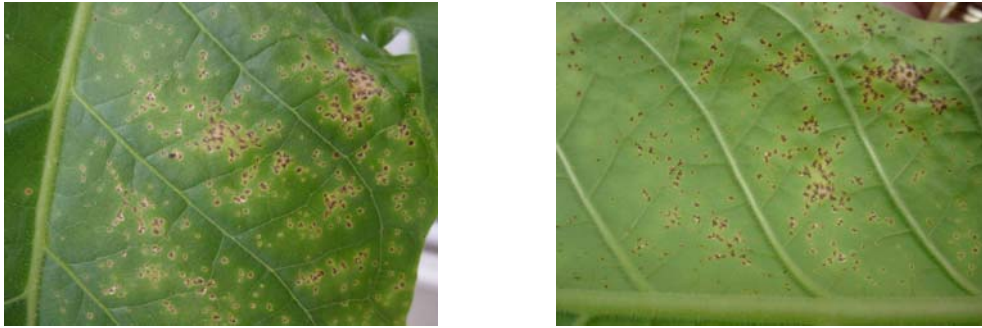


Figura 2. Lesiones necróticas iniciales y más avanzadas en el haz y el envés de la hoja.

El halo clorótico, característico de la enfermedad, es producto de la tabtoxina, un metabolito de las células bacterianas, que provoca la interrupción del ciclo foto respiratorio y la inhibición de la fotosíntesis (Turner *et al.*, 1986; Turner, 1988).



Figura 3. Mancha necrótica circundada por el halo clorótico, característico de la enfermedad

A medida que el fuego salvaje progresa, las manchas locales incrementan su tamaño entre 12 - 25 mm y se unen, convirtiéndose en áreas grandes e irregulares de tejido necrótico que puede involucrar una porción grande de la hoja (Figura 4). En tiempo seco, las áreas necróticas permanecen intactas, aunque se produce un torcimiento y deformación de la hoja (Figura 5).



Figuras 4 y 5: Áreas necróticas y deformación de la hoja del tabaco

En períodos húmedos la enfermedad puede aparecer como una putrefacción acuosa que causa derrumbamiento de las hojas más bajas y la muerte de la planta. Los síntomas descritos aparecen menos frecuentemente en flores, pecíolos y tallos.

En la corola, el cáliz y las cápsulas de la semilla, las lesiones se manifiestan como pequeños puntos irregulares necróticos o como manchas acuosas que después adquieren un color pardo. En los tallos pueden observarse puntos hundidos de color pardo con halo

clorótico alrededor o sin él (Lucas, 1975).

En los semilleros, donde el patógeno es más destructivo, una vez manifestado el fuego salvaje, existe un ciento por ciento de probabilidad de pérdida total del semillero. La incidencia alta en esta fase se debe, en primer lugar, a la persistente humedad y al efecto de la toxina de la bacteria que se hace sistémico (Braun, 1955); las plántulas afectadas generalmente mueren y las menos dañadas quedan tan débiles que no sobreviven al trasplante. Las aparentemente sanas, tras sobrepasar el ataque de la enfermedad, pueden sobrevivir, aunque se produce una gran reducción en calidad y rendimiento de las plantaciones.

Según lo descrito por Lucas (1975) en su libro *Enfermedades del Tabaco*, el fuego salvaje se distribuye generalmente con poca uniformidad en el semillero. Las zonas enfermas quedan en sitios bajos o en los extremos del cantero que coincidentemente son los más desnivelados y anegados. Las áreas afectadas forman parches de uno a dos metros de diámetro y las plantas más severamente afectadas son las del centro, las cuales pueden ser totalmente destruidas. En las plantas muy jóvenes o muy apiñadas, todas las hojas pueden ser completamente desintegradas por una pudrición húmeda de avance rápido. En resumen, las pérdidas por la enfermedad se deben fundamentalmente a la clorosis, necrosis, desecación, pudrición, deformación o caída de las hojas y al desarrollo retrasado de la planta

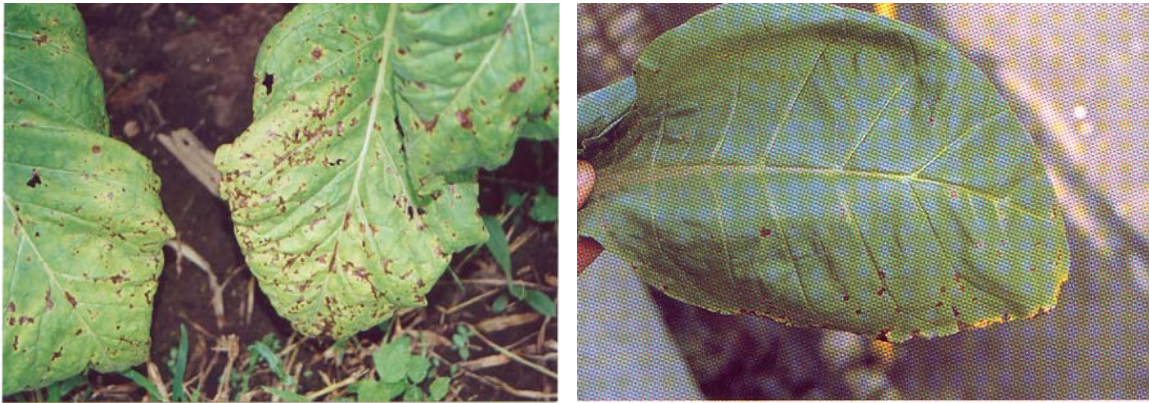
de tabaco.

Lesiones similares a las del fuego salvaje, pero con ausencia del halo clorótico, pueden aparecer tanto en el semillero como en la plantación y se relacionan con la mancha angular, que algunos autores denominaron Fuego Negro (Clayton, 1936; Fulton, 1980), cuyo organismo causante fue nombrado *Pseudomonas syringae* pv. *angulata*. La mancha angular tiene una distribución más uniforme en las condiciones del campo (Wannamaker y Rufty, 1989) y aparece igualmente en las partes más húmedas del semillero (Clayton, 1937) de donde se disemina la bacteria hasta cubrir el área sembrada.

El síntoma inicial de la enfermedad consiste en manchas angulares acuosas limitadas por las venas, en el rango de 1 a 8 mm de diámetro, que más tarde se tornan casi negras. (Figuras 6 y 7). A continuación las manchas pueden unirse y el centro de las lesiones se desprende causando el ahuecamiento de la hoja (Lucas, 1975) (Figura 8). El tejido que bordea la lesión sufre cierta clorosis, pero nunca reproduce el característico halo clorótico del fuego salvaje producto de las alteraciones fisiológicas, entre ellas la pérdida de clorofila, acumulación de amonio e inactivación de la glutamina sintetasa que caracterizan el efecto de la tabtoxina (Turner y Taha, 1984).

Los síntomas de la enfermedad pueden observarse también en las flores y las cápsulas de la semilla. El cáliz y la corola son

ennegrecidos y distorsionados y las lesiones pardo oscuras en las cápsulas pueden ser no distinguibles de la lesión producida por el fuego salvaje. Pueden presentarse también numerosas formaciones angulares en los márgenes de las hojas.



Figuras 6 y 7 Lesiones provocadas por *Pseudomonas syringae* pv *angulata*.



Figura 8. Ahuecamiento producido con el avance de la mancha angular.

En las hojas más maduras, durante la última parte del cultivo, es

difícil distinguir el fuego salvaje y la mancha angular debido, al parecer, a la mayor resistencia que ofrecen las hojas maduras al desarrollo del halo clorótico producido por *Pseudomonas syringae pv tabaci*. Es igualmente común la aparición de ambos síntomas sobre una misma hoja, así como la asociación con otros patógenos entre ellos: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani* y *Cercospora nicotianae*, lo cual complica extraordinariamente el diagnóstico. Actualmente la mancha angular se relaciona con las estirpes de *Pseudomonas syringae pv tabaci* que no producen la tabtoxina.

En el cuadro sintomatológico que caracteriza al fuego salvaje pueden ser distinguidas cuatro fases o tipos de síntomas que ocurren siguiendo el orden: *mancha acuosa*, *lesión necrótica local*, *halo clorótico* y al final *necrosis secundaria*, entre las lesiones locales.

Klement *et al.*, (1978) con un experimento sencillo demostraron que el desarrollo de la enfermedad se inicia con la producción, por *Pseudomonas syringae pv tabaci*, de un lipomucopolisacárido en los tejidos de la planta, cuya función principal es absorber, en condiciones favorables, el agua de la superficie de la planta y/o de la atmósfera, dentro de los espacios intercelulares produciendo el congestionamiento acuoso o la *mancha acuosa*, creando el medio favorable para la multiplicación vigorosa de la bacteria teniendo en cuenta que la dispersión de la misma es posible en espacios

intercelulares saturados de agua, según Young (1974). Esto explica por qué el síntoma acuoso solo aparece cuando las plantas se exponen a un ambiente con el 100% de humedad relativa.

Cuando el número de células del patógeno compatible alcanza el nivel crítico de 2×10^6 cél/cm² de área foliar, se origina *la lesión necrótica local*, producto de las células vivas y metabólicamente activas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, independientemente de la toxina bacteriana. El tiempo de aparición de la necrosis depende del número de bacterias en el inóculo. La concentración de 5×10^4 células causa necrosis entre 3–4 días, menos células que 5×10^4 nunca inducen una necrosis confluyente, sin embargo, células de tabaco individuales que colapsan después de 48 horas pueden ser observadas mediante tinción con Evans Blue; alrededor de 50 células de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* son indispensables para producir la necrosis de una sola célula de la planta (Klement *et al.*, 1978).

El *halo clorótico* que tiene lugar alrededor de la lesión necrótica es causado por la tabtoxina producida por el patógeno durante su vigorosa multiplicación a continuación del proceso. Otra endotoxina, llamada necrotoxina y secretada por las células bacterianas viejas, difunde de las manchas necróticas dentro de los espacios entre las manchas y causa la *necrosis secundaria* y por ende la destrucción total de las hojas de tabaco infectadas.

La necrosis producida por *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* es consecuencia del proceso patológico, que tiene lugar en el hospedante compatible bajo determinadas condiciones, que permiten la proliferación de la bacteria. Esta necrosis es diferente de la reacción hipersensitiva (HR) de incompatibilidad, producto de la introducción de una bacteria no patógena al tabaco, como es el caso de *Pseudomonas syringae* pv *lisi*. Turner y Novacky (1974) calcularon que solamente de 1-10 células de *Pseudomonas syringae* pv *lisi* son necesarias para causar la HR en las hojas del tabaco.

Tejidos necróticos pueden aparecer a las siete horas cuando un inóculo alto (2×10^8 cél/ml) de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* es introducido en las hojas de tabaco. En este caso no se necesita la multiplicación de la bacteria compatible para que se produzca el colapso de los tejidos, lo que ocurre cuando el inóculo está por debajo del nivel crítico donde el proceso es estimulado por la congestión acuosa. La necrosis a primera vista resulta indistinguible de la reacción de hipersensibilidad (HR) producida por *Pseudomonas syringae* pv *lisi* en la misma concentración infiltrada en tabaco (Klement *et al.*, 1978). De ahí la importancia de utilizar suspensiones bacterianas de concentración por debajo de 10^8 cel/ml, cuando la prueba de patogenicidad se realiza por infiltración en las hojas del tabaco.

AGENTE CAUSAL (*PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV *TABACI*) Y SU DIAGNOSTICO

El agente causal del fuego salvaje, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Foster 1917) Young, Dye & Wilkie 1978, (Young, *et al.*, 1998) es una bacteria aerobia, Gram negativa, no produce esporas. Tiene forma de bastoncillos rectos con flagelos polares, entre 1-6 (Figura 9). Se presenta mayormente como células simples, de 0,5 - 0,7 x 1,4 - 2,8 μ , sin asociación o en pares (Bradbury, 1967). La bacteria pertenece al género *Pseudomonas* y es una variedad patogénica de la especie *Pseudomonas syringae*.

Según la descripción de Wolf y Foster (1918), en papa agar y glicerol agar, las colonias bacterianas son blanco grisáceas, elevadas, redondas y brillantes, con márgenes enteros. En agar extracto de carne se desarrollan colonias blancas, con centro un poco elevado y opaco, los bordes son translúcidos. En agar nutriente son de color blanco perla, circulares con bordes lisos, ligeramente mucosas y elevadas (Figura 10).



Figura 10. Colonias de *P. tabaci* en el medio de cultivo nutriente agar



Figura 9. Microfotografías de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Pueden observarse bastoncillos rectos con varios flagelos polares (1-6).

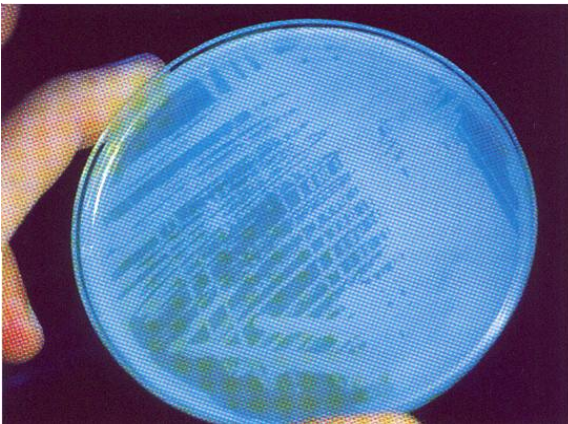


Figura 11. Fluorescencia azul de un cultivo puro de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* bajo radiación ultravioleta de alta energía (~254 nm).

La especie *Pseudomonas syringae* produce diversos síntomas en las plantas que incluyen manchas foliares, tizón y agallas. La misma se divide en variantes patogénicas o patovares (pv) según el hospedante, aunque muy similares en su comportamiento fisiológico, bioquímico, serológico, la morfología de las colonias y en el plano molecular. Cuando células de un patovar de *Pseudomonas syringae* son infiltradas en los tejidos de la planta pueden ocurrir dos posibles reacciones, una de ellas, caracterizada por tejido húmedo que

continúa proliferando hasta la aparición de síntomas, que indica la interacción susceptible y compatible entre la bacteria y el hospedante. En contraste de la reacción de hipersensibilidad necrótica (HR) que puede ocurrir entre 18 - 24 horas cuando existe incompatibilidad. La región terminal de genes *hrp* es propia de los fitopatógenos, que determina la patogenicidad en las plantas hospedantes y la habilidad de crecer en su superficie (Gopalan y He, 1997). En adición las *Pseudomonas* fitopatógenas enlazan genes que potencian la virulencia del patógeno mediante la secreción de polisacáridos, fitotoxinas, fitohormonas y enzimas degradantes de las paredes celulares (Gross, 1991; Salmond, 1994; Costacurta y Vanderleyden, 1995; Denny, 1995; Alfano y Collmer, 1996; Pettersson *et al.*, 1996).

Una de sus distinciones bacteriológicas más importante es la producción del pigmento fluorescente pioverdín en medio King B (King *et al.*, 1954), el cual difunde en el medio con una tonalidad amarillo-verdosa y fluoresce azul, bajo radiación ultravioleta de alta energía (~254 nm) (Figura 11). Este comportamiento, junto a las características de las colonias y los síntomas que provoca la bacteria en la planta, conforma la base del procedimiento diagnóstico que hasta ahora se ha seguido para identificar a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

Muy útil y confiable resulta la prueba LOPAT (Lelliot *et al.*, 1966) en la cual los patógenos pertenecientes al género *Pseudomonas*, grupo

syringae, dan positiva la prueba de levano, mientras son negativas la oxidasa, la pudrición de rodajas de papa y la arginina dihidrolasa. Como elemento complementario en la clasificación de Lelliot, se encuentra la incapacidad de reducir nitratos y crecer a 41 °C. La tabla I resume algunos de los caracteres bioquímicos que definen a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* dentro del grupo *syringae*.

Tabla I. Caracteres bioquímicos que definen a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* dentro del grupo *syringae* (Krieg y Holt, 1984)

Characterics of <i>Pseudomonas syringae</i> pathovars (section I) ^a																				
Characteristics	<i>tabaci</i>	<i>lachrymans</i>	<i>syringae</i>	<i>apitata</i>	<i>pisi</i>	<i>antirrhini</i>	<i>morsprunorum</i>	<i>delphinii</i>	<i>tomato</i>	<i>eribotryae</i>	<i>sesami</i>	<i>savastanoi</i>	<i>coronafaciens</i>	<i>strafaciens</i>	<i>mori</i>	<i>passiflorae</i>	<i>glycinea</i>	<i>phaseolicola</i>	<i>persicae</i>	<i>cannabina</i>
Levan formation	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Pectate gel pitting ^b	4, 8	4, 8	-	-	-	4	4	4	4	4	4, 8	4	-	+	4	4	4	4	4	4
β-Glucosidase	+	+	+	+	d	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Growth on:																				
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	d	-	+	-
Betaine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	d	-	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+	+	+	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+	d	+	-	-	+	-
Trigonelline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	+	-	+	+	-	+
Quinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Erythritol	d	+	+	+	d	-	d	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
L-Tartrate	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tartrate	-	-	d	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Lactate	-	-	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anthranilate	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-
Homoserine	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Data with permission from Sands et al. (1980). For symbols see standard definitions.
^b Method of Hildebrand (1971); numbers represent pH values at which pitting occurs.

Como puede observarse, estos se comportan homogéneamente

dentro del grupo, lo cual no debe constituir fuente de confusión pues la especificidad del hospedante y la producción de tabtoxina son distinciones exclusivas de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. De igual forma se puede realizar el diagnóstico de cualquier otra *Pseudomonas* perteneciente al grupo fluorescente, algunas de las cuales están asociadas a manchas foliares en el tabaco. En el caso de las saprófitas, puede aprovecharse la capacidad de producir arginina dihidrolasa, lo cual generalmente coincide con una incapacidad para inducir la reacción de hipersensibilidad o causar síntoma en hojas de tabaco infiltradas, así como la mayor velocidad de crecimiento de las colonias en los medios de cultivo.

