

BOLETIN DE SANIDAD VEGETAL

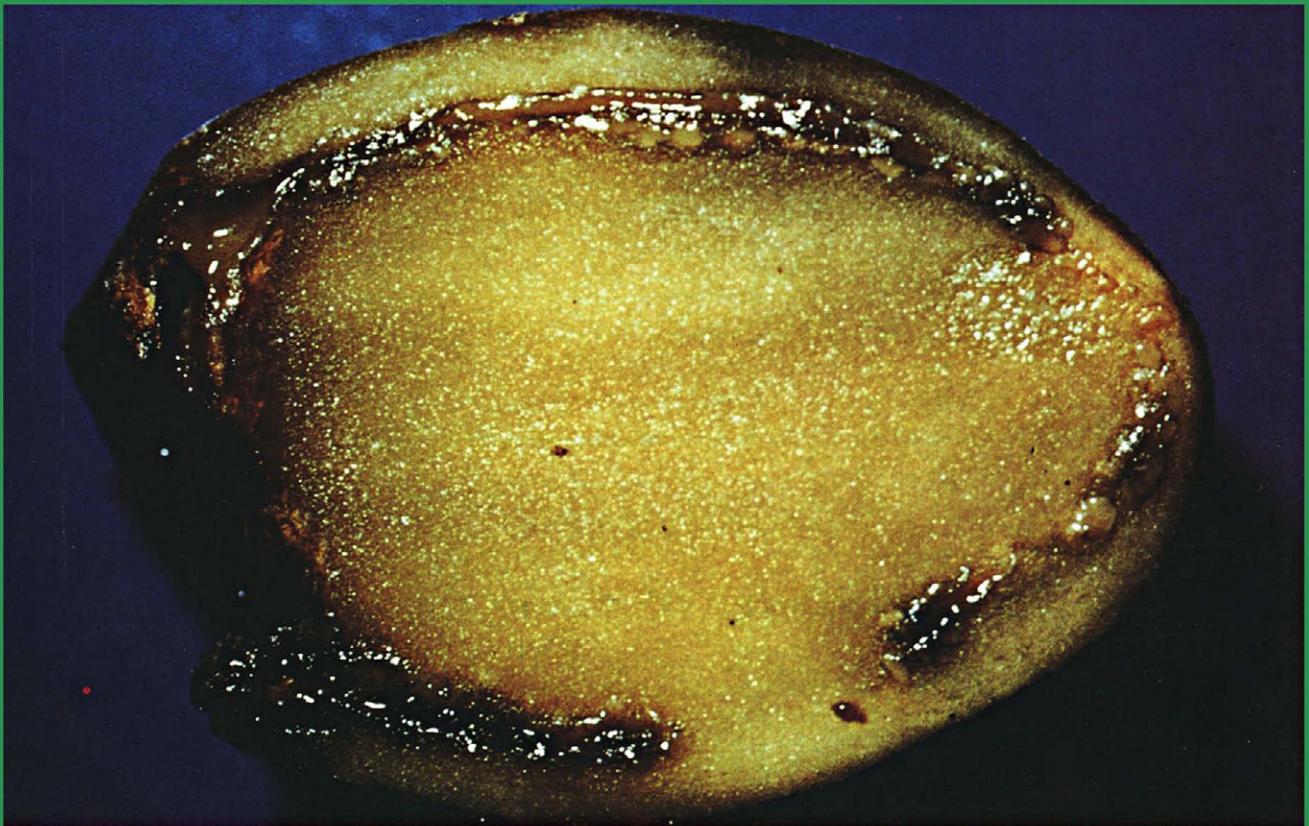


CORYNEBACTERIUM SEPEDONICUM

(Spieck. y Kotth.) Skapt. y Burkh.

agente productor de

**LA PODREDUMBRE ANULAR
DE LA PATATA**



PORTADA:

Corte transversal de tubérculo
de patata afectado por *Coryne-
bacterium sepe-donicum*.

(Foto Chauveau - Francia.)

INDICE

	<u>Págs.</u>
Prólogo	7
Agradecimientos	9
Capítulo 1. Introducción	11
1.1. La patata. Su origen. Introducción en Europa y difusión en el mundo	11
1.2. Importación y cultivo	12
1.3. El problema de la Podredumbre anular	15
Capítulo 2. Distribución geográfica y nombres comunes de la enfermedad	17
Capítulo 3. Sintomatología de la podredumbre anular	21
3.1. Síntomas en hojas	21
3.2. Síntomas en tallos	21
3.3. Síntomas en tubérculos	21
3.4. Problemática de la sintomatología	23
Capítulo 4. La bacteria: <i>Corynebacterium sepedonicum</i>	33
4.1. Nomenclatura	33
4.2. Morfología y caracteres culturales	34
4.3. Principales pruebas de laboratorio utilizadas para el aislamiento e identificación de la bacteria	35
4.3.1. Medios para el aislamiento y la multiplicación	35
4.3.2. Test nutritivos y fisiológicos	36
4.3.3. Tinción de Gram (modificación de HUCKER, DOETSCH, 1981)	39
Capítulo 5. Epidemiología	41
5.1. Formas de actuación del patógeno sobre la planta	41
5.2. Transmisión del agente patógeno	42
5.3. Influencia ambiental en el desarrollo del patógeno	42
5.4. Hospedantes	44
Capítulo 6. Métodos para el diagnóstico de la enfermedad	45
6.1. Examen visual de síntomas	45
6.2. Examen con luz ultravioleta	45
6.3. Aislamiento directo del patógeno	46
6.4. Tinción de Gram	47
6.5. Test de berenjenas	47
6.6. Test de aglutinación	50
6.7. Test de precipitación de la toxina	51
6.8. Test de doble difusión en Agar	52
6.9. Test de aglutinación pasiva al látex	54
6.10. Test ELISA (Enzime-Linked Inmunosorbent Assay)	56
6.11. Test de inmunofluorescencia	63
6.12. Nuevas técnicas	68
6.13. Consideraciones para un diagnóstico correcto de la Podredumbre anular	69

	<u>Págs.</u>
Capítulo 7. Control y lucha	73
7.1. Tolerancia cero	73
7.2. Medidas relativas al material de siembra	73
7.3. Medidas relativas a la manipulación y cultivo	74
7.4. Desinfección química	75
Capítulo 8. Legislación referente a la Podredumbre anular de la patata	77
8.1. Legislación de la Comunidad Económica Europea	77
8.2. Legislación nacional	82
Bibliografía	83

Prólogo

La Podredumbre anular de la patata es una grave enfermedad que causa enormes daños tanto en las cosechas como en los mecanismos de producción de patata de siembra. Como organismo de cuarentena, *Corynebacterium sepedonicum* constituye una constante pesadilla para la Comunidad Económica Europea, que a toda costa intenta evitar nuevas introducciones y su difusión dentro de los territorios de los países miembros, a través de las importaciones de terceros países que la padecen.

En 1981, en el seno del Comité Fitosanitario Permanente de la CEE, se formó un Grupo de Trabajo específicamente dedicado al *Corynebacterium sepedonicum*, cuyos esfuerzos se dirigieron al establecimiento de las normas precisas para la identificación del patógeno, incluso en muestras asintomáticas, mediante la puesta a punto de métodos de análisis rápidos y homologados que permitieran detectar la enfermedad en las partidas de importación y del comercio intracomunitario, particularmente de las patatas de siembra, y en el caso de ser detectada su presencia, poner en marcha los mecanismos adecuados para su aislamiento y erradicación. Aun cuando hasta el momento aún no ha sido detectada la presencia de este agente patógeno en nuestro país, tras su incorporación a la CEE y la adecuación de la legislación específica, España participa en los trabajos de dicho Grupo.

El primer paso dado en España, consistente en la puesta a punto de las técnicas de detección e identificación del parásito según las normas comunitarias, ha sido posible gracias a la ayuda del Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero y del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, que facilitaron la realización de un proyecto específico. En él se efectuaron muestreos de patatas de distintas Comunidades Autónomas y de diferentes partidas de importación de Dinamarca y Canadá. Asimismo, durante el año 1986, se participó en el programa de la CEE de muestreo y análisis de patatas importadas de Canadá con destino a Grecia e Italia.

El interés que suscitó el tema, tanto en el INSPV como entre los patólogos de las Comunidades Autónomas colaboradoras, hizo pensar a nuestra Subdirección General de Sanidad Vegetal en la necesidad de completar los estudios y trabajos efectuados con otros relativos al mejor conocimiento del agente patógeno y sus efectos, de la problemática de su identificación diferencial con otros agentes nocivos que pueden inducir a errores, así como de los medios de lucha.

El desconocimiento de la enfermedad por parte de los técnicos y productores, al no existir en nuestro país, y el gran interés provocado por la aplicación de las Directivas comunitarias y medidas de control de la enfermedad, casi todas ellas preventivas, requerían una transferencia tecnológica a la que está obligado todo científico y que se ha procurado plasmar en este trabajo de recopilación y síntesis.

En nuestro único deseo que esta pequeña contribución a un gran esfuerzo colectivo pueda ser útil en algún aspecto a cuantos trabajan en el sector.

Madrid, 14 de octubre de 1987

Domingo Cadahía Cicuendez
*Jefe del Servicio de Campañas
y Lucha Preventiva*

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a cuantas personas y entidades han contribuido a la realización de esta monografía.

Al INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS Y PLANTAS DE VIVERO por su colaboración, financiación y ayuda en la puesta a punto de las técnicas de diagnóstico, y en especial a D. LUIS MARTÍNEZ VASALLO, Jefe de la Estación de Ensayos de Semillas, y a D. GERARDO DÍAZ RODRÍGUEZ, ex-Jefe del Servicio de la Patata de Siembra.

A la SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL por la publicación de la presente obra, y en especial a D. DOMINGO CADAHIA CICUÉNDEZ, Jefe del Servicio de Campañas y Lucha Preventiva, por su constante ayuda y entusiasmo.

Al INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRARIAS, en donde fue realizada la mayor parte del trabajo, y en especial a D. JAVIER TELLO MARQUINA por su asesoramiento en la elaboración de algunos apartados del manuscrito, así como a todo el equipo del Proyecto «Bacteriosis, virosis y micoplasmosis de la patata».

A Mme. REGINE SAMSON y a M. JEAN-FRANCOIS CHAUCHEAU por todas sus enseñanzas.

A D.^a BELÉN CALVO y a D.^a LOURDES MONJE por su inestimable colaboración.

LOS AUTORES.

Introducción

1.1. LA PATATA. SU ORIGEN. INTRODUCCION EN EUROPA Y DIFUSION EN EL MUNDO.

La patata, cuyo nombre científico es *Solanum tuberosum* L., es una planta anual perteneciente a la familia de las solanáceas.

Las plantas procedentes de semilla botánica, denominadas plántulas, se caracterizan por poseer una raíz principal filiforme, a partir de la cual se desarrollan ramificaciones laterales, tener dos cotiledones (algunas veces tres) y producir tubérculos pequeños. Se utilizan casi exclusivamente con fines científicos en programas de mejora genética. Sin embargo, en la República Popular China se cultivan más de 10.000 Ha de patata por semilla, con la finalidad de evitar enfermedades viróticas y disminuir los costes de transporte de tubérculos a grandes distancias.

El sistema habitual de multiplicación de esta especie es mediante sus tubérculos, dando lugar a plantas denominadas «clones». No tienen raíz principal ni cotiledones, ya que nacen de una yema, siendo el sistema radicular adventicio.

Según VAVILOV (1926), el centro de origen de la patata (Centro Sudamericano) se sitúa en las cordilleras andinas, donde se encuentra una mayor variación en sus formas cultivadas y especies silvestres. Posteriormente se planteó la teoría de dos centros de origen: uno primario ubicado en Perú y Bolivia,

para la subespecie «andigenum», y otro secundario para la subespecie «tuberosum», localizado en el sur de Chile (Isla de Chiloé).

Su existencia se remonta a unos tres mil años de antigüedad. De hecho, era cultivada por los incas antes del Descubrimiento de América en alturas superiores a los dos mil metros.

La primera referencia escrita acerca de la patata se debe al cronista Gonzalo Fernández de Oviedo y Valdez en su «Historia Natural y General de los Indios», escrita en Sevilla en 1535, en la que se cita como producto alimenticio utilizado por los indígenas.

En 1537, el historiador Juan de Castellanos en su «Historia del Nuevo Reyno de Granada», hace una breve descripción de ella.

En 1539, el primer Obispo del Cuzco, Fray Vicente Valverde, en una carta fechada el 20 de marzo y dirigida al Emperador Carlos V, proponía se aplicase a las cosechas de patata los «diezmos y primicias» como renta del obispado.

De nuevo, en 1550, aparece otra descripción de la patata en la obra «Parte primera de la Crónica del Perú» de Pedro Cieza de León, que había recorrido el imperio incaico para informarse de su organización y cultura.

La primera introducción de la patata en España, según la publicación inglesa anónima «The South American Potatoes and their

Breeding Valvue» (1936), se produjo en 1565 como un obsequio, consistente en un cargamento de patatas, de la región del Cuzco, al Rey Felipe II. Este a su vez envió parte del mismo al Papa, quien las hizo llegar al botánico Carolus Clusius de Leyden en 1568, el cual las cultivó en Viena y Francfort y cuyas cosechas sirvieron para dar a conocer la patata en aquella zona.

Sin embargo, según la «Enciclopedia Británica» la patata llegó primero a España gracias al monje Jerónimo Cardan, cultivándose en Galicia, de donde pasó a Italia mediante Vincenzo Dandolo y posteriormente a Bélgica, donde se denominó «taratoufli» (trufas).

En pleno siglo XVI, a partir del primitivo centro español, la patata se empezó a cultivar en Italia, Francia, Suiza, Países Bajos, Inglaterra y Alemania, siendo conocida como «Papus Hispaniorum».

Una segunda vía de introducción de la patata en Europa fue, probablemente, a través de las rutas abiertas por los corsarios ingleses Drake, Raleigh y Howkins entre 1580 y 1600.

En la mayor parte de los países europeos la introducción de la patata no supuso una inmediata extensión de su cultivo y consumo, debiendo transcurrir un largo período de tiempo hasta su aceptación. Al ser un cultivo nuevo que crecía bajo tierra, y cuyo aspecto no era muy bonito, hizo que fuese considerado alimento para los pobres y como tal, excluido de las dietas de la nobleza. A pesar de esta repulsión inicial, la patata se fue imponiendo, por una u otra razón, en todos los países. Así, en Francia su popularización se produjo hacia finales del siglo XVIII debido a los esfuerzos de Antonio Augusto Parmentier que vio en ella el alimento ideal para paliar el hambre que asolaba a su país. Su eficacia fue elogiada por el rey Luis XVI y quedó resumida en las siguientes palabras: «Francia le agradecerá a Vd. algún día por haber hallado pan para los pobres».

Desde Europa la patata se fue difundiendo a los demás continentes, bien por la expansión colonial o a través de los emigrantes,

estando actualmente su cultivo extendido en todo el planeta.

1.2. IMPORTANCIA Y CULTIVO

La patata representa actualmente uno de los vegetales de mayor importancia como fuente de alimentación humana.

La superficie mundial de cultivo es de unos 20 millones de Ha. con una producción de 286 millones de Tm. El porcentaje de la producción de las distintas regiones mundiales (MAPA: Anuario de Estadística Agraria, 1984) es:

Europa (excepto URSS) ..	34 %
URSS	30 %
Asia	25 %
América del Norte	6,5%
América del Sur	3 %
Africa	1 %
Oceanía	0,5%

El rendimiento medio mundial es de 14 Tm/ha, siendo éste mayor en los países del norte de Europa y de América del Norte donde es superior a 20 Tm/ha y menor en los trópicos (entre los 30° Norte y Sur) donde con frecuencia es inferior a las 10 Tm/ha.

En la C.E.E., en 1984, se dedicó al cultivo de la patata una superficie de 1.105.000 Ha., con una producción de 29 millones de Tm. y un rendimiento medio de 26 Tm/ha (solamente Italia presenta un rendimiento medio inferior a las 20 Tm/ha). Es de destacar que en todos los países miembros de la C.E.E. se ha experimentado una reducción de la superficie cultivada en los últimos años, a excepción de Holanda, destacando especialmente la República Federal de Alemania que entre 1970 y 1980 ha reducido la superficie en un 50%.

En la Tabla 1 se recoge la serie histórica de la superficie, producción y rendimiento en España desde el año 1960.

TABLA 1

AÑOS	Superficie (miles Ha)	Producción (miles Tm)	Rendimiento (Qm/ha)
1960	394,7	4.619,7	117
1961	416,4	4.918,3	118
1962	408,4	4.153,3	101
1963	410,7	4.074,6	123
1964	365,2	4.254,2	116
1965	368,4	4.078,5	110
1966	374,6	4.423,4	118
1967	376,2	4.489,7	119
1968	382,1	4.545,8	119
1969	376,6	4.789,0	127
1970	369,9	5.300,7	133
1971	393,8	4.865,0	124
1972	401,1	5.275,3	132
1973	409,0	5.578,7	136
1974	407,1	5.693,0	140
1975	384,8	5.337,8	139
1976	390,8	5.658,7	145
1977	402,6	5.889,6	146
1978	371,4	5.364,3	194
1979	354,7	5.637,4	159
1980	355,2	5.737,4	162
1981	342,7	5.570,0	160
1982	338,3	5.221,8	154
1983	340,0	5.162,9	152
1984	347,5	5.980,7	172
1985	330,9	5.927,0	179
1986	288,8	4.856,5	168

Fuente: Anuario de Estadística Agraria. MAPA.

En la Tabla 2 se refleja la superficie, producción y rendimiento en España por Comunidades Autónomas durante el año 1986.

Como puede apreciarse el rendimiento medio nacional es algo superior al mundial, pero aún muy lejano al de la CEE, y la superficie y producción van en disminución desde el año 1977.

El comercio exterior español de patata está preferentemente dirigido hacia los países comunitarios (Tabla 3).

Aunque el destino principal de la patata es la alimentación humana, en Europa un alto porcentaje de la producción se utiliza para alimentación del ganado. En España su destino es el siguiente:

Consumo en fresco	74,5%
Pérdidas	10,0%
Siembra	9,5%
Alimentación ganado	3,0%
Proceso industrial	3,0%

Estas cifras sitúan a nuestro país en uno de los de más alto nivel de consumo mundial, superando ampliamente la media de los países de la CEE.

La producción de patata según la época de su recolección se clasifica en:

Extratempрана ..	15-I y 15-IV
Temprana	15-IV y 15-VI
Media estación ..	15-VI y 30-IX
Tardía	1-X y 15-I

La distribución de la producción española de patata, por Comunidades Autónomas, es la reflejada en la Tabla 4.

TABLA 2

COMUNIDAD	Superficie (ha)	Producción (1.000 Tm)	Rendimiento Kg/ha
Galicia	94.471	1.333,1	14.111
Asturias	5.846	120	20.526
Cantabria	1.162	43,1	37.091
País Vasco	12.310	183	14.865
Navarra	4.208	80,3	19.082
La Rioja	8.831	241,3	27.324
Aragón	10.582	155,7	14.713
Cataluña	17.848	295,7	16.567
Baleares	3.600	78,4	21.777
Castilla y León	49.716	892,3	17.947
Madrid	3.150	70	22.222
Castilla-La Mancha	15.933	276,1	17.328
C. Valenciana	11.098	119,6	17.985
Murcia	5.699	106,2	18.634
Extremadura	6.250	89,5	14.320
Andalucía	26.611	576,7	21.671
Canarias	9.530	115,5	12.119
TOTAL NACIONAL	288.846	4.856,5	16.813

Fuente: Boletín mensual de la Secretaría General Técnica. MAPA, 1986.

Las variedades de patata mayormente utilizadas en España son:

a) para extratemprana y temprana:

Baraka	23%
Arran Banner	14%
Spunta	12%
King Eduard	10%
Otras	41%

b) para media estación y tardías:

Desirée	28%
Kennebec	24%
Jaerla	16%
Red Pontiac	13%
Otras	19%

Estos datos indican que realmente con sólo ocho variedades se absorbe un 70% de la oferta nacional de patata de siembra.

TABLA 3

Países	Importaciones (Tm)			Exportaciones (Tm)		
	1982	1983	1984	1982	1983	1984
Alemania (R.F.)	26	56	239	7.912	3.657	20.025
Francia	8.247	12.633	7.416	19.307	14.621	28.756
Irlanda	5.062	4.044	6.884	—	—	—
Países Bajos	10.455	30.332	12.033	2.166	297	2.012
Reino Unido	43.001	35.025	48.880	36.725	36.522	51.161
Bélgica	—	265	168	762	1.628	4.957
Otros países	6.123	9.931	6.637	24.727	1.964	21.607
TOTAL	72.914	92.286	82.257	91.599	58.689	128.518

Fuente: «Estadística del Comercio Exterior de España». Dirección General de Aduanas.

TABLA 4

	SUPERFICIE (ha)				PRODUCCION (1000 Tm)			
	EXTRA-TEMPRANA	TEMPRANA	MEDIA ESTACION	TARDIA	EXTRA-TEMPRANA	TEMPRANA	MEDIA ESTACION	TARDIA
Galicia	105	4.225	71.401	18.740	0,7	54,9	1.048,6	228,9
Asturias	—	—	5.126	720	—	—	105,0	15,0
Cantabria	—	—	2.001	1.162	—	—	26,0	17,1
País Vasco	—	170	2.090	10.050	—	1,6	32,5	148,9
Navarra	—	—	1.932	2.276	—	—	49,5	30,8
La Rioja	—	—	3.400	5.431	—	—	73,0	168,3
Aragón	—	—	4.459	6.123	—	—	70,3	85,4
Cataluña	—	3.457	11.255	3.136	—	69,8	189,3	36,6
Baleares	—	1.025	775	1.800	—	24,1	21,3	33,0
Castilla y León	—	200	14.846	34.670	—	3,5	263,6	625,2
Madrid	—	—	2.100	1.050	—	—	46,0	24,0
Castilla-La Mancha	—	600	8.473	6.860	—	9,7	135,8	130,6
C. Valenciana	—	5.290	3.100	2.700	—	113,4	53,2	33,0
Murcia	40	3.800	650	1.209	0,5	80,0	11,5	14,2
Extremadura	—	500	5.200	550	—	5,6	74,0	9,9
Andalucía	2.291	10.530	8.890	4.900	50,1	200,2	231,8	94,6
Canarias	3.240	3.500	1.480	1.310	35,7	52,0	15,6	12,2
España	5.676	33.305	147.178	102.687	87,0	614,8	2.447,0	1.707,7

Fuente: Boletín mensual de la Secretaría General Técnica. MAPA, 1986.

La utilización de patata de siembra certificada en nuestro país es del orden de 130.000 Tm., mientras que la reutilización de la propia cosecha supera las 400.000 Tm.

1.3. EL PROBLEMA DE LA PODREDUMBRE ANULAR

La Podredumbre anular es una enfermedad muy grave producida por la bacteria *Corynebacterium sepedonicum* o *C. sepedonicum* que afecta al cultivo de la patata.

Los problemas que origina esta bacteriosis se deben, no sólo al hecho de producir grandes pérdidas económicas, sino también a la facilidad de propagación de la enfermedad, a las dificultades para una correcta identificación del patógeno y a los escasos medios disponibles para combatirlo. Estos hechos han obligado a adoptar una serie de medidas de protección a escala mundial. Así, la CEE contempla en su Directiva 77/93 la disposi-

ción de medidas fitosanitarias de control y el establecimiento de cuarentenas, como medios de protección contra la introducción en los Estados miembros de organismos nocivos, entre ellos el *Corynebacterium sepedonicum*, para los vegetales o productos vegetales. En especial, para este agente patógeno, la Directiva 80/665/CEE relativa a la lucha contra la Podredumbre anular, contempla los controles mínimos obligatorios para evitar su aparición, los métodos de localización en sus territorios, el aislamiento con vistas a su erradicación, así como la prevención de su propagación.

Si bien la enfermedad puede repercutir sobre toda la planta, los mayores daños se producen en los tubérculos, resultando comercialmente inservibles y descalificando las parcelas afectadas como productoras de semilla por el hallazgo de un solo tubérculo enfermo. (EASTON, 1979; NELSON y TORFASON, 1974; SHEPARD y CLAFIN, 1975).

La diseminación más importante de la

bacteria se realiza mediante los propios tubérculos enfermos, bien por transmisión directa al ser utilizados como semilla de reproducción vegetativa, o por transmisión mecánica, mediante contacto e infección de los tubérculos sanos con útiles, maquinaria, envases y almacenes contaminados.