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* pierde la virulencia con pases sucesivos, otros factores pueden influir, tales como el tipo de medio de cultivo utilizado para el mantenimiento del microorganismo, el número de pases realizados para el mantenimiento, la temperatura y las características inherentes de la cepa en cuestión. Para el mantenimiento de este microorganismo es necesario realizar inoculaciones en tabaco y el posterior reaislamiento de la bacteria. Puede ser guardada por largos períodos en agua destilada estéril donde se mantiene la virulencia original (Shoemaker, 1990). Según la experiencia de investigadores brasileños el patógeno puede conservarse en agua estéril a 21 ° C por dos años, en caldo peptona-extracto de carne a 21 ° C por un año y tres años si se conserva a 5 ° C (Oliveira, 2003).

En la literatura especializada se relaciona la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *angulata* con *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* y la similitud entre las dos especies ha sido debatida por muchos años (Stapp, 1930; Braun, 1937; Valteau *et al.*,1943; Deal y Cole,1986). Desde un inicio, Stapp (1930) no pudo distinguir las dos especies por las pruebas culturales, bioquímicas y serológicas y por ende las consideró sinónimas. Braun (1937), señaló la presencia de cepas espontáneas, que no producen clorosis y a pesar de que no encontró diferencias consistentes, prefirió mantener a *Pseudomonas syringae* pv *angulata* como una variante de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Deal y Cole (1986) agruparon en el patovar *angulata* las estirpes que no producen tabtoxina, criterio no validado más tarde por Young *et al.*,(1996) en la nueva propuesta de nombres de bacterias fitopatógenas.

Actualmente está definido que en las condiciones del laboratorio no es posible distinguir estos microorganismos mediante pruebas morfológicas, culturales, bioquímicas o serológicas, y que la diferencia entre ellos radica en la producción, por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, de la tabtoxina, que provoca el halo clorótico característico y le confiere resistencia a la metionina sulfoximina, análogo de la tabtoxina que, sin embargo, inhibe el crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv *angulata*, según Garber y Shaeffer (1963), citados por Bradbury (1967). La protección de la bacteria de la tabtoxina ha sido asociada con la adenilación de la glutamina

sintetasa y la liberación, durante el proceso, del metabolito no tóxico, tabtoxinina (Knight *et al.*, 1986; Knight *et al.*,1987; Coleman *et al.*, 1996).

El patovar *angulata* se considera un mutante atoxigénico espontáneo de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (Braun, 1937; Turner y Taha, 1984; Knoche, 1990); incluso Knoche (1990) verificó que los mutantes atoxigénicos de esta especie producían síntomas semejantes a los causados por las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *angulata* sobre las hojas de tabaco. Mutantes Tox - se producen en los medios de cultivos. Turner y Taha (1984) señalaron que la mutación de las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* para la formación de fenotipos mutantes atoxigénicos era de una tasa de 10^{-3} y que no existía diferencia entre las estirpes mutantes y salvajes de la bacteria en cuanto el crecimiento y la invasión de los tejidos, se relacionaron los síntomas de manchas angulares sin prominente halo clorótico con aislamientos menos o moderadamente virulentos del fuego salvaje (Zarei y Rahimian, 1997). Mapuranga (1998) designó una nueva raza del fuego salvaje (Raza 2) para estirpes aisladas en Zimbabwe que afectan líneas de tabaco resistentes. La caracterización patogénica de esta nueva raza describe estirpes Tox+ con presencia de halo clorótico, lesiones de hipersensibilidad y necróticas y estirpes Tox - que producen lesiones de hipersensibilidad y ausencia de clorosis. De los 58 aislados obtenidos con estas características, 38 fueron Tox + y 20 Tox-. Un 66% de los aislados Tox+ y un 70 % de los aislados Tox-

colonizaron eficientemente variedades resistentes a Raza 0 y 1.

El diagnóstico presuntivo del fuego salvaje se inicia con la observación de los síntomas y el examen al microscopio de las lesiones. Un corte en el tejido de la lesión en presencia de una gota de agua destilada muestra, bajo el microscopio, la salida de un flujo que contiene numerosas bacterias.

El aislamiento del patógeno a partir de tejidos enfermos y los estudios morfo-culturales y bioquímicos de los aislados complementan la identificación (OEPP/EPPO, 1998). Para el aislamiento de *Pseudomonas syringae pv tabaci*, se describe un procedimiento general que se adapta a las condiciones específicas de cada laboratorio: los tejidos seleccionados, que exhiben síntomas, son sometidos a una desinfección superficial con alcohol etílico durante 30 segundos, o hipoclorito de sodio al 0,5% durante 1 minuto, lavados a continuación y triturados en agua destilada estéril. Alícuotas de la suspensión se extienden, con la ayuda de un asa, sobre medio de cultivo agar nutriente o KB (King *et al.*, 1954) en placas Petri que se incuban a 28 °C por 48-72 h. A las colonias, con características morfológicas anteriormente descritas se les realizan las pruebas LOPAT (Lelliot *et al.*, 1966), así como las pruebas bioquímicas complementarias indicadas por Doudoroff y Paleroni (1974) y Hildebrant *et al.*, (1988). El estudio bioquímico puede ampliarse con pruebas, citadas por otros autores, para comparar

cepas de diferentes hospedantes y orígenes. La producción de la tabtoxina es una propiedad de la especie en cuestión.

Para demostrar la patogenicidad se realiza la inoculación artificial en plantas de tabaco con vistas a lograr la manifestación de la enfermedad. El protocolo sencillo incluye plantas jóvenes, preferentemente de la misma variedad de la cual se realiza el aislamiento, que se colocan 24 h antes de la inoculación en cámara húmeda para facilitar la apertura estomática. Se inoculan no menos de 4-5 plantas asperjando por el envés una suspensión bacteriana entre 10^7 - 10^8 ufc/ml de las cepas sospechosas cultivadas durante 24 h en agar nutriente o el medio de cultivo King B (KB). Las plantas se mantienen después de la inoculación en condiciones de alta humedad para favorecer el desarrollo del patógeno por 2 - 3 días más y los síntomas deben reproducirse en el transcurso de 3 a 10 días. Los controles se inoculan de la misma manera pero con agua destilada estéril.

Stefanova *et al.*, (2008) desarrollaron un método para la detección de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* que ha funcionado muy bien con semillas inoculadas. En dependencia del tamaño del lote se toman una o varias muestras de semillas de 1gr que se depositan por separado en erlenmeyers con 50 ml de buffer PBS estéril (8.0g NaCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ para 1L H_2O , pH 7,4). Después de una maceración por tres horas a 27°C en una zaranda (shaker) a

140 rpm, el líquido se decanta y centrifuga a 10000 rpm durante 10 min. a 4° C. El pellet se resuspende en 2 ml del mismo buffer y de las diluciones y el tubo original se efectúa siembra por espátula con 0.1ml por placa en medio de cultivo KB. El conteo de las colonias se hace a las 72 horas y se calcula la cantidad de bacteria recuperada por ml. Las colonias del patógeno se distinguen bien, por su morfología y crecimiento más lento, de las colonias de otros microorganismos acompañantes (Figura 12).

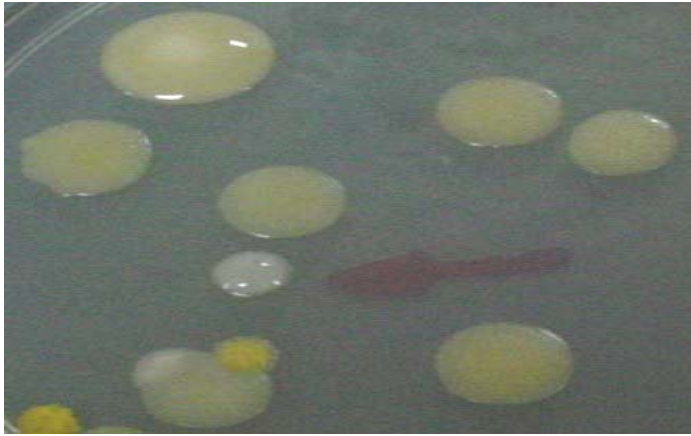


Figura 12 Colonia de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, entre otras colonias bacterianas, recuperadas a partir de semillas de tabaco.

El método se complementa con la prueba de patogenicidad en hojas de tabaco. Las suspensiones, después de ser utilizadas en la siembra en los medios de cultivo, se infiltran en los espacios intravenales de hojas de tabaco de plantas de una variedad susceptible mediante jeringuillas hipodérmicas. Las plantas se mantienen bajo condiciones de humedad alta y se observan diariamente para detectar la aparición

de los síntomas por un período de 15 días. La población bacteriana en las semillas del rango de 10^7 ufc/ ml produce a las 24 horas una fuerte necrosis con halo clorótico alrededor. Las concentraciones de 10^6 - 10^4 provocan necrosis menos intensa con clorosis y expansión de la infección 3-4 días después de la infiltración. Las lesiones correspondientes a las poblaciones inferiores (10^3 - 10^1) aparecen entre 10-15 días con una clorosis ligera seguida de manchas puntiformes acuosas en el lugar de la infiltración (Figura 13).

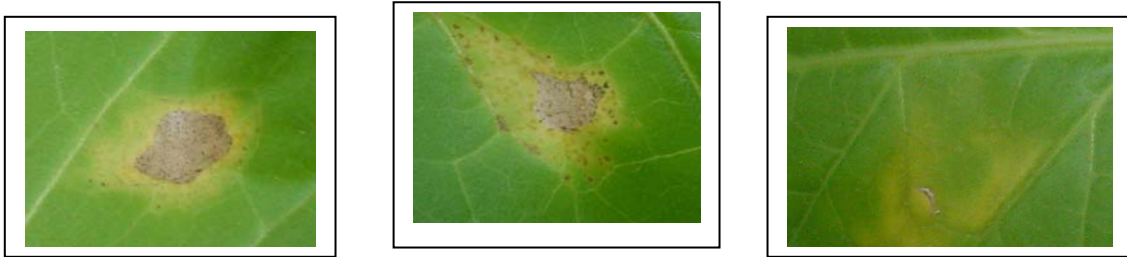


Figura 13. Lesiones causadas por la infiltración en hojas de tabaco de diferentes concentraciones de la bacteria recobradas a partir de las semillas.

El medio MSP- M puede ser utilizado para optimizar el aislamiento de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* por la selectividad y la sensibilidad en el recobrado de la bacteria a partir de semillas. Las colonias a las 48 horas pueden definirse como elevadas, brillantes, con bordes enteros, de color amarillo claro que a las 72 horas se torna más oscuro, casi anaranjado con un cambio de color del medio entorno de las colonias, de verde a amarillo. El medio de cultivo modificado

reduce sustancialmente la presencia de contaminantes bacterianos . El medio de cultivo KB suplementado con la cyclohexamida y cefalexina, en las mismas dosis, puede ser utilizado con igual propósito (Stefanova *et al.*, 2009).



Figura 14: Reducción de colonias contaminantes en el medio de cultivo MSP-M (a la izquierda).

La serología es una herramienta muy útil para el diagnóstico del fuego salvaje dada la identidad serológica entre los aislamientos del patógeno de diferentes hospedantes y la posibilidad de ser reconocidos por un inmunosuero policlonal (Allington, 1945; Prestes *et al.*, 1998). La identidad serológica entre las cepas de diferentes hospedantes permite, con el empleo un antisuero policlonal, detectar e identificar la bacteria en semillas y plantas mediante técnicas serológicas convencionales y de más alta resolución para la vigilancia fitosanitaria de la enfermedad. Stefanova *et al.*, (2005) obtuvieron inmunosueros policlonales anti *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* cuyos títulos, confirmados mediante lectura espectrofotométrica, resultaron altos (Figura 15), la dilución apropiada para la técnica

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) resultado de 1/3200. Con muestras de campo se detectaron hasta tres células del patógeno por campo de observación microscópica, además la posibilidad de apreciar las células fluorescentes hace de la técnica una herramienta valiosa para el diagnóstico del patógeno.

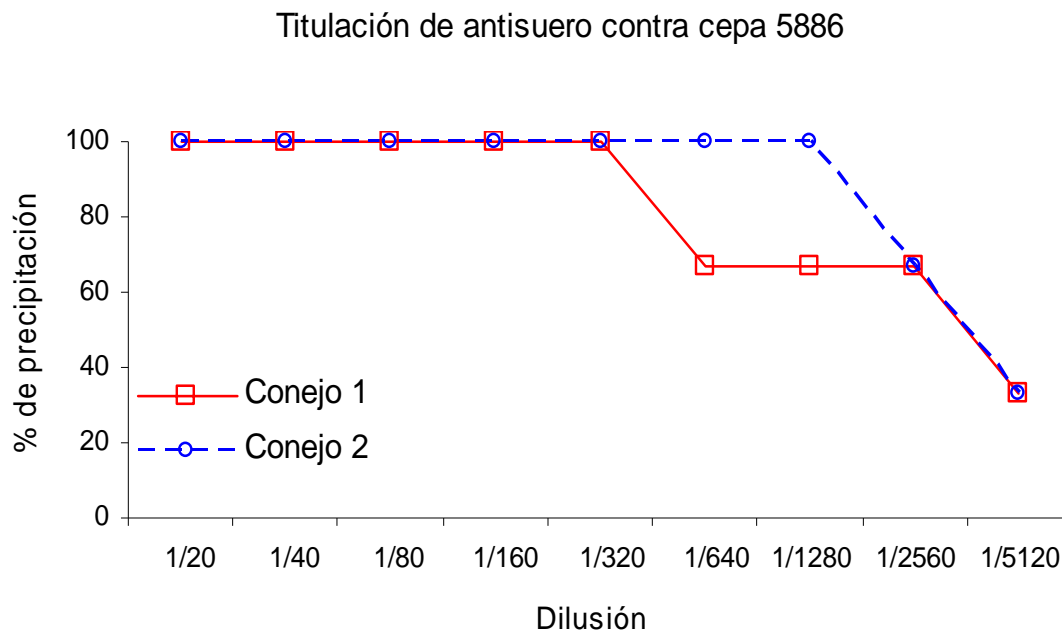


Figura 15. Precipitación de los sueros anti *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* con la cepa 5886 del patógeno.

Álvarez y Márquez (2004) informaron que las técnicas de látex e inmunofluorescencia indirecta (IFI) resultaron específicas y detectaron la bacteria pura en concentraciones de 10^4 ufc/ml. También plantean las autoras que la técnica inmunoenzimática

ELISA podría ser útil y permite la detección de concentraciones de la bacteria de 10^4 ufc / ml., sin la presencia de reacciones cruzadas con bacterias del grupo fluorescente del género *Pseudomonas*.

Los estudios a nivel molecular realizados en los últimos años brindan respuestas a varias incógnitas dentro de los patovares del género *Pseudomonas* y entre las cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* en particular. Schulz *et al.*, (1994) utilizaron como sondas de hibridación las secuencias NPS3121 hrp de *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* en el análisis por RFLP de 24 cepas de este patógeno de diferentes regiones del mundo y años de aislamiento para evaluar la relación genética y taxonómica de patovares de *Pseudomonas syringae*. Con la secuencia hrpA-S, como patrón de hibridación, fueron conducidos análisis por Southern Blot y el análisis de regiones ADN amplificadas por PCR. Los patrones RFLP obtenidos fueron uniformes para veintitrés de las veinticuatro cepas estudiadas, la cepa BR2R mostró un patrón único. Esta cepa patógena al frijol, que fue clasificada como patovar *tabaci* por su habilidad de producir tabtoxina, no provocó síntomas de la enfermedad en el tabaco, a diferencia de las otras veintitrés cepas. Cuando fue utilizado el fragmento ADN que contiene la secuencia hrpM las cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* pudieron ser divididas en tres grupos en base a los patrones RFLP. La cepa BR2R comparte patrones idénticas con *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* NPS3121, también patógena al frijol, pero no causa enfermedad en el tabaco. Sin embargo, ambas cepas pueden ser

diferenciadas una de otra con arg F. Se concluyó que los genes hrp y arg F son conservados en las cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* patógenas al tabaco y que cepas de *Pseudomonas syringae* patogénicas a hospedantes específicos pueden tener un alto nivel de similitud genética. Finalmente los resultados mostraron que la diferencia genética identificable puede ser correlacionada con el rango de hospedantes.

Las técnicas moleculares resultan una herramienta valiosa para el diagnóstico y los estudios epidemiológicos de la enfermedad. Lyndon y Patterson (2001) desarrollaron un sistema, basado en PCR a partir de los genes amplificados, tblA y tabA, necesarios para la producción de la tabtoxina, para distinguir a las cepas que producen tabtoxina de otros patovares de *Pseudomonas syringae*, que provocan clorosis a causa de fitotoxinas de otro tipo. Treinta y dos cepas de patovares de *Pseudomonas syringae* fueron estudiadas con el método. El protocolo descrito permite distinguir los patovares de *Pseudomonas syringae* que producen la tabtoxina, y también los aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de estos de *Pseudomonas syringae* pv *garcae* y *Pseudomonas syringae* pv *coronafaciens*, que también secretan dicha toxina (Sunden y Durbin, 1970; Lyndón y Patterson, 2001).

Cabe señalar que los patovares de la especie tipo *Pseudomonas syringae*, a donde pertenece el agente causal del fuego salvaje, se diferencian por la planta hospedante que afectan y por la fitotoxina

que producen, algunas de ellas, como la tabtoxina, coronatina, faseolotoxina y tagetitoxina, limitadas a patovares específicos, según señalan los trabajos de Durbin (1981) y Willis et al., (1991). Existen plantas hospedantes que pueden ser afectadas por más de un patovar de *Pseudomonas syringae* y la causa de las zonas cloróticas, que circundan las lesiones necróticas, pueden no ser identificadas correctamente. Es por eso que a partir del año 1990 fueron desarrollados métodos para la detección de la coronatina, faseolotoxina y la syringomicina, basados en los genes que se requieren para su producción (Bereswill et al., 1994; Schaad et al., 1995; Sorensen et al., 1998) a los que se suma el sistema de Lyndón y Patterson para la tabtoxina.