En los tubérculos infectados pueden manifestarse síntomas o, por el contrario, tener una apariencia totalmente normal (infección latente). En este caso, hay un grave riesgo de diseminación de la enfermedad al poder ser considerados como sanos.

Aunque existan síntomas típicos visibles sobre plantas y tubérculos es imprescindible la realización de los correspondientes análisis para la identificación de la bacteria. El aislamiento de la misma resulta especialmente difícil cuando los tubérculos están muy podridos, o cuando la infección se encuentra en estado latente.

Para la detección de la Podredumbre anular en tubérculos se han propuesto numerosos métodos, tales como la tinción de Gram, los test serológicos (CHAFLIN y SHEPARD, 1977; DE BOER y COPEMAN, 1980; SAMSON y POUTIER, 1979; SLACK *et. al.*, 1979), test de patogenicidad sobre plantas de berenjena o tomate (LELLIOT y SELLAR, 1976) y aisla-

miento en cultivo puro e identificación (MANZER y SLACK, 1979).

El criterio para proceder a un diagnóstico correcto de la podredumbre anular debe de ser totalmente objetivo, por la posibilidad de obtener falsos resultados tanto positivos como negativos, debidos en muchas ocasiones a bacterias saprofitas o a otras morfológicamente muy similares (CALZOLARI *et al.*, 1982; CROWLEY y DE BOER, 1982; DE BOER y COPEMAN, 1974; MILLER, 1984). Por tanto se hace necesario combinar distintos test, tales como la tinción Gram, los métodos serológicos y test de patogenicidad, siendo obligatorio el aislamiento de *C. sepedonicum* en cultivo puro y la comprobación de los postulados de KOCH antes de emitir un diagnóstico positivo.

El peligro de introducción de la enfermedad en áreas sanas, a través del comercio de tubérculos que pueden ser portadores de infecciones latentes, y la necesidad de aplicar criterios objetivos en el diagnóstico de la misma, motivó el desarrollo de un programa de investigación de la C.E.E. para el estudio de detección e identificación del patógeno, llegándose a elaborar un método estandarizado que puede utilizarse en el análisis de lotes comerciales de patata.

Distribución geográfica y nombres comunes de la enfermedad

La Podredumbre anular fue descrita por APPEL (1906) como una enfermedad que estaba afectando a las patatas en Alemania. SPIECKERMANN en 1910 demostró que el agente causal era una bacteria.

Posteriormente aparecen referencias de la misma en numerosos países: Polonia (1928), Rumania (1929), Suecia (1930). Se cita por primera vez en 1931 en Canadá y en 1932 en los EE.UU (SAVILE y RACICOT, 1937).

Hacia 1940 se había encontrado la enfermedad en la mayor parte de las zonas de producción de patata de ambos países (DYKSTRA, 1941). Dado que la diagnosis se hacía principalmente por sintomatología, las fechas de su aparición son, en algunos casos, bastante inciertas (EPPPO, 1961).

En los mapas de *Commonwealth Mycological Institute* correspondientes a la distribución estimada de la enfermedad en los años 1965, 1972 y 1983 (Fig. 1), se reflejan los países afectados a lo largo del tiempo. Se observa que la enfermedad ha logrado ser erradicada en algunas áreas, como consecuencia principalmente de la aplicación de programas de certificación de semillas, prohibición del troceado de tubérculos y otras medidas sanitarias. La adopción de todas estas medidas se ha revelado insuficiente en ocasiones, como lo demuestra el hecho de la

aparición de la enfermedad recientemente en Alemania Federal (1986).

En la Tabla 5 se resumen los datos referidos a la fecha de aparición, así como a la distribución mundial de la Podredumbre anular.

Si bien a lo largo de esta monografía se va a mantener el nombre común de «Podredumbre anular», por ser en nuestra opinión, el que refleja de forma más patente los daños de la enfermedad (caracterizados por la destrucción del anillo vascular) y el hasta ahora mayormente utilizado, existen otros nombres que aparecen en distintos medios oficiales tales como «Marchitamiento bacteriano» (B.O.E. 1 de marzo de 1986) y «Necrosis bacteriana» (traducción oficial de la directiva 80/665/CEE).

Algunas de sus denominaciones en otros idiomas son:

- Bacteriose annulaire de la pomme de terre.
- Flétrissement bactérien de la pomme de terre.
- Bacterial ring rot of potatoes.
- Bakterienringfaule der kartoffel.
- Bakterielle ringfaule der kartoffel,
- Ringbakteriose der kartoffel.
- Marciume anulare.
- Arrizzimento batterico.

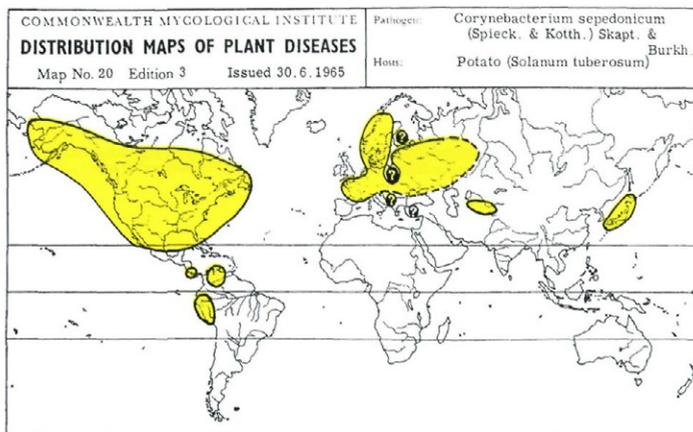
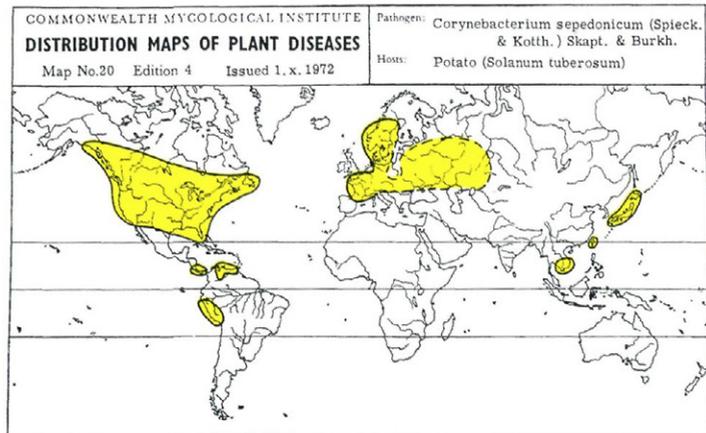
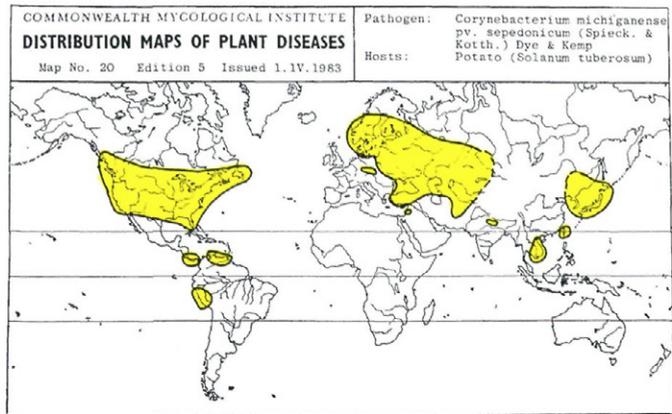


Fig. 1. Distribución estimada de la Podredumbre anular en los años 1965, 1972 y 1983. (Fuente CMI.)

TABLA 5
Fecha de aparición y distribución mundial de la Podredumbre anular

PAIS	FECHA APARICION (*)	DISTRIBUCION (**)		
		1965	1972	1983
USA	1932	SI	SI	SI
Canadá	1931	SI	SI	SI
Dinamarca	1960	SI	SI	SI
Finlandia		?	?	SI
Suecia	1930	SI	SI	SI
Noruega		SI	SI	SI
Polonia	1928	?	?	SI
URSS		SI	SI	SI
Alemania F.	1906	SI	SI	
Austria	1933	SI	SI	NO
Suiza	1947	SI	SI	NO
Yugoslavia		SI	?	
Rumania	1929	SI	SI	NO
Francia	1956	SI	SI	NO
Checoslovaquia		SI	SI	SI
Alemania W.				NO
Camboya			SI	SI
Afganistán				SI
Vietnam			SI	SI
Nepal			SI	SI
Formosa			SI	SI
Turquía		?	?	SI
Líbano			SI	SI
Japón		SI	SI	SI
Corea				SI
Panamá			SI	SI
Costa Rica		SI	SI	SI
Venezuela			SI	SI
Perú			SI	SI

(*) EPPO 1961.

(**) CMI 1965, 1972, 1983.

Sintomatología de la Podredumbre anular

Aunque las plantas enfermas pueden mostrar ciertos síntomas característicos, tales como el marchitamiento de hojas y el exudado que sale del anillo vascular cuando se oprimen los cortes efectuados en tallos y tubérculos, normalmente los síntomas suelen ser muy variables haciéndose patentes tras la floración al final del ciclo vegetativo.

Por otra parte, en las plantas pueden no aparecer síntomas (infección latente), o bien síntomas similares pueden originarse por la acción de otras causas.

3.1. SINTOMAS EN HOJAS

El primer síntoma que presenta la planta enferma es un marchitamiento parcial o total, afectando generalmente a las hojas inferiores que enrollan sus bordes hacia arriba y hacia su interior. A medida que progresa la infección se produce una decoloración de las hojas, evolucionando de verde pálido a verde grisáceo (acompañado a veces de moteado), tornándose amarillentas y finalmente marrones y necróticas. Estos cambios de tonalidad se localizan en las áreas comprendidas entre los nervios, pudiendo originarse clorosis o marchitamientos asimétricos (EPPO, 1978; HOOKER, 1980; RICH, 1983).

Los síntomas foliares aparecen normalmente a partir de la mitad del período ve-

getativo. No obstante, pueden desarrollarse otros síntomas al principio del ciclo, como en el caso del arrosamiento apical que se produce en la variedad «Russet Burbank» (HOOKER, 1980).

3.2. SINTOMAS EN TALLOS

En los tallos se observa un marchitamiento de sentido ascendente, comenzando por la base, pudiendo afectar a uno o varios tallos de la misma mata e incluso a un solo sector de un mismo tallo. Ocasionalmente el marchitamiento del tallo puede ser de sentido descendente. Además, en algunos casos se presenta una ligera decoloración del pie de las plantas.

Si se corta por su base un tallo afectado (pero por encima de cualquier decoloración) y se oprime, se observa en el tejido vascular un exudado lechoso constituido por una mezcla de bacterias y células vegetales desorganizadas. Este síntoma es característico de la enfermedad (BONDE, 1939; HOOKER, 1980; O'BRIEN y RICH, 1976; RICH, 1968).

3.3. SINTOMAS EN TUBERCULOS

Para la apreciación óptima de los síntomas en tubérculos se debe realizar un corte entre el ombligo (zona basal de unión del estolón con el tallo) y la corona.

El síntoma más precoz es una ligera transparencia de los tejidos que rodean al sistema vascular, especialmente cerca del ombligo, aunque a veces tan sólo es observable un color ligeramente más oscuro que el normal. Más característica es ya la coloración amarillo-pálida del anillo vascular.

En un estado de infección más avanzado, se observa una separación definitiva entre el anillo vascular y los tejidos adyacentes. Al presionar ligeramente el tubérculo, emergen fibras con aspecto de cintas de queso de los

vasos del anillo y un exudado de consistencia pastosa de los tejidos colindantes (Fig. 2).

Al agudizarse la infección, el anillo vascular se oscurece y los tejidos adyacentes comienzan a descomponerse, presentando una coloración amarillenta, crema o marrón y una textura ligeramente desmoronada y sin olor. Posteriormente pueden llegar a separarse de la corteza del tubérculo, terminando finalmente por pudrirse (Fig. 3).

Cuando la infección está muy avanzada, las

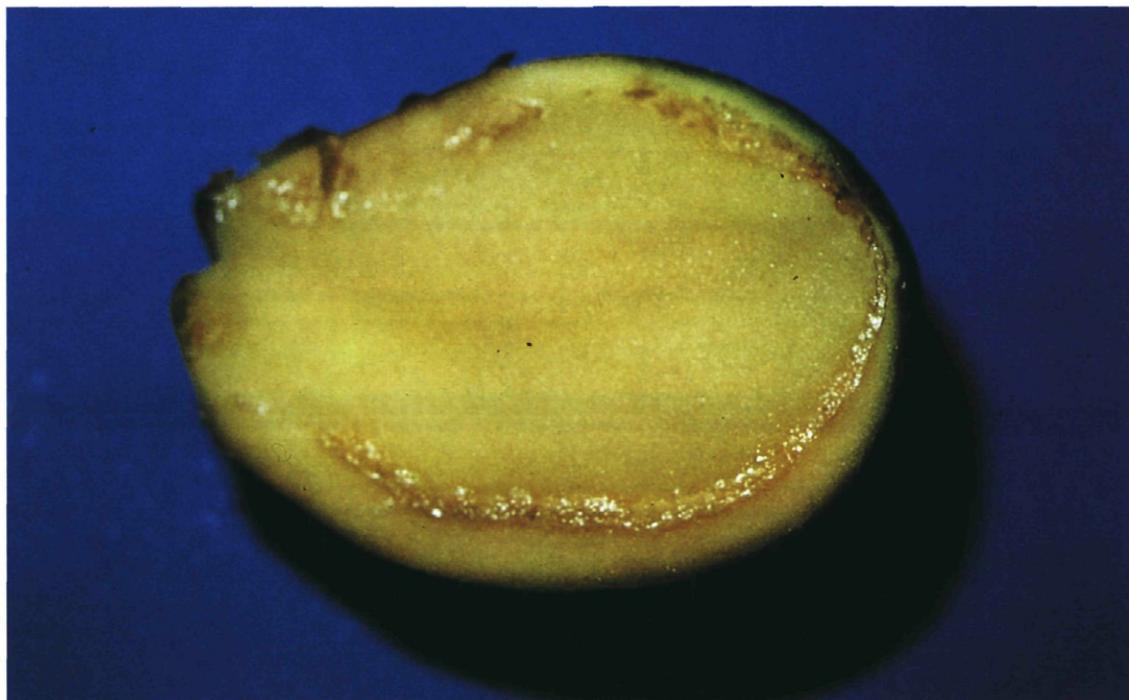


Fig. 2. Tubérculos atacados por *C. sepedonicum*. Presencia de exudados en el anillo vascular.

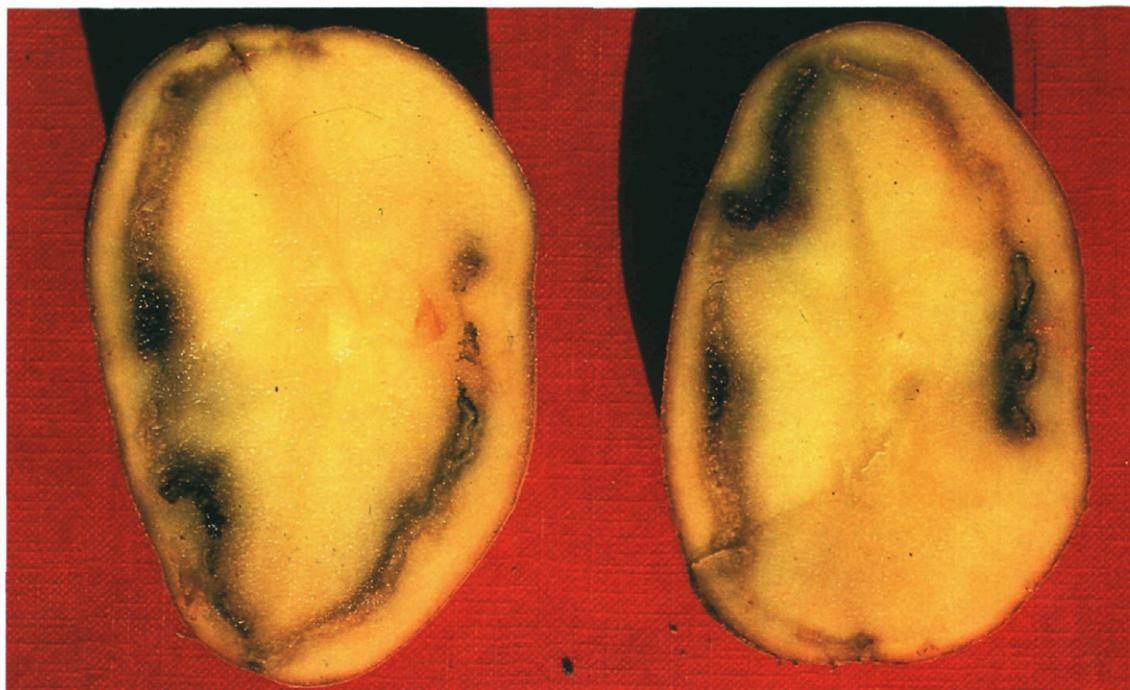


Fig. 3. Estado más avanzado de la infección con descomposición de algunos tejidos adyacentes al anillo vascular.

bacterias pueden salir de la región vascular al exterior del tubérculo, originando hinchamientos y deformaciones externas, a modo de hoyos y cráteres, fisuras y hendiduras irregulares cuyos bordes adquieren una coloración castaño rojiza, especialmente cerca de los ojos (Fig. 4). Estas alteraciones y deformaciones del tubérculo, hacen que sea muy susceptible a la invasión de organismos secundarios, causantes de podredumbres, ocasionando un enmascaramiento de síntomas.

Los síntomas pueden aparecer en cualquier parte del anillo, no necesariamente cerca del ombligo, extendiéndose paulatinamente a todo él por acción de las enzimas producidas por la bacteria y la destrucción de los propios tejidos vasculares.

La Fig. 5 representa un esquema de las distintas fases de infección con corte transversal de un tubérculo, desde su estado sano hasta una podredumbre avanzada.

Algunos tubérculos, a pesar de no mostrar síntomas, pueden ser portadores de *C. sepe-*

donicum. Este hecho se ha puesto de manifiesto tanto en variedades sensibles como en resistentes. Las infecciones latentes representan un alto potencial de diseminación de la enfermedad, dado que la ausencia de síntomas induce al error de su estado sanitario.

3.4. PROBLEMATICA DE LA SINTOMATOLOGIA

En la realidad, tanto en plantas como en tubérculos, los síntomas descritos no aparecen tan claros y nítidos.

Dado que síntomas similares pueden ser debidos a diversas causas (HOOKER, 1980) se recogen en las Tablas 6 y 7, los más característicos de la Podredumbre anular, algunas enfermedades o anomalías que pueden motivarlas y el agente productor de las mismas. Se describen a continuación más extensamente las que con mayor frecuencia pueden inducir a error en un diagnóstico sintomatológico.

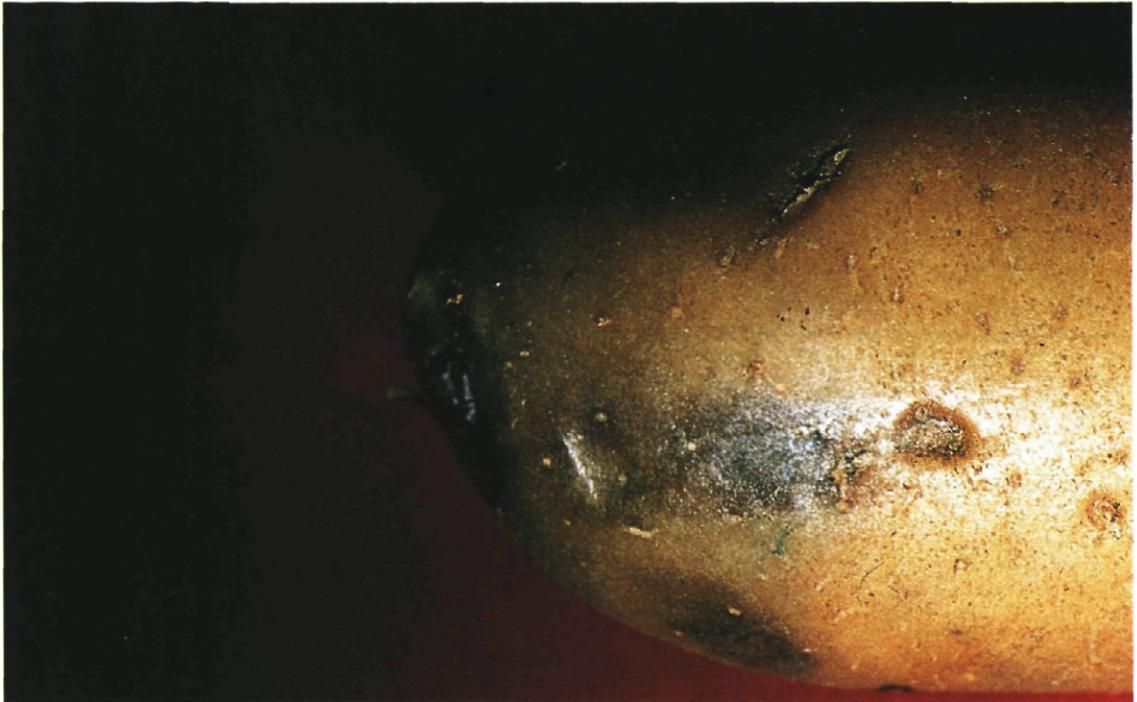


Fig. 4. Alteraciones externas de un tubérculo afectado de Podredumbre anular. (Foto Chauveau-Francia.)

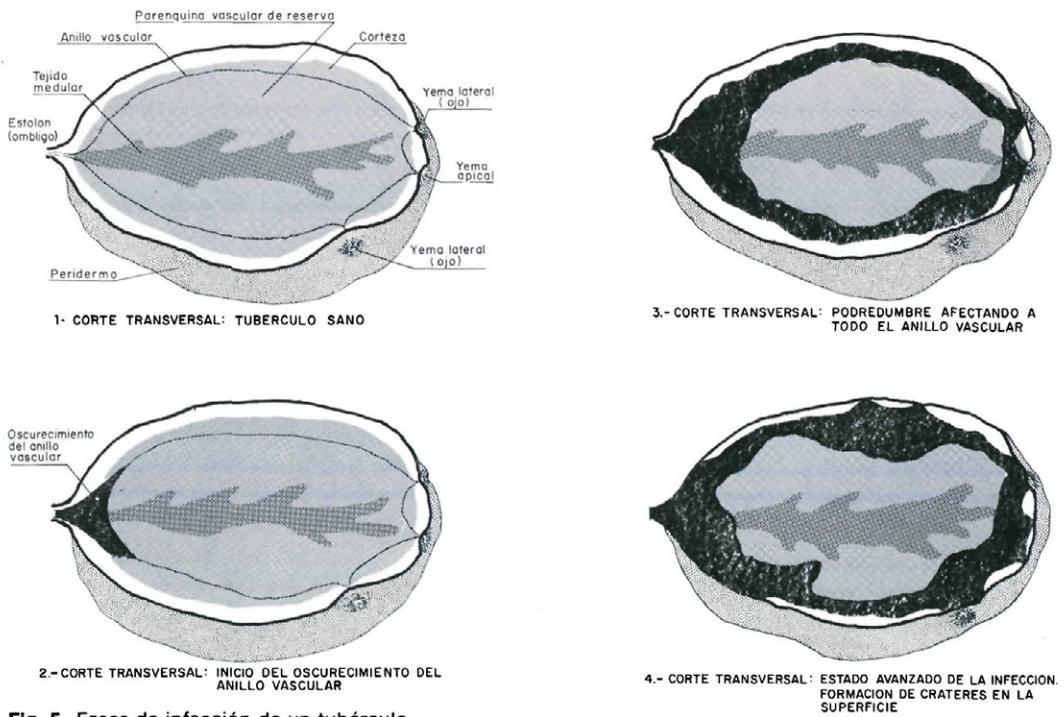


Fig. 5. Fases de infección de un tubérculo.

TABLA 6
Diagnóstico sintomatológico a partir de hojas y tallos

Síntomas en hojas y tallos	Enfermedad o anomalía	Agente causante
Marchitamiento y/o clorosis de hojas y tallos (Fig. 7)	— Podredumbre anular	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i>
	— Podredumbre parda	— <i>Pseudomonas solanacearum</i>
	— Fusariosis	— <i>Fusarium</i> spp.
	— Verticilosis	— <i>Verticillium</i> spp.
Marchitamiento, clorosis y necrosis de hojas	— Podredumbre anular	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i>
	— Podredumbre parda	— <i>Pseudomonas solanacearum</i>
	— Tizón tardío	— <i>Phytophthora infestans</i>
	— Pudrición rosada	— <i>Phytophthora erythroseptica</i>
	— Pudrición basal	— <i>Sclerotium rolfsii</i>
	— Pie negro	— <i>Erwinia carotovora</i>
	— Fusariosis	— <i>Fusarium</i> spp.
	— Enanismo amarillo	— Virus del enanismo amarillo de la patata (PYDV)
	— Fitotoxicidad	— Productos agroquímicos
	— Fisiopatía	— Bajas temperaturas
Arrosetamiento del ápice	— Podredumbre anular	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i>
	— Fusariosis	— <i>Fusarium</i>
	— Enanismo amarillo	— Virus del enanismo amarillo de la patata (PYDV)
	— Fisiopatía	— Deficiencia de calcio
Enrollado de hojas (Fig. 8)	— Pie negro	— <i>Erwinia carotovora</i>
	— Podredumbre anular	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i>
	— Enanismo amarillo	— Virus del enanismo amarillo de la patata (PLRV)
	— Enrollado	— Virus del enrollado de la patata (PLRV)
	— Fisiopatía	— Deficiencia de calcio
Exudado en los tejidos vasculares del tallo	— Podredumbre anular	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i>
	— Podredumbre parda	— <i>Pseudomonas solanacearum</i>

a) Daños causados por rayos

Diversos daños que pueden aparecer sobre las plantaciones de patatas originados por rayos recuerdan, por su sintomatología, a los que manifiestan las plantas con Rhizoctonia, Pie negro y a los tubérculos con Podredumbre anular.

En la epidermis de los tubérculos aparecen necrosis y grietas de color castaño o negro. La corteza y la médula se reblandecen, deteriorándose posteriormente. Las partes no afectadas permanecen compactas, presentándose en ocasiones una corteza intacta frente a una médula blanda y acuosa.

b) Daños producidos por bajas temperaturas

Las bajas temperaturas pueden producir daños en los tubérculos, siendo más intensos cerca del punto de unión al estolón. En ocasiones, el anillo vascular puede quedar parcial o totalmente oscurecido. Asimismo, pueden ocasionar marchitamientos y necrosis en tallos y hojas.

c) Efectos de productos agroquímicos

La aplicación inadecuada de productos agroquímicos ocasiona quemaduras en las hojas, decoloraciones vasculares en los tallos,



Fig. 6. Muchas causas (a veces de origen desconocido) pueden originar alteraciones de las plantas y tubérculos. Podredumbre apical gelatinosa.



Fig. 7. Clorosis de hojas.



Fig. 8. Enrollamiento de folíolos.

TABLA 7
Diagnóstico sintomatológico a partir de tubérculos

Síntomas en tubérculos	Enfermedad o anomalía	Agente causante
Transparencia o vidriosidad de los tejidos que rodean al anillo vascular (Fig. 9)	— Podredumbre anular — Pie negro — Pudrición apical	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i> — <i>Erwinia carotovora</i> — Desorden fisiológico desconocido
Oscurecimiento del anillo vascular en la zona del ombligo	— Podredumbre anular — Podredumbre parda — Verticilosis — Bronceado del extremo del estolón — Fisiopatía — Fisiopatía — Fitotoxicidad	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i> — <i>Pseudomonas solanacearum</i> — <i>Verticillium</i> spp. — Desorden fisiológico desconocido — Deficiencia de calcio — Bajas temperaturas — Productos agroquímicos
Oscurecimiento de los tejidos vasculares en cualquier parte del anillo (Fig. 10)	— Podredumbre anular — Podredumbre parda — Verticilosis — Fisiopatía — Fisiopatía	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i> — <i>Pseudomonas solanacearum</i> — <i>Verticillium</i> spp. — Bajas temperaturas — Deficiencia de calcio
Exudados en el anillo vascular (Fig. 11)	— Podredumbre anular — Podredumbre parda	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i> — <i>Pseudomonas solanacearum</i>
Tejidos con textura desmoronada	— Podredumbre anular — Pudrición rosada — Podredumbre blanda — Fisiopatía	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i> — <i>Phytophthora erythroseptica</i> — <i>Erwinia carotovora</i> — Daños por rayos
Exudados bacterianos en el exterior del tubérculo	— Podredumbre anular — Podredumbre parda	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i> — <i>Pseudomonas solanacearum</i>
Hinchamientos y deformaciones externas	— Podredumbre anular — Enanismo amarillo	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i> — Virus del enanismo amarillo de la patata (PYDV)
Fisuras y hendiduras con bordes marrón rojizo	— Podredumbre anular — Fisiopatía	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i> — Daños por rayos
Tubérculo completamente deteriorado (Fig. 12)	— Podredumbre anular — Pudrición rosada — Podredumbre blanda — Tizón tardío — Pudrición apical gelatinosa — Fisiopatía	— <i>Corynebacterium sepedonicum</i> — <i>Phytophthora erythroseptica</i> — <i>Erwinia carotovora</i> — <i>Phytophthora infestans</i> — Desorden fisiológico desconocido — Daños por rayos

etc., pudiendo asimismo originar necrosis y oscurecimiento de los tubérculos en la zona de unión con el estolón.

d) Deficiencia de calcio

Un síntoma característico de la deficiencia de calcio es la presencia de folíolos enrollados

con márgenes cloróticos, pudiendo posteriormente necrosarse. En carencias acentuadas, las hojas se arrugan y los tallos detienen su crecimiento apical, adquiriendo aspecto de roseta. Sobre los tubérculos aparece una necrosis de color castaño en el anillo vascular, cerca de su punto de unión con el estolón.

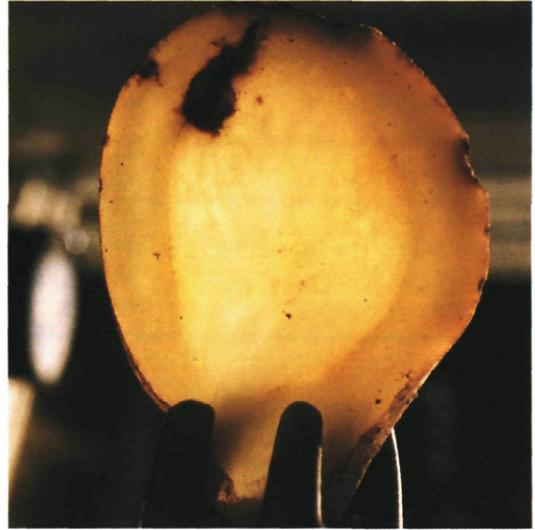


Fig. 9. Transparencia o vidriosidad de los tejidos que rodean al anillo vascular.



Fig. 10. Alteración del anillo vascular no relacionada con *C. sepedonicum*.

e) *Bronceado del extremo del estolón*

Esta anomalía, cuyo origen se desconoce, puede confundirse con un ataque de podredumbre anular al presentar el interior de los tubérculos, especialmente los de menor tamaño, una decoloración parda en el tejido próximo al estolón.

f) *Pudrición apical gelatinosa*

Sobre los tubérculos con pudrición apical gelatinosa no se ha detectado la presencia de patógenos, pero sí la de numerosas bacterias de carácter secundario.

El extremo del tubérculo unido al estolón se vuelve translúcido o vidrioso, poseyendo un contenido anormal de almidón. Posteriormente se encoge y se arruga, llegando a adquirir consistencia húmeda y viscosa (Fig. 6).

Se ha observado que cuando se almacenan a baja temperatura tubérculos inmaduros que han sufrido los efectos de una sequía temprana, esta alteración se presenta con mayor frecuencia. Los tejidos afectados se secan, formando una capa de consistencia coriácea.

g) *Daños producidos por Verticillium*

Las plantas con verticilosis pueden perder su turgencia y marchitarse en cualquier época del período vegetativo, observándose este síntoma generalmente en tallos aislados o en hojas de un solo lado del tallo.

Los tejidos vasculares de las partes afectadas, tanto tubérculos como tallos, muestran decoloración castaño clara. En infecciones agudas, se llegan a formar cavidades en el interior del tubérculo.

h) *Daños producidos por Fusarium*

Diversas especies de *Fusarium* pueden originar síntomas similares a los producidos por *C. sepedonicum*, tales como marchitamiento o clorosis unilateral, clorosis y necrosis de las hojas, verdes y tallos y arrosamientos terminales. En ambos casos, las clorosis se inician en las hojas inferiores progresando hacia la parte superior de la planta. En el caso de *Fusarium* estos síntomas aparecen, en numerosas ocasiones, hacia la mitad del período de

cultivo, pudiendo producirse un marchitamiento repentino de los tallos, como si éstos hubieran sido seccionados.

i) *Daños producidos por Erwinias*

Los síntomas originados por algunas especies fitopatógenas del género *Erwinia*, en su ataque a plantas y tubérculos, presentan cierto grado de similitud con los originados por *C. sepedonicum*. Así, el enrollado de foliolos, la clorosis y el marchitamiento, se observan con frecuencia en plantas con ataques de *Erwinia*, aunque su síntoma más característico sea el ennegrecimiento del pie de las plantas (Pie negro).

Las alteraciones sobre los tubérculos son variables, desde una ligera decoloración vascular en el extremo del estolón hasta la pudrición total del tubérculo.

Cuando las infecciones se inician en el extremo del estolón aparecen áreas circulares humedecidas, de consistencia blanda (Podredumbre blanda) y de coloración crema o canela. Se observa una profunda demarcación entre tejido sano y enfermo.

Los tubérculos, inicialmente inodoros, a medida que la pudrición avanza, desprenden un olor desagradable y adquieren consistencia viscosa debido a la invasión de organismos secundarios.

j) *Daños producidos por Pseudomonas solanacearum*

Pseudomonas solanacearum, agente productor de la Podredumbre parda, origina sobre patata síntomas de gran similitud a los ocasionados por *C. sepedonicum*, por lo que pasamos a describirlos.

El síntoma inicial es un ligero marchitamiento, durante las horas más cálidas del día, de los foliolos situados en los extremos de las ramas, recuperándose posteriormente, pudiendo comenzar afectando a una sola rama en cualquier momento del ciclo vegetativo. Al evolucionar la enfermedad, las hojas marchitas adquieren un color verde claro, tornándose marrones, sin enrollamiento en los bordes. En la zona basal del tallo, puede aparecer un área oscurecida, de 2,5 cm de



Fig. 11. Exudados en el anillo vascular.



Fig. 12. Tubérculo totalmente deteriorado por invasión de organismos secundarios.

larga e incluso mayor. Al cortar se produce la salida de un exudado bacteriano blanco y viscoso por los haces vasculares.

Al seccionar un tubérculo, se observa oscurecimiento y necrosis del anillo vascular. El oscurecimiento normalmente afecta sólo al anillo y a los tejidos más próximos, pudiendo

llegar a abarcar una zona de 0,5 cm a cada lado. Del anillo vascular del tubérculo seccionado, normalmente sin necesidad de presionar sobre él, emana un exudado bacteriano fluido y cremoso. En los casos en que éste no aparece, si se presiona el tubérculo se observa la salida de un exudado fibroso del anillo.

La bacteria: *Corynebacterium sepedonicum*

4.1. NOMENCLATURA

El patógeno causante de la Podredumbre anular de la patata, como ya hemos dicho, fue descrito por primera vez por SPIECKERMANN en 1910.

Desde la primera clasificación hasta el momento actual se han producido diferentes cambios en su denominación:

- *Bacterium sepedonicum* SPIECKERMANN y KOTTHOFF (1914).
- *Aplanobacter sepedonicum* (SPEICK. y KOTTH.) E.F. SMITH (1920).
- *Phytomonas sepedonica* (SPEICK.) MAGROU (1937).
- *Corynebacterium sepedonicum* (SPEICK. y KOTTH.) SKAPTASON y BURKHOLDER (1942).

El confusionismo existente sobre la verdadera posición taxonómica de la familia Corynebacteriaceae hace que en la 8.ª edición del manual BERGEY (1974) se sustituya Corynebacteriaceae por «grupo de bacterias corineformes», existiendo tres secciones:

1. Parásitos y patógenos de hombres y animales.
2. Corynebacterias fitopatógenas.
3. Corynebacterias no patógenas.

En esta clasificación las diferentes especies de Corynebacterias fitopatógenas están divi-

das en 5 grupos, ocupando en solitario *Corynebacterium sepedonicum* el grupo III.

DAVIS, M.J. (1986) efectuó una revisión de las propuestas llevadas a cabo estos últimos años para enclavar las bacterias fitopatógenas corineformes en nuevos géneros.

Si bien se estaba de acuerdo en que no debían pertenecer al género *Corynebacterium*, la problemática de su emplazamiento hizo que algunos científicos (CARLSON, R.R., VIVADER, A.K. 1982; DYE, D.W., KEMP, W.J., 1977) fuesen partidarios de mantener el género hasta que se realizasen más investigaciones, y concretamente, propusieron para *Corynebacterium sepedonicum* la denominación *Corynebacterium michiganense* subsp. *sepedonicum* (SPEICKERMANN y KOTTHOFF) CARLSON y VIVADER, 1982.

Actualmente se dispone ya de mucha más información debida a los estudios quimiota-xonómicos que han permitido establecer relaciones filogenéticas entre los diferentes taxones.

El agente productor de la Podredumbre anular de la patata podría enclavarse en el género *Clavibacter* que englobaría a bacterias fitopatógenas corineformes que poseen, entre otras muchas características, ácidos aminobutíricos en sus paredes (DAVIS, M.J. *et al.*, 1984).

Los estudios (CARLSON y VIVADER, 1982) de los perfiles electroforéticos de las proteínas celulares en geles de poliacrilamida, la producción de bacteriocinas y otros caracteres contribuirían a que dentro del género *Clavibacter*, los diferentes fitopatógenos tuviesen la categoría de subespecies, denominándose el fitopatógeno que nos ocupa *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* (SPIECKERMANN y KOTTHOFF) DAVIS *et. al.* 1984.

A pesar de ello, en la novena edición del Manual Bergey (Volumen II, 1986) si bien se reconoce que no se trata de lo definido como auténticas corinebacterias, se retiene el nombre del género para las siguientes especies: *C. iranicum*, *C. insidiosum*, *C. michiganense*, *C. nebraskense*, *C. rathayi*, *C. sepedonicum* y *C. tritici*.

4.2. MORFOLOGIA Y CARACTERES CULTURALES

Corynebacterium sepedonicum es una bacteria Gram positiva, no móvil, cuyo tamaño

oscila entre 0,4-0,6 μm de ancho y 0,8-1,2 μm de largo. En las preparaciones procedentes de infecciones naturales o de aislamientos de cultivos recientes, se observan los tamaños inferiores de bacterias. En la mayor parte de los medios de cultivo de células de *C. sepedonicum* se presentan como bastones corineiformes pleomórficos, capsulados o no, pudiendo dar una reacción de Gram variable (DE BRUYNE, E. *et al.*, 1986), aparecer aislados, unidos en pares, con forma de encorvamientos típicos de la división celular, o bien, ocasionalmente, en grupos irregulares tomando forma de empalizada o de caracteres chinoscos (Fig. 13).

El crecimiento de la bacteria es lento, tardando en aparecer normalmente entre 5 y 30 días. El subcultivo mejora los porcentajes de crecimiento. Las colonias típicas son de color blanco-crema o marfil, redondeadas, lisas, en forma de cúpula convexa, con bordes nítidos, oscilando su tamaño de 1 a 3 mm. de diámetro.



Fig. 13. Fotografía tomada al microscopio electrónico de *C. sepedonicum*. 50.000 y 64.000 aumentos respectivamente.

A continuación se reflejan las principales características de la bacteria:

<u>Test</u>	<u>C. sepedonicum</u>
Gram	+
Oxidación fermentación (O/F)	inerte o débilmente oxidativa
Oxidasa	—
Catalasa	+
Reducción de nitratos	—
Actividad ureasa	—
Producción de SH ₂	—
Producción de indol	—
Utilización de citrato	—
Hidrolisis del almidón	— o débil
Crecimiento a 37°C	—
Crecimiento en CINA 7%	—
Hidrolisis gelatina	—
Hidrolisis esculina	+
Acido procedente de:	
Glicerol	—
Lactosa	— o débil
Ramnosa	—
Salicina	—

La temperatura óptima de crecimiento está entre 18-21°C, y la máxima alrededor de 30°C.

La bacteria necesita para su crecimiento una fuente de carbono (glucosa o sacarosa), una fuente de nitrógeno en forma de dos aminoácidos (metionina y asparagina), sales (Mn, Fe, Mg) y vitaminas en un medio tamponado (Ph = 6,5 a 7,2). (BORDELEAU y LANCHANCE, 1968; IKIN *et al.*, 1978; LACHANCE *et al.*, 1962; MACLACHLAN y THATCHER, 1951; PAQUIN y PELLETIER, 1966, 1969; PAQUIN y LACHANCE, 1970).

4.3. PRINCIPALES PRUEBAS DE LABORATORIO UTILIZADAS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA BACTERIA

Se recogen a continuación las pruebas de

laboratorio que el Grupo de Expertos en el diagnóstico de *C. sepedonicum* de la CEE, recomienda para el aislamiento e identificación de la bacteria.

4.3.1. Medios para el aislamiento y la multiplicación

AGAR NUTRITIVO (NA)

Agar nutritivo Bacto-Difco que se disuelve en agua destilada en la proporción que indique el fabricante.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

AGAR NUTRITIVO DEXTROSA (NDA) (sólo para subcultivo)

Agar Bacto nutritivo Difco conteniendo el 1% D(+) Glucosa (monohidrato).

Esterilizar en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

AGAR AL EXTRACTO DE LEVADURA. PEPTONA Y GLUCOSA (YPGA)

Extracto de levadura	
Bacto-Difco (n.º 0127)	5,0 g
Bacto Peptona-Difco (n.º 0118)	5,0 g
D(+) Glucosa monohidrato	10,0 g
Agar Purificado Bacto-Difco (n.º 0560)	15,0 g
H ₂ O destilada	1 litro

Esterilizar el medio en volúmenes de 1/2 litro en autoclave a 115°C, durante 20 minutos.

MEDIO DE EXTRACTO DE LEVADURA Y SALES MINERALES (YGM)

Extracto de levadura	
Bacto-Difco	2,0 g
D(+) — Glucosa (monohidrato)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ 7.H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ H ₂ O	0,015 g
Na Cl	0,05 g
Fe SO ₄ 7.H ₂ O	0,005 g

Agar purificado

Bacto-Difco 18,0 g
H₂O destilada 1 litro

Esterilizar el medio en volúmenes de medio litro en autoclave a 115°C durante 20 minutos.

4.3.2. Test nutritivos y fisiológicos

Todos los medios se incubarán a 21°C y se observarán a los 6 días. Si no hay crecimiento, incubar por lo menos 20 días.

TEST DE OXIDACION Y FERMENTACION (Hugh y Leifson, 1953) (O/F TEST)

Medio base:

K Cl 0,2 g
MgSO₄ 7.H₂O 0,2 g
NH₄H₂PO₄ 1,0 g
Bacto Peptona-Difco 1,0 g
Agar purificado
Bacto-Difco 3,0 g
D (+) Glucosa
(monohidrato) 10,0 g
Azul de Bromotinol 0,03 g
H₂O destilada 1 litro

Mezclar y ajustar el pH 7,0-7,2 con KOH 1N.

Distribuir el medio de cultivo en cantidades de 5 ml. y 10 ml. en tubos Pyrex de 16 mm × 100 mm (12 ml de capacidad).

Esterilizar en autoclave a 115°C durante 10 minutos.

Inocular por picadura los tubos de 5 ml y 10 ml con cada cultivo, añadiendo asépticamente 1-2 ml de parafina líquida estéril a los tubos de 10 ml. Incubar.

<u>Tubo</u>	<u>Color</u>	<u>Interpretación</u>
Abierto	amarillo	Fermentativo
Cerrado	amarillo	
Abierto	amarillo	Oxidativo
Cerrado	azul-verdoso	
Abierto	verdoso	Oxidativo o inerte
Cerrado	azul-verdoso	

TEST DE LA OXIDASA (KOVACS, 1956)

Reactivo de la oxidasa de Kovacs:

Solución acuosa al 1% de dihidroclorhídrico tetrametil parafenilendiamino (BDH n.º 30386) en H₂O destilada.

Este reactivo puede prepararse para uso inmediato en volúmenes de 1 ml, o puede guardarse en frascos opacos durante 1-4 semanas a 5 °C.

Colocar una gota de reactivo sobre papel de filtro en una placa Petri limpia. Inmediatamente frotar un poco de cultivo procedente de agar nutritivo usando un asa de platino.

Reacción positiva:

Aparición de color púrpura en 10 segundos. Si el tiempo de aparición es de 10-30 segundos es débilmente positiva.

Nota: Es importante el uso del asa de platino y cultivos en NA, ya que rastros de hierro o el alto contenido de azúcar en el medio de crecimiento, podría originar falsos resultados positivos.

TEST DE LA CATALASA

Poner una gota de peróxido de hidrógeno (30 volúmenes) sobre un porta limpio, y emulsionarlo con un asa de platino llena de cultivo.

Reacción positiva:

La producción de burbujas de oxígeno en la gota indica la presencia de catalasa.

REDUCCION DE NITRATOS Y DESINITRIFICACION (BRADBURY, 1970)

Medio cultivo:

KNO₃ (nitrato libre) 1,0 g
Extracto de levadura
Bacto-Difco 1,0 g
K₂HPO₄ 5,0 g
H₂O destilada 1 litro

Distribuir cantidades de 10 ml en frascos de 20 ml. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Reactivo A:

H₂SO₄ 8,0 g
 Acido acético 5 N 1 litro

Reactivo B:

Naftilamina 5,0 g
 Acido acético 5 N 1 litro

Inocular el medio del nitrato por duplicado. Testar después de 10 a 20 días, añadiendo 1 gota de Lugol, 0,5 ml de reactivo A y 0,5 ml de reactivo B (Estado 1). Si el medio no se pone rojizo añadir 50 mg de polvo de zinc (Estado 2). Observar el color de la reacción.

	Color de la reacción	
	Estado 1	Estado 2
No reducción de nitratos	No cambia el color	Rojo
Reducción de nitrato a nitrito (sólo reducción de nitratos)	Rojo	—
Reducción de nitratos más allá de nitrito (Desnitrificación, nitrato y nitrito reducido)	No cambia el color	No cambia el color

ACTIVIDAD UREASA (LELLIOT, 1966)

Medio base:

Agar base de urea
 Oxoid (CM 53) 2,4 g
 H₂O destilada 95 ml

Esterilizar en autoclave 115 °C durante 20 minutos.

Enfriar el medio base hasta 50 °C y añadir asepticamente 5 ml de una solución acuosa de urea (Oxoid SR 20) al 40% esterilizada por filtración. Mezclar bien.

Distribuir 6 ml en tubos estériles (16 × 100 mm) e inclinar los tubos para que formen estría.

Reacción positiva:

El cambio de color del medio de ama-

rillo-naranja a rojo cereza o magenta-rosa, indica que ha habido producción de ureasa.

PRODUCCION DE SULFHIDRICO (RAMAMURTHI, 1959)

Medio:

Bacto-Tryptona-Difco
 (n° 0123) 10,0 g
 K₂HPO₄ 1,0 g
 Na Cl 5,0 g
 H₂O destilada 1 litro

Disolver y repartir 6 ml en tubos de 16 × 100 mm. Esterilizar en autoclave a 115 °C durante 10 minutos. Inocular y suspender asepticamente papel de acetato de plomo (Merck 9511) desde el borde del tubo. Colocarlos en su sitio con el tapón. Incubar más de 20 días.

Reacción positiva:

La producción de H₂S procedente de la triptona se manifiesta por la aparición de una coloración marrón-negra en el papel de test.

PRODUCCION DEL INDOL (RAMAMURTHI, 1959)

Medio:

El mismo que para la producción de sulfhídrico.

Cambiar el papel de acetato de plomo, agregar 1-2 ml de éter dietílico y agitar suavemente. Esperar la separación de las capas (5 minutos). Añadir cuidadosamente 0,5 ml de reactivo Kovacs (Merck 9293) en el fondo de la superficie del tubo inclinado.