TABTOXINA: FACTOR DE VIRULENCIA DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE PV TABACI*

Pocos años después de ser descrita por primera vez la enfermedad algunos investigadores encontraron que el patógeno produce en medios de cultivo una potente toxina (Johnson y Murwing, 1925; Clayton, 1934) e incluso lograron reproducir la mancha necrótica con los filtrados estériles de los cultivos de la bacteria en un gran número de especies de plantas. Intensos trabajos a continuación, realizados bajo la dirección del Dr. Woolley, permitieron el aislamiento y la identificación de la toxina, se informó que la misma es un derivado de un nuevo α - amino ácido (ácido α , ϵ - diamino- β - hidroxilado).

pimérico) que denominaron tabtoxinina (Woolley *et al.*,1952; Woolley *et al.*,1952 ; Woolley *et al.*, 1953). Esta fue la primera vez que una toxina de origen bacteriano era purificada hasta un alto grado de pureza y caracterizada utilizando modelos y metodologías bioquímicas. En 1955, Armin Braun propuso el primer mecanismo de acción de la tabtoxina, en cuya presencia la planta no puede sintetizar la cantidad normal de clorofila.

Actualmente es bien conocido que *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, al igual que todas las bacterias pertenecientes al grupo *syringae*, produce un principio tóxico cuyo modo de acción radica en la inhibición del metabolismo aminoacídico de un gran número de especies de plantas (Bender *et al.*, 1999).

La bacteria produce la toxina en un gran número de medios de cultivo e incluso en un medio salino simple que contiene sacarosa (Braun, 1955). Aún hoy se prosiguen estudiando las condiciones óptimas para la producción de la toxina en condiciones de cultivo *in vitro*. Dehbi *et al.*, (2001) proponen el medio basal constituido por; sacarosa (10 g/L), KNO₃ (5 g/L), MgSO₄ 7H₂O (0.2 g/L), CaCl₂ 2 H₂O (0.11 g/L), FeSO₄ 7H₂O (20 mg/L), NaH₂PO₄ 2H₂O (0.9 g/L) y KH₂PO₄ 3H₂O (1 g/L). Según comentan los autores el sorbitol, la xilosa y la sacarosa fueron las mejores fuentes de carbono para la producción de la toxina. Entre las fuentes de nitrógeno probadas, el nitrato fue superior sobre el NH₄ Cl y la producción de la toxina fue

baja o afectada cuando se incluyó en el medio como única fuente de carbono glucosa, treonina o lisina.

La tabtoxina es un dipéptido formado por un derivado β -lactámico de la metionina unido mediante enlace peptídico a un residuo de la treonina (Bender *et al.*, 1999) (Figura 16). El mismo constituye el precursor de la toxina activa, la cual es activada por peptidasas presentes en el periplasma bacteriano al hidrolizar el enlace peptídico (Durbin y Uchytíl, 1984; Levi y Durbin, 1986). La toxina también puede ser transportada en su forma precursora hacia el interior de la célula vegetal vía di y oligopéptido permeasas y activarse en el interior de la célula por acción de aminopeptidasas de la planta. El derivado β -lactámico de la metionina, forma activa de la toxina, inhibe irreversiblemente la glutamina sintasa (Thomas *et al.*, 1983), una enzima requerida para la síntesis de aminoácidos y clave en la detoxificación del amonio en la célula vegetal.

A partir de 1990 se realizaron numerosos estudios para elucidar la biosíntesis y la regulación de la tabtoxina. Engst y Shaw (1992) identificaron el gen *tabA* involucrado en la producción de la tabtoxina. Varios años más tarde Liu y Shaw (1997) caracterizaron el gen *dapB* y demostraron que es requerido por *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* para la biosíntesis de la lisina y el tabtoxinina- β - lactam. Tres genes, fueron caracterizados y localizados en la región 31-kb: *tabA*, *tabB* y *tblA* (Engst y Shao, 1992; Barta *et al.*, 1993; Liu y Shaw,

1997), región que alberga a todos los genes necesarios para la síntesis y la resistencia de la tabtoxina (Kinscherf *et al.*, 1991).

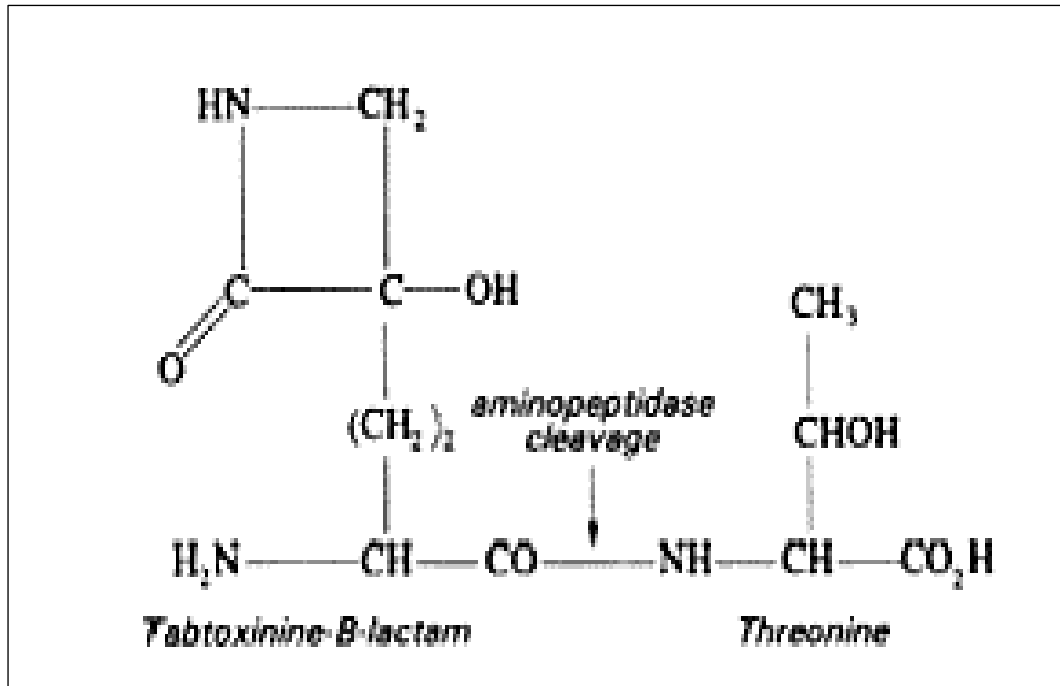


Figura 16. Estructura química de la tabtoxina producida por *Pseudomonas syringae pv. tabaci*. La flecha indica el sitio de corte de la aminopeptidasa que libera la treonina y activa la toxina. (Tomado de Bender *et al.*, 1999).

Muchos efectos deletéreos han sido atribuidos a la acumulación de amonio en planta. Un aumento del amonio provoca un desbalance del equilibrio ácido-base de la célula causando, entre otras cosas, la

destrucción de la clorofila, la ruptura de la membrana de los tilacoides en los cloroplastos y por consiguiente, el desacople de la fotofosforilación responsable de la producción energética en el proceso fotosintético (Turner y Debbage, 1982). La destrucción de la clorofila se evidencia en el halo clorótico provocado por *Pseudomonas syringae pv. tabaci* que induce un desenmascaramiento de los pigmentos carotenoides.

Entre los cuestionamientos más interesantes formulados por los investigadores que iniciaron el estudio del modo de acción de la tabtoxina se encuentra el de ¿cómo puede *Pseudomonas syringae pv. tabaci* sobrevivir, desarrollarse y tomar ventaja en un medio insostenible para el desarrollo de cualquier forma de vida?. Aunque el patógeno inhibe la glutamina sintasa del hospedante, la enzima bacteriana retiene significativa actividad en el periplasma. Knight *et al*, (1986) encontraron que una vez iniciada la activación de la tabtoxina, es puesto en marcha en la bacteria, un mecanismo de adenilación de la glutamina sintasa bacteriana. La adenilación de la enzima bacteriana protege significativamente a *Pseudomonas syringae pv. tabaci* de la acción del inhibidor tabtoxina, aunque, independientemente de su extensión la misma no resulta suficiente para proteger completamente la bacteria del efecto de la toxina.

Más tarde los mismos autores describieron un segundo mecanismo de autoprotección consistente en la abertura enzimática del anillo β -

lactámico, produciéndose un derivado inactivo de la toxina, tabtoxinina. De igual forma, el patógeno posee un mecanismo de bloqueo de la maquinaria transportadora que impide la entrada de la toxina hacia el interior de la bacteria. Varios inhibidores, quizás liberados por la propia célula vegetal dañada, inhiben completamente las permeasas transportadoras de la bacteria (Durbin y Uchytel, 1988). Es evidente además, que la síntesis de un precursor inactivo de la tabtoxina constituye un mecanismo que protege la bacteria de la acción de la toxina, y garantiza su activación en el momento justo y en cantidades suficientes.

Aunque la tabtoxina está asociada con los síntomas del fuego salvaje, su rol preciso en la enfermedad es controversial, pues la correlación entre la producción de la toxina y la patogenicidad puede ser cuestionable. ¿Es la tabtoxina un determinante indispensable para la patogenicidad de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* o simplemente un factor de virulencia? Tres razones apuntan a considerar la capacidad de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* de producir tabtoxina, un factor que contribuye o modifica la extensión de la patogenicidad pero no la convierte, en ninguno de los casos, en indispensable para que la bacteria pueda colonizar y desarrollar la enfermedad en la planta:

1. Cuando *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* pierde la capacidad de producir la toxina, se hace indistinguible de *Pseudomonas syringae* pv. *angulata*, patógeno responsable de la mancha

angular de la hoja. Estudios bioquímicos y moleculares indican que esta última especie pudiera ser una variante, espontáneamente mutada, de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* que ha perdido la capacidad de producir tabtoxina (Kinscherf *et al.*, 1991).

2. La frecuente ocurrencia en la naturaleza de cepas *defectuosas* en la producción de tabtoxina, lo cual es causado por la inestabilidad del segmento génico de 31 kb que codifica las proteínas responsables de la síntesis de tabtoxina. Este segmento génico se escinde del cromosoma bacteriano con una elevada frecuencia (Kinscherf *et al.*, 1991), esto pone en tela de juicio la estricta dependencia de la bacteria hacia la toxina. Procesos indispensables para la supervivencia de un microorganismo son protegidos en la naturaleza por varios mecanismos redundantes.
3. Contrariamente, si los genes que permiten la síntesis de tabtoxina son introducidos en cepas de *Pseudomonas* saprofíticas, los nuevos microorganismos son incapaces de causar los síntomas del fuego salvaje.

Todas estas observaciones indican que la colonización de la planta depende de otros factores independientes de la producción de la toxina. Esta toxina, como en otros fitopatógenos, no parece ser determinante en la patogenicidad, sino un factor que contribuye a la

virulencia del patógeno, jugando un papel importante en el desarrollo de los síntomas.

No obstante Batchvarova *et al.* (1998) realizaron un estudio interesante en la generación de tabaco transgénico resistente a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* . Ellos clonaron el gen *ttr* en tabaco, que confiere resistencia a *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* contra su propia toxina. Los transformantes fueron retados para resistencia al fuego salvaje. Aproximadamente entre 30 y 60 % de los cultivares de tabaco obtenidos mostraron resistencia en la generación F0. La F1 mostró mucho más nivel de resistencia en aproximadamente un 80 %. De tal forma se comprobó que la progenie heredó el nuevo carácter hasta obtenerse a partir de la cuarta generación un 100 % de resistencia. Por supuesto, la estabilidad del inserto génico se comprobó también mediante técnicas moleculares. Las plantas controles desarrollaron el síntoma clorótico en los dos-tres primeros días después de la inoculación. Este experimento demostró varios puntos interesantes en relación con la patogénesis de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y los mecanismos de resistencia de la planta. En especial provee argumentos a favor de la importancia de tabtoxina en la patogénesis de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*.

¿Qué ventajas podría ofrecer a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* la producción de tabtoxina? La toxina producida por este patógeno pudiera contribuir al movimiento sistémico de la bacteria por la

planta al provocar la muerte de las células parenquimatosas. Al morir estas, liberan los nutrientes necesarios para el patógeno, los cuales también pudieran actuar como activadores de la síntesis y liberación de la toxina. De esta forma, la tabtoxina contribuye a la virulencia de la bacteria favoreciendo el desarrollo de la lesión y la multiplicación del patógeno en la planta. La acción de la toxina en las etapas tempranas de la invasión del hospedero podría evitar el desencadenamiento de los mecanismos de defensa de la planta.

Una vez aislada y determinada la estructura de la tabtoxina era esencial, según Braun (1955), conocer no solamente la estructura química de todos los componentes, sino también determinar desde la base de la estructura el mecanismo involucrado en el desarrollo del síntoma. Interesantes experimentos, utilizando el alga *Chlorella vulgaris*, fueron conducidos para definir los términos fisiológicos y bioquímicos en el transcurso de la producción de la lesión patológica del fuego salvaje. Cuando la tabtoxina fue probada en *Ch. vulgaris*, el crecimiento de este organismo fue completamente inhibido por concentraciones convenientes de la toxina estéril. Cuando el medio de cultivo, que contenía la toxina, fue suplementado con hígado o extracto de levadura se obtuvo un cambio del efecto sobre el alga, lo cual sugirió que la tabtoxina interfiere en la síntesis, por *Chlorella*, de algún factor esencial de crecimiento. El estudio de muchos componentes probados reveló, que la utilización del dL- metionina es anulada por la acción de la toxina. Los resultados experimentales con

el uso del alga y el análisis estructural indicaron que la tabtoxina es análogo estructural de la metionina y la relación entre ambos quedó esclarecida cuando sus estructuras fueron comparadas con la estructura del antimetabolito sintético de la sulfoximina de metionina. Cuando se efectuó una comparación de la actividad biológica en hojas de tabaco de varios análogos estructurales de la metionina y la toxina del fuego salvaje, solamente la sulfoximina de metionina, fue capaz de reproducir totalmente la manifestación toxica de la enfermedad. Introducida en hojas de tabaco como solución acuosa en concentraciones desde 0,05 hasta 0,1 mg/ ml provoco la formación de halos cloróticos no distinguibles de los producidos por la tabtoxina de *P. syringae* pv *tabaci*, según informa Braun (1955) (Figura 17).

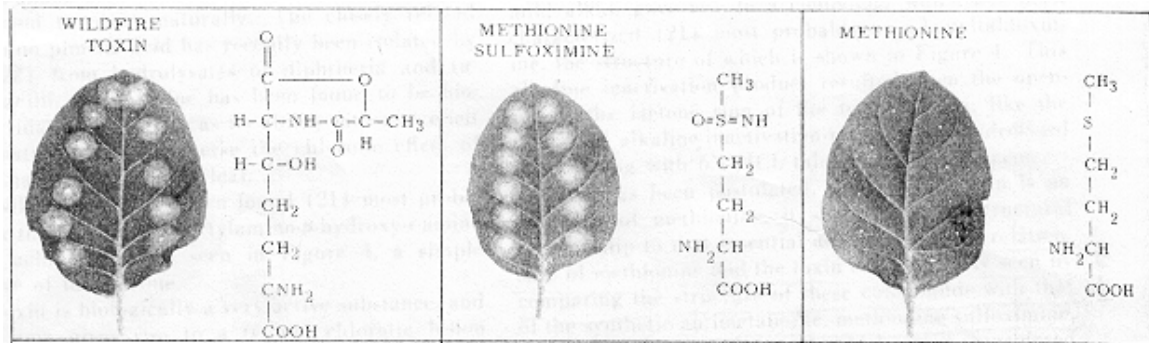


Figura 17: Comparación de la actividad biológica en hojas de tabaco de la tabtoxina(a la izquierda), la sulfoximina de metionina (centro) y la metionina(a la derecha). (Tomada de Braun, 1955).

De esta forma quedó determinado que el análogo químico de la tabtoxina es la sulfoximina de metionina, por su estructura similar y actividad biológica sobre el tabaco. La misma fue utilizada en la selección de mutantes resistentes a *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y a la tabtoxina por Carlston (1973).

Stefanova et al., (2007) utilizaron como inmunógeno la sulfoximina de metionina unida a la especie bacteriana *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, biológicamente similar a *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, bajo un tratamiento específico, que propiciara la unión de unidades de la sulfoximina de metionina a su superficie externa. La inmunización en conejos condujo a la generación, por una parte, de anticuerpos contra *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, que reconocen cruzadamente a *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, y por otra, de anticuerpos que pueden reconocer a la tabtoxina, que potenciaron el reconocimiento de esta última bacteria, resultados que aportan elementos sobre la posibilidad del uso de la sulfoximina de metionina en el desarrollo de herramientas para el diagnóstico del patógeno.

REQUERIMIENTOS BIOECOLÓGICOS PARA EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD.

El fuego salvaje está fuertemente influenciado por diversos factores bioecológicos donde la humedad parece ser el elemento desencadenante para el desarrollo y propagación de la enfermedad

de forma epidémica, causante de los verdaderos estragos en el semillero y en el campo.

En los meses en los cuales tiene lugar la campaña tabacalera, se crean condiciones climáticas favorables para el Fuego Salvaje. Variaciones de temperatura entre 15 y 37°C no parecen afectar considerablemente el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, las lluvias son indispensables para provocar la impregnación en agua de las hojas de tabaco, lo cual parece condicionar la asombrosa rapidez con que se propaga la enfermedad y se desarrollan los síntomas (Johnson, 1937). En la literatura está fuertemente fundamentado el efecto de las tormentas con agua y viento que al golpear sobre las hojas facilitan la impregnación en agua de las mismas. Johnson (1936) por primera vez discute la probable relación entre la impregnación o embebimiento en agua de los tejidos, la infección y desarrollo de epidemias por el fuego salvaje y el fuego negro en tabaco. Una estrecha relación fue observada por Braun y Johnson (1939) entre la cantidad de tejidos impregnados en agua encontrados en los semilleros y la presencia del fuego negro. Señala Fulton (1980) que el fuego salvaje ha ocurrido por muchos años en el estado de Wisconsin, tanto en los semilleros como en el campo, donde a pesar de la esporádica aparición, las pérdidas en el cultivo han sido altas en los años con abundante lluvia. No obstante, basta solo la incidencia de períodos húmedos con lluvias ligeras intermitentes, una alta humedad del suelo y una atmósfera saturada de humedad para que se produzca el empapado

natural de las hojas de tabaco. Gao y Gao (1997) sitúan la lluvia en primer lugar entre los factores que intervienen en el desarrollo de la enfermedad y la época de siembra vinculada a ella.

La bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* pertenece al grupo de los fitopatógenos que invaden el tejido parenquimatoso de la planta, entran a través de los estomas, los hidátodos y diversas heridas provocadas por insectos, herbívoros y el hombre. En los espacios intercelulares llenos de agua la bacteria encuentra el medio idóneo para multiplicarse y propagarse a través de los tejidos con extraordinaria rapidez. He aquí el momento de recordar el factor lipopolisacárido y su función de conducir el agua necesaria para la multiplicación de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* dentro de los espacios intercelulares. Según Clayton (1936) se requiere que las hojas permanezcan empapadas por lo menos 24 horas para el desarrollo epidémico de la enfermedad. En las hojas impregnadas en agua, en 48 horas se producen grandes lesiones de tejido afectado mientras que sin impregnación de agua se requiere alrededor de una semana para el desarrollo de lesiones de pequeño halo (Johnson, 1937).

Wannamaker y Rufty (1989) precisan que el período húmedo post-infección de 24, 36 y 48 horas eleva significativamente el porcentaje del área foliar dañada, siendo la severidad mayor cuando la humedad se combina con una concentración alta de 1×10^8 ufc / ml de la bacteria. El factor humedad explica la elevada sensibilidad en

los semilleros del tabaco con poblaciones altas de plántulas y la razón de los verdaderos estragos que se registran en esta fase del tabaco.

Cuando persiste una gran humedad y los tejidos de la planta se encuentran embebidos en agua, tiene lugar un flujo desde el exterior hacia el interior de la hoja arrastrando consigo la bacteria. Igualmente la entrada a presión del microorganismo se produce por efecto de la lluvia golpeante sobre la hoja o la salpicadura por el envés. En este sentido se debe tener en cuenta la presencia de flagelos polares en *Pseudomonas syringae pv. tabaci* lo cual la convierte en un microorganismo móvil y facilita su movimiento dentro y fuera de los tejidos (Hill, 1930). La población de la bacteria muestra una fase exponencial creciente tanto en las hojas del tabaco como en cultivo *in vitro* (Sigeo y El - Masry, 1989). Según demuestran estos investigadores, ocurre cambio en el tamaño celular que al inicio del período de infección es mayor mientras que la proporción de células con flagelos se incrementa notablemente durante la fase logarítmica.

Varios factores parecen influir sobre el efecto de la humedad y la impregnación de las hojas en agua. Los fotoperíodos, los cuales determinan el intercambio gaseoso de la planta y por tanto controlan la abertura de las estomas, condicionan el infiltrado de agua de las hojas y así la entrada de la bacteria. Durante el día, cuando los estomas están abiertos, las hojas pueden empaparse de agua con más facilidad que por la noche cuando estos se encuentran cerrados.

Un efecto similar tiene lugar con la presencia de heridas mecánicas frescas o las propias lesiones del fuego salvaje. Experimentos durante 1991- 1994 señalaron las heridas y los estomas entre las entradas más importantes de la bacteria (Gao y Gao,1997). Las hojas basales maduras quedan saturadas en agua con más rapidez que las hojas jóvenes de la punta. El desbotonado bajo, además de constituir una vía de entrada para el patógeno, aumenta la susceptibilidad a la saturación por agua, posiblemente debido al efecto fisiológico que tiende a la maduración simultánea de todas las hojas de la planta, en lugar de producirse la maduración progresiva desde la base hacia arriba.

La fertilización alta en nitrógeno y baja en potasio aumenta la susceptibilidad de la planta a la saturación de agua (Clayton, 1937, Allington y Johnson, 1942). Gao y Gao (1997) sitúan la fertilización entre los factores estrechamente relacionados con la ocurrencia de la enfermedad en el campo. No es de sorprender que la predisposición de la planta a la impregnación en agua esté también controlada por componentes genéticos. Se ha demostrado que algunas especies y variedades se saturan de agua más fácilmente que otras y que existe una correlación entre la predisposición genética a la saturación de agua del tabaco y la resistencia al fuego salvaje (Heggstad, 1945). Clayton (1947) describió la influencia de la saturación de agua sobre el desarrollo de las lesiones en las hojas en la variedad resistente TL

106, la cual es también resistente al embebimiento en agua.

El comportamiento y diseminación de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* presupone la existencia de otras variables bioecológicas que inciden positivamente sobre el desarrollo del fuego salvaje y que están directamente relacionadas con la fuente de inoculación. Han sido definidas varias fuentes de inóculo que posibilitan además la hibernación de la bacteria entre cosechas y la diseminación de la enfermedad en el semillero y las plantaciones.

La semilla constituye la primera fuente de contaminación definida, lo cual es enteramente posible si se tiene en cuenta que las cápsulas pueden ser atacadas por el patógeno reproduciendo síntomas de la enfermedad y la bacteria ha sido identificada en la testa y el endospermo (Gao y Gao, 1997). Son varias las experiencias en las que se contaminan semillas con cultivos puros de la bacteria y se manifiesta posteriormente la enfermedad en todas las plántulas provenientes de semillas infestadas (Wolf, 1957; Johnson y Murwing, 1925). Algunas de ellas sugieren que las semillas infectadas constituyen una fuente de inóculo del patógeno hasta los dos años de almacenamiento. La evidencia más significativa de que la semilla es fuente de inóculo de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* viene de la amplia distribución mundial de este patógeno. Actualmente esta fuente de contaminación continúa siendo la causa de graves epidemias.

Los restos de cosechas infectadas por la enfermedad constituyen otra fuente importante de inóculo (Valleau *et al.*, 1944; Knoche *et al.*, 1994, Gao y Gao, 1997). Las hojas de plantas enfermas secadas al aire durante 198-298 días son capaces de provocar la infección (Clinton y Mc Cormick, 1922). Este resultado junto a otras evidencias (Johnson y Murwing, 1925) confirman que la bacteria del fuego salvaje puede permanecer en los detritos secos de tabaco que quedan en el campo y provocar la infección de las plantas sembradas en la próxima temporada. *Pseudomonas syringae pv. tabaci* ha sido aislada viable de hojas de tabaco manufacturado y varias fuentes hacen referencia de que los propios trabajadores agrícolas, que mastican hojas secas de tabaco, pueden introducir la bacteria al escupir sobre las plántulas durante la atención cultural al semillero.

A pesar de algunos contradictorios resultados obtenidos durante la primera mitad del siglo pasado (Johnson y Murwing, 1925; Clinton y Mc Cormick, 1922; Wolf, 1957; Valleau *et al.*, 1944; Reid *et al.*, 1942) todo parece indicar que el suelo es otra fuente de inóculo de *Pseudomonas syringae pv. tabaci*. Las principales evidencias provienen de la infección de plantas de tabaco sanas al plantarlas en suelo procedente de plantaciones enfermas (Clinton y Mc Cormick, 1922), de la aparición de la enfermedad en el semillero (Wolf, 1957) por el mismo sitio donde ocurrió la enfermedad el año anterior y por el éxito en lograr la aparición de la enfermedad cuando se utiliza una

suspensión de suelo proveniente de semilleros infectados como fuente de inóculo (Valleau *et al.*, 1944). Estos autores lograron la aparición de los síntomas de la enfermedad a partir de 35 de 116 muestras de suelo. En este sentido sería interesante considerar, en futuros estudios, la influencia de la densidad de la bacteria en el inóculo y la influencia de las características del suelo en la supervivencia de la misma.

Algunos autores consideran las raíces de plantas silvestres y cultivables, entre ellas el pasto, como una fuente de inóculo tan importante como las propias semillas de tabaco infectadas y más importantes que los detritos de plantaciones infectadas. Es larga la lista de plantas que pueden ser afectadas o de las cuales puede ser aislada *Pseudomonas syringae pv. tabaci* y donde el patógeno puede invernar o multiplicarse. Adicionalmente, la bacteria ha sido aislada de las raíces de varias plantas silvestres cercanas al semillero, tales como *Ambrosia artemisiifolia*, *Capsella bursa-pastoris* y *Cerastium arvensis* (Valleau *et al.*, 1944).

Una fuente de inóculo poco considerada y superficialmente estudiada lo constituye la tela con la cual se cubren los semilleros. La fundamentación que sustenta este criterio proviene de experiencias en las cuales se han plantado semilleros utilizando simultáneamente coberturas nuevas y coberturas provenientes de semilleros afectados y sólo se ha manifestado la enfermedad en el semillero cubierto por la

tela infectada (Wolf, 1922).

Ciertos insectos, como dos especies de la pulga saltona (*Epitrix hirtipennis* y *Epitrix párvula*), la especie *Macrosiphum sp*, las larvas de *Ephestia elutella* y la mosca blanca (*Aleurodes vaporarium*) han sido informados como vectores naturales que diseminan la bacteria. Se ha observado como las lesiones del fuego salvaje se desarrollan alrededor de las perforaciones provocadas por la pulga saltona; en 1957, Wolf aisló *Pseudomonas syringae pv. tabaci* del cuerpo de este insecto.

A pesar de no encabezar la relación aquí descrita de vías de propagación de la enfermedad, las plantulas infectadas procedentes de semilleros contaminados constituyen la más importante y evidente vía de propagación de la enfermedad en el campo, sobre todo si el trasplante viene acompañado de lluvias intensas con vientos, los cuales arrastran la bacteria de planta a planta alcanzando distancias considerables.

Finalmente, debe tenerse en cuenta que la diseminación del fuego salvaje en el semillero puede producirse a través de la operación de desyerbe o cuando los trabajadores se mueven indiscriminadamente de semilleros enfermos a semilleros sanos.

COMPORTAMIENTO VARIETAL Y RAZAS DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV *TABACI*.

En la década siguiente a la descripción del fuego salvaje varios investigadores (Chapman y Anderson, 1921; Clinton y McCormick, 1922; Fromme y Wingard, 1922; Anderson, 1925) notaron diferencia en la resistencia varietal frente a la enfermedad sin percatarse, posiblemente, de la importancia de esta observación y de los futuros arduos trabajos de selección de variedades como medida de control. Diez años más tarde Garner *et al.*, (1936) reportaron la selección de la variedad Narrow - Leaf Orinoco, cultivada en Virginia, con alguna resistencia al fuego negro. Valleau *et al.*, (1943) informaron el tabaco Dark como más resistente al fuego negro que los cultivares de Burley, crecidas en las mismas áreas.

Con la liberación de la primera variedad de tabaco resistente al fuego salvaje (Heggstad *et al.*, 1960) se inició la incesante búsqueda de variedades resistentes como la principal y más poderosa arma para combatir *Pseudomonas syringae pv. tabaci*. En 1963 fue liberado el cultivar resistente Habana 501(Ogden, 1963) reemplazado más tarde por Habana 503. Ambos derivaron su resistencia de *Nicotiana longiflora* mediante el cruzamiento de *Nicotiana tabacum* con el híbrido TL 106 de *N. longiflora* (Clayton, 1947). Algunos años después fueron encontrados ocasionalmente síntomas típicos del fuego salvaje en

Havana 503 y más tarde resultaron infectados otros cultivares que tenían parentesco con TL 106 (Skoog y Fulton, 1976) clasificándose las estirpes de la bacteria en comunes y virulentas, siendo más tarde agrupadas en razas.

La designación de razas se define por la reacción de los diferentes cultivares a la acción de cepas del microorganismo patógeno. Dos razas han sido reconocidas por mucho tiempo para *Pseudomonas syringae pv. tabaci*: Raza O para las estirpes de la bacteria que infectan variedades que no contienen resistencia proveniente de *Nicotiana longiflora* (Clayton, 1947) y Raza 1 patogénica en variedades que contienen resistencia proveniente de *Nicotiana longiflora* o que no contengan resistencia derivada de *N. rustica*. Recientemente se ha informado una tercera raza (Raza 2) para estirpes aisladas (Tox+ y Tox-) en Zimbabwe que afectan las dos líneas de tabaco que hasta ahora han conferido resistencia. La caracterización patogénica de esta nueva raza describe estirpes Tox+ con presencia de halo clorótico, lesiones de hipersensibilidad y necróticas, y estirpes Tox- que producen lesiones de hipersensibilidad y ausencia de clorosis (Mapuranga, 1998).

Para la caracterización de las razas 0 y 1 se utilizan las variedades de tabaco Havana 142 (susceptible a las dos razas), Havana 503 (susceptible a la raza 1, pero resistente a la 0), Havana 615 (resistente a las dos razas, pero que contiene de un 5-10% de plantas sensibles a

la raza 1), *Nicotiana rustica* (resistente a las dos razas) (Knoche *et al.*, 1994).

La existencia de razas del patógeno, que parecen surgir de la continua evolución o selección de estirpes capaces de franquear las barreras que le impone el hombre, ha hecho más difícil el desarrollo e implementación de resistencia en las variedades comerciales, ya que esto implica, además del trabajo de genetistas, un riguroso aporte de los fitobacteriólogos al hacerse necesaria la caracterización de las estirpes que específicamente afectan una región determinada. En los Estados Unidos se han empezado a realizar validaciones de la resistencia directamente en las plantaciones, pues existen criterios que la validación en condiciones experimentales no se corresponde con los resultados en las condiciones del campo.

Después de reconocer que la resistencia a la raza 1 podía lograrse a partir de *N. rustica* se inició un programa para su incorporación contra las nuevas estirpes de la bacteria (Stavely y Skoog, 1976), no obstante los esfuerzos las variedades resistentes de tabaco no son muy abundantes ya que no resulta fácil obtener material que reúna la resistencia con la calidad orgaléptica requerida.

La tabla II ofrece una lista de variedades de tabaco resistentes al fuego salvaje y la tabla III muestra los resultados de la experiencia con variedades americanas en campo.

Tabla II. Variedades de tabaco resistentes a *Pseudomonas syringae pv. tabaci*. Comportamiento frente a las tres razas del patógeno.

GENOTIPO / CV	<i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i>		
	Raza 0	Raza 1	Raza 2
<i>N. longiflora</i>	R	S	
<i>N. rustica</i>	R	R	
BY 21	R	R	
BY 10	S	S	
HAVANA 142	S	S	
HAVANA 503 / 503B	R	S	
HAVANA 615 / 627	R	R	
CV. KUTSAGA E1	S	S	S
LINE WZ 3-2-1 X KUTZAGA 35	R	R	S

A partir del intenso trabajo en la incorporación de resistencia al fuego salvaje en variedades de tabaco, se ha podido determinar que la misma reside en un gen dominante (Woodend y Mudzengerere, 1992) y que la resistencia a los estirpes Tox+ y Tox- pudiera estar relacionada, puesto que la resistencia a *Pseudomonas syringae pv. tabaci*

generalmente suele expresarse también contra *Pseudomonas syringae* pv. *angulata*. En este sentido algunos autores consideran la existencia de dos genes dominantes relacionados.

Tabla III. Resultado de las experiencias americanas en la validación de la resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* en condiciones de campo

VARIETADES	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> / <i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>angulata</i>
KY 14	R
KY 17	R
TN 90	R
CLAY 501	I
KY 907	R
NC 3	R
KY8959	R
KY 10	S
MS KY 14 X L8	R

Con la aplicación de técnicas moleculares al estudio de la interacción planta-patógeno y la incorporación de resistencia mediante la ingeniería genética, se ha podido determinar que además de los dos

genes dominantes que confieren resistencia al fuego salvaje, existen genes modificadores que determinan la susceptibilidad y la respuesta de la planta (Batchvarova *et al.*, 1998; Beffa *et al.*, 1995; Thilmony *et al.*, 1995; Florack *et al.*, 1995).

Tal es el caso de genes que codifican características morfológicas (estructura de los estomas o predisposición al embebimiento en agua) y fisiológicas (capacidad tamponante del medio intercelular). Johnson (1936) fue el primero en llamar la atención a los investigadores sobre la relación entre el embebimiento natural de los tejidos del tabaco y el desarrollo de epidemias por el fuego salvaje y el fuego negro. En 1936, Dr. Clayton encontró que la variedad American resulto una de las mas susceptibles y la variedad Daruma la mas resistente, entre las cien variedades y estirpes de *N. tabacum* probadas, en cuanto al embebimiento por agua.

Motivado por las múltiples evidencias de este hecho, Heggstad (1945) comparó la reacción frente al embebimiento en agua de numerosas variedades locales, domésticas e introducidas del exterior, bajo las condiciones de cámara húmeda, casa de vegetación y de semillero, incluso estudió la posibilidad de que este carácter, relacionado con la resistencia, fuese heredable. Quedó demostrado experimentalmente que la resistencia a la enfermedad guarda estrecha relación con la resistencia al embebimiento por agua, las variedades American y Daruma se reafirmaron como susceptibles y

resistentes, respectivamente. La población F1 se mostró aparentemente intermediaria sin embargo, en algunas variedades hubo evidencia de una resistencia parcial dominante, la reacción en F2 y F3 claramente indicó la segregación del factor genético que controla la herencia del factor, la resistencia resultó predominante en la población F3. De esta manera Heggstad (1945) sugirió que es posible descartar, mediante la selección de este carácter de resistencia a variedades de tabaco susceptibles. Dos años más tarde Clayton (1947) señaló, que la resistencia de la variedad Burley -21 está relacionada con la resistencia que muestra al embebimiento en agua.