Reacción positiva:

La presencia de indol se manifiesta por la aparición de color rojo en la capa amarilla entre el éter y la fracción acuosa.

UTILIZACION DE CITRATO (Medio de Christensen) (SKERMAN, 1967)

Agar base de citrato
 (Merck 2503) 23,0 g
 H₂O destilada 1 litro

Mezclar y disolver calentando. Distribuir en volúmenes de 6 ml como para el medio de urea. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Inclinarse los tubos para formar estría.

Reacción positiva:

Un cambio de color del medio de naranja a rojo, indica la utilización del citrato.

HIDROLISIS DEL ALMIDON

Medio:

Agar Bacto nutritivo-Difco
(fundido) 1 litro
Bacto-almidón soluble-Difco
n.º 0178 2,0 g

Mezclar, esterilizar en autoclave a 115 °C durante 10 minutos. Verter en placas. Inocular puntualmente.

Después de que haya habido un buen crecimiento (10-20 días) separar parte del crecimiento y cubrir con Lugol.

Reacción positiva:

La hidrólisis del almidón se realiza cuando aparecen zonas claras debajo o alrededor del crecimiento bacteriano. El resto del medio se tiñe de color púrpura.

CRECIMIENTO A 37 °C (RAMAMURTHI, 1959)

Medio:

Caldo Bacto nutritivo-Difco
(n.º 0003) 8,0 g
H₂O destilada 1 litro

Mezclar, disolver y distribuir 6 ml por tubo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Inocular e incubar a 37 °C.

Reacción positiva:

Se produce crecimiento.

CRECIMIENTO EN CLORURO DE SODIO AL 7% (RAMAMURTHI, 1959)

Medio:

Caldo Bacto nutritivo-Difco 8,0 g

Na Cl 70 g
H₂O destilada 1 litro

Mezclar, disolver y distribuir 6 ml por tubo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Reacción positiva:

Se produce crecimiento.

HIDROLISIS DE LA GELATINA (LELLIOT, BILLING y HAYWARD, 1966).

Medio:

Bacto gelatina-Difco (n.º 0143) 120,0 g
H₂O destilada 1 litro

Mezclar y disolver por calentamiento. Distribuir 6 ml por tubo. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Reacción positiva:

Licuación de la gelatina aun estando a 5 °C durante 30 minutos.

HIDROLISIS DE LA ESCULINA (SNEATH y COLLINS, 1974)

Medio:

Bacto Peptona-Difco 10,0 g
Esculina 1,0 g
Citrato férrico (Merck 3862) ... 0,05 g
Citrato sódico 1,0 g
H₂O destilada 1 litro

Mezclar hasta disolución y distribuir 6 ml en cada tubo. Esterilizar en autoclave a 115 °C durante 10 minutos. El medio es claro pero tiene fluorescencia azulada.

Reacción positiva:

La hidrólisis de la esculina se manifiesta por el desarrollo de color marrón junto con la desaparición de la fluorescencia. Esto se puede ver usando una lámpara de luz ultravioleta.

PRODUCCION DE ACIDO A PARTIR DE GLICEROL, LACTOSA, RAMNOSA Y SALICINA

Preparar el medio de Hugh-Leifson O/F sin glucosa.

Distribuir en tubos con 5 ml. Esterilizar en autoclave a 115 °C durante 10 minutos. Dejar enfriar hasta 45 °C, añadir asépticamente 0,5 ml de una solución acuosa al 10%, esterilizada por filtración, de glicerol, lactosa, ramnosa o salicina. Mezclar cuidadosamente.

Reacción positiva:

El cambio de color de azul-verdoso a amarillo, indica producción de ácido.

4.3.3. Tinción de Gram (modificación de HUCKER, DOETSCH, 1981)

SOLUCION DE VIOLETA CRISTAL

Disolver 2 g de violeta cristal en 20 ml de etanol del 95%.

Disolver 0,8 g de oxalato amónico en 80 ml de H₂O destilada.

Mezclar las dos soluciones.

SOLUCION DE LUGOL

Iodo	1 g
Ioduro potásico	2 g
H ₂ O destilada	300 ml

Triturar en un mortero el Iodo y el Ioduro potásico. Añadir el agua y agitar en un recipiente cerrado hasta la disolución.

SOLUCION DE SAFRANINA PARA CONTRASTE

Solución concentrada:

Safranina O	2,5 g
Etanol al 95%	100 ml

Mezclar y guardar:

Diluir a 1/10 la solución obtenida para trabajar.

PROCESO DE TINCION

1. Preparar en los portas las extensiones, secar al aire y fijar con calor.

2. Cubrir el porta con solución de violeta cristal durante 1 minuto.

3. Lavar brevemente con agua.

4. Cubrir con la solución de lugol durante 1 minuto.

5. Lavar con agua y escurrir.

6. Decolorar con etanol del 95% hasta que no se produzca color, o sumergir agitando suavemente durante 30 segundos.

7. Lavar con H₂O y secar.

8. Cubrir con solución de safranina durante 10 segundos.

9. Lavar con H₂O y secar.

En observación microscópica, la bacteria Gram-positiva aparece azul-violeta, mientras que la Gram-negativa se tiñe de rosa-rojo.

Epidemiología

5.1. FORMAS DE ACTUACION DEL PATOGENO SOBRE LA PLANTA

C. sepedonicum produce sobre las plantas una traqueobacteriosis. Las alteraciones histológicas que se originan como consecuencia del ataque de la bacteria, dependen del estado vegetativo de la planta y del de la población bacteriana.

En los casos de infecciones precoces, la bacteria, que avanza a través del xilema primario, puede salir fácilmente de unos vasos para penetrar en otros adyacentes o bien en el parénquima peribasal, en cuyas laminillas medias se multiplica, volviendo a penetrar en nuevos vasos. En los parénquimas del floema y del xilema, la multiplicación del patógeno es más rápida en las zonas próximas a los lugares de transpiración intercelular activa. Al infectarse el parénquima leñoso primario las bacterias se dividen rápidamente entre las paredes celulares, de consistencia blanda, destruyendo las laminillas medias. Como consecuencia, algunas células que quedan aisladas del parénquima así como diversos elementos del floema, se plasmolizan, dando origen a la formación de cavidades que pueden llegar a interrumpir, por lo menos parcialmente, el flujo de savia elaborada, lo cual origina la aparición en la planta de síntomas de la enfermedad (WALKER, 1965).

En los casos de infección tardía, cuando la planta se encuentra en un estado más

avanzado de desarrollo, la savia bruta no circula por el sistema leñoso primario, sino a través de los vasos secundarios ya lignificados, por lo que la bacteria, al invadir el parénquima leñoso secundario, encuentra paredes celulares mucho más duras, resultándole difícil su destrucción. De ahí la ausencia de cavidades y por consiguiente la ralentización de la difusión del parásito y de la progresión de la infección. Por tanto, el avance de la bacteria a lo largo de los tallos se realiza preferentemente a través de las zonas más jóvenes, en las que permanece aún activo el xilema primario. (WALKER, 1965).

Sin embargo, en las raíces, el avance de la bacteria a través del xilema secundario es más rápido que en los tallos, debido a la posibilidad que las bacterias encuentren zonas más favorables para su rápida multiplicación en los puntos próximos a los lugares de emisión de raíces y raicillas laterales.

La presencia de bacterias en división activa, en cualquier punto de la planta, sirve como fuente de inóculo, ya que mediante la invasión de vasos secundarios permite su avance en sentido descendente, alcanzando las raicillas jóvenes, cuya destrucción origina clorosis y marchitamientos de la planta.

En los casos de plantas infectadas, la vía de penetración en el tubérculo es el estolón,

estando localizadas las bacterias en las proximidades del ombligo. La emigración hacia el ápice del tubérculo se efectúa a través del anillo vascular.

Así pues, la localización de las bacterias en el tubérculo puede ser aleatoria: es posible que su presencia sea detectada en el estolón, en el ápice o en cualquier punto del anillo vascular.

5.2. TRANSMISION DEL AGENTE PATOGENO

La siembra de patata contaminada constituye el origen de la introducción de la enfermedad en una zona sana. Esto es debido a que en un tubérculo infectado, las bacterias se multiplican rápidamente y durante el período vegetativo pasan al tallo a través del estolón. A partir de esta planta enferma se produce la diseminación del patógeno por diferentes vías.

La bacteria puede subsistir en tierra procedente de cultivos infectados desprendida por los tubérculos en cosechadoras, aperos de labranza, maquinaria de almacén, sacos, etc. (O'BRIEN y RICH, 1976; RICH, 1968). Asimismo, se ha detectado la supervivencia de la bacteria en sacos de arpillera, de papel Kraft y de polietileno, en la superficie de maquinaria, contenedores y equipo, que han estado en contacto con material contaminado, (NELSON, 1979, 1980).

Existe también algún peligro de diseminación de la enfermedad mediante el agua de riego a pie, (RICH, 1983).

Los propios tubérculos y restos de plantas infectadas abandonadas en el campo, constituyen reservorios naturales del patógeno, persistiendo su infectividad por lo menos durante 11 meses (NELSON, 1979).

Algunos estudios demuestran que la enfermedad no se transmite directamente de planta a planta (DOUNINE, 1960; FRAZZOLI *et al.*, 1984). Sin embargo, se ha demostrado que diversos insectos chupadores y en particular el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) pueden diseminar el patógeno durante el período de cultivo a

otras plantas (DUNCAN *et al.*, 1958 y 1960; LIST y KREUTZER, 1942), aunque no se ha podido aportar ninguna prueba relativa a la contaminación de los tubérculos procedentes de estas plantas. Además de la vía anterior, los daños mecánicos ocasionados durante el período de cultivo, la recolección y el almacenamiento, constituyen puntos de entrada del patógeno. De igual modo, existe la posibilidad de contaminación a través del contacto entre sí de las raíces (RICH, 1983).

Ahora bien, los tubérculos contaminados son los principales medios de propagación de la enfermedad de un año a otro. La práctica del troceado de tubérculos sin desinfección de los utensilios de corte, constituye un método muy eficaz de diseminación de la enfermedad. Una hoja de cuchillo que haya cortado un solo tubérculo enfermo, puede transmitir la infección a más de 100 tubérculos sanos. (LANSADE, 1950).

Hay razones suficientemente fundadas para pensar que existen fuentes de inóculo desconocidas hasta el momento, a partir de las cuales se producen contaminaciones. Así, en el suelo, tal vez la no detección de la bacteria sea debida en muchas ocasiones a la falta de métodos de diagnóstico lo suficientemente sensibles para ello. Asimismo, existe idéntica posibilidad de que ciertas plantas silvestres puedan albergar al patógeno.

No se excluye que la diseminación entre campos de cultivo de patata pueda llevarse a cabo mediante insectos, aves o mamíferos. (DE BOER y SLACK, 1984).

En la figura 14 se recogen las vías más importantes de diseminación del patógeno, siguiendo el esquema básico de MAZZUCHI (1983).

5.3. INFLUENCIA AMBIENTAL EN EL DESARROLLO DEL PATOGENO

Las condiciones más favorables para la diseminación del agente patógeno, se dan en general en primavera, debido a que las temperaturas suaves favorecen la actividad bacteriana en los tubérculos infectados.

La enfermedad alcanza su mayor índice de desarrollo cuando la temperatura del suelo se encuentra entre 18 y 22°C. Temperaturas superiores retardan la expresión de los síntomas.

En general, el clima templado y seco facilita el desarrollo de la enfermedad, mostrando las plantas infectadas los síntomas típicos.

En primaveras y veranos frescos los síntomas apicales pasan inadvertidos hasta la recolección. En el caso de primaveras frescas y veranos calurosos, suele aparecer una clorosis del limbo de los folíolos, llegando hacia el final del verano a observarse una necrosis en sus bordes, seguida por la deten-

ción del crecimiento e incluso la muerte del tallo.

5.4. HOSPEDANTES

La bacteria sólo afecta de forma natural a la patata (*Solanum tuberosum L.*).

Experimentalmente se han provocado síntomas en 28 especies de *Solanum*, entre las que cabe destacar la berenjena (*Solanum melongena L.*) utilizada como planta test diferencial, y 2 especies de *Lycopersicon*.

La transmisión de la enfermedad por semilla, sólo se ha logrado experimentalmente en tomate (*Lycopersicon esculentum L.*).

Métodos para el diagnóstico de la enfermedad

Las graves consecuencias económicas que origina en cualquier país la aparición de la Podredumbre anular de la patata, hacen necesario disponer de métodos de diagnóstico seguros y específicos que permitan detectar la presencia del patógeno, incluso cuando éste se encuentre en muy pequeña proporción.

A continuación se describen algunos de los más utilizados para la detección de *C. sepedonicum* en las plantas y tubérculos de patatas.

6.1. EXAMEN VISUAL DE SINTOMAS

Una parte de los programas de certificación de semillas está basada en la diagnosis visual de síntomas en plantas y tubérculos. Para llevar a cabo ésta, debe tenerse en cuenta que la manifestación de los síntomas de una enfermedad está influenciada, como hemos visto, por factores climáticos, culturales y/o biológicos.

En la Podredumbre anular los síntomas foliares iniciales son reversibles y pasan fácilmente desapercibidos, mientras que aquellos que permiten realmente la identificación o, por lo menos, la sospecha razonable de existencia de la bacteria, no aparecen hasta que la enfermedad se encuentra en un estado muy avanzado.

El método de inspección visual más utilizado consiste en seccionar los tallos por la parte inferior de su base, para observar la posible existencia de síntomas característicos de la enfermedad, limpiándolos de tierra y efectuando un segundo corte tan cerca de la base como sea posible. Si al presionar a la altura del corte con ayuda de pinzas, aparece un líquido espeso de color lechoso, podría tratarse de plantas afectadas de Podredumbre anular. Si este líquido es espumoso pero formado por aglomeraciones, la planta no está atacada por *C. sepedonicum*. Este método ha sido utilizado con éxito en la realización de controles de campo (BLAGADAROV V. A., 1952).

El examen de los tubérculos, mediante el corte de las patatas y observación de la sintomatología, sobre todo en el punto de unión del estolón, es un método complementario del anterior y normalmente más efectivo.

La no presencia de síntomas en el campo no implica que la enfermedad esté ausente y la inspección visual de los tubérculos no es válida cuando estos están muy podridos o la enfermedad se encuentra en estado latente.

6.2. EXAMEN CON LUZ ULTRAVIOLETA

La presencia de la bacteria en los tubércu-

los puede hacerse más precisa examinando los cortes de patata con luz ultravioleta (IVERSON y KELLY, 1940; IVERSON y HARRINGTON, 1942). En los tubérculos infectados, el anillo vascular aparece fluorescente. Este hecho parece deberse a una concentración local de riboflavina, aunque no tiene porqué ser debida a la acción de la bacteria.

6.3. AISLAMIENTO DIRECTO DEL PATOGENO

Como la bacteria se encuentra en el sistema vascular de la planta, es en este tejido donde debe investigarse su presencia.

Su aislamiento puede hacerse del tallo o de los tubérculos, siendo importante que las zonas elegidas para el análisis muestren síntomas iniciales de ataque.

Cuando el aislamiento se hace a partir del tallo, éste se trocea y se corta longitudinalmente, separándose porciones de haces vasculares lo más asépticamente posible. En los

aislamientos a partir de tubérculos es conveniente desinfectarlos previamente con hipoclorito y a continuación con alcohol antes de cortarlos longitudinalmente. Con ayuda de instrumental esterilizado, se extrae un fragmento del anillo vascular donde los vasos presenten coloración. En los casos de posible infección latente se extrae la parte del anillo próxima al talón. Estos fragmentos se colocan en una placa Petri estéril, troceándolos con un escalpelo y dejándolos en maceración en 1 ml de agua estéril durante 30 minutos. Una gota del extracto se extiende sobre un medio de cultivo apropiado (Capítulo 4) y se incuba a 21-25 °C. Las placas se observan durante tres semanas, o si es necesario durante un período más largo.

Normalmente, el tiempo de aparición de la bacteria es de 5 a 10 días. No obstante, puede tardar más o, por el contrario al tercer día es posible empezar a observar una especie de película traslúcida sobre las placas (Fig. 15).



Fig. 15. Aspecto de *C. sepedonicum* en medio de cultivo. (Foto Chauveau-Francia.)

Una vez aislada la bacteria se procede a su identificación (Capítulo 4). Como criterios orientativos para diferenciarla de otras bacterias patógenas de patata (*Pseudomonas* y *Erwinias*), pueden considerarse los siguientes:

- Células en forma de bastón ovoides.
- Gram positivo.
- No móviles.
- Inerte o débilmente oxidativa sobre medio Hugh y Leifson con glucosa.
- Hipersensibilidad positiva sobre tabaco.

Esta técnica de aislamiento directo del patógeno sobre medios de cultivo presenta numerosos inconvenientes:

a) Al ser *C. sepedonicum* una bacteria de crecimiento muy lento, es necesario mucho tiempo para su cultivo.

b) La presencia en las plantas o tubérculos de otros microorganismos de crecimiento más rápido, puede enmascarar la detección de *C. sepedonicum*.

c) SAMSON y POUTIER (1979), demostraron que es necesario alcanzar una determinada concentración de células para que se produzca crecimiento en las placas de cultivo. Ello indica que, aún existiendo, puede no detectarse el patógeno, especialmente en el caso de infecciones latentes, razón por la cual la técnica es poco sensible. Se estima que son precisas concentraciones mayores de 10^6 bacterias por mililitro para que se produzca su crecimiento en las placas.

6.4. TINCION DE GRAM

La reacción de Gram es un reflejo de las propiedades fundamentales de la pared. Las células bacterianas están rodeadas por una pared rígida, cuya estructura y espesor varía según las especies. La rigidez se debe principalmente a la presencia de una sustancia denominada mureína. Además de ella, la pared contiene otros compuestos químicos, variables según las especies. En las Gram (+) se encuentran, por ejemplo, ácidos teicoicos, polipéptidos, polisacáridos, etc., que contribuyen a mantener una estructura rígida y quebradiza. En las Gram (—) aparecen polipéptidos, lipopolisacáridos, lipo-

proteínas, etc. La presencia de estos compuestos lipídicos hace que la pared de las bacterias Gram (—) sea blanda y se decolore rápidamente por la acción de disolventes orgánicos.

Durante muchos años, el examen visual de síntomas y la coloración Gram han sido los métodos empleados para la diagnosis de la enfermedad. Es la técnica aconsejada en Estados Unidos y Canadá, basándose en que, de todas las bacterias fitopatógenas conocidas hasta ahora que atacan a la patata, *C. sepedonicum* es la única cuyo Gram es positivo.

La ejecución de la técnica (Capítulo 4) no requiere el aislamiento previo de la bacteria.

El método de Gram es muy rápido y sensible, teniendo un umbral de detección de $10^2 - 10^4$ bacterias/ml.

6.5. TEST DE BERENJENAS

Las berenjenas son unas plantas excelentes como medio de multiplicación selectivo para la bacteria (Fig. 16).



Fig. 16. Cultivo de berenjenas para su inoculación.

El test constituye una prueba de patogenicidad, basada en la posibilidad de reproducir síntomas de la enfermedad al inocular mecánicamente *C. sepedonicum* bajo determinadas condiciones (LARSON R. H., 1944; WARREN H. L. y HOOKER W. J., 1962).

La inoculación de berenjenas se viene en-

sayando en Suecia desde 1968 (OLSON, 1976), como apoyo al diagnóstico visual, tanto para tubérculos excesivamente podridos como sospechosos de infección en estado latente. Al observar la aparición de síntomas, el diagnóstico se confirma mediante la tinción de Gram con savia procedente de peciolos de hojas con síntomas.

LELLIOT y SELLAR (1976), diseñaron un método, aplicable a análisis masales, que permite la detección y el aislamiento del patógeno, aún cuando éste se encuentre en niveles muy bajos, mediante la inoculación de extractos bacterianos procedentes de la zona vascular de tubérculos de patata.

Para la realización del test suele utilizarse la variedad de berenjenas «Black Beauty». Los semilleros se preparan con tierra esterilizada y se realiza el trasplante a tiestos también esterilizados cuando los cotiledones están bien desarrollados (10-14 días).

Las condiciones ambientales del cultivo en invernadero son: un fotoperíodo de 14 horas o más, una temperatura durante el día entre 21-24 °C y por la noche de 15 °C. Si la temperatura nocturna no baja a 15 °C, se pueden producir en las hojas necrosis plateadas, debido a daños en los cromóforos, especialmente cuando las plantas se exponen a longitudes de día largas e intensidades lumínicas altas.

Cuando las plantas se encuentran en estado de tres hojas, con dos de ellas, pero no las tres, completamente extendidas, se procede a la inoculación con los extractos bacterianos cuya obtención puede realizarse de la siguiente forma:

— Hacer lotes de 200 tubérculos, y proceder a su lavado con agua, para eliminar las partículas adheridas a su superficie. Como medida de mayor seguridad pueden desinfectarse previamente sumergiéndolos unos minutos en agua con lejía del 1 al 5%. Las operaciones de desinfección se efectúan para que los extractos puedan utilizarse simultáneamente en la realización de otros test.

— Separar la epidermis alrededor del ombligo en un área de 2 a 3 cm, utilizando

un escalpelo o un pelador de patatas desinfectado. La desinfección puede realizarse introduciendo el instrumento de pelar en etanol del 70% y pasándolo a la llama.

— Extraer pequeños conos (1,0-1,5 cm de diámetro × 0,7-1,0 cm de profundidad) del tejido que rodea al ombligo, procurando que contengan la menor cantidad posible de tejido no vascular.

— Homogeneizar los conos hasta su total maceración en un disolvente que no sea tóxico para *C. sepe-donicum*. En la homogeneización conviene añadir un defloculante y un antiespumante.

La fórmula del tampón de maceración recomendada por LELLIOT y SELLAR (1976) es:

DC silicona antifoam MSA	10 ml
Lubrol WX	0,5 g
Pirofosfato tetrasódico	1,0 g
Tampón fosfato 0,05 M pH 7,0	
(PO ₄ HNa ₂ · 12H ₂ O, 4,26 g;	
PO ₄ H ₂ K, 2,72 g; ClNa 8,0 g,	
H ₂ O destilada c.s.p. 1 l.)	1 litro

En este proceso deben evitarse excesivas maceraciones e impedir que la temperatura sobrepase los 30 °C.

— Dejar reposar el macerado 30 minutos para que sedimenten los restos de tejidos.

— Decantar el sobrenadante, procurando no arrastrar sedimento alguno.

— Filtrar mediante embudo de filtración de vidrio sintético. (n.º 2 = 40 — 100 µm), provisto de papel (Whatman n.º 1) usando una bomba de vacío.

— Recoger el filtrado en un tubo de centrifuga.

— Centrifugar a no menos de 4.000 g durante 20 minutos.

— Disolver el precipitado en tampón fosfato 0,01 M pH 7,2 (PO₄HNa₂ · 12H₂O, 2,7 g; PO₄H₂Na · 2H₂O, 0,4 g; ClNa 8,0 g; H₂O destilada c.s.p. 1 l.) hasta un volumen total de 1 ml.

La cuarta parte del precipitado obtenido es suficiente para la inoculación de las plantas de berenjena. Se debe utilizar por

cada muestra ensayada, por lo menos 25 plantas en estado de tres hojas.

Uno de los métodos de inoculación que puede seguirse consiste en:

- Colocar el tiesto horizontalmente sobre un soporte adecuado, por ejemplo de poliestireno expandido (Fig. 17).

- Introducir una hoja de papel de aluminio esterilizada entre el soporte y el tallo, reemplazándola tras inoculación de cada muestra, para evitar contaminaciones.

- Sujetar la planta al soporte.

- Entre los cotiledones y el primer par de hojas, hacer una hendidura de 0,5-1 cm, longitudinal o ligeramente diagonal, cuya profundidad sea aproximadamente tres cuartas partes del diámetro del tallo.

- Mantener abierta la herida y depositar en ella inóculo.

- Sellar el corte con vaselina estéril.

- Incubar las plantas en las condiciones indicadas, durante 40 días. Empezar a observar los síntomas a partir del octavo día.

- Proceder al aislamiento e identificación del patógeno.

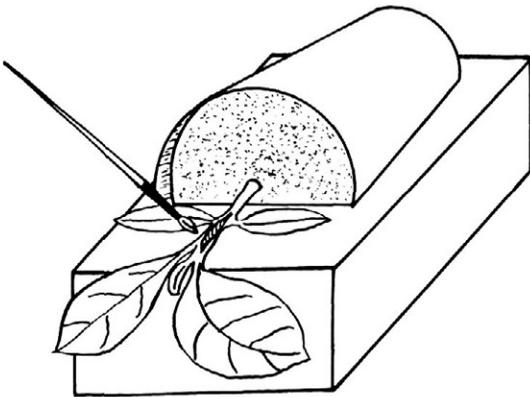


Fig. 17. Planta de berenjena preparada para inoculación (Lelliott y Sellar, 1976).

Sobre las plantas inoculadas (Figs. 18 y 19) *C. sepedonicum* produce marchitamiento de hojas, pudiendo comenzar como una flaccidez marginal o entre nerviaciones. Inicial-

mente el tejido marchito puede tomar una coloración verde oscura o en forma de moteado, tornándose más pálido, y comenzando a necrosarse. La marchitez del tejido entre nerviaciones presenta a menudo un aspecto grasiento. Los bordes de los tejidos necróticos adquieren una tonalidad amarillo brillante. Las plantas no mueren necesariamente; cuanto más tiempo transcurra antes que aparezcan los síntomas, mayores son las probabilidades de supervivencia. Las plantas pueden sobrevivir a la infección. Ante una pequeña concentración de *C. sepedonicum* son mucho más susceptibles a la infección las plantas jóvenes que las más viejas, de ahí la necesidad de utilizar plantas con no más de tres hojas.

Hay que tener en cuenta que el marchitamiento puede ser inducido asimismo por



Fig. 18. Síntomas de clorosis y necrosis apical.

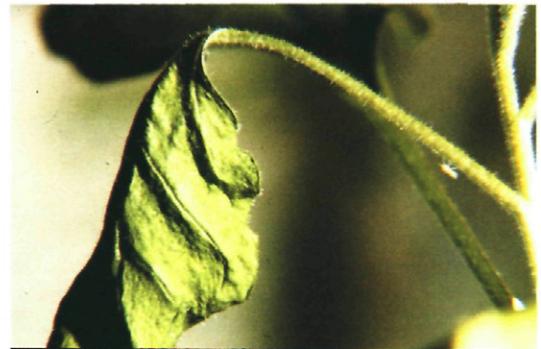


Fig. 19. Síntomas de marchitamiento y flaccidez marginal.

poblaciones de otras bacterias u hongos presentes en el precipitado del tejido del tubérculo. En ellas están comprendidas *Erwinia carotovora*, subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, así como gran variedad de bacterias saprofitas. Estas marchiteztes pueden distinguirse de las causadas por *C. sepedonicum*, en que en ellas la totalidad de las hojas o de las plantas se marchitan rápidamente.

En circunstancias excepcionales, puede suceder que *C. sepedonicum* exista como una infección latente en las berenjenas, incluso después del período de incubación de 40 días. A veces, este tipo de infecciones, puede producir achaparramiento o falta de vigor en dichas plantas.

6.6. TEST DE AGLUTINACION

El fenómeno de la aglutinación consiste en que al poner un antígeno en presencia de sus anticuerpos específicos se produce la formación de un agregado, que a lo largo del proceso va haciéndose más voluminoso y se observa más claramente al flocular en la suspensión que lo contiene.

En las soluciones acuosas, las bacterias se mantienen dispersas gracias a los grupos hidrófilos que poseen en su pared. La aglutinación se va a producir por medio de los anticuerpos específicos y sus determinantes antigénicos.

Al agregar un antisuero, los determinantes antigénicos de la pared bacteriana se bloquean por la fijación de los anticuerpos. Como éstos tienen dos sitios de combinación, pueden reaccionar con dos unidades bacterianas diferentes formando redes tridimensionales que dan lugar a agregados, los cuales, reuniéndose por aproximación entre sí, forman aglutinados más o menos voluminosos (Fig. 20). Su tamaño y velocidad de formación están en función de la concentración sérica, del pH, de la temperatura, de la agitación y de la relación entre las cantidades de antígenos y anticuerpos puestos en contacto.

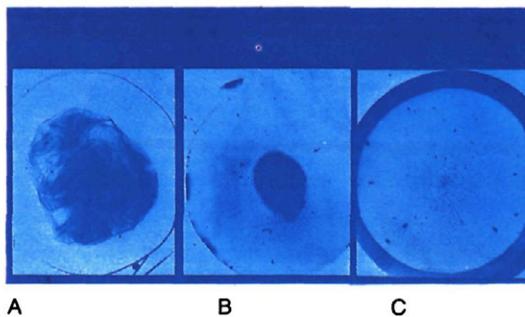


Fig. 20. Reacciones de aglutinación positivas: (A) floculación y (B) aglutinación. Reacción negativa: (C) granulado. (Foto Noordam.)

Este test, por su sencillez, se utiliza frecuentemente para la diagnosis y detección rápida de muchas bacterias fitopatógenas, habiendo sido puesto a punto por Tipograf (1941) en la URSS para el diagnóstico directo de *Corynebacterium sepedonicum* sobre plantas (Fig. 21).

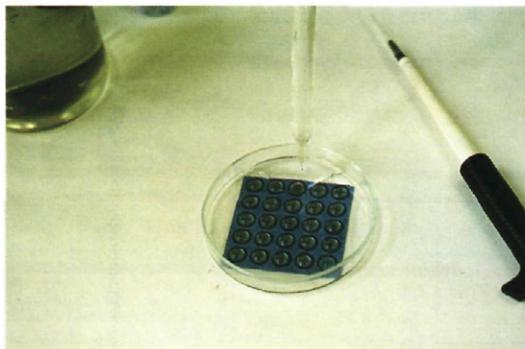


Fig. 21. Disposición del test de aglutinación en placa Petri.

Su realización es como sigue:

- Cortar un fragmento de 2-3 cm de longitud del pie de la planta.
- Lavar y secar con papel de filtro.
- Triturar en mortero.
- Depositar el triturado en una gasa y comprimir para extraer de 3 a 5 gotas de savia que se colocan sobre un portaobjetos.
- Depositar en otro portaobjetos una

gota de agua fisiológica (0,85% de ClNa) y otra de antisuero específico de *C. sepedonicum* separada de la anterior.

— Con pipeta, se toma la savia del primer porta y se deja caer una gota sobre cada una de las contenidas en el segundo porta.

— Mezclar cuidadosamente cada una de ellas por separado.

— Cada mezcla se extiende ligeramente hasta formar un círculo de 2 cm de diámetro aproximadamente.

Si la savia contiene *C. sepedonicum*, en un tiempo de 1 minuto o menos se observará a simple vista la reacción de aglutinación, acentuándose al agitar circularmente el portaobjetos. La otra gota, mezcla del agua fisiológica y savia, deberá permanecer turbia sin aglutinar.

La aglutinación puede observarse más claramente con ayuda de una lupa a pocos aumentos.

El método puede aplicarse también a la detección de *C. sepedonicum* sobre tubérculos extrayendo la savia del anillo vascular (KATZNELSON y SUTTON, 1956).

Este método ha sido muy utilizado para la diagnosis del patógeno en patata de siembra, ya que el *Corynebacterium sepedonicum* conserva su capacidad de aglutinación durante mucho tiempo, incluso mucho después de haber dejado de ser viable. Este hecho permite analizar la patata de siembra en el momento de reproducción de los clones. Al efectuarse la recolección de la patata de siembra se toma a la vez un trozo de la base del tallo, realizándose posteriormente el test sobre éste.

CLAFLIN y SHEPARD (1977) utilizan el método para detectar el patógeno en tubérculos y tallos, realizando el test de la siguiente forma:

— Tomar una pequeña cantidad de tejido del anillo vascular del tubérculo (5 mm³ aproximadamente) o un trozo de 1 cm de la base del tallo, colocarlo en un tubo de ensayo conteniendo 2 ml de agua fisiológica estéril y triturarlo con una varilla de vidrio.

— En las muestras procedentes de tubér-

culos se deja reposar hasta decantación de las partículas gruesas. Los tejidos procedentes de tallos se centrifugan a 1.000 g durante 1 minuto.

— Extraer con una pipeta estéril 0,2 ml del sobrenadante, depositándolo sobre un pocillo.

— Añadir una gota de antisuero (aprox. 0,04 ml) y agitar la mezcla con una varilla de vidrio.

— Tras 30 minutos a temperatura ambiente observar el grado de aglutinación.

6.7. TEST DE PRECIPITACION DE LA TOXINA

Las células procarióticas y eucarióticas, además de su actividad antigénica, poseen capacidad inductora de toxinas.

Bajo la denominación de reacciones de seroneutralización se agrupa el conjunto de reacciones antígeno-anticuerpo en las que la actividad inmunológica viene dada por el grado de neutralización de alguna de las propiedades biológicas del antígeno. Este grupo de reacciones se clasifica según el tipo de propiedad biológica que se neutralice, asimilándose el término seroneutralización al de precipitación.

Este test fue propuesto por STROBEL y RAI (1968) como método serológico rápido para la detección de la Podredumbre anular de la patata. Está basado en la detección de una toxina producida por *C. sepedonicum*.

Para ello se prepara un antisuero, inyectando en un conejo una toxina producida por *Corynebacterium michiganense* (E.F. SMITH JENSEN).

La extracción de la toxina producida por *C. sepedonicum* se efectúa según el siguiente método.

— Tomar 10 g de tejido fresco del anillo vascular de un tubérculo, o un trozo de tallo.

— Triturar en un mortero con 5 ml de agua estéril.

— Decantar el triturado a través de una

columna de filtración de 1×10 cm, conteniendo:

- 1 cm de lana de vidrio
 - 1 cm de arena lavada
 - 1 cm de Dowex 50 (200-400 mesh-X8, h+form).
- Al líquido efluyente de la columna, añadirle 4 volúmenes de acetona fría.
- Centrifugar a baja velocidad.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 0,5 ml de agua destilada.
- Centrifugar de nuevo a baja velocidad la suspensión anterior, estando en el sobrenadante la solución tóxica.

El test serológico se efectúa de la manera siguiente:

- Depositar 0,1 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo pequeño (de unos 6×50 mm) bien limpio.
- Añadir 0,01 ml de anti suero no diluido.
- Si en unos 30 segundos aparece un enturbiamiento en la solución, la reacción se considera positiva. En caso contrario se considerará negativa.

6.8. TEST DE DOBLE DIFUSION EN AGAR

Es un método de precipitación, en que el antígeno y anticuerpo se emplazan en pocillos, sobre un medio gelosado. Al difundirse a través de los poros del gel y entrar en contacto entre sí, dan lugar a una precipitación, en forma de bandas.

La cantidad de cualquiera de los reactivos en un punto dado del precipitado, es función de dos factores principales:

- a) Su concentración inicial. Una vez emplazado el reactivo en el pocillo correspondiente, comienza su difusión en el gel en sentido radial, formándose a partir del centro un gradiente continuo pero de concentración decreciente.
- b) La velocidad de difusión en el medio. El más utilizado es el gel de agar, siendo

éste un polisacárido extraído de algas marinas. Es soluble en agua a 95°C y forma un gel cuando se enfría a 37°C . Al gelificar, las moléculas forman poros cuyo tamaño varía inversamente a la concentración de agar.

Una vez que los reactivos se difunden en el medio gelosado, se produce la reacción serológica de precipitación en aquellos puntos en que las concentraciones de antígeno y anticuerpo están en equilibrio.

La banda de precipitación será tanto más marcada cuanto mayor sea la cantidad de antígeno y anticuerpo reaccionantes, siendo más nítida y precisa, sin alargarse exageradamente, cuando los reactivos estén en equilibrio.

En la Fig. 22 se exponen de manera simplificada los casos más típicos de las reacciones serológicas que pueden presentarse.

El test de doble difusión de agar fue descrito inicialmente por OUTCHERLONY (1949) y aplicado a la detección de *C. sepedonicum* por LAZAR (1968). La sencillez del método, al no requerir manipulaciones ni aparatos complicados, ha hecho que sea propuesto (DE BOER, S. H., 1983) como un test adicional para confirmar la diagnosis de la podredumbre anular, cuando la presencia de un gran número de organismos secundarios dificulte la interpretación de otros test serológicos.

Para su realización pueden utilizarse, por ejemplo, cajas de Petri de 100×15 mm, o portaobjetos. En este último caso se necesita disponer de un Kit de bastidores para inmunodifusión. Las cajas o los portaobjetos se cubren con una solución de agar (agar purificado 0,8%, ClNa 0,85% y azida de sodio 200 ppm). Si se emplean cajas suelen rellenarse con 15 ml de la solución de agar, y una vez que el medio se ha enfriado a temperatura ambiente, se conservan a 4°C hasta su utilización. En caso de utilizar un Kit comercial (Fig. 23), se seguirán las instrucciones de manejo que lo acompañan. Antes de realizar el test es preciso emplazar los pocillos en los geles. El agujereado de los geles se puede efectuar con plantillas y su extracción con una aguja hueca conectada a una bomba de vacío. El número de

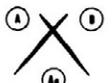
	<p>I.—El antígeno y anticuerpo tienen la misma velocidad de difusión y probablemente un peso molecular similar, formando bandas de precipitación rectas. Si hay equivalencia, la banda estará en medio, sino se desplazará hacia el de menor concentración.</p>		<p>VI.—REACCIÓN DE IDENTIDAD. Cuando dos antígenos, (A y B) serológicamente diferentes, se comparan frente a un antisuero (As) que contiene motivos antigénicos de alguno de ellos, cada sistema AG-AC precipita independientemente del otro, resultando bandas de precipitación cruzadas o intersección.</p>
	<p>II.—Banda de precipitación formada por un antígeno con mayor coeficiente de difusión (menor peso molecular) que el anticuerpo, pero en equivalencia.</p>		<p>VII.—IDENTIDAD o FUSIÓN. Cuando dos antígenos son serológicamente idénticos y se utilizan en igual concentración respecto a su antisuero específico.</p>
	<p>III.—Caso idéntico al anterior, salvo que existe exceso de antígeno.</p>		<p>VIII.—IDENTIDAD PARCIAL. Cuando un antígeno (A) bastante similar a otro (Aa) es capaz de precipitar algunos anticuerpos contenidos en el antisuero del otro antígeno homólogo (As-Aa), se formará una banda de precipitación tipo fusión, pero de su vértice sobresale un arco (denominado spur o espólon), cuya longitud es inversamente proporcional al de su relación cruzada entre antígeno (A) y su homólogo (Aa), al igual que su curvatura.</p>
	<p>IV.—Banda de precipitación formada por un anticuerpo con mayor coeficiente de difusión (menor peso molecular) que el antígeno, pero en equivalencia.</p>		<p>IX.—IDENTIDAD PARCIAL DOBLE. Se forma cuando los dos antígenos que se comparan son diferentes, pero están serológicamente relacionados con un tercer antígeno utilizado para la obtención del antisuero.</p>
	<p>V.—Caso idéntico al anterior, salvo que existe exceso de anticuerpos.</p>		<p>X.—IDENTIDAD PARCIAL DOBLE. Se forma cuando los dos antígenos que se comparan son diferentes, pero están serológicamente relacionados con un tercer antígeno utilizado para la obtención del antisuero.</p>

Fig. 22. Casos típicos de reacciones serológicas.

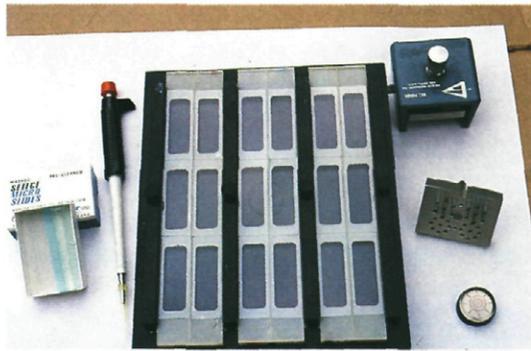


Fig. 23. Test de doble difusión en agar en lámina, donde se muestra un kit completo para su ejecución.

agujeros y su disposición varía según el ensayo. El dispositivo comúnmente utilizado es el de un pocillo central y 6-8 periféricos dispuestos simétricamente. En las cajas Petri el diámetro del agujero suele ser de 5 mm y en los portaobjetos de 3 mm.

La realización del test, aplicable a tubérculos o tallos, es como sigue:

— Extraer con ayuda de un escalpelo estéril, una pequeña cantidad de tejido del anillo vascular (0,5-1 g) del tubérculo, depositarla en un mortero de porcelana esterilizado y triturlarla en 0,5-1 ml de agua destilada o en NaOH 1M. En el caso de análisis de tallos, cortarlos perpendicularmente por la zona del cuello y extraer, con ayuda de unas pinzas, la savia bruta.

— Depositar un volumen determinado de antisuero (50 μ l, en el caso de las placas mencionadas) en el pocillo central.

— Depositar el mismo volumen (50 μ l) de diluciones antigénicas positivas en dos pocillos opuestos.

— Rellenar el resto de los pocillos con las diluciones antigénicas que se deseen investigar.

— Cerrar las placas Petri o los portaobjetos introducidos en los contenedores.

- Dejar reposar a temperatura ambiente.
- Observar al cabo de unas horas la formación de bandas de precipitación (Figs. 24 y 25).

6.9. TEST DE AGLUTINACION PASIVA AL LATEX

Es un método de aglutinación en medio

líquido que ha sido mejorado, aumentando su sensibilidad, mediante la utilización de partículas inertes de látex (unidades de poliestireno de un diámetro uniforme de $0,81 \mu$), en las que se fijan sobre su superficie los anticuerpos y al reaccionar con los antígenos correspondientes, dan lugar a la formación de agregados en el medio.

Las reacciones serológicas se llevan a

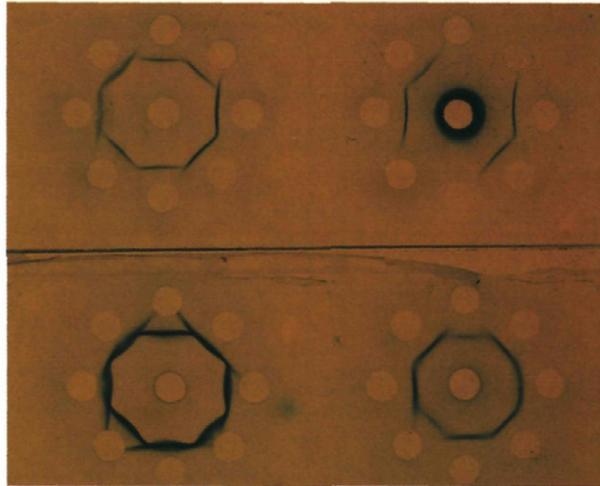


Fig. 24. Disposición de pocillos en doble difusión en lámina y reacciones cruzadas.

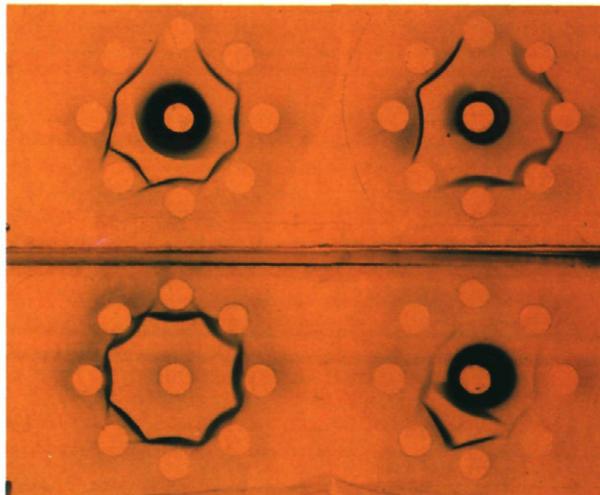


Fig. 25. Obsérvese en ambas figuras los distintos tipos de reacciones de identidad parcial, total y doble.

cabo en placas de perplex grueso recuperables o bien en hojas finas de plástico desechables, en ambos casos provistas de pocillos semiesféricos en los que se depositan los reactivos.

La aglutinación empieza a ser perceptible mediante una lupa, siendo posteriormente visible de forma directa.

El buen funcionamiento de la técnica requiere disponer de antisueros de alta calidad y establecer la proporción adecuada en que deben utilizarse para la «sensibilización» de las partículas de látex. Sin embargo, una buena suspensión de suero-látex, permite efectuar un gran número de pruebas serológicas con una sensibilidad adecuada, evitando reacciones no específicas.

Este método fue puesto a punto por BERCKS (1967) para la detección de virus y aplicado posteriormente a la detección del *C. sepedonicum* por SLACK *et al.* (1979).

En la actualidad, si bien no es frecuente su utilización para la detección rutinaria de la Podredumbre anular se emplea en muchos centros de multiplicación para comprobar que las plántulas están libres de *C. sepedonicum*.

La realización del test es muy sencilla pero se necesita disponer de un buen conjugado de suero y látex. Se describe a continuación una de sus posibles formas de obtención, siguiendo las líneas básicas propuestas por BERCKS (1967):

— Poner en un Erlenmeyer 1 ml de anti-suero de *C. sepedonicum* cuyo título sea conocido y 9 ml de agua destilada.

— Colocar el frasco en un agitador magnético y añadir gota a gota 6,6 ml de sulfato de amonio saturado.

— Una vez mezclado, dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente.

— Centrifugar a 1.800 g durante 20 minutos.

— Preparar tampón clorurado de Bercks a pH 7,5 (ClNa, 8,0 g; PO₄HNa₂ anhidro, 2,4 g; PO₄Na anhidro 1,5 g; H₂O destilada 1 litro).

— Resuspender el precipitado en 8 cc del

tampón anterior y dializar una noche frente al mismo.

— Medir la solución dializada y si hay menos de 10 ml completar hasta dicha cantidad con el mismo tampón (solución de gammaglobulinas).

— Poner en un Erlenmeyer 1 ml de suspensión homogénea de látex y 14 ml de agua fisiológica (ClNa 0,85%).

— Colocar el matraz, bien cerrado, en un agitador de vaivén durante dos horas.

— Preparar tampón Tris-ClH-PVP:

a) Mezclar 6,05 g Tris y 800 ml de agua destilada, y llevarlo a pH 7,4 con ClH 0,1 M.

b) Completar la solución hasta 1 l con agua destilada (Tampón Tris-ClH 0,05 M pH 7,4).

c) Preparar una solución de polivinilpirrolidona (PVP) al 1% en agua destilada.

d) Mezclar la cantidad deseada de Tris-ClH 0,05 pH 7,4 con el 2% de la solución de PVP anterior.

— Diluir a la mitad el título conocido de la solución de gammaglobulinas con tampón Tris-ClH 0,05 M, pH 7,4.

— Mezclar un volumen determinado (v) de solución de gammaglobulinas diluidas con una cantidad igual de solución de látex, agitando fuertemente durante 30 minutos.

— Centrifugar a 7.500 g durante 30 minutos.

— Resuspender el precipitado con tampón Tris-ClH-PVP, hasta alcanzar el volumen v, agitando fuertemente unos minutos.

— Repetir 2 veces más el proceso de centrifugación, obteniendo al final un precipitado que se resuspende en la misma cantidad de tampón v (conjugado suero-látex), al que se le adiciona 0,05% de azida de sodio.

Se ha comprobado (SLACK, S. A. *et al.*, 1979) que es conveniente, en el caso de *C. sepedonicum* añadir albúmina bovina (0,004%) a la solución tampón con el látex sensibilizado, con objeto de evitar reacciones no específicas.

El suero látex así obtenido se conserva a

4 °C. Antes de su utilización debe agitarse fuertemente unos minutos y conocer cuales son las diluciones del antígeno testigo y conjugado suero-látex que producen la reacción óptima.

El test es aplicable tanto a tubérculos como a tallos y su realización es como sigue:

- Tomar, como ya se ha explicado, una pequeña parte del anillo vascular del tubérculo o del tejido del tallo.

- Colocar en un recipiente pequeño con solución tampón TBS (0,1 M Tris-ClH pH 7,4 y 0,85% ClNa) adicionado con 0,1% de azida de sodio y triturarlo.

- Colocar en cada pocillo 0,1 ml de las diferentes soluciones antigénicas (o de sus diluciones en tampón TBS) a testar, incluyendo un testigo sano.

- Añadir 0,05 ml de conjugado suero-látex (o de sus diluciones).

- Colocar la placa durante 30 minutos en un agitador de vaivén.

- Dejarla reposar una hora.

La lectura de las reacciones debe hacerse tras ese período de reposo pero antes de 6 horas, pues de lo contrario comienzan a aparecer reacciones secundarias no específicas, que perturban el precipitado, pudiendo inducir a error en su interpretación.