Todo esto presupone un conjunto de factores genéticos y ambientales que propician una efectiva expresión de la resistencia al fuego salvaje. Por ejemplo, Burley-21 en las condiciones brasileñas expresa una resistencia intermedia, la cual se podría explicar con los factores nutricionales, ambientales o por la interacción con insectos que logran abrir una puerta de entrada al microorganismo. Esto define un tipo de herencia cuantitativa que es la que se verifica en las condiciones de campo y se contrapone a la herencia cualitativa determinada por los dos genes dominantes, la cual debería expresarse como todo o nada.

Durante la década del ochenta, las variedades comerciales cubanas fueron evaluadas en las condiciones de la antigua Unión Soviética. El estudio fue realizado utilizando el método tradicional de probar la

resistencia frente a la infección natural en el campo y la selección de las líneas menos afectadas. Las evaluaciones se realizaron en varias estaciones experimentales bajo infección natural de intensidad media y elevada de la enfermedad.

Tabla V. Afectación por Fuego Salvaje de variedades de tabaco cubano frente a una mediana intensidad de la enfermedad (Resumido de Vinogradov *et al.*, 1988).

VARIEDAD	Desarrollo de Fuego Salvaje (%)	Plantas no Afectadas (%)	Rango de afectación *
Habana 7.5.1	0	100	0
Cabaiguán 7HC	0	100	0
F.5.11	0	100	0
Escambray 70	0	100	0
Cabaiguán 72	0	100	0
Pelo de Oro	0	100	0
Corojo	0	100	0
Virginia 315	0	100	0
Ky-17	2.8	85.7	0-1
Criollo	11.7	88.2	0-5
Habana Resistent,	0	100	0
Canadá	0	100	0
Habana 142, EUA	0	100	0
Burley 21, EUA	100	0	5

*Escala de evaluación de la infección; 0 = no hay manchas de afectación; 1 = manchas aisladas, menos del 1% de superficie foliar; 2 = afectado 1-5 % de la hoja, de 2 a 3 manchas por plantas; 3 = 5 -25 % de la hoja afectada ó 1/3 de hojas manchadas; 4 = 25 -50 % de la hoja afectada ó 50 % de hojas manchadas; 5 = más del 50 % de afectación.

Tabla VI. Afectación por Fuego Salvaje de variedades de tabaco cubano ante una intensidad alta de la enfermedad (Resumido de Vinogradov *et al.*, 1988)

VARIEDAD	Desarrollo de Fuego Salvaje (%)	Plantas no Afectadas (%)	Rango de afectación *
Habana 7.5.1	8.2	58.8	0-1
Cabaiguán 7HC	3.5	82.6	0-1
F.5.11	5.5	77.8	0-2
Escambray 70	8.6	66.7	0-3
Cabaiguán 72	10.0	62.5	0-2
Pelo de Oro	21.1	22.2	0-3
Corojo	15.0	33.6	0-3
Virginia 315	8.7	56.2	0-2
Ky-17	24.3	28.6	0-4
Criollo	35.0	33.0	0-5
Habana Resistent,	0	100	0
Canadá	0	100	0
Habana 142, EUA	8.5	57.1	0-1
Burley 21, EUA	100	0	5

Las tablas V y VI muestran los resultados obtenidos con las variedades cubanas y otras de referencia internacional. Los resultados señalan un elevado grado de resistencia de las variedades Habana 7.5.1 y Cabaiguán 7 HC y el mayor o menor grado de resistencia de otras diez variedades evaluadas en este estudio (Vinogradov *et al.*, 1988). Si bien alguna de las variedades comerciales actuales posee en su progenie líneas cuya resistencia ha sido evaluada en condiciones naturales (Vinogradov *et al.*, 1988), esto no implica la incorporación de los factores determinantes de la

resistencia (Tabla VII).

Tabla VII. Variedades comerciales de tabaco cubano que poseen en su progenie líneas de probada resistencia al fuego salvaje.

VARIEDAD	PROGENITORES
Habana 2000	Corojo x Habana 2.1.1
Habana 92	Corojo x RxT (Polaca)
Habana VA	Corojo x GA-955 (Australiana)
S. Spíritus 96	Habana 92 x Habana RxT
BH-13	BH-11 x Ky 17

RANGO DE HOSPEDANTES DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. TABACI*.

El solo hecho de que la bacteria secrete una toxina que afecta el metabolismo nitrogenado de la planta, la convierte en una bacteria fácilmente inoculable en numerosas especies de plantas, lo cual ha sido comprobado experimentalmente por muchos autores (Wolf y Foster, 1918; Chapman y Anderson, 1922; Clinton y Mc Cormick, 1922; Johnson *et al.*, 1924; Anderson, 1925; Valleau *et al.*, 1943).

Johnson *et al.* (1924) emplearon cultivos virulentos de *Pseudomonas syringae pv. tabaci* y provocaron la infección en especies de 24 familias

de plantas. Las mismas se inocularon dejando caer solamente una gota de la suspensión bacteriana o provocando una lesión con la punta de una aguja. Entre las solanáceas, además del tabaco, lograron la infección del pimiento, la berenjena, la papa, el tomate y la cereza (*Physalis grandiflora*). El rango de hospedantes descrito por estos autores comprende cuatro especies de cucurbitáceas, 13 leguminosas, 11 gramíneas, 7 crucíferas, 6 compositáceas, 5 poligonáceas, 5 malváceas y 2 umbelíferáceas. En plantas cultivables los autores describieron la infección en el melón, la sandía, la calabaza, el pepino, el frijol, el guisante, el cacahuete, la soya, la alfalfa, el trigo, la avena, el centeno, la cebada, la berza, el nabo, el rábano, la mostaza, la lechuga, la remolacha, la espinaca, la zanahoria, y el algodón. Entre las especies de *Nicotiana* (N.), señalaron *N. alata grandiflora*, *N. angustifolia*, *N. atropurpureum*, *N. vigelovii*, *N. caliciflora*, *N. campanulata*, *N. chinensis*, *N. glutinosa*, *N. langsdorffii*, *N. laterrima*, *N. sylvestris* y *N. trigonophylla*.

Anderson (1925) realizó un experimento similar con 41 variedades de *N. tabacum* y confirmó los resultados obtenidos por Johnson *et al.* (1924), incluyendo además otras especies susceptibles como *N. colosea*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. quadrivalvis*, *N. sanderae* y *N. wigandoides*. Este autor también describe a las especies *N. alata*, *N. attenata*, *N. nudicaulis*, *N. repanda*, y *N. rustica* como altamente resistentes.

Existen hospedantes cuya principal función es garantizar la hibernación del patógeno y la presencia del inóculo bajo condiciones naturales de campo. En este sentido Valleau *et al.* (1944) demostraron, en los años 40, que la bacteria se multiplica en la superficie de las raíces de varias plantas cultivadas y también en las silvestres, donde sobrevive durante todo el año, por lo que se pudiera considerar a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* un habitante del suelo. En la lista de malezas vinculadas al Fuego Salvaje se encuentran el pimiento de agua (*Polygonum hydropiper* L), bolsa de pastor (*Capsella bursa-pastoris* L), hierba mora (*Solanum nigrum* L var. *americanum*), arrocillo (*Echinochloa crusgalli* L), diente de león (*Taraxacum officinale*), *Desmodium canum*, *Ipomoea cynanchifolia*, *Ipomoea* spp., *Vigna sinensis*, *Atropa belladonna* y *Nicandra physaloides*.

Los estudios durante varios años han sumado al tabaco, la soya (*Glycine max* L Mern), el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), el pepino (*Cucumis sativus*), el chícharo (*Pisum sativum*) y recientemente la fruta bomba (*Carica papaya* L.) como cultivos hospedantes en condiciones naturales de la bacteria. Los síntomas en el chícharo son similares a los en la soya (Ribeiro y Hagedorn, 1976) y en el pepino el fuego salvaje provoca manchas angulares parecidas a las de *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* (Robbs *et al.*, 1990).

En las hojas de la fruta bomba se observan manchas cloróticas con centro necrótico y tizón foliar (Figura 18), a veces circundadas por

halos cloróticos con presencia de exudado (Beriam *et al.*, 2002; Beriam *et al.*, 2006).



Figura 18. Síntomas del fuego salvaje en hoja de fruta bomba (*Carica papaya*) (Foto de Beriam *et al.*, 2002).

La soya (*Glycine max* L Mern) y el fuego salvaje

De los hospedantes naturales, en el frijol y la soya se han registrado afectaciones económicamente importantes y la enfermedad ha sido estudiada con una mayor profundidad, según muestran los artículos publicados.

El primer reconocimiento y estudio del fuego salvaje en el cultivo de la soya pertenece a Allington (1945), en los Estados Unidos de América, en la primavera de 1943, aunque el propio autor señala que probablemente la enfermedad ha estado presente antes de la fecha.

De hecho ya existía información sobre la susceptibilidad del cultivo a la inoculación artificial (Johnson *et al.*, 1924; Valleau *et al.*, 1943). Las primeras muestras procedían de campos de Mississippi y más tarde fue observado el fuego salvaje en todas las áreas de producción, excepto en el estado de Carolina del Norte, donde la enfermedad apareció algo más tarde. Al principio de agosto de 1943 fueron reportadas infecciones severas en Arkansas, Tennessee, Alabama y Georgia. Después de 1944 fueron registradas infecciones en todos los estados del sur y del norte del país, en la mayoría de los campos estas se presentaron como áreas definidas y en muy pocos casos la infección fue uniforme, relacionándose esto con la fertilidad y el drenaje (Allington, 1945).

Según Allington, los síntomas son confinados al follaje y son tan característicos que podían constituir criterio a respetar para el diagnóstico de la enfermedad: manchas necróticas de color carmelita oscuro a negro que contrasta con el color del halo clorótico circundante. Las lesiones pueden unirse y motivar quemazón con una severa defoliación prematura (Allington, 1945; Clayton, 1950; Chamberlain, 1956), con pérdidas en el cultivo sobre todo en períodos de lluvia. Las fuertes lluvias guardaron estrecha relación con la epidemiología de la enfermedad, bajo estas circunstancias se incrementa la presencia de agua en la superficie de las hojas y en los espacios intercelulares, y la penetración y la dispersión de la bacteria se hacen extremadamente rápidas requiriendo para eso solamente de

pocos segundos. Allington (1945) estimó que en las hojas embebidas de agua se producen alrededor de 7-8 generaciones bacterianas durante 24 horas en contraste de una sola generación en condiciones contrarias.

Aunque Allington describe en su artículo de 1945 solamente síntomas foliares, puntualizando que en las vainas y las semillas no se halló infección, más tarde Graham (citado por Jardim Freire, 1963) se refiere al ataque de la enfermedad en todas las partes de la planta: tallo, ramas, pecíolos, vainas y semillas. Jardim Freire (1963), en un detallado estudio del fuego salvaje en la soya en Brasil, reafirma en las hojas lesiones necróticas, irregulares, de color castaño claro a castaño oscuro, con un tamaño medio de 5 milímetros, circundadas por un halo clorótico de mayor o menor tamaño que depende de la susceptibilidad de la variedad, probablemente por el grosor de la hoja y también por la dificultad de embebimiento en agua del tejido vegetal. En las ramas y los pecíolos las manchas son algo alargadas e irregulares, de color violáceo a negro donde la coalescencia de las lesiones puede causar muerte de los órganos afectados (Figura 19), el ataque severo de la enfermedad durante la floración ocasiona abortamiento de las flores. En las vainas las manchas son grandes, húmedas, de color castaño oscuro; las semillas presentan deformaciones y manchas que impiden la germinación y/ o el desarrollo normal. La presencia de una o dos manchas deprimidas, de color castaño oscuro, se registran en los cotiledones, en las hojas

primarias las mismas son grandes y más amarillentas que se tornan posteriormente, por la necrosis, de color castaño claro (Jardim Freire, 1963).



Figura 19. Síntomas del Fuego Salvaje: A, en hojas; B, en ramas y pecíolos de soja (Foto de Jardim Freire, 1963)

En las hojas de la soja pueden apreciarse también pequeñas “pústulas” incluso en el centro de las lesiones típicas del fuego salvaje, esto ocurre igualmente en los pecíolos y las ramas. Se trata de la pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) que produce pequeñas manchas necróticas que no exceden en tamaño de 1mm, más o menos circulares, de color castaño claro a oscuro. En el centro, el tejido afectado se eleva formando una pústula, con el tiempo las lesiones coalescen y forman manchas grandes irregulares cuyo tejido comúnmente se rompe (Figura 20). El camino abierto por

la pústula bacteriana es aprovechado por el agente causal del fuego salvaje para penetrar en los tejidos de la planta (Jardim Freire, 1963). La ausencia de pústulas y el tamaño de las lesiones pueden distinguir fácilmente a ambas enfermedades cuyos agentes causales igualmente son diferentes.

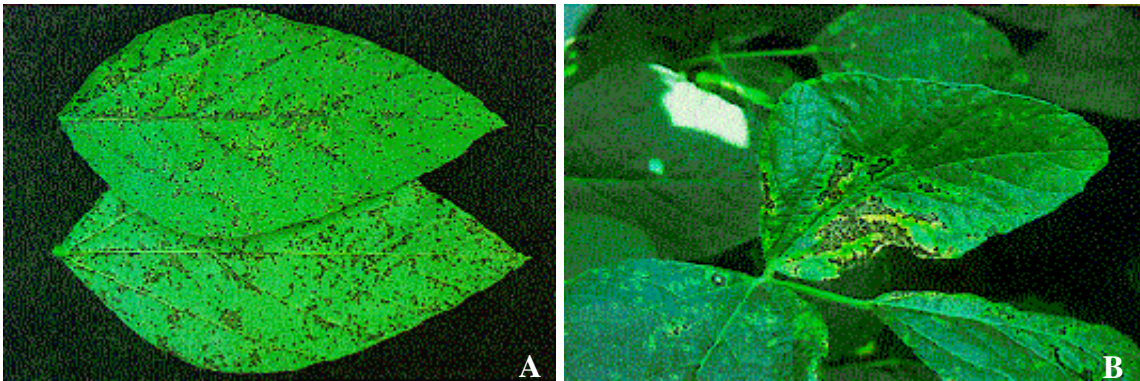


Figura 20. A. Síntomas en hojas de soya causadas por la pústula bacteriana. B. Tizón bacteriano (Fotos: Atlas de Enfermedades en Soya)

Distinta, sin embargo, es la situación con el tizón bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*) de la soya que causa manchas muy parecidas, castaño oscuras a negras de 2 - 3mm, más o menos angulares, sin halo clorótico, asemejándose a las del fuego salvaje que no muestran el halo típico. En las ramas y los pecíolos los síntomas son prácticamente idénticos. Señala Jardim Freire que el fuego salvaje difiere del tizón por el mayor tamaño de la lesión necrótica, presencia de halo clorótico, así como por la ausencia de embebimiento de los tejidos y de exudado bacteriano.

Entre los aislamientos del tizón bacteriano y del fuego salvaje no existe mucha diferencia morfológica y bioquímica (Jardim Freire, 1963). En las claves para la identificación de las bacterias hay pruebas, tales como, la β -glucosidasa, eritritol, L (+) tartrato, gelatina y otros, que pueden aportar elementos para distinguir a los microorganismos, sin embargo, la prueba de patogenicidad sería la más apropiada para diferenciar a ambas bacterias, teniendo en cuenta que *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* no es patógena al tabaco.

El fuego salvaje en el cultivo del fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.),

En el frijol común aparecen lesiones foliares marrones, muchas veces restringidas a pequeñas puntuaciones, circundadas por un halo clorótico (Ribeiro y Hagedorn, 1976, Ribeiro y Robbs, 1984), la enfermedad comienza un mes después de la siembra y hasta el final del ciclo del cultivo con una intensidad mayor en las hojas del tercio inferior de las plantas, principalmente en las más bajas (Tanaka *et al.*, 1996). Esta sintomatología se asemeja a la del tizón aureolado, causada por *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, cuyo efecto clorótico es insensible a la luz y es termo-resistente, características señaladas para la toxina que produce esta especie, pero totalmente opuestas a las de la tabtoxina. (Durbin y Sinden, 1967; Sinden y Durbin, 1969; Hoitink y Sinden, 1970).

La bacteria fue registrada en *Desmodium canum* e *Ipomoea cynanchifolia* en las mismas áreas sembradas de frijol y la patogenicidad cruzada verificó la infección en las malezas y el frijol con síntomas similares (Tanaka *et al.*, 1996). Comentan los autores que, teniendo en cuenta la aparente no transmisión de la bacteria por las semillas del frijol, estas plantas invasoras podrían constituir un factor importante para la ocurrencia de la enfermedad a niveles epidémicos en el campo y deben ser eliminadas con la finalidad de reducir la fuente de infección.

Todo indica que el frijol es altamente susceptible al fuego salvaje que se manifiesta en varias regiones productoras del grano en Brasil, donde la enfermedad fue descrita por primera vez y considerada entre los factores que reducen la productividad por la disminución del área fotosintética y la defoliación (Mohan, 1982; Tanaka *et al.*, 1993). Ito *et al.*, (1993) señalaron que de 84 genotipos regionales y mejorados de frijol, un 60% muestran síntomas del fuego salvaje y 15 pueden ser catalogados de susceptibles por la severidad del ataque. De diez y nueve cultivares, cuyo comportamiento fue estudiado en condiciones controladas, solamente uno, IAPAR 31, mostró resistencia a la enfermedad (Theodoro y Maringoni, 1998). Los autores indican la concentración de 10^8 ufc/ml como adecuada para la inoculación del frijol por la manifestación clara de los síntomas. Las concentraciones de 10^5 - 10^7 provocan lesiones menos intensas y a la concentración de 10^9 ufc/ml las lesiones son demasiado severas.