El precipitado es de forma granular, no floculante, en forma de suspensión que se aglomera en estrías irregulares, empezando a ubicarse en la periferia de los pocillos de la placa, normalmente formando un anillo (Fig. 26).

Las reacciones negativas aparecen formando un punto blanco grueso en el fondo del pocillo (Fig. 27).

6.10. TEST ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Bajo el título genérico de técnicas inmunoenzimáticas (EIA) se engloban aquellas que emplean marcadores enzimáticos, conjugados con antígenos o anticuerpos.

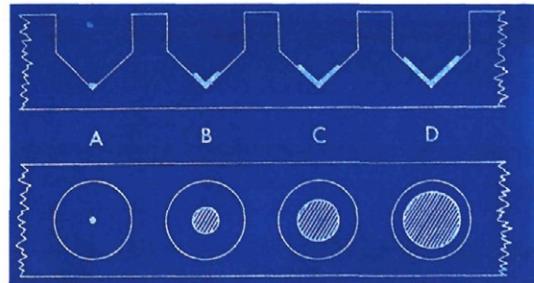


Fig. 26. Formación del aglutinado de látex en el fondo del pocillo a lo largo del tiempo.

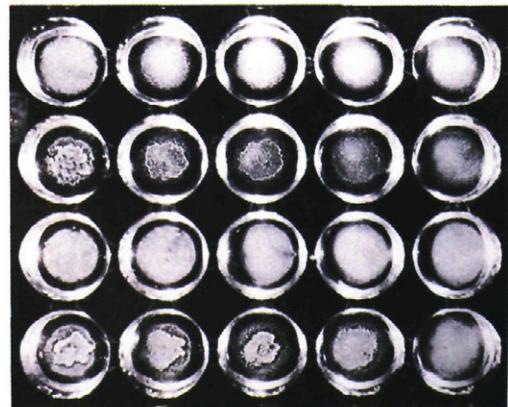


Fig. 27. Resultados del test. Filas 2 y 4, reacciones positivas. Filas 1 y 3, reacciones negativas.

La técnica inmunoenzimática ELISA se basa en dos hechos principales:

a) Que el antígeno o el anticuerpo se fijen a una superficie portadora insoluble, conservando su capacidad de reacción y actividad inmunológica, de tal manera que:

b) Un marcador enzimático pueda unirse al anticuerpo o al antígeno fijados, produciendo una reacción colorimétrica.

El método ELISA fue aplicado al estudio de bacterias por primera vez por H. VRUGGINK (1978), en *Erwinia carotovora v. atroseptica* (pie negro de la patata) y *Xanthomas pelargonii*. El test más utilizado en la identificación de bacterias es el ELISA SANDWICH.

Los resultados obtenidos en la determina-

ción de *C. sepedonicum* hasta el momento actual, muestran una fiabilidad menor que otros métodos, debido a la falta de especificidad de los antisueros y a la imposibilidad de visualizar la bacteria (BARZIC H.R., TRIGALET A. 1982, CLAFLIN L.E., UYEMOTO J.K., 1978).

Actualmente para algunas bacterias se comercializa un MICRO-ELISA, en forma de kit con todos los reactivos necesarios (tampones, enzima-conjugado, etc.), así como las placas necesarias que ya vienen con antisueros y preparadas para su uso. Existe un kit montado específicamente para *C. sepedonicum* comprendiendo un manual de la metodología a seguir, resultando bastante simple. Las muestras que pueden ser utilizadas en el test, según el prospecto de la casa comercial, pueden provenir de cualquier parte de la planta.

El método ELISA SANDWICH consta de las siguientes etapas (Fig. 28):

1. Tapizado o sensibilización de placas. Consiste en la fijación de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar, sobre un soporte insoluble utilizado como inmunoabsorbente.

Depositar 200 μ l de solución de gammaglobulinas en tampón carbonato pH 9,6 en cada pocillo de la placa, taponarla herméticamente e incubarla durante 5 h a 37 °C.

El primer paso a efectuar es la obtención de las inmunoglobulinas, siendo el método utilizado normalmente el de Clark y Adams (1977).

— Mezclar 1 cc de antisuero con 9 cc de agua destilada.

— Añadir 10 ml de solución saturada de sulfato de amonio.

— Agitar y dejar en reposo de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente.

— Centrifugar a 3.000 g durante 10 minutos.

— Disolver el precipitado en 2 ml de PBS diluido a 1/2.

— Dializar tres veces frente a PBS diluido a 1/2 (500 ml de tampón por cada diálisis).

— Filtrar a través de una columna de 3-5 ml de celulosa DEAE (Whatman 52) pre-equilibrada en PBS diluido a 1/2.

— Lavar las inmunoglobulinas a través de la columna con PBS diluida a 1/2.

— Recolectar, mediante un fraccionador con absorción a 280 nm, la fracción proteica primera que absorba.

— Medir la densidad óptica (D.O.) y ajustar la fracción recolectada a 1 mg/ml de inmunoglobulinas (1,4 D.O. equivalen a dicha concentración). Efectuar las diluciones con PBS diluido a 1/2.

— Fraccionar la solución en alícuotas para su conservación en tubos de vidrio tratados con silicona a -18 °C, salvo la fracción que se utilice para comprobar su actividad, cerciorándose que no producen reacciones extrañas o inespecíficas frente a extractos vegetales sanos, medios de cultivo, etc. Debe comprobarse asimismo la ausencia de reacciones cruzadas con otras razas, cepas o aislados bacteriológicos, emparentadas serológicamente con el patógeno a estudiar, ya que este hecho puede influir grandemente en el resultado final.

Los tampones utilizados son los siguientes:

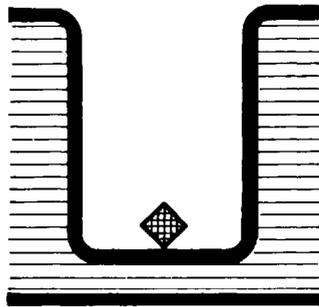
— Tampón fosfato pH 7,4 (PBS)

ClNa	3,0 g
PO ₄ H ₂ K	0,2 g
PO ₄ H ₂ Na	2,9 g
ClK	0,2 g
N ₃ Na	0,2 g (optativo)
Agua destilada	1 l.
Conservar a 4 °C.	

— Tampón carbonato pH 9,6

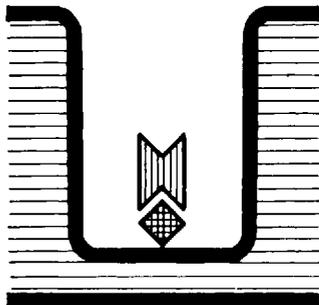
CO ₃ Na ₂	1,59 g
CO ₃ HNa	2,93 g
N ₃ Na	0,20 g (optativo)
Agua destilada	1 l.
Llevar a pH 9,6 con ClH 1N o con NaOH 1N.	
Conservar a 4 °C	

2. Lavado de pocillos. Se trata de eliminar los anticuerpos no fijados o deficientemente fijados tras la operación anterior. Para ello lavar los pocillos de la placa con



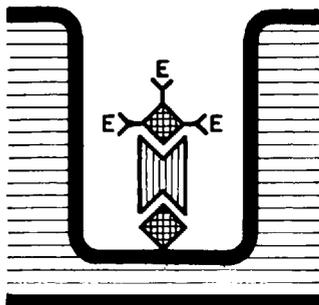
FIJACION DE ANTICUERPOS
ESPECIFICOS DEL AGENTE
PATOGENO A DETECTAR

LAVADO



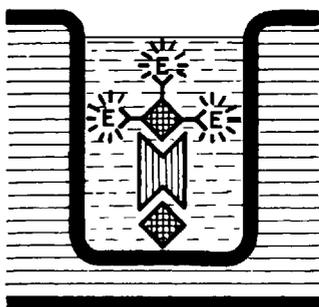
ADICION DE LA MUESTRA
PROBLEMA

LAVADO



ADICION DEL CONJUGADO

LAVADO



ADICION DEL SUSTRATO Y
REACCION COLORIMETRICA

Fig. 28. Etapas constitutivas del test ELISA SANDWICH.

PBS-Tween (Tween 20, 0,5 cc y agua destilada 999,5 cc) dejándola reposar durante 3 minutos. Repetir el lavado 3 veces, vaciando la placa.

3. Adición de la muestra problema. Consiste en adicionar un extracto bruto del material vegetal objeto de estudio. El agente patógeno a diagnosticar reaccionará con sus anticuerpos específicos formando un complejo estable fijado a la placa soporte.

Depositar en cada pocillo 200 μ l de las muestras y testigos (cada una a su dilución conveniente) en tampón PBS. Tapar la placa herméticamente e incubarla durante una noche (16 horas) a 28 °C.

Si los antígenos a testar proceden de cultivos puros, las muestras pueden prepararse todo lo purificadas que se estime necesario, según el siguiente método:

— Poner las bacterias en suspensión, en el tampón E:

ClNa	8,0 g
PO ₄ H ₂ Na. 2H ₂ O	0,4 g
PO ₄ HNa ₂ . 12H ₂ O	2,7 g
N ₃ Na	0,2 g
Agua destilada	1 l
Llevar a pH 7,4 con ClH 1N o con NaOH 1N	
Conservar a 4 °C	

— Ajustar en espectrofotómetro la densidad óptica a 660 nm, a 0,25 que corresponde a una concentración aproximada de 3×10^8 bact/ml. Esta suspensión bacteriana puede utilizarse directamente en el test. Si se desea una mayor concentración, más purificada, se puede centrifugar a 4.500 g durante 10 minutos, resuspendiendo en el tampón anterior el precipitado obtenido y filtrándolo por una membrana Millipore de 0,22 μ m, obteniendo así un concentrado bacteriano, dispuesto para su utilización. El proceso puede repetirse cuantas veces se desee.

Si los antígenos proceden de muestras vegetales:

— Colocar trozos de anillo vascular de tubérculos o tallos en maceración, con tampón E en la proporción 1:5(p/v), durante 16 horas a 4 °C. La suspensión obtenida puede utilizarse tal cual, o diluida, quedando en

forma de extracto bruto. Si se desea, puede filtrarse al igual que en el caso precedente quedando un extracto filtrado.

En el test deberá disponerse un control positivo (antígeno catalogado y conocido) y uno negativo (muestra vegetal sana), como elementos de juicio comparativos. Su proceso de extracción será idéntico a los descritos anteriormente.

Es conveniente buscar la concentración idónea de los antígenos en los ensayos previos, debido a que si es demasiado elevada, durante el tapizado pueden aparecer reacciones extrañas o cruzadas y si es demasiado baja puede producir deficiencias en la coloración.

4. Lavado de pocillos. Se trata de eliminar los restos vegetales no fijados y de los antígenos que no hayan formado complejo. Proceder igual que en el punto 2.

5. Adición del conjugado. Se agregan anticuerpos específicos del antígeno a detectar, previamente conjugados con una enzima. Estos anticuerpos conjugados reaccionan donde existe antígeno insolubilizado.

Depositar en cada pocillo 200 μ l del conjugado gammaglobulina-enzima en tampón PBS + 0,4% albúmina de huevo. Tapar la placa herméticamente e incubar 4 horas a 37 °C.

El objetivo de un conjugado es obtener simultáneamente una alta actividad enzimática e inmunológica de sus componentes. Para ello se efectúa un ensamblaje de una enzima y una proteína (que en nuestro caso serán las inmunoglobulinas) a través de dos grupos activos específicos de un agente puente.

Existen numerosos métodos de conjugación, clasificándose según que la unión de la enzima, el agente puente y la proteína se efectúe de una sola vez (añadiendo todos simultáneamente) o en dos etapas (primero se fija un componente al agente puente y posteriormente se fija el otro).

En nuestro caso el complejo utilizado es:

Inmunoglobulinas (proteína)-glutaraldehído (agente puente)-fosfatasa alcalina (enzima).

Para la obtención del conjugado se utiliza el siguiente método:

— Centrifugar 2 cc de fosfatasa alcalina a 5.000 g durante 15 minutos.

— Eliminar el sobrenadante.

— Disolver el precipitado directamente en 1 cc (1 mg) de inmunoglobulinas purificadas.

— Dializar tres veces frente a PBS diluido a 1/2, a 4 °C (500 ml de tampón por cada diálisis).

— Añadir solución fresca de glutaraldehído purificado y monomérico, hasta una concentración final del 0,06%, mezclando bien.

— Dejar reposar durante 4 horas a temperatura ambiente.

— Dializar tres veces frente a PBS diluido a 1/2, a 4 °C, para eliminar el glutaraldehído sobrante (500 ml de tampón por cada diálisis).

— Añadir 0,4% de ovoalbúmina de suero bovino.

— Adicionar el mismo volumen de glicerol.

— Conservar a -20 °C.

La concentración de conjugado influye en el resultado del test. Es preciso buscar la dilución que produzca la menor reacción inespecífica (color de fondo) con muestras negativas (muestra sana) y una clara coloración de las muestras positivas (antígeno catalogado y conocido). Si la concentración es alta, aumenta la densidad óptica produciéndose coloraciones indiscriminadas (poca diferencia colorimétrica entre los controles).

6. Lavado de pocillos. Se trata de eliminar el exceso de anticuerpos marcados no reaccionantes.

Lavar procediendo igual que en el punto 2.

7. Adición del sustrato. Al adicionar un sustrato específico, en los casos en que exista el antígeno buscado, se producirá una reacción colorimétrica (enzima-sustrato), cuya intensidad dependerá de la cantidad de antígeno presente.

Depositar 200 μ l de sustrato, preparado en el mismo momento de su uso, en cada pocillo de la placa. Taparla herméticamente e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora al abrigo de la luz solar directa. Parar la reacción adicionando a cada pocillo 50 μ l) de NaOH 3M.

El sustrato empleado para la fosfatasa alcalina es el p-nitrofenil fosfato, que se utiliza en la proporción de 0,8 mg/ml del siguiente tampón:

Dietanolamina	9,7 cc
Agua destilada	700 cc
N ₃ Na	0,2 g

Llevar a pH 9,8 con ClH 1N.

Añadir agua destilada hasta completar el litro.

La hidrólisis de la solución enzima-sustrato produce una coloración amarilla intensa, cuantificable espectrofotométricamente a 405 nm. Debe estudiarse el tiempo de incubación del sustrato, efectuando series continuas de lecturas hasta hallar el óptimo que será aquel en que se encuentre mayor diferencia de color entre testigos de referencia positivos y negativos.

8. La lectura puede realizarse de dos maneras:

a) Por evaluación visual.

b) Por evaluación fotométrica, mediante la medición de la extinción a 405 nm (Fig. 29).

Para la mejor realización del test y la obtención de resultados objetivos es necesario tener en cuenta una serie de normas y consideraciones.

Antes de comenzar una determinación en serie es conveniente calcular la concentración idónea de uso de todos los reactivos, para lo cual se deben probar las combinaciones de las siguientes diluciones:

a) Del conjugado (1/100, 1/1000 y 1/2000).

b) Del antígeno (1/10, 1/100 y 1/1000).

c) Testigo sano (1/10 y 1/100).

d) Del anticuerpo tapizante (1/500, 1/1000 y 1/2000).

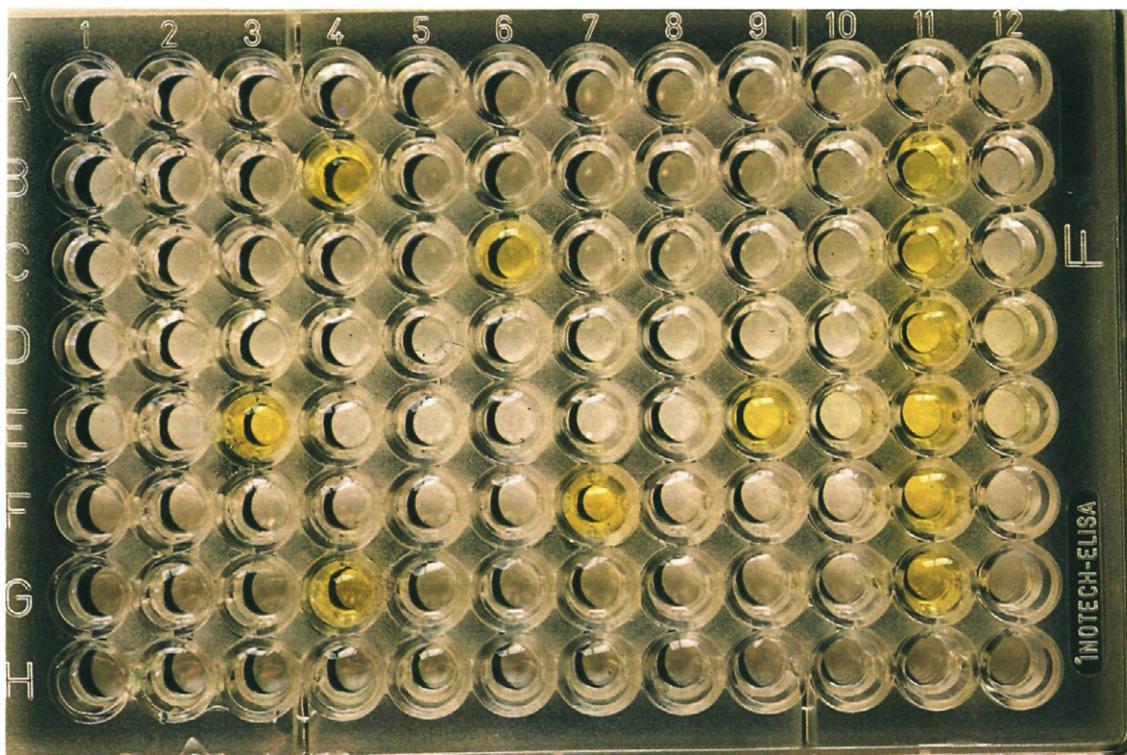


Fig. 29. Reacción colorimétrica en el test ELISA.

- e) Tampón de prueba para la comprobación del antisuero y del sustrato.

Por tanto el dispositivo de ensayo, dejando libres los pocillos laterales, será el indicado en la Figura 30.

A la vista de las reacciones de coloración obtenidas en esta placa de prueba, se seleccionan para la siguiente las escalas de dilución más apropiadas respecto a los resultados obtenidos, es decir, las combinaciones de las variables que lleven a una coloración positiva idónea.

También deben tenerse en cuenta una serie de factores que pueden afectar en mayor o menor medida a los resultados, induciendo a error, por lo que su observación es necesaria. Se enumeran los más importantes.:

— Limpiar previamente las placas a utilizar, eliminando aquellas que presenten

rayados o anomalías en sus pocillos, para descartar cualquier error debido a las características del plástico de la placa.

— El tampón fijador (carbonato) debe hallarse en perfectas condiciones de uso a fin de permitir una absorción correcta de las proteínas.

— Utilizar la dosis apropiada de inmunoglobulinas, previamente tituladas, para evitar deficiencias en el recubrimiento de los pocillos.

— Depositar en los pocillos los volúmenes correctos, mediante uso de micropipetas graduadas que sean de buena fiabilidad y fácil repetibilidad (Fig. 31).

— Evitar desecaciones o evaporaciones, que falsean resultados, cubriendo las placas con parafilm o tapas de plástico.

— Las placas deben estar siempre en posición horizontal para que el nivel que

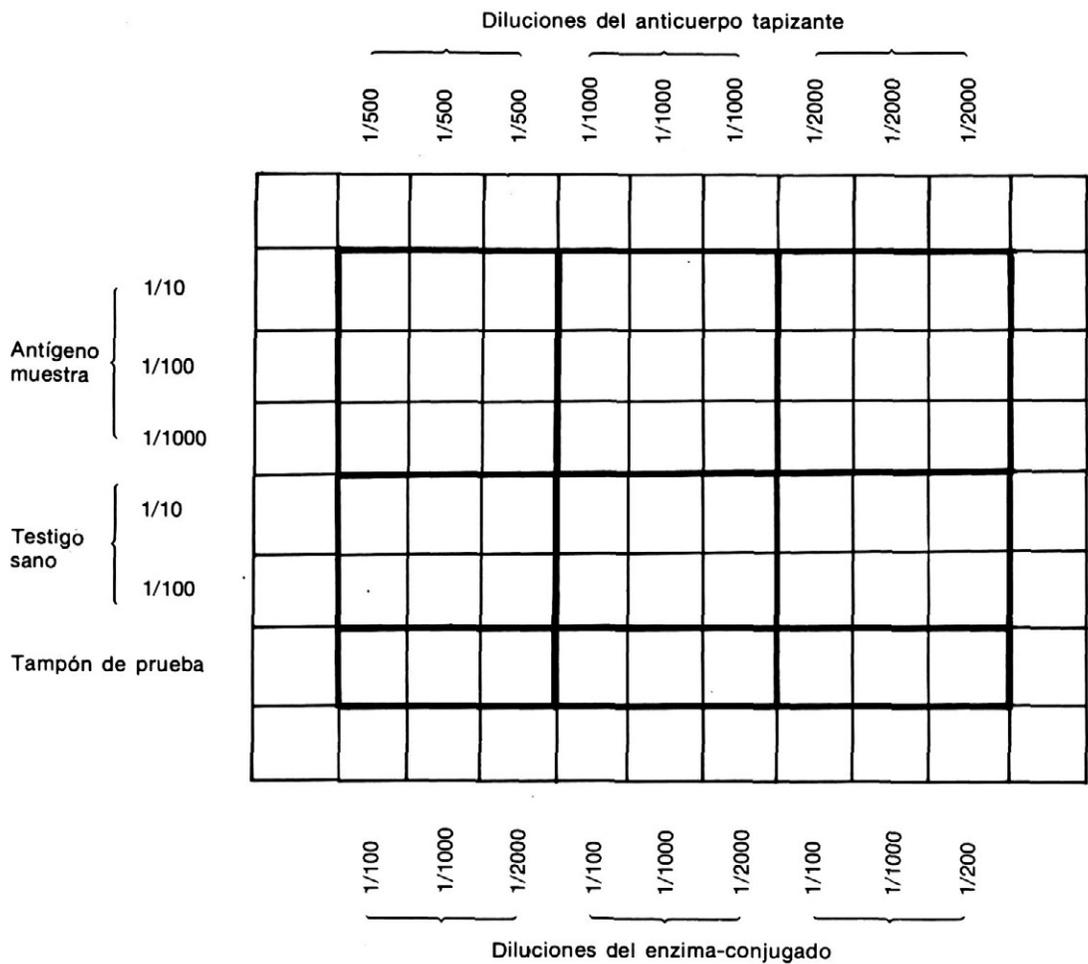


Fig. 30. Dispositivo general de ensayos previos.



Fig. 31. Micropipeta multicanal graduable para lavado y rellenado manual de placas.

alcancen los reactivos sea siempre el mismo, evitando de este modo fijaciones inespecíficas.

— Los tiempos de incubación fijados deben ser cumplidos escrupulosamente, pues de ellos depende la especificidad y sensibilidad del método.

— Los lavados de los pocillos deben ser correctos y homogéneos, evitando errores en los resultados. No deben ser ni deficientes ni intensos.

— Los tampones deben encontrarse en perfectas condiciones (pH, concentración, etc.) y en perfecta actividad, evitando con-

taminaciones que darán falsos resultados por interferencias, reacciones extrañas o falta de sensibilidad del test.

— Es conveniente utilizar micropipetas de puntas desechables, abandonándolas después de cada operación, evitando contaminaciones.

— La máxima estandarización posible del método permite una mayor fiabilidad y sobre todo una mejor repetibilidad (Fig. 32).

— Al paralizar la reacción se debe esperar unos minutos antes de proceder a su lectura, con objeto de estabilizar la coloración.

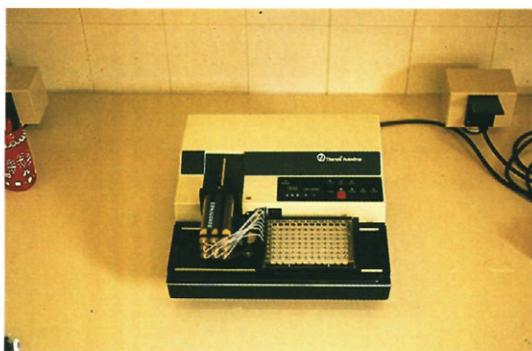


Fig. 32. Lavador y cargador automático de placas.

6.11. TEST DE INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia es una técnica que permite, con ayuda del microscopio, visualizar la unión antígeno-anticuerpo.