A pesar de la sensibilidad del cultivo las afectaciones son relacionadas comúnmente con el follaje de las plantas. Respecto a las infecciones en las vainas del frijol, Ribeiro *et al.*, (1979) expresan que estas no han sido encontradas bajo condiciones naturales. Vainas de 65 cultivares de frijol, entre ellos 45 variedades comerciales de Brasil, fueron inoculadas por estos autores con cepas aisladas del fuego salvaje en frijol y solamente desarrollaron diminutas manchas de color carmelita claro en el lugar de la punción. Bajo las mismas condiciones *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* indujo lesiones húmedas expandidas y presencia de exudado bacteriano, ambos elementos típicos de la enfermedad. Incluso se recomendó (Ribeiro *et al.*, 1979) la prueba en vainas para distinguir aislamientos de esta bacteria y de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Según señalan estos autores ninguna de las 600 semillas de frijol procedentes de las 40 plantas inoculadas a través de las flores y vainas dio lugar a plántulas con síntomas de la enfermedad. En trabajos más recientes, Tanaka *et al.*, (1996) no describen síntomas en las vainas a pesar que observan la enfermedad hasta el final del ciclo del cultivo, y Teodoro y Maringoni (1998) solo valoraron la resistencia foliar de las variedades estudiadas.

En el cultivo del frijol, como anteriormente se comentó, los síntomas del fuego salvaje en las condiciones del campo, pueden ser confundidos con los producidos por *Pseudomonas savastanoi* pv.

phaseolicola, que causa el tizón aureolado o tizón de halo (Ribeiro *et al.*, 1979; Tanaka, 1996). En este caso, aunque se realicen pruebas bioquímicas diferenciativas, también deberá recurrirse a la prueba de patogenicidad y a la prueba de HR en hojas de tabaco, que no es afectado por esta bacteria, para la identificación correcta de la especie causante de la enfermedad, objeto de diagnóstico.

CARACTERÍSTICAS MORFO-CULTURALES, BIOQUÍMICAS, SEROLÓGICAS, PATOGÉNICAS Y MOLECULARES DE CEPAS DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *TABACI* DE DIFERENTES HOSPEDANTES

A medida que fueron apareciendo nuevos hospedantes del fuego salvaje en condiciones naturales, los aislamientos bacterianos obtenidos a partir de ellos fueron caracterizados mediante estudios morfológicos, culturales, bioquímicos, serológicos y patogénicos, y comparados los resultados con los informados para las cepas de tabaco, como punto de partida para una identificación certera. En general los diferentes autores señalan un comportamiento similar referente a los caracteres morfo-culturales y bioquímicos, aunque resulta difícil la comparación más profunda por las referencias, debido a que no siempre fueron utilizadas las mismas fuentes de nitrógeno, carbono y otros substratos. Respecto a la prueba LOPAT, que constituye el punto de partida para el diagnóstico de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, existe unidad de criterios entre los

autores de referencia.

Según Allington (1945) las colonias de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* a partir de la soya morfológicamente son indistinguibles, en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar, de las obtenidas de tabaco. Frecuentemente ocurre una disociación espontánea en varios medios de cultivo de colonias lisas y rugosas. El microorganismo del fuego salvaje de la soya también se muestra como bacilo Gram negativo, de $0,86 \times 3,0\mu$, con 1-5 flagelos, sin esporas; produce el pigmento fluorescente. Respecto a la utilización de lactosa, levulosa, inulina, maltosa, glicerol, L-arabinosa, L-xylosa, D-galactosa, dextrosa, sucrosa, sulfato de amonio, nitrito de potasio y urea, como fuentes de nitrógeno y carbono, hubo una concordancia alta con los resultados de Braun (1937) referentes a los aislamientos de tabaco. Señala Allington que las ligeras variaciones dentro de los propios grupos de cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* de soya y de tabaco demostraron la variabilidad de la especie como tal, pero sin diferencia sustancial específica para ser considerados dos bacterias bioquímicamente diferentes.

En el estudio realizado por Jardim Freire (1963) las cepas del fuego salvaje de soya y tabaco morfológica y culturalmente se comportaron de manera similar. En el medio de cultivo nutriente agar las colonias resultaron circulares y elevadas, de 1-2 mm de diámetro, márgenes enteros poco definidos, superficie lisa, color blanco sucio, brillantes y

translucidas. Respecto a la fermentación de los carbohidratos los aislamientos fueron uniformemente positivos frente a la arabinosa, xylosa, glucosa, levulosa, galactosa, manosa, sacarosa, glicerol, manitol, sorbitol e inositol, y negativas respecto a inulina, dextrina y salicina, mientras que la utilización de la lactosa resultó errática.

Ribeiro *et al.*, (1979) no encontraron diferencias morfológicas y bioquímicas entre las diez y nueve cepas del patógeno aisladas de frijol, tabaco y soya, pero señalaron que ellas se diferencian bioquímicamente de las especies *Pseudomonas syringae* pv *syringae* y *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola*, patógenas ambas al frijol.

Las pruebas realizadas por Tanaka *et al.*, (1996), para caracterizar los aislamientos a partir del frijol común, *Desmodium canum* e *Ipomoea* spp. permitieron verificar que todos mostraron características semejantes, propias del género *Pseudomonas*, grupo *syringae*, patovar *tabaci*. Las cepas utilizaron la D-xylosa, manitol, m-inositol, D (-) sorbitol, eritritol, malonato, succinato y L (-) tartrato. La respuesta frente al D (-) tartrato y la reducción de los nitratos resultaron negativas, mientras que la producción de gelatinasa fue positiva. Las pruebas LOPAT dieron resultado negativo para la oxidasa, protopectinasa y arginina, y positivo para el levano. En tabaco el área infiltrada se expandió con halo amarillo que señala la colonización de los tejidos por la bacteria fitopatógena. Comentaron los autores que los resultados son semejantes a los obtenidos por Ribeiro *et al.*, (1979)

y apuntan las pruebas de utilización de manitol, sorbitol, eritritol, inositol y L (+) tartrato como características para el patovar *tabaci* y diferenciativas para *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* que afecta también al frijol.

Comportamiento bioquímico similar en el estudio de cuatro aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de pepino, tabaco y frijol, hallaron Prestes *et al.*, (1998) pero señalaron que el diagnóstico de las tres especies, que pueden afectar al cultivo del pepino, *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*, se hace difícil dada la similitud bioquímica entre las mismas. Además el análisis de las proteínas totales por PAGE/ SDS no permitió diferenciar dichas bacterias, todas potencialmente patógenas al pepino.

Recientemente Álvarez y Márquez (2004) realizaron un estudio nutricional de veintiocho aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de: tabaco (4), soya (2), frijol (9), aster (1), papaya (2), *Celosia* (2), *Ipomoea* (1), pepino (2) y de hospedante no conocido (4), sin encontrar diferencia entre los mismos. Las respuestas de las cepas fueron las siguientes: catalasa (+), nitratos (-) levan (+), oxidasa (-), pectinasa (-), arginina (-), HR (+), celobiosa (+), D-manitol (+), sorbitol (+), sacarosa (+), trehalosa (+) y ramnosa (+). El perfil de proteínas (PAGE/ SDS) mostró un grado elevado de similitud entre las cepas estudiadas con bandas de 14, 26, 36, 70 y 80 kDa.

Respecto a las relaciones serológicas Allington (1945) obtuvo antisueros de aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de tabaco y soya, demostrando por macroprecipitación, que entre los aislamientos existe una estrecha relación y respuesta positiva de identidad serológica. El antisuero policlonal de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* reconoce por igual los aislamientos del patógeno a partir del pepino, tabaco y frijol, con una identidad serológica total entre las cepas independientemente del hospedante, sin reacción cruzada entre el antisuero y las cepas pertenecientes a las patovares *lachrymans* y *syringae*, resultado que confiere una confianza mayor en la prueba (Prestes *et al.*, 1998). Álvarez y Márquez (2004) observaron una identidad serológica total entre el antisuero contra *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, el antígeno del mismo aislado y el antígeno Emb C 478, cepa de tabaco. Entre los aislamientos del fuego salvaje de los otros hospedante y el antisuero utilizado, sin embargo, se estableció una identidad parcial lo que muestra la existencia de antígenos determinantes no compartidos (Álvarez y Márquez, 2004).

A continuación el estudio a nivel molecular de estos aislamientos, mediante rep-PCR y cebadores de la firma GIBCO, reveló la existencia de polimorfismo genético y presencia de cuatro grupos genómicos de acuerdo a los hospedantes de origen (Álvarez y Márquez, 2004). Las cepas a partir del tabaco formaron un primer grupo; los del frijol, pepino y papaya se agruparon en un segundo;

los aislamientos de *Aster* y *Celosia* en un tercero y los de soya formaron el cuarto grupo genómico. Anteriormente Lyndon y Patterson, (2001) señalaron la detección de estirpes Tox + por la técnica PCR.

Mucho más polémica resulta la caracterización patogénica de la población dentro de la especie bacteriana. Desde el primer reporte del fuego salvaje en soya se comienzan estudios para determinar la patogenicidad de los aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* de soya sobre tabaco y viceversa, y explicar el origen de la infección en los campos de soya, y la implicación del tabaco como fuente de inóculo para el cultivo. Desde un inicio Allington (1945) demuestra la patogenicidad de los aislamientos obtenidos de soya sobre el tabaco y apunta la presencia de agua en los tejidos (embebimiento) como factor primordial para el desarrollo de las lesiones. Comenta el autor que las extensivas pruebas de inoculación, en condiciones controladas y en el campo no mostraron diferencia sintomatológica producida por los aislamientos del fuego salvaje de soya y tabaco.

El hecho de encontrar, en Georgia y Carolina del Sur, donde crecen ambos cultivos, el fuego salvaje en la soya pero no en el tabaco, hizo que Clayton (1950) realizara inoculaciones cruzadas (22 inoculaciones) sobre variedades de tabaco y soya durante dos años (1947-1949) con cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* obtenidas de los dos cultivos. Halló el autor que las cepas de soya no infectaron a

las variedades de tabaco mientras que las cepas de tabaco causaron altas infecciones en su hospedante, pero no resultaron patógenas a las variedades de soya aunque provocaron, después de la segunda inoculación realizada, lesiones muy pequeñas, que más tarde abortaron.

Mucha más claridad en el asunto ofrecieron los resultados de Chamberlain (1956). El investigador seleccionó doce aislamientos de la bacteria, seis procedentes de soya y seis de tabaco, pasados por sus hospedantes para mantener la virulencia, y realizó inoculaciones cruzadas y sobre cada cultivo hospedante con la utilización de agujas múltiples y aspersion (Chamberlain , 1956a) . La tabtoxina fue eliminada del inóculo y se evaluó el número total de halos producidos expresados como porcentaje de la infección total. Los resultados demostraron la existencia de una variación considerable entre los aislamientos de soya y de tabaco. Estos últimos fueron uniformemente altos en patogenicidad sobre su propio hospedante y la infección en soya alcanzó valores de infección máxima de 22-61%. Los aislamientos de la bacteria, obtenidos de soya, fueron fuertemente patógenos en su hospedante pero no en tabaco, donde el porcentaje de lesiones típicas no sobrepasó de un 19 %. Después de la prueba de adaptación por tres inoculaciones cruzadas, las cepas de soya mostraron entre un 40 - 62% de incremento de patogenicidad en tabaco y reducción, en su propio hospedante, de 16 - 38%. Las cepas de tabaco después de su pase por soya redujeron su virulencia en

tabaco entre 50-100% pero no variaron su patogenicidad en soya. Así pues Chamberlain demostró por qué el fuego salvaje se dispersa más rápido del tabaco hacia la soya y la presencia de cepas adaptadas del patógeno. En el proceso de adaptación las cepas pueden variar su patogenicidad, pero también surgen cepas altamente virulentas para ambos cultivos, posiblemente por la mediación de otros hospedantes, como son las malezas. La multiplicación del fuego salvaje en plantas de tabaco resistentes sugiere el surgimiento de nuevas cepas más virulentas y podía explicar también la adaptación de las cepas de soya hacia el tabaco mediante los procesos de mutación y selección.

Varios años más tarde Jardim Freire (1963) confirmó la variabilidad patogénica y de virulencia de aislamientos de la bacteria en el cultivo de la soya. El autor encontró aislamientos altamente virulentos en soya y en tabaco, otros con una moderada patogenicidad en soya que causaron una ligera reacción positiva en tabaco, y también aislamientos no patógenos al tabaco y poco virulentos sobre la soya. Esta variación en la patogenicidad-virulencia desde luego trae variación en la expresión de las manchas, su avance y tamaño, y la presencia o no del halo clorótico.

Al igual que en la soya, la patogenicidad cruzada entre cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* de frijol y tabaco muestra resultados contradictorios. Clayton (1934) informó que el frijol posee resistencia

frente al fuego salvaje del tabaco cuando realizó un estudio de la tabtoxina sobre esta especie.

Ribeiro *et al.*, (1979) estudiaron aislamientos del fuego salvaje de frijol, tabaco, soya y chícharo, originarios de Brasil y de otros países, utilizando tres tipos de inoculación en las plantas: punción, aspersion bajo presión y aspersion ligera. Los aislamientos bacterianos a partir de frijol y soya causaron síntomas típicos de fuego salvaje en frijol, pero fueron avirulentas en tabaco, o sea, las hojas del tabaco de las tres variedades empleadas (Xanthi, Habana-38 y Burley 21) desarrollaron reacción de incompatibilidad con todos los aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de las especies leguminosas. Todos los aislamientos de la bacteria a partir del tabaco provocaron reacción de hipersensibilidad en hojas de frijol, sin embargo, las plantas de chícharo de vaca, frijol Lima y soya desarrollaron síntomas típicos del fuego salvaje. La variedad Burley 21 mostró resistencia a una parte de estos aislamientos, mientras que las dos restantes variedades de tabaco desarrollaron síntomas claros de la enfermedad.

Tanaka *et al.*, (1996) con aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de plantas de frijol, *Desmodium canum* e *Ipomoea spp.*, provocaron, por infiltración, intensas áreas de tejido necrotizado en hojas de tabaco después de 24 horas que más tarde continuaron su expansión con halos cloróticos, reacción típica de la colonización de

los tejidos, según señalan los autores, que indica la compatibilidad entre el hospedante y las cepas en estudio. Por otra parte Álvarez y Márquez (2004) comprobaron la patogenicidad cruzada, sobre: tabaco (var. TNN), frijol (var. Roxao) y soya (var. Celete), de cuatro aislamientos de la bacteria obtenidos de frijol, soya, Asther y tabaco, y obtuvieron síntomas en todas las plantas inoculadas.

Los resultados anteriormente expuestos evidencian la variabilidad de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* por la respuesta patogénica en plantas hospedantes comunes y por su virulencia en cultivares dentro del hospedante homólogo.

MEDIDAS DE CONTROL DEL FUEGO SALVAJE EN SEMILLEROS Y CAMPO

La primera medida contra la enfermedad es evitar la introducción de la misma en el país para lo cual existen medidas de cuarentena que, en primer lugar, se proponen impedir su entrada y erradicarla, en caso que se detecte su presencia en el tabaco. Las medidas de erradicación incluyen la destrucción total de las plantas, desinfección del suelo e implementos, cuarentena del campo y de las áreas colindantes, entre otras. En Cuba, donde la bacteria es objeto de Cuarentena, existe un Programa de Defensa que agrupa a todas las acciones, desde la regulación de importación de semillas, vigilancia fitosanitaria en el territorio nacional y el diagnóstico en frontera hasta

las medidas de erradicación y control.

En los países donde la enfermedad forma parte de las plagas que afectan al cultivo se aplican diferentes medidas legales, fitotécnicas, físicas y de control químico e incluso algunas de carácter biológico para asegurar el manejo del fuego salvaje sin daños económicos y ambientales. Las medidas legales que prohíben el uso y el traslado de semillas y posturas de tabaco a partir de semilleros contaminados están dirigidas a prevenir la diseminación del Fuego Salvaje de un territorio a otro. Las otras medidas se aplican fundamentalmente para disminuir la incidencia tanto en la fase de semillero como en la plantación.

Prácticas de manejo en el semillero

Las experiencias han demostrado que la enfermedad tiene sus orígenes en el semillero por el uso de semillas contaminadas; también a partir del patógeno sobreviviente en el suelo y cubiertas del semillero y a través de la contaminación causada por el propio hombre. En este sentido la primera y más importante medida es el uso de semilla sana, ya sea certificada por las autoridades o de origen conocido.

Para las semillas cuya sanidad es dudosa Wolf (1957) recomendó una metodología sencilla que en muchos casos resulta efectiva para la

desinfección y consiste en introducir las semillas, protegidas en una bolsa (por ejemplo, una bergantina), en un cubo con una solución de formaldehído (formol) diluido en agua en una proporción de 1:16. El tratamiento en esta solución desinfectante no debe extenderse por más de diez minutos, tras los cuales las semillas deben enjuagarse con abundante agua corriente. La desinfección de las semillas sin embargo no siempre cumple con las expectativas principalmente cuando la contaminación penetra en el interior y la bacteria se aloja en la testa y el endospermo de las semillas, donde el desinfectante no puede extender su efecto.

En los inicios fueron utilizados otros tratamientos como el nitrato de plata 0.2 %, cianuro, bromuro de metilo y cloropicrina, sin embargo son poco recomendados en la actualidad por la toxicidad y el efecto contaminante sobre el medio ambiente. La solución aconsejable cuando el suelo constituya un factor de riesgo, es el cambio del semillero hacia lugares nuevos, preferentemente vírgenes. Esta medida es de estricto cumplimiento cuando el fuego salvaje se ha presentado en la campaña anterior. Se han obtenido algunos resultados con la aplicación de calor (60 ° C durante 5 minutos). Aunque en la práctica no ha constituido una fuente importante de inóculo, debe tenerse cuidado con las fuentes de aguas, sobre todo si estas pudieran traer inóculo por drenaje desde una plantación enferma.

Una de las prácticas más profusas entre los productores americanos y la más recomendada actualmente en la literatura, es el uso del antibiótico sulfato de estreptomicina, conocido comercialmente como Agristrep, así como del sulfato de cobre (caldo Bordeaux). En ambos casos se hacen aplicaciones foliares, el antibiótico se aplica semanalmente a razón de 0.25-0.5 libras por cada 50 galones de agua y el sulfato de cobre a 4 libras por cada 50 galones entre cinco a diez días. El cobre, producto más bien preventivo, tiene propiedades bacteriostáticas que detienen el desarrollo de *Pseudomonas syringae pv. tabaci*; hay que tener cuidado con la fitotoxicidad cuando es usado a elevadas concentraciones o aplicado a altas temperaturas. El antibiótico propicia un control superior de la bacteria aunque existe un alto riesgo de aparición de estirpes del patógeno resistentes a la estreptomicina. Otros productos utilizados en el semillero son los fungicidas Strobilurin (F500-BASF) y Actigard (Bion-Syngenta), los cuales activan los mecanismos de defensa de la planta (Oliveira, 2003).

Señala Cole (1999) la eficacia de un nuevo producto, acibenzolar-S-metil (ABM), un benzotiadiazol que induce resistencia sistémica adquirida en las plantas contra el Fuego Salvaje. Las plántulas asperjadas 2-3 veces con ABM (0,05-0,1 g i.a./m²), siete semanas después de la siembra, resultaron libres de la enfermedad, mientras que el oxiclورو de cobre (0,52-1,56 g i.a./m²) solamente redujo su incidencia. El producto extiende su efecto incluso después del

transplante pero causa fitotoxicidad mediana, al menos en las dosis ensayadas.

Como se ha constatado, la mayor incidencia de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* en el semillero concuerda con las densidades elevadas de plántulas en los canteros, lo cual aconseja una población normal (3000-5000) de plántulas por cantero para los semilleros tradicionales. La humedad elevada no solamente contribuye a la multiplicación y diseminación de la bacteria, sino al desarrollo de plántulas con tallos delgados y alargados propensos al ataque de la enfermedad. La nivelación adecuada del terreno para evitar el encharcamiento de hecho puede evitar un posible foco por la humedad excesiva in situ.

Por otra parte, conociendo el ciclo de la bacteria, una de las medidas a aplicar sería evitar el regadío por aspersión o realizarlo más bien por la mañana y no en la tarde, lo cual posibilita que las plantas se sequen durante el día. Los semilleros deben tener el mayor grado posible de aireación con el fin de disminuir la excesiva humedad y evitar la presencia de agua libre sobre las plantas, las enfermas deben ser retiradas del semillero y eliminadas. La limpieza alrededor del semillero es otra práctica preventiva, pues, muchas malezas pudieran albergar el inóculo desencadenante de la epidemia.

Especial atención debe darse al uso del sistema de bandejas flotantes para la producción de posturas, por las ventajas que brinda al usar

sustrato estéril, así como posibilidades en la desinfección de las bandejas.

Prácticas de manejo en el campo

Las medidas que pueden ser tomadas en la plantación para evitar la aparición y desarrollo de la enfermedad deben comenzar por el plantado de posturas completamente sanas. En caso de que no sea posible, usar entonces aquellas que aparentemente están libres de la enfermedad y han sido tratadas con los productos mencionados en el acápite anterior. Como fue planteado anteriormente, la fertilización alta en nitrógeno y baja en potasio aumenta la susceptibilidad de la planta a la saturación de agua, esto da paso a una medida que pretende disminuir la predisposición de la planta a la enfermedad mediante la realización de fertilizaciones equilibradas.

Otros factores de orden fitotécnico, como la distancia entre las plantas y el uso de cortinas rompe vientos, pueden evitar la entrada de *Pseudomonas syringae pv. tabaci*, reduciendo los daños mecánicos en las hojas y la impregnación en agua. Aunque la eliminación o aprovechamiento de hojas afectadas ha demostrado ser una medida de poco valor, con el objetivo de disminuir las pérdidas, se recomienda adelantar la recogida de las hojas maduras en los estadios iniciales de la enfermedad.

Si se tiene en cuenta el número elevado de hospedantes naturales de *Pseudomonas syringae pv. tabaci* y la contribución al ciclo del patógeno de los detritos de cosechas, es importante la eliminación completa de los restos de las cosechas antes de plantar nuevamente y el control de las malezas durante el cultivo.

En caso de ocurrencia de la enfermedad en una plantación determinada, es de obligatorio cumplimiento la rotación con cultivos que no son hospedantes de *Pseudomonas syringae pv. tabaci*. En Brasil, por ejemplo, es recomendado el uso de gramíneas para la rotación de tierras infestadas con tal patógeno. Finalmente se debe recordar que el arma principal en la lucha contra la enfermedad es el uso de variedades resistentes. A pesar de las restricciones que impone el mercado se han obtenido prometedores resultados con el desarrollo de tabaco transgénico resistente. Son varios los genes manipulados que han logrado conferir determinada resistencia en tabaco, con aportes significativos en el campo de las investigaciones básicas y en el desarrollo de cultivares comerciales (Batchvarova *et al.*, 1998; Beffa *et al.*, 1995; Thilmony *et al.*, 1995; Florack *et al.*, 1995) que esperan ser introducidas en un futuro.

Control biológico del fuego salvaje

En la actualidad prevalecen los criterios que es necesario profundizar y ampliar las investigaciones en el control biológico de la bacteria.

Una de las alternativas al uso de funguicidas y bactericidas, muy estudiada en el cultivo de tabaco, es la activación de la defensa de las plantas. La resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) es el fenómeno por el cual los mecanismos propios de las plantas son inducidos con tratamientos previos, bien sean biológicos o químicos. El concepto de SAR ha sido ampliamente estudiado en los pasados cien años con relación al incremento de la resistencia a patógenos fúngicos, bacterianos y virales en cultivos económicamente importantes. Se ha demostrado la presencia de genes SAR que inducen quitinasas, β -1,3-glucanasas, y PR-1 proteínas, llamadas proteínas relacionadas con la patogénesis, muy relacionadas con la SAR (Percival, 2001). En los últimos quince años numerosas investigaciones han demostrado la resistencia sistémica adquirida bajo tratamientos con rizobacterias en varios sistemas planta/ patógeno (Ryals *et al.*, 1996) con la presencia de múltiples mecanismos involucrados en la activación de la resistencia adquirida (Press *et al.*, 1997; Maurhofer *et al.*, 1998). Park y Kloepper (2000) estudiaron la inducción de resistencia de diez especies bacterianas contra *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, cuatro de ellas: *Bacillus pumilus*, *Serratia marcescens* (90 - 166), *Pseudomonas fluorescens*, y *Pseudomonas putida*, con reconocido efecto inductor de SAR. Todas estas cepas proporcionaron una protección significativa contra el agente causal del fuego salvaje en las condiciones del invernadero. En trabajos previos Press *et al.*, (1997) indicaron la inducción de protección sistémica en tabaco contra *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* por la cepa

90-166 de *Serratia marcescens*; Schneider y Ullrich (1991) informaron similar protección por los filtrados de cepa de *Pseudomonas fluorescens*, asociada a la inducción de quitinasa, β -1,3-glucanasa, peroxidasa y lisozima. La resistencia inducida por rizobacterias en el tabaco ha sido estudiada para otros patógenos que afectan al cultivo (Maurhofer *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2002) con resultados alentadores como una alternativa futura promisoría.

Experimentos de laboratorio señalan dos sustancias aisladas de vainas de arroz que inhiben el crecimiento *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Cho *et al.*, 1998) y que el micelio de *Lentinula edodes* igualmente posee efecto antagónico (Pacumbaba *et al.*, 1999).

En este sentido puede hacerse un buen uso probablemente de los bacteriófagos que, desde los estudios iniciales de la enfermedad, han mostrado reducir su presencia en un 50 por ciento o más (Fulton, 1950). Los bacteriofagos o fagos, como también se les llama, tienen la categoría de virus y afectan solamente las bacterias, cada fago es relativamente específico a determinada especie de bacteria. Después de la infección, los fagos se replican dentro de la bacteria fitopatógena, ocasionando la ruptura de la pared celular. Un buen ejemplo de su uso como biocontrol es el primer producto, Agri Phage, de EPA (Environmental Protection Agency, US), registrado en el año 2005, cuyo ingrediente activo esta constituido por dos bacteriofagos de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* y *Pseudomonas*

syringae pv *tomato*. Se recomienda aplicar el producto en las plantas o en el suelo durante la vegetación (EPA, 2006). La eficacia de los productos a base de bacteriofagos ha sido comprobada, el reto de la tecnología es mantener viable la población de los fagos en el cultivo por un periodo mayor de 48 horas. Las investigaciones con agentes microbiológicos y sus metabolitos prometen nuevas alternativas futuras, entre ellas las bacteriocinas, sustancias que producen las propias bacterias fitopatógenas antagónicas a especies estrechamente relacionadas. Las variantes avirulentas de los fitopatógenos pueden resultar útiles como biorreguladores de sus semejantes fitopatógenos.

El esquema representado en la figura 21 muestra los factores a tener en cuenta en el manejo integrado de plagas y enfermedades en el cual se hace uso racional de varios medios de control. Este sistema se adapta perfectamente para el manejo del fuego salvaje en el cultivo del tabaco independientemente que algunas alternativas aún no están suficientemente explotadas.

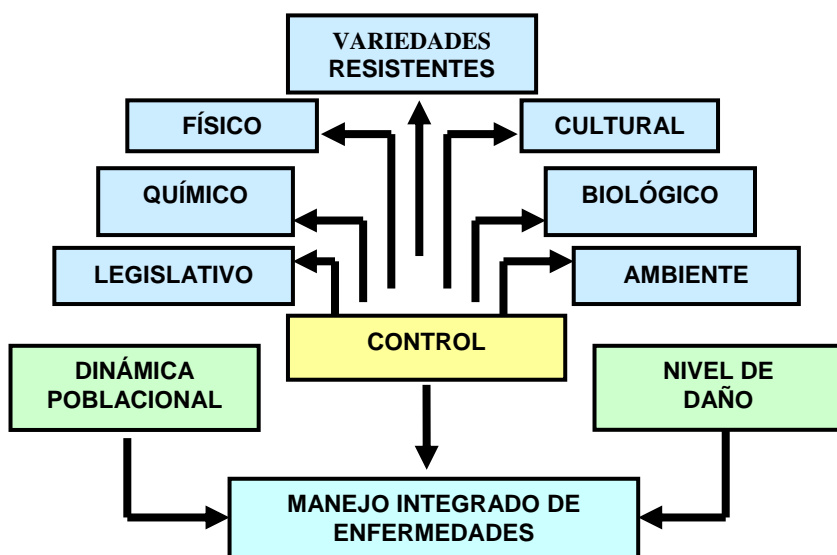


Figura 21. Esquema de medidas para el manejo de la enfermedad Fuego salvaje en el cultivo del tabaco. Tomada de: Cultura do Fumo: Manejo Integrado de Pragas y Doenças, Souza Cruz, 1998).

REFERENCIAS

Alfano, J. B., and Collmer, A. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* 8:1683-1698, 1996.

Allington, W. B. Wildfire disease of soybean. *Phytopathology* 35: 857 – 869, 1945.

Allington, W. B. and Johnson, J. The relation of potassium to water – soaking of tobacco. *Phytopathology* 32: 1, 1942.

Álvarez, E. R., Márquez, A S. A. Caractericao molecular, sorologica e nutricional de isolados de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* provenientes de fumo, feijao e soya. Boletín de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos # 52, p. <http://www.cenagen.embrapa.br/publica/trabahlos/bp052.doc>, 2004

Anderson P. J. Susceptibility of *Nicotiana* species, varieties, and hybrids to tobacco wildfire», *Phytopathology* 15: 77-84, 1925

Barta, T. M., Kinscherf, T. G., Uchytíl, T. F. and Willis, D. K. DNA sequence and transcriptional analysis of the *tblA* gene required for tabtoxin biosynthesis by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 458-466, 1993.

Batchvarova R., Nikolaeva, V., Slavov, S., Bossolova S., Valkov V., Atanassova S., Guelemerov, S., Atanassov, A., and Anzai H.

Transgenic tobacco cultivars resistant to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Theoretical and Applied Genetic 97 (5-6): 986 - 989, 1998.

Beffa R., Szell M., Meuwly P., Pay A., Vogeli L.R., Mettraux J.P., Neuhaus G., Meins F. Jr., Nagy F. Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco, EMBO J. 14 (23): 5753-5761, 1995.

Bender C.L., Alarcón- Chaidez, F., Gross D.C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63 (2): 266-292, 1999.

Bereswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C.L. and Geider, K. Identification and relatedness of coronatine producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. Applied and Environmental Microbiology 60, 2924 - 2930, 1994 .

Beriam, L.O. S., Almeida, I. M. G., Ferrari, J.T., Grabert, E., Barbosa, A. F., Barbosa, I., Loureizo, I. M. Bacteriose em mamoeiro (*Carica papaya* L.) causada por patovar de *Pseudomonas syringae* strain. Summa Phytopathologica, Botucatu, vol. 28 # 1,p. 95, 2002.

Beriam, Luís Otávio S.; Irene M. G. Almeida; Suzete A.L. Destéfano; Eunice Grabert; Denise M. Balani; Mariana Ferreira; Júlio Rodrigues

Neto. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* em plântulas de mamoeiro
Summa phytopathol. vol.32 no.1 Botucatu Jan./Mar. 2006

Blancard, D. Maladies du tabac. Ed. INRA, Paris, 1998.

Bradbury, J. F. *Pseudomonas tabaci*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria # 129, Commonwealth Mycological Institute (CMI), Ferry Lane, Surrey, England, 1967.

Braun A.C. A comparative study of *Bacterium tabacum*, Wolf and Foster, and *Bacterium angulatum*, Fromme and Murray, *Phytopathology* 27: 283-304, 1937.

Braun, A. C. and Johnson, J. Natural water - soaking and bacterial infection. *Phytopathology* 29: 2-3, 1939.

Braun A.C. A study on the mode of action of the wildfire toxin. *Phytopathology* 45: 659-664, 1955.

Carlson P.S. Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science* 180: 1366-1368, 1973.

Chamberlain, D. W. Pathogenicity of *Pseudomonas tabaci* on soybean and tobacco. *Phytopathology* 46: 51 - 52, 1956.

Chamberlain, D. W. Methods of inoculation for wildfire of soybean

and the effect of bacterial pustule on wildfire development. *Phytopathology* 46: 96-98, 1956 a.

Chapman G.H. and Anderson P.J. Tobacco wildfire. *Mass. Agr. Exp. Stat. Bul.* 203, pp.67-81, 1921.

Chapman G.H. and Anderson P.J. Wildfire of tobacco in 1922. *Conn. State Sta., Tobacco Substa. Bul.* 2: 7-38, 1922.

Cho, J.Y., Moon, J. H., Seong, K. Y., Park, K. H. Antimicrobial activity of 4 hydroxybenzoic acid and trans - 4 - hydroxycinnamic aisolated and identified from rice hull. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62 (11) : 2273 - 2276, 1998.

Clayton, E.E. Toxin production by *Bacterium tabacum* and its relation to host range. *J. Agric. Res.* 48: 411 - 426, 1934.

Clayton, E.E. Water soaking of leaves in relation to development of the wildfire disease of tobacco. *J. Agric. Res.* 52 : 239 - 269, 1936.

Clayton E.E. Water soaking of leaves in relation to development of the blackfire disease of tobacco. *J. Agric. Res.* 55: 883-889, 1937.

Clayton E.E. A wildfire resistant tobacco, *J. Hered.* 38: 35- 40, 1947.

Clayton, E.E. Wildfire disease of tobacco and soybean. *Plant Dis. Rep.* 34: 141 - 142, 1950.

Clinton G.P., and Mc Cormick, F.A. Wildfire of tobacco in Connecticut, *Conn. Agr. Exp. Stat. Bul.* 239, pp. 365- 423, 1922.

Cole, D.L. The efficacy of acibenzolar - s- methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection* 18 (4): 267 - 273, 1999.

Coleman, R. H., Shaffer, J., True, H. Properties of β -lactamase from *Pseudomonas syringae*. *Curr. Microbiol.* 32:147-150, 1996.

Costacurta, A., and Vanderleyden, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21:1-18 , 1995.

Deal, M. W. and Cole, J. S. A comparative study of the pathogenicity and epidemiology of strains of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* the cause wildfire and angular leaf spot of tobacco in Zimbabwe. *Plant Pathol.*, 35: 74 - 81, 1986.

Dehbi F., Harzallah D., Larous L. Effects of nutritional factors on production of tabtoxin, a phytotoxin, by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkde Toegep Biol. Wet.* 66 (2a): 241-247, 2001.

Denny, T. P. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:173-197, 1995.

Doudoroff, M., Paleroni, N. J. Genus *Pseudomonas*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8ed. Baltimore: Williams & Wilkins. P. 217- 243.1974.

Durbin, R. D., and Sinden, S.L. The effect of light on the symptomatology of oat halo blight. *Phytopathology* 57: 1000-1001, 1967.

Durbin, R.D. (ed). *Toxins in Plant Disease*. New York: Academic Press, 1981.

Durbin R. D. and Uchytel T. F. The role of intercellular fluid and bacterial isolate on the *in vivo* production of tabtoxin and tabtoximine beta-lactam. *Physiol. Plant Pathol.* 24 : 25-31, 1984.