COONS (1941) ensayó un método que posibilita detectar la presencia de un antígeno en una preparación de tejido fijado sobre una lámina, por medio del anticuerpo correspondiente marcado por un fluorocromo.

El marcaje de los anticuerpos se efectúa separando por precipitación las inmunoglobulinas del antisuero, concentrándolas y posteriormente poniéndolas en contacto con el fluorocromo en frío. El exceso no fijado se elimina por diálisis.

Un fluorocromo es una sustancia que

sometida a una fuente luminosa, absorbe una longitud de onda determinada, emitiendo una longitud de onda mayor. Este fenómeno fluorescente se debe a que el sustrato absorbe energía de la luz irradiante, entra en un estado de «excitación» y vuelve de nuevo a su estado primitivo mediante emisión de energía en forma lumínica de distinta longitud de onda. La sustancia utilizada habitualmente es el isotiocianato de fluoresceína que al absorber los rayos ultravioletas emite una fluorescencia visible de color verde.

El microscopio que se utiliza está iluminado por una lámpara de mercurio de alta presión o de cuarzo-iodo, cuyos haces luminosos atraviesan un filtro que solamente deja pasar aquella radiación necesaria (ultravioleta) sobre la preparación fluorescente, tratada con fitocromo, disponiendo finalmente de un filtro supresor selectivo, cuya misión es la de retener toda luz no absorbida por la preparación fluorescente para no causar molestias al observador (Fig. 33).

El objetivo que suele utilizarse es el de inmersión en aceite, ya que produce una mayor ampliación. El aceite de inmersión proporciona un medio óptico homogéneo al paso de la luz entre la preparación y la lente frontal del objetivo.

Entre las distintas formas de aplicación de la inmunofluorescencia, las más utilizadas son:

a) Inmunofluorescencia directa

El anticuerpo marcado se aplica directamente sobre el antígeno y se deja treinta minutos en cámara húmeda. A continuación se lava la lámina para eliminar el exceso de anticuerpos no retenidos, pasando a su examen para detección de complejos antígeno-anticuerpos fluorescentes.

Este método es más específico, dando resultados claros. Su desventaja consiste en que es necesario disponer de antisueros marcados muy específicos para cada antígeno, siendo menos sensible que el método indirecto.

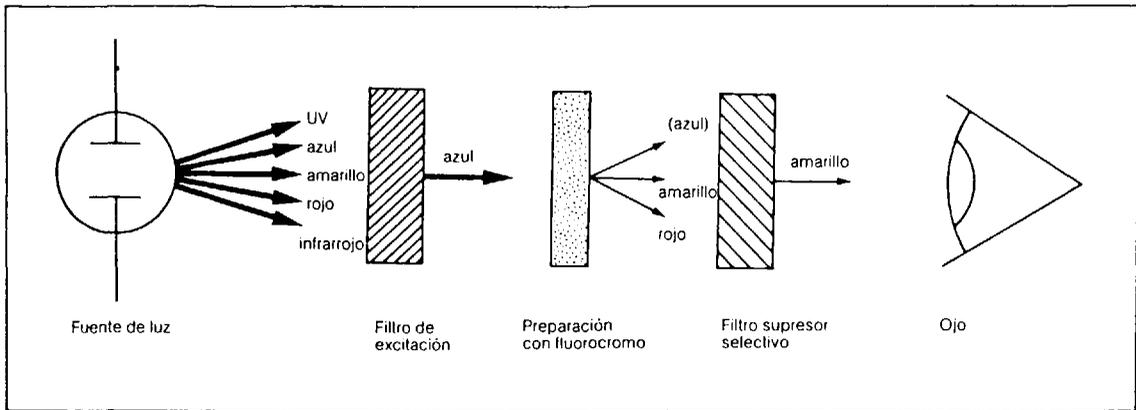


Fig. 33. Fundamento óptico de la inmunofluorescencia.

b) Inmunofluorescencia indirecta

Hoy en día se emplean muchas variantes del método primitivo (directo). Una de las más interesantes e importantes ha sido sobre todo el denominado método indirecto o técnica «sandwich».

Para no tener que preparar el correspondiente anticuerpo marcado para cada antígeno que pueda presentarse, se hace una provisión de «anti-anticuerpos». Un protocolo a seguir sería inmunizar un conejo con antígenos bacterianos, obteniendo de este animal anticuerpos específicos anti-bacteria. Por otro lado, se inmuniza otro animal, por ejemplo una cabra, con antiglobulina de un conejo cualquiera, obteniéndose un complejo inmunológico de anti-anticuerpos de conejo. Este complejo se marca con fitocromo, que reaccionará a partir de ahora con cualquier complejo de anticuerpos de conejo, como si se tratase de un antígeno.

La técnica consta de dos fases: en la primera se pone a reaccionar la bacteria-problema frente a los anticuerpos de conejo. El complejo formado no es visible. En la segunda fase, se visualiza el complejo anterior al añadirle los anticuerpos de cabra marcados con fitocromo.

Con este método no se precisa disponer de antiseros específicos marcados para cada antígeno, por lo que resulta muy versátil.

En la Fig. 34 se esquematizan ambos métodos.

La técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IF) es actualmente la más utilizada para la detección de *C. sepedonicum*, empleándose asimismo en Centros de multiplicación de material vegetal como test confirmatorio de la aglutinación pasiva al látex. Puede aplicarse a extractos procedentes de tallos o de tubérculos.

Para su realización, según recomienda el grupo de expertos de la CEE, conviene:

- Utilizar antisero de una cepa conocida de *Corynebacterium sepedonicum* (p. ej. ATCC 33113 o bien NCPPB 2140), cuyo título en I.F. deberá ser superior a 1:600.

- Incluir un control negativo de agua fisiológica tamponada (PBS), para ver si el conjugado de isotiocianato de fluoresceína anti-inmunoglobulina de conejo (FITC) combina de manera no específica con células bacterianas.

- Incluir como testigo positivo, en lámina aparte, un *Corynebacterium sepedonicum* de colección, homólogo al antisero utilizado (p. ej. ATCC33113 o bien NCPPB 2140).

- A ser posible, se utilizará también como testigo en la misma lámina, tejido infectado (conservado por liofilización o congelación a -20°C).

- Si se realizan ensayos de detección masales testar las diluciones 10^1 , 10^2 y 10^3 de los extractos bacterianos obtenidos según el

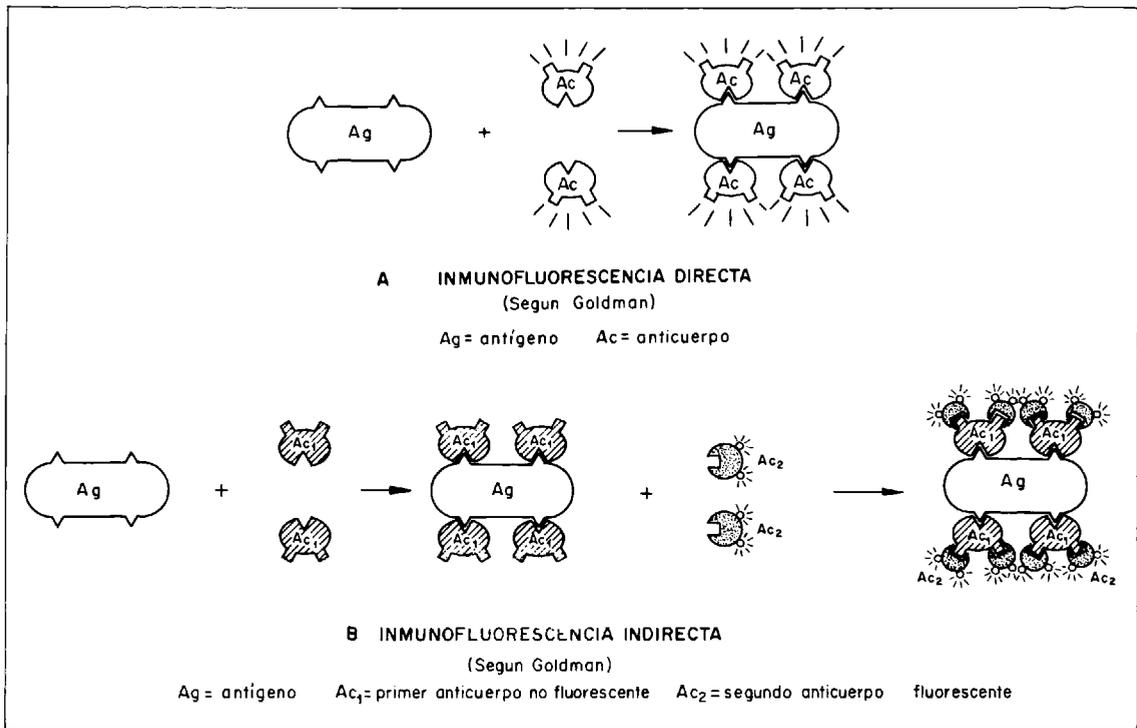


Fig. 34. Inmunofluorescencia directa e indirecta (según Goldman).

procedimiento empleado para la inoculación de las berenjenas.

Un procedimiento a seguir, especialmente útil en el caso de análisis masales es:

— Depositar un volumen calibrado de las diferentes diluciones antigénicas sobre los círculos marcados de un portaobjetos. Estos deberán estar muy limpios y desprovistos de todo tipo de grasa. Antes de su utilización se pasan por la llama de un mechero, insistiendo ligeramente sobre la cara en la que están marcados los círculos para favorecer la adherencia al vidrio de las partículas antigénicas. La gota depositada debe cubrir el círculo y estar bien extendida para evitar la acumulación de unas bacterias sobre otras.

— Dejar secar los portaobjetos. Es importante que la desecación sea completa para que todo el antígeno quede adherido.

— Proceder a la fijación de las suspensiones bacterianas con un doble objeto: por

un lado insolubilizarlas a fin de evitar la degradación química de los constituyentes responsables del poder antigénico de las bacterias y por otro lado fijar su estructura física. Una de las formas de fijación consiste en cubrir los portas con alcohol de 95° durante 10 minutos, al cabo de los cuales se tira el exceso de alcohol y se pasan por la llama con precaución.

— Depositar sobre los círculos una gota gruesa de suero inmunológico no marcado, a la dilución elegida, exceptuando uno que va a servir como control y que se recubre con tampon fosfato 0,01M pH 7,2 (PBS). Se deja reposar la gota cubriendo como siempre la totalidad del círculo durante 30 minutos.

— Eliminar el suero con PBS mediante un frasco lavador, procurando que el chorro no incida directamente sobre el círculo. Evitar que el suero arrastrado caiga sobre el círculo control.

— Introducir el portaobjetos en un baño de PBS durante 5 minutos.

— Realizar un segundo lavado de otros 5 minutos en otro baño, también con PBS.

— Secar con cuidado y rapidez todo el porta a excepción del interior de los círculos.

— Depositar sobre cada uno de los círculos una gota de suero fluorescente a la dilución escogida. La gota deberá cubrir totalmente los círculos durante 30 minutos.

— Eliminar el suero fluorescente utilizando un frasco lavador con PBS.

— Sumergir los portas, como anteriormente, cinco minutos en un baño con PBS.

— Pasar seguidamente al segundo baño con PBS.

— Secar el portaobjetos, excepto el interior de los círculos.

— Depositar una gota de glicerina tamponada 0,1M pH 7,6 (PO₄HNA₂ 12.H₂O 3,2 g; PO₄H₂Na 2.H₂O, 0,15 g; Glicerol, 50 ml; H₂O destilada, 100 ml) en el centro de cada círculo o sobre la superficie del cubreobjetos.

En la Fig. 35 se representa la forma aconsejada por el grupo de expertos de la CEE de distribución de muestras y diluciones de sueros en los portaobjetos múltiples.

Al realizar la lectura de las preparaciones al microscopio (Fig. 36), se recomienda:

— Efectuar barridos sobre cada círculo a lo largo de dos diámetros perpendiculares, así como alrededor del perímetro.

— Observar las células fluorescentes en los controles positivos y determinar el título.

— Observar si hay células fluorescentes en el control negativo de FITC/PBS. En su ausencia proceder a testar el resto de los círculos de la lámina.

— Determinar, en un mínimo de diez campos del microscopio el número medio por campo de células fluorescentes con morfología típica, calculando su número por mililitro del precipitado no diluido.

— Si no hay células fluorescentes, el test IF se considerará negativo.

— Si hay células fluorescentes en gran número, el test IF se considerará como potencialmente positivo, recomendándose repetir el test. La presencia de células fluorescentes de bacterias corineformes saprofitas se considera un hecho normal. Sin embargo, si el número de bacterias fluorescentes en el precipitado excede a 10⁶ bacterias/ml, probablemente existe *C. sepe-donicum*. Cuando la población es menor a 10³ bact/ml, las muestras son normalmente negativas, pero podrían ser consideradas como sospechosas.

Para determinar el número de células bacterianas positivas en I.F. hay que tener en cuenta que:

— El área (S) de cada círculo de los portaobjetos es:

$$S = \frac{\pi D^2}{4} \quad (1)$$

Siendo D el diámetro del círculo.

— El área (s) del campo del objetivo es:

$$s = \frac{\pi d^2}{4} \quad (2)$$

Siendo (d) el diámetro del campo del objetivo.

El valor de (d) puede calcularse bien por medición directa bien por la siguiente fórmula:

$$s = \frac{\pi i^2}{4G^2K^2} \quad (3)$$

donde:

i = coeficiente de campo (depende del tipo de ocular y varía de 8 a 24)

K = coeficiente del tubo (1 ó 1,25).

G = aumento del objetivo (100x, 40x, etc.).

Despejando (d) en la fórmula (2):

$$d = \sqrt{\frac{4s}{\pi}}$$

Sustituyendo s por su valor de la fórmula (3):

$$d = \sqrt{\frac{4\pi i^2}{\pi \cdot \frac{4G^2K^2}{\pi}}} = \frac{i}{G \cdot K} \quad (4)$$

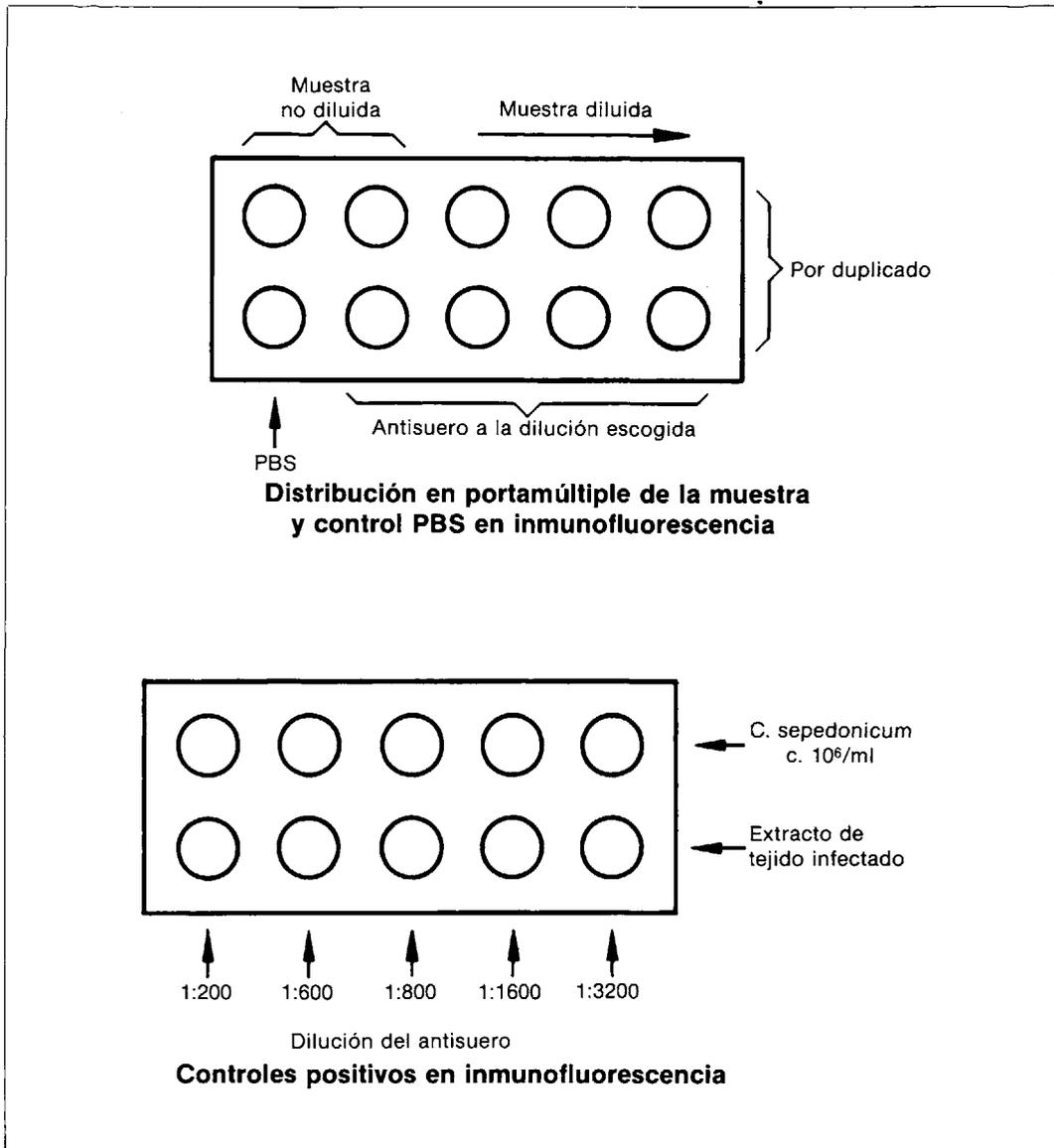


Fig. 35. Distribución de muestras y diluciones de sueros en los portaobjetos múltiples.

Siendo (x) el número de células típicas fluorescentes que se han contado por campo de microscopio, el número de células típicas fluorescentes (X) que existen en cada círculo del portaobjetos es:

$$X = \frac{xS}{s}$$

Y el núm. de células típicas fluorescentes (N) que existen en cada ml. de precipitado es:

$$N = X \frac{1.000}{y} F$$

Siendo (y) el volumen de precipitado

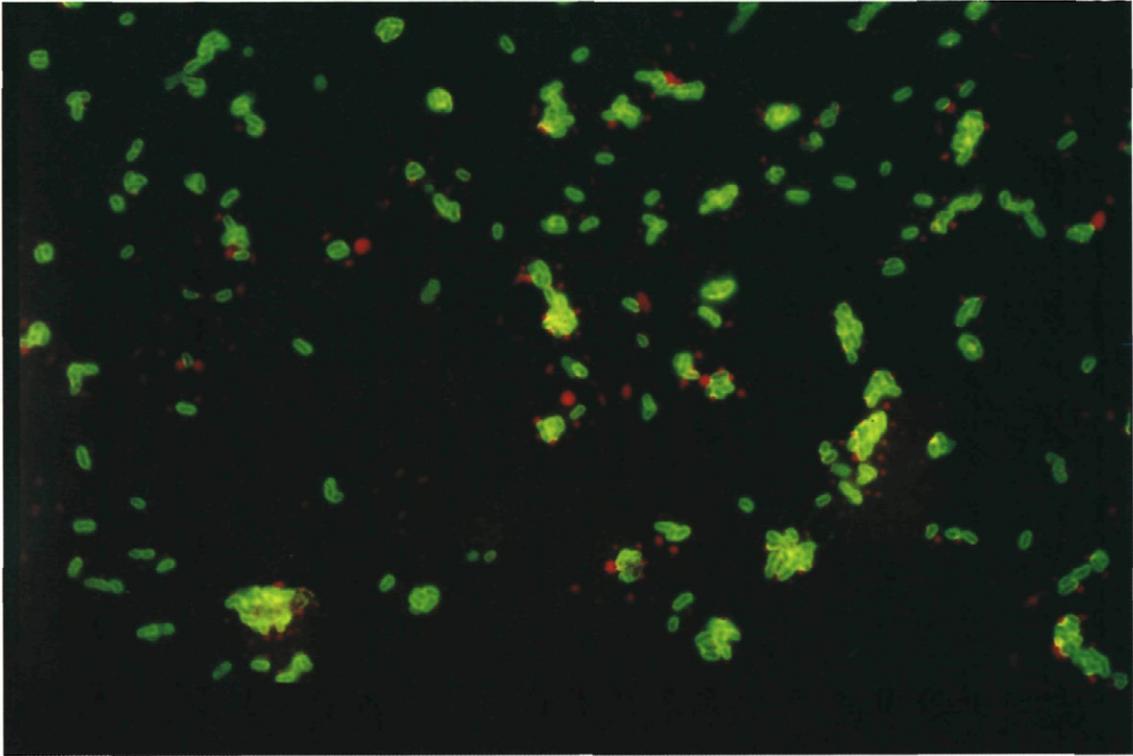


Fig. 36. Visualización mediante IF de *C. sepedonicum*. (Foto Chauveau-Francia.)

depositado en cada círculo de portaobjetos, y (F) el factor de dilución del precipitado.

6.12. NUEVAS TECNICAS

Actualmente las investigaciones para la identificación de bacterias fitopatógenas se centran fundamentalmente en la obtención de antisueros de alta especificidad, así como en la puesta a punto de métodos de diagnóstico capaces de solucionar los inconvenientes que presentan los anteriormente descritos.

Entre estas nuevas técnicas serológicas, cabe citar la microscopía de inmunofluorescencia-inmunoadsorción (Inmunosorbent immunofluorescence microscopy, ISIF) (VAN VUURDE V.W.L. y VAN HEUTEN C., 1983), basada en la adsorción selectiva de bacterias fitopatógenas, incluso procedentes de extractos concentrados, sobre portaobjetos en los que ha sido fijado previamente un inmuno-

adsorbente. Las bacterias homólogas se fijan, eliminándose los demás componentes de la muestra mediante lavado, pudiendo a continuación aplicarse la inmunofluorescencia tanto directa como indirecta. Este método supone una selectividad en cuanto a la limpieza de las preparaciones, evitando las interferencias producidas por partículas extrañas, facilitando la lectura.

Otra técnica que puede tener interés para el aislamiento de la bacteria es la siembra mediante inmunoadsorción (Immunosorbent dilution-plating, ISAP) (VAN VUURDE J.W.L. y VAN HENTEL C., 1983), basada en la adsorción selectiva de las bacterias fitopatógenas contenidas en un extracto celular, por un bastón de siembra, impregnado de una película de inmunoadsorbente fijada a él mediante celulosa nitrato disuelta en acetona. Estas bacterias fijadas en el bastón, se siembran en el medio de cultivo apropiado,

consiguiéndose de esta manera cultivos puros.

6.13. CONSIDERACIONES PARA UN DIAGNOSTICO CORRECTO DE LA PODREDUMBRE ANULAR

La diagnosis de *C. sepedonicum* no resulta fácil debido a los inconvenientes con que se tropieza en las distintas fases que comprende su identificación, ya que los resultados obtenidos con las diferentes técnicas empleadas, contemplados individualmente, no permiten asegurar un diagnóstico positivo.

Asimismo, la interpretación de dichos resultados es realmente difícil y subjetiva.

Ambos hechos hacen necesario que la emisión de un diagnóstico positivo esté basada en el mayor acopio posible de datos y resultados que permitan disminuir al máximo las posibilidades de error.

La LOCALIZACION de la enfermedad por sintomatología, aunque es útil como diagnóstico orientativo, se ve dificultada por las siguientes causas:

a) Infecciones latentes no producen síntomas.

b) Síntomas similares pueden ser producidos por otros agentes distintos.

c) Síntomas de descomposición muy avanzados no son válidos para la diagnosis de ningún patógeno implicado.

El AISLAMIENTO del patógeno, y su IDENTIFICACION son parte obligatoria para la emisión de un diagnóstico positivo.

El aislamiento directo del patógeno se ve dificultado por las siguientes razones:

a) El crecimiento de *C. sepedonicum* en los medios de cultivo utilizados actualmente resulta muy lento.

b) La presencia en muestras de tejidos infectados de otros microorganismos de crecimiento más rápido, enmascara la detección de *C. sepedonicum*.

c) Cuando en una muestra, la población de células de *C. sepedonicum* es baja (menor de 10^6 bact/ml), como en el caso de infecciones

latentes, no se produce crecimiento en las placas de cultivo.

Las investigaciones sobre medios de cultivo sintéticos, más selectivos y específicos, pueden suponer un avance considerable en la identificación del patógeno.