Durbin R.D. and Uchytel T.F. The mechanism of self-protection against bacterial phytotoxins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26 : 313-329, 1988.

Engst, K., and Shaw, P. D.. Identification of a *lysA*-like gene required for tabtoxin biosynthesis and pathogenicity in *Pseudomonas syringae*

pv. *tabaci* strain PTBR2.024. Mol. Plant- Microbe Interact. 5: 322-329, 1992.

EPA. AgriPhage" EPA Registration # 67986-1 Bacteriophages of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (006449) & Bacteriophages of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (006521), 2005 <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>. 2006

Florack D., Allefs, S., Bollen, R., Bosch, D., Visser, B., and Stiekema, W. Expression of giant silkworm cecropin B gene in tobacco. Transgenic Res. 4 (2): 132-141, 1995.

Fromme, F. D. and Wingard, S.A. Blackfire and wildfire of tobacco and their control. Va. Agr. Exp.Stat.Bul.228, 1922.

Fulton R.W. Tobacco blackfire disease in Wisconsin. Plant Disease 64: 100, 1980.

Gao, Jie and Gao, J. Study on occurrence of tobacco wildfire disease. Journal of Jilin Agricultural University 19(1): 8-15, 1997.

Garner, W. W., Allard, H. A., and Clayton, E. E. Superior germ plasm in tobacco. In: Yearbook of Agriculture, U. S. Dept. Agr., pp. 785 - 830, 1936.

Gopalan, S., and S. Y. He. Bacterial genes involved in the elicitation of hypersensitive response and pathogenesis. *Plant Dis.* 80:604-609, 1996.

Gross, D. C. Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:247-278, 1991.

Heggstad, H. E. Varietal variation and inheritance studies on natural water - soaking in tobacco. *Phytopathology* 35 : 754 - 770, 1945.

Heggstad, H.E., Clayton, E. E., Neas, M.W., and Skoog, H. A. Development of Burley 21, the first wildfire- resistant tobacco variety, including results of variety trials. *Tenn. Agric. Exp. Stn. Bull.*, 331, 51 p., 1960.

Hildebrand, D. C., Schorth, M. N., and Sands, D. C. *Pseudomonas*. In: Schaad, N.W.(Ed.) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 2.2d. St. Paul: APS Press. p. 60- 80, 1988.

Hill, J. B. The zoogloae of *Bacterium tabacum* and their relation to the problem of the migration of phytopathogens through the host tissues. *Phytopathology* 20 : 187 -195, 1930.

Hoiting, H.A.J., and Sinden, S. L. Partial purification of chlorosis inducing toxins of *Pseudomonas phaseolicola* and *Pseudomonas glycinea*..

Phytopathology 60 : 1236 - 1237, 1970.

Ito, M. F., Castro, J. L., Dudienas, C., Neto, J. R. Comportamiento de materiais regionais e melhoradas de feijao a infecção de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* em condições de campo. Summa Phytopathologica 19 (1) : 31, 1993.

Jardim Freire, J. R. O “ Fogo Salvagem” , o “ Crestamento” e a “ Pustula Bacteriana” da Soja. Sintomatología, estudio morfo - fisiológico dos organismos e resistencia varietal. Tese apresentada para o concurso de Docente Livre da Cadeira de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola, da Faculdade de Agronomia e Veterinaria, da Universidade do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - R. G. S. - Brasil, 37 p. ,1963.

Johnson, J., Slagg, C.M., and Murwing, H.F. Host plants of *Bacterium tabacum*. Phytopathology 14: 175-180, 1924.

Johnson, J. and Murwing, H. F. Experiments on the control of wildfire of tobacco», Wis. Agr. Exp. Sta. Bul. 62, 34 p., 1925.

Johnson, J. Relation of water - soaked tissues to infection by *Bacterium angulatum* and *Bacterium tabacum* and other organisms. J. Agric. Res. 55: 599 - 618, 1937.

King, E. O., Ward, W. K. Raney, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307, 1954.

Kinscherf, T.G., Coleman, R.H., Barta, T.M., and Willis D.K. Cloning and expression of the tabtoxin biosynthetic region from *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriology 173: 4124-4136, 1991.

Klement, Z., Hevesi, M., Sasser, M. Mecanism of the development of wildfire disease in susceptible tobacco plant. Proc. 4th. Int. Conf. Plant Path. Bact. Angers, p. 679 - 685, 1978.

Knight, T.J., Durbin, R.D. and Langston-Unkefer, P.J. Role of glutamine synthetase adenylation in the self-protection of *Pseudomonas syringae* subsp. *tabaci* from its toxin, tabtoximine beta-lactam, J. Bacteriology 166: 224-229, 1986.

Knight, T.J., R. D. Durbin, and Langston-Unkefer, P. J. Self-protection of *Pseudomonas syringae* pv. "*tabaci*" from its toxin, tabtoxinine - β - lactam. J. Bacteriol. 169:1954-1959, 1987 .

Knoche, K. K., Parke, J. L., and Durbin, R. D. Relationship of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* races to the rhizosphere of Wisconsin grown tobacco. Plant and Soil 158: 91-97, 1994.

Knoche K. K. Pathogenesis by *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*: the function of tabtoxin-beta-lactam, Dissertation, University of Wisconsin -Madison. 270 p. 1990.

Krieg, R.N. and Holt, J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins Ed. Baltimore /London, 943 p., 1984.

Lelliot, R.A., Billing, E., Hayward, A.C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads, J. Appl. Bacteriology 29: 470-489, 1966.

Levi, C. and Durbin R.D. The isolation and properties of a tabtoxin-hydrolyzing aminopeptidase from the periplasm of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 28 : 345-352, 1986.

Liu, L., and Shaw, P. D. Characterization of *dapB*, a gene required by *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* BR2.024 for lysine and tabtoxinine - β -lactam biosynthesis. J. Bacteriol. 179:507-513, 1997.

Lucas G.B. Diseases of tobacco. 3rd ed., Biological Consulting Associated, Raleigh, NC, 651p., 1975.

Lucas, J.A. Plant pathology and plant pathogens. Blackwell Science Ltd. Oxford, England. pp 129-134, 1988.

Lyndon, J., and Patterson, C. D. Detection of tabtoxin producing strains of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* by PCR. Letters in Applied Microbiology 32 (3): 166- 170, 2001.

Mapuranga, N. A new race of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* on tobacco in Zimbabwe», Plant Disease 82 (12) : 1404, 1998.

Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J. P., and Defago, G. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. Phytopathology 84, 139–146, 1994.

Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D., and Défago, G. Salicylic acid biosynthesis genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. Phytopathology 88, 678-684. 1998.

Mohan, S. K. Ocorrenca de fogo salvagem causado por *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* nos feijoeiros do Parana. In: ReuniaoNacinal de Pesquisa de Feijao,1, Goiania. Anais..p.296-297,1982.

OEPP/EPPO. Guideline on Good Plant Protection Practice: Tobacco. Bulletin OEPP/ EPPO 28: 411- 423, 1998.

Oliveira G. Etiología, epidemiología y manejo de la enfermedad Fuego Salvaje. Curso impartido en INISAV, La Habana, Cuba, 2003.

Ogden, W.B. Breeding Habana 501. Wis. Agric. Exp. Stn. Bull. 562, 18p., 1963.

Pacumbaba, R. P. Beil, S.A., and Pacumbaba, R.O. Jr. Shiitake mycelial leachate suppresses growth of some bacterial species and symptoms of bacterial wilt of tomato and lima bean in vitro. Plant Diseases 83 (1): 20 – 23, 1999.

Percival, G. P. Induction of systemic acquired disease resistance in plants: potencial implications for disease management in urban forestry. Journal of Arboriculture 27 (4) : 181- 192, July, 2001.

Park, K. S., and Kloepper, J. W. Activation of PR-1a promoter by rhizobacteria which induce systemic resistance in tobacco against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Biol. Control 18, 2-9, 2000.

Pettersson, J., R. Nordfelth, E. Dubinina, T. Bergman, M. Gustafsson, K. E. Magnusson, and Wolf -Watz, H. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. Science 273:1231-1233, 1996.

Press, C. M., Wilson, M., Tuzun, S., and Kloepper, J. W. 1997. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary

determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. Mol. Plant-Microbe Interact. 6, 761-768.

Prestes, E. B., Almeida, I.M.G., Beriam, L. O. S., Malavolta Jr., V. A., Yano, T. Variabilidade entre isolados de *Pseudomonas* patogênicos ao pepino. Summa Phytopathologica 24 : 210 - 215,1998.

Reid, J.J., Naghaski, J.M.A., Farrell, A., Haley, D.E. Bacterial leaf spots of Pennsylvania tobacco. I. Occurrence and nature of microorganisms associated with wildfire, Pa. Agr. Exp. Sta. Bul. 422, 36 p., 1942.

Ribeiro, R. de L. D., Robbs, C.F. Etiologia do crestamento de halo ou crestamento do feijoeiro no Brasil. Horticultura Brasileira 2(2): 3- 4, 1984.

Ribeiro, R. de L.D., Hagedorn, D.J., Durbin, R. D., and Uchytel, T. F. Characterization of the bacterium inciting bean wildfire in Brasil. Phytopathology 69: 208- 212, 1979.

Robbs, C. F., Neto, J. R., Beriam, L.O.S., Malavolta Jr., V.A. Ocorrência de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* em cultura de pepino em São Paulo. Fitopatologia Brasileira 15 (2): 126, 1990.

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y., and Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819, 1996.

Salmond, G. P. C. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:181-200, 1994.

Schaad, N.W., Cheong, S.S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panopoulos, N.J. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85, 243 - 248, 1995.

Schneider, S., and Ullrich, W. R. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45, 291-301, 1991.

Schulz, B.K. Jakobek, J.L., and Lindgren, P.B. Restriction fragment length polymorphism evidence for genetic homology within a pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* 60(4) : 1093-1100, 1994.

Shoemaker, P.B. Foliar diseases caused by bacteria In: *Compendium of Tobacco Diseases*». Edited by H. D. Shew and G.B Lucas. APS PRESS. The American Phytopathology Society, 1990.

Skoog, H. A. and Fulton, R.W. Sources of resistance in the *Nicotiana tabacum* virulent on TL 106- derived tobacco. Proc. Am. Phytopathol. Soc. 3: 231 - 232 (Abstr.), 1976.

Sigee, D.C., and El- Masry, M.H. Changes in cell size and flagellation in the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* cultured in vitro and in plant: comparative electron microscope study. Journal of Phytopathology 125 (3 : 217- 230, 1989.

Sinden, S. L., and Durbin, R. D. Some comparisons of chlorosis inducing pseudomonad toxins. Phytopathology 59: 249 - 250, 1969.

Sinden, S.L. and Durbin, R.D. A comparison of the chlorosis inducing toxin from *Pseudomonas coronafaciens* with wildfire toxin from *Pseudomonas tabaci*. Phytopathology 60, 360- 364, 1970.

Sorensen, K.N., Kim, K. and Takemoto. J.Y. PCR detection of cyclic lipodepsinonapeptide-producing *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and similarity of strains. Applied and Environmental Microbiology 64, 226 - 230, 1998

Souza Cruz. Cultura do Fumo. Manejo Integrado de Pragas e Doenças, Comunicação Empresarial, Brasil, 1998.

Stapp, C. Bacterielle Tabakkrankheiten und ihre Erreger. Angew. Bot. 12: 241- 274, 1930.

Stavely, J. R. and Skoog, H. A. Transfer of resistance to a virulent strain of *Pseudomonas tabaci* from *Nicotiana rustica* to *Nicotiana tabacum* breeding lines. Proc. Am. Phytopathol. Soc. 3: 231(Abstr.), 1976.

Stefanova, M., Basalto, A. Oliveira, G. H.N., Viana, F. C. Obtención de antisueros para el diagnóstico de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* FITOSANIDAD vol. 9, # 2, p.17- 20, 2005

Stefanova, M., Basalto, A. Larrinaga, Ma. L., Coronado, Ma. F. Oliveira, G. H. N. Desarrollo de anticuerpos contra *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* con la utilización de sulfoximina de metionina FITOSANIDAD vol. 11, no. 2 p. 63 – 67, 2007.

Stefanova, M., Oliveira, G. H.N., Viana, F. C. Recobrado de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* a partir de semillas de tabaco infectadas. FITOSANIDAD vol. 12, no. 1, p. 21- 25, 2008.

Stefanova, M., Pedro Ivo A.L. Sala, Joanice P.S. Damasceno & Abi S.A. Marques. Optimización de la recuperación de *Pseudomonas*

syringae pv. *tabaci* por la modificación de dos medios de cultivo.

Tropical Plant Pathology v.34 # 3, p. 178-181, 2009.

Tanaka, M. A. de S., Ito, M. F., Dudienas, C., Neto, J. R. *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* em feijao vagem na regio de Itatiba region. Summa Phytopathologica 19 (1) : 31- 32, 1993.

Tanaka, M. A. de S., Ito, M.F., Dudienas, C., Rodriguez, Neto, J., Sugimori, M.H. *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* em *Phaseolus vulgaris* (feijao vagem), *Desmodium canum* e *Ipomea spp* na regio de Itatiba. Summa Phytopatologica 22 (3/4): 248-251, 1996.

Theodoro G., Maringoni, A. Comportamento de cultivares de feijoeiro a *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Summa Phytopathologica 24 (1): 37-41, 1998.

Thilmony, R.L., Chen, Z., Versan, R.A., and Martin, G.A. Expression of the tomato Pto gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* expresing avr Pto. Plant Cell 7(10): 1529-1536, 1995.

Thomas, M.D., Langston-Unkefer, P. J., Uchytel, T.F., Durbin, R.D. Inhibition of glutamine synthetase from pea by tabtoxinine beta-

lactam. *Plant Physiol.* 71: 912-915, 1983.

Turner, J. G., and Novacky, A. The quantitative relation between plant and bacterial cell involved in the hypersensitive reaction. *Phytopathology* 64: 885 - 890, 1974.

Turner, J. G. and Debbage, J. M. Tabtoxin-induced symptoms are associated with accumulation of ammonia formed during photorespiration. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 223-233, 1982.

Turner, J. G., and Taha, R.R. Contribution of tabtoxina to the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. *Physiol. Plant. Pathol.* 25: 55-69, 1984.

Turner, J. G., Taha, R. R., and Debbage, J.. Effects of tabtoxin on nitrogen metabolism. *Physiologia Plantarum* 67 (4) : 649 - 653, 1986.

Turner, J. G. Inhibition of photosynthesis in *Nicotiana tabacum* leaves treated with tabtoxin and its relation to pigment loss. *Physiologia Plantarum* 74 (3) : 549- 555, 1988.

Valleau W.D., Johnson, E. M., and Diachun, S. Angular leaf spot and wildfire of tobacco. *Ky. Agr. Exp. Sta. Bull.* 454, 60 p., 1943.

Valleau W.D., Johnson, E. M., and Diachun, S. Root infection of crop

plants and weed by tobacco leaf spot bacteria. *Phytopathology* 34 : 163-174, 1944.

Vinogradov, V. A., Espino, E., Rey, X. Evaluación de variedades de tabaco ante la infección del Fuego Salvaje y el Moho Azul en las condiciones de la URSS. *Cienc. Tec. Agric. Tabaco*, 11(2) : 15-24, 1988.

Wannamaker, M. J., and Rufty, R. S. Development of a method to evaluated tobacco genotypes for resistance to angular leaf spot in the greenhouse. *Plant Diseases* 73: 964 - 968, 1989.

Willis, D.K., Barta, T. and Kinsherf, T.G. Genetics of toxin production and resistance in phytopathogenic bacteria. *Experientia* 47, 765 - 771, 1991.

Wolf, F.A. Tobacco diseases and decays. Duke University Press. Durham, North Carolina. pp 188-211, 1957.

Wolf, F.A. and Foster A.C. Bacterial leaf spot of tobacco. *Science* 46: 361-362, 1917.

Wolf F.A. and Foster A.C. Tobacco wildfire. *Jour. Agr. Res.* 12: 449-458, 1918.

Wolf, F.A. Wildfire of tobacco. *N.C. Agr. Exp. Sta. Bull.* 246: 4-26,

1922.

Woodeng, J.J. and Mudzengerere, E. Inheritance of resistance of wildfire and angular leaf spot derived from *Nicotiana rustica* var. Brasilea, Euphytica 64 (1-2): 149-156, 1992.

Woolley, D. W., Pringle, R. B., and A.C. Braun. Isolation of the phytopathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*, an antagonist of methionine. Jour. Biol. Chem. 197 : 409 - 417, 1952.

Woolley, D. W., Schaffner, G. and A.C. Braun. Isolation and determination of structure of a new amino acid contained within the toxin of *Pseudomonas tabaci*. Jour. Biol. Chem. 198 : 807 - 813, 1952.

Woolley, D. W., Schaffner, G. and A.C. Braun. Studies on the structure of the phytopathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*. Jour. Biol. Chem. 215 : 485 - 493, 1953

Young, J.M. Effect of water on bacterial multiplication in plant tissue. N. Z. Journal of Agric. Res. 17 : 115 - 119, 1974.

Young, J.M., and Triggs, C. M. Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. Jour. of Applied Bacteriology 77 195 - 207, 1994.

Young, J. M., Saddler, G. S., Takikawa, Y., De Boer, S.H., Vauterin, L., Gardan, L., Gvozdyak, R.I., Stead, D.E. Names of plant pathogenic bacteria 1864 - 1995. *Review of Plant Pathol.* 75 : 721 - 763, 1996.

Zhang, Shanan, Reddy, M. S., and Klopper, J. W. Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* 23, 79 - 86, 2002.

Zarei, S., and Rahimian, H. Angular leaf spot of tobacco in Mazardan province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 33(½) 92, 1997.