La TINCION DE GRAM es un test orientativo. Sin embargo su validez se ve comprometida por el hecho de existir en las muestras, incluso sanas, bacterias saprofitas cuyo Gram, al igual que *C. sepedonicum*, sea también positivo. Por tanto, esta técnica por sí misma carece de fiabilidad y especificidad. (DE BOER S.H. y COPEMAN R.J., 1974).

EL TEST SOBRE BERENJENAS es el que presenta hoy en día mayor fiabilidad para el diagnóstico de *C. sepedonicum*, debido a un crecimiento más selectivo de la bacteria en dicha planta. Este hecho permite su aislamiento directo en medios de cultivo. No obstante, existen algunos inconvenientes:

a) La larga duración del test, debido a que es necesario esperar hasta 45 días para la aparición de síntomas.

b) Puede suceder que no se observen síntomas transcurrido este período.

c) Los síntomas pueden ser confundidos con los producidos por otras bacterias.

d) Es preciso inocular 25 plantas por muestra.

La localización de otras plantas sobre las que los síntomas apareciesen con mayor prontitud y nitidez, haría que los test biológicos fuesen más útiles.

Los TEST SEROLÓGICOS son orientativos, debido a la baja especificidad de los sueros, originándose reacciones cruzadas que les restan validez.

La utilización de antisueros monoclonales (DE BOER S.H. *et al.*, 1984), cuyas moléculas de inmunoglobulina poseen idéntica especificidad, no ha dado resultados más satisfactorios que los policlonales.

De todas las técnicas serológicas utilizadas hasta la actualidad, la Inmunofluorescencia es la que presenta mayor fiabilidad, al permitir la visualización de la bacteria. Aún siendo hoy día la mejor de las técnicas serológicas

para identificación de *C. sepedonicum*, presenta los siguientes problemas:

a) La concentración inadecuada de bacterias puede dar lugar a un falso resultado negativo. Con una excesiva concentración, normalmente aparece sobre la preparación una fluorescencia generalizada. Empleando diluciones más elevadas de los extractos, se consigue visualizar las células.

b) La existencia de reacciones cruzadas puede originar un falso resultado positivo. Este hecho puede solventarse considerando el número, la forma de las bacterias y la intensidad de la fluorescencia. Empleando mayores diluciones en los sueros, desaparecen estas reacciones.

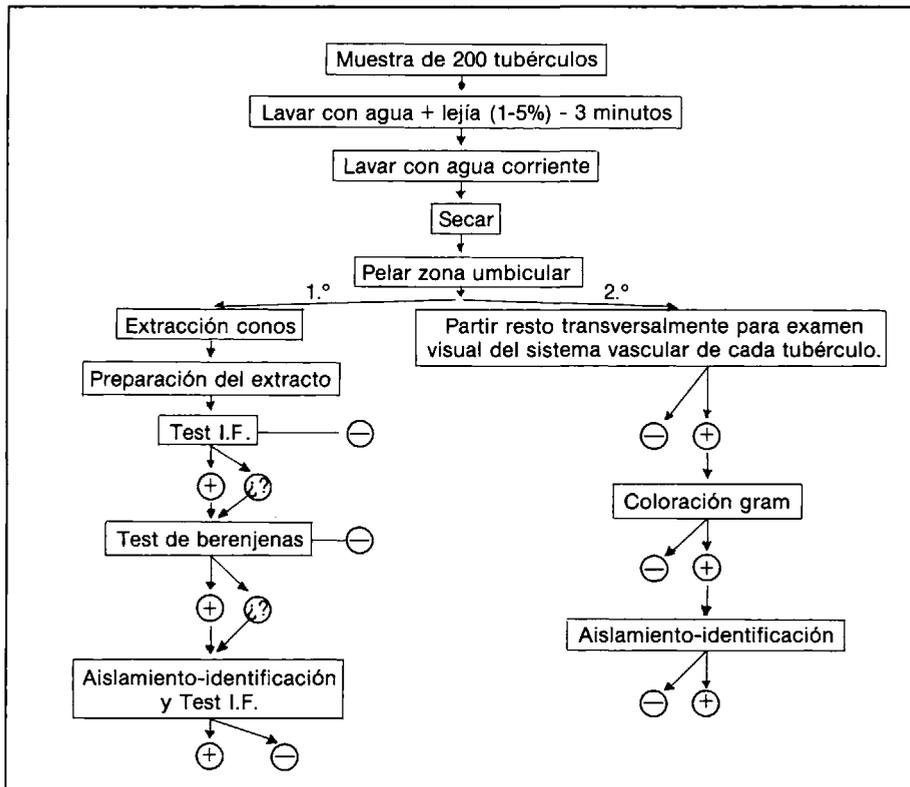
c) Las interferencias en la fluorescencia dificultan la lectura de las preparaciones. Ello es debido a la presencia de partículas extrañas en los extractos de las muestras. La aplicación de un método de obtención de concentrados celulares más puros, tal como el de DINESEN (1984) (Fig. 37), basado en la

posibilidad de extracción de la bacteria de las células vegetales por difusión en un medio líquido mediante agitación mecánica, o bien la utilización de la técnica ISIF, permiten solucionar este problema.

Actualmente se está tratando de resolver cuantas dificultades e inconvenientes presentan los diversos procesos enumerados anteriormente.

En 1981, un Grupo de Trabajo de la Comunidad Económica Europea, constituido por especialistas en Bacteriología, conscientes de las dificultades que supone el diagnóstico positivo de *C. sepedonicum*, comenzó a elaborar un programa sobre los métodos de detección más apropiados.

Tras cinco años de experiencias y trabajos conjuntos, el citado Grupo acordó la utilización de un método estandarizado, basado en la aplicación de diversas técnicas (ver esquema simplificado a continuación) y que la emisión de un diagnóstico positivo final sea efectuado por personal especializado.



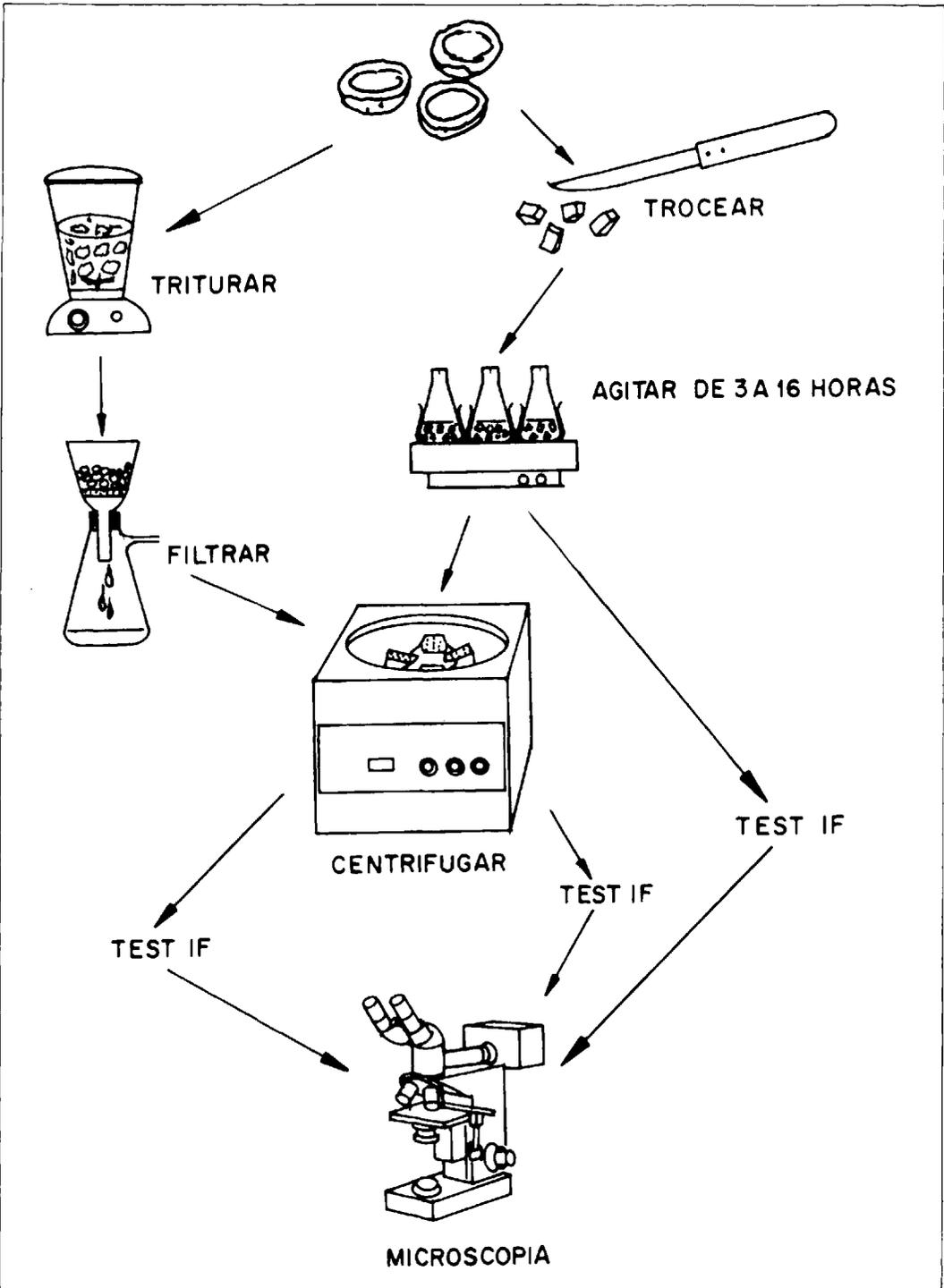


Fig. 37. Métodos para la obtención de extractos según DINESEN.

Control y lucha

Las investigaciones y observaciones efectuadas en campo y laboratorio, iniciadas desde 1940, han permitido adquirir algunos conocimientos de la naturaleza de la enfermedad, de su agente y formas de transmisión, así como de los efectos que provoca.

La principal fuente de inóculo de la enfermedad son los tubérculos infectados.

El control de la enfermedad comienza por la atención y los cuidados que deben adoptarse en la desinfección y uso de utensilios, maquinaria, almacenes, envases, etc. En definitiva es necesaria la adopción y el cumplimiento estricto de medidas profilácticas a lo largo del ciclo de siembra, producción, recogida y almacenamiento de tubérculos.

Una segunda fase, considerada hoy día más importante aún que la primera, es la utilización de patata de siembra sana.

El cumplimiento de las medidas citadas, aplicadas estrictamente, puede llevar a la erradicación de la enfermedad en orden creciente de superficie: parcelas, fincas, términos municipales, provincias, estados o continentes.

Posteriormente se vio que estas medidas no eran suficientes para la erradicación total de la enfermedad, por lo que los controles preventivos debían ser mucho más estrictos en su aplicación y amplios en sus medidas.

7.1. TOLERANCIA CERO

En los programas de certificación de semillas, existen unos niveles de TOLERANCIA para cada enfermedad y variedad respecto a un determinado patógeno. Las muestras que

se encuentran por encima de este nivel son rechazadas.

La expresión TOLERANCIA se contempla aquí como sinónimo de «cantidad de semilla infectada permisible de un lote», en razón de la utilización del término en la legislación. En ningún caso tiene algo que ver con el concepto genético de resistencia parcial, ni con sus acepciones agronómicas que reflejan el comportamiento de una planta manifestando los síntomas típicos de la enfermedad pero sin alterar su rendimiento, ni tampoco con el utilizado en Virología Vegetal que se emplea para designar a las plantas que permiten una multiplicación activa de un virus sin que se exterioricen los síntomas característicos de la infección.

En el caso de la Podredumbre anular este nivel es de TOLERANCIA CERO, considerándose contaminado un campo, un almacén, un envío o una partida cuando se detecta la presencia de la bacteria en una sola plántula o tubérculo.

Las inspecciones han de ser por tanto muy severas y continuadas, siendo obligatoria la realización de encuestas oficiales sistemáticas relativas a la Podredumbre anular en tubérculos recolectados, almacenados o comercializados.

7.2. MEDIDAS RELATIVAS AL MATERIAL DE SIEMBRA

Conocida la transmisión del agente patógeno y su ciclo evolutivo, explicado en el capítulo 5, el principal control de la enfermedad debe partir el origen de la contaminación: del propio tubérculo.

De hecho, la normativa de la Comunidad Económica Europea contempla las medidas necesarias para prevenir la aparición de la enfermedad, para detección y localización de los focos infecciosos; y en caso de aparición evitar su propagación, tanto dentro del propio Estado como a otros Estados miembros, combatiéndola de cara a su erradicación.

Las medidas de prevención, detección y localización de la enfermedad son las siguientes:

— Sistemáticamente efectuar encuestas oficiales con inspección visual de patatas recolectadas, almacenadas o comercializadas.

— En caso de sospecha de enfermedad, efectuar por servicios oficiales inspecciones visuales con cortes de tubérculos, en cualquier estado o situación del ciclo de producción.

— En caso de detección de síntomas, efectuar exámenes oficiales con métodos apropiados para emitir un diagnóstico científico.

— Si el diagnóstico es positivo en una sola planta o tubérculo, el lugar donde haya sido encontrado se considerará automáticamente contaminado.

— El Estado miembro en cuestión procederá inmediatamente a la determinación de la localización y extensión del área contaminada.

— El Estado afectado informará confidencialmente al resto de los Estados miembros y a la Comisión de la contaminación confirmada, debiendo proceder a efectuar las encuestas oficiales, informándoles de sus resultados al menos una vez al año.

Las medidas a tomar por parte del Estado afectado, caso de ser confirmada la enfermedad, para evitar su propagación y proceder a su control y erradicación son:

— Prohibición absoluta de cultivar las patatas provenientes del enclave o sitio contaminado. Estos tubérculos, bajo control oficial, deberán ser manipulados de modo que se evite la propagación de la enfermedad, o ser destruidos.

— Las patatas provenientes de un enclave afectado no podrán ser utilizadas para siembra, ni dentro ni fuera de la explotación. No podrán nunca ser certificadas.

— Prohibición de cultivar patata, al menos durante dos años en la parcela enferma, o durante todo el tiempo en que el campo siga conteniendo plantas espontáneas de patata.

— Durante tres años, se delimitará una zona de seguridad alrededor de la afectada, en la que deberá extremarse la vigilancia en todo el sistema productivo, se prohibirá el seccionamiento de tubérculos y cuantas medidas estimen necesarias, permitiendo tan sólo la salida del área de patata certificada como sana.

Estas medidas y controles, entre otros, son en síntesis los exigidos por la CEE en régimen interior, mancomunado. Independientemente cada país debe poseer su propia normativa de control y certificación sanitaria de patata para siembra, en concordancia con las normas comunitarias.

Por otro lado, la CEE exige a los Estados miembros el obligado cumplimiento de una serie de controles y testajes del material de reproducción procedente de terceros países, a fin de evitar la introducción de la enfermedad en su territorio. Estas medidas contemplan el establecimiento y tipificación de las muestras de cada lote a importar y los métodos de análisis a efectuar.

7.3. MEDIDAS RELATIVAS A LA MANIPULACION Y CULTIVO

La legislación comunitaria contempla asimismo normas relativas a la manipulación del material de reproducción y a su cultivo, dejando en manos de cada Estado miembro cuantas medidas estime necesarias para contribuir a la erradicación de la enfermedad.

Un factor importante en este capítulo es la utilización como material de reproducción, de patata certificada. A estos efectos, debería considerarse la utilización tanto para siembra como para consumo de patata certificada.

La principal fuente de contaminación de los tubérculos proviene de la práctica del troceado de éstos, utilizando cuchillos o instrumentos cortantes que constituyen, como ya se ha descrito, una vía de inoculación a partir de un solo tubérculo infectado. Esta práctica sería aconsejable que desapareciese a efectos sanitarios, de no ser así debería realizarse obligatoriamente con instrumentos desinfectados antes de efectuar cada corte.

A efectos de cultivo son importantes:

— El control de plagas, en especial el escarabajo de la patata.

— El desherbaje de los brotes de las parcelas y caminos.

— La limpieza total del terreno tras la recolección, evitando dejar plantas y tubérculos aislados.

— Es aconsejable establecer rotación de cultivos en las parcelas y la no utilización consecutiva durante años del cultivo de patata en una misma parcela.

Reviste especial importancia, según refleja la Directiva 80/665/CEE, la desinfección y limpieza de cuantos útiles, envases y almacenes estén en contacto o contengan tubérculos. Aparte de los ya citados instrumentos de corte para el troceado de tubérculos, de igual modo la maquinaria de siembra, labranza y recolección debe limpiarse y desinfectarse con productos adecuados, siendo necesario el mantenimiento más aséptico posible de envases, contenedores y almacenes de patata, pues en el manejo de grandes cantidades de tubérculos existe un alto riesgo de contaminación, al tiempo que se dan condiciones idóneas para su conservación en restos, deshechos y tierra desprendida.

7.4. DESINFECCION QUIMICA

Desde hace años se han emprendido estudios y ensayos sobre productos desinfectantes de maquinaria y equipo. Su adopción generalizada no ha tenido gran éxito debido a las costosas inversiones necesarias y a la dificultad que a veces representa su aplicación.

Aunque las prácticas de desinfección tales como el tratamiento eléctrico con calor,

calentamiento por agua, uso de antibióticos, aplicación de compuestos químicos y fumigaciones, han sido incapaces de eliminar la Podredumbre anular en los programas de certificación de patata, no es menos cierto que han reducido sensiblemente las pérdidas de cosecha en la producción de patata para consumo, (BONDE y JOHNSON, 1958; DYKSTRA, 1942; MACLACHLAN *et al.*, 1953; RICHARDSON y BUCKLAND, 1958).

La aplicación de algunos antibióticos ha dado buenos resultados en el control de la enfermedad, sin embargo en algunas ocasiones han causado fitotoxicidad y retraso en la expresión de los síntomas, teniendo un alto coste de aplicación. (Logsdon, 1961).

El hipoclorito de sodio, aunque ha sido utilizado para el control de la Podredumbre anular, su resultado no ha sido satisfactorio debido a su rápida degradación en presencia de la luz solar y de la materia orgánica, siendo corrosivo para las superficies metálicas de la maquinaria y equipo empleados (EASTON *et al.*, 1977, 1978).

Se han ensayado otros compuestos químicos como:

- Physan 20.
- N-alkil.
- Cloruro de dimetil-etil-benzil de amonio al 10%.
- Roccal II.
- Alcohol etílico al 1,25%.

Pero su utilización se ha visto limitada por diversas razones, estando hoy día en desuso.

Los productos químicos más utilizados para desinfección de los diferentes aperos, maquinaria y almacenes, actualmente, son:

Sacos	Oxido de etileno	80 gr/m ³ a) 24 horas a presión atmosférica b) 5 horas al vacío parcial
Maquinaria	Formaldehido	Al 10%
	Borato potásico	4.000-5.000 ppm de disolución saturada de cloro
	Cloruro mercurico	Al 2%
Almacenes y cobertizos	Sulfato de cobre	3 kg en 100 l de agua

En Estados Unidos viene empleándose el 8-quinoleato de cobre (C8Q), siendo un desinfectante relativamente no corrosivo, registrado en 1981, poseyendo una amplia gama

de aplicación en superficies contaminadas y en tubérculos de patata (EASTON G.D., 1978, 1985).

Legislación referente a la Podredumbre anular de la patata

En este capítulo se recopila una gran parte de la Legislación Fitosanitaria referente a la Podredumbre anular de la patata.

La legislación española al respecto, estaba basada en las normas de la Comisión Económica para Europa de las Naciones Unidas, hasta su integración en la CEE, en que, como Estado miembro, ha asumido toda su legislación.

8.1. LEGISLACION DE LA COMUNIDAD ECONOMICA EUROPEA

— Directiva del Consejo del 14 de junio de 1966 (66/403/CEE) sobre comercialización de plantas de patata.

(J.O. n.º 125 del 11 de junio de 1966).

— Directiva del Consejo del 21 de Diciembre de 1976 (77/93/CEE) sobre medidas de protección contra la introducción en los Estados miembros de organismos perjudiciales a vegetales o a productos vegetales.

(J.O. n.º L 26/10 del 31 de enero de 1977).

— Directiva del Consejo del 18 de marzo de 1980 sobre modificaciones de la Directiva 77/93/CEE.

(J.O. n.º L 100/32 del 17 de abril de 1980).

— Directiva del Consejo del 18 de marzo de 1980 (80/393/EWG) sobre modificaciones de los anexos de la Directiva 77/93/CEE.

(J.O. n.º L 100/35 del 17 de abril de 1980).

— Directiva del Consejo del 24 de junio de 1980 (80/665/CEE) sobre lucha contra la Podredumbre anular de la patata.

(J.O. n.º L 180 de julio de 1980).

— Directiva del Consejo del 12 de diciembre de 1983 (83/639/CEE) sobre aprobación de derogaciones previstas para Italia acerca de determinadas previsiones de la Directiva 77/93/CEE con respecto a patata de siembra originaria de Canadá.

Debido a su importancia, ya que la legislación española sobre Podredumbre anular en la patata se remite a ella, adjuntamos a continuación la traducción oficial de la directiva 80/665/CEE de la cual se han reflejado ya muchas de sus medidas, imprescindibles para el control y lucha contra la Podredumbre anular.

DIRECTIVA DEL CONSEJO

de 24 de junio de 1980
relativa a la lucha contra
la necrosis bacteriana
(80/665/CEE)

EL CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea y, en particular, sus artículos 43 y 100,

Vista la Propuesta de la Comisión (DO n.º C 175 de 23-7-1977, p. 2).

Visto el dictamen del Parlamento Europeo (DO n.º C 266 de 7-11-1977, p. 45).

Considerando que la producción de patatas ocupa un lugar importante en la agricultura de la Comunidad; que los organismos nocivos comprometen constantemente el rendimiento de dicha producción;

Considerando que la protección del cultivo de patatas contra la introducción de dichos organismos nocivos no sólo es necesaria para el mantenimiento del rendimiento, sino también para el incremento de la productividad de la agricultura;

Considerando que las medidas de protección contra la introducción de organismos nocivos en el territorio de un Estado miembro sólo tendrían un alcance limitado si al mismo tiempo no se combatieran dichos organismos metódicamente en el conjunto de la Comunidad y si no se hiciera lo necesario para evitar su propagación;

Considerando que uno de los organismos nocivos más peligrosos para la patata es *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. y Kotth.) Skapt. y Burkh., agente patógeno de la plaga bacteriana denominada «necrosis bacteriana de la patata»; que dicha plaga ha aparecido en una parte de la Comunidad y que subsiste algunos focos de infección de poca importancia;

Considerando que el cultivo de patata en toda la Comunidad corre un peligro permanente si no se adoptan medidas eficaces para impedir la aparición de la plaga, localizarla y dominarla a fin de lograr su erradicación y evitar su propagación;

Considerando que para alcanzar dicho objetivo, es imprescindible adoptar medidas mínimas para la Comunidad; que, además, los Estados miembros deben poder adoptar medidas complementarias o más rigurosas siempre que sean necesarias;

Considerando que las medidas mínimas deben tener en cuenta que la plaga puede permanecer latente y no apreciarse en patatas en fase de crecimiento o en tubérculos almacenados, por lo que sólo puede combatirse eficazmente mediante la producción y el uso de plántulas de patata exentas de

infección; que son necesarias para su localización encuestas oficiales sistemáticas; que la plaga no se propaga apenas o nada en patatas en fase de crecimiento que puede estar presente durante el invierno en plántulas procedentes de tubérculos olvidados (plántulas llamadas espontáneas); que se propaga principalmente cuando las patatas están en contacto con equipos de plantación, arranque y manipulación o con envases de transporte y almacenamiento contaminados por un contacto anterior con patatas infectadas; que dichos objetivos contaminados pueden seguir siendo infecciosos durante cierto tiempo después de una contaminación de ese tipo; que puede reducirse o evitarse la propagación de la plaga mediante la desinfección de dichos objetos;

Considerando que, tanto para la fijación de las modalidades de las medidas mínimas como para todas las demás medidas que adopten los Estados miembros para impedir la introducción de dicha plaga en su territorio, es deseable que los Estados miembros cooperen estrechamente con la Comisión en el seno del Comité fitosanitario permanente creado por la Decisión 76/894/CEE (DO n.º L 340 de 9-12-1976, p. 25).

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

La presente Directiva se refiere a las medidas mínimas que deberán adoptar los Estados miembros contra la necrosis bacteriana de la patata provocada por *Corynebacterium sepedonicum* (SPEICK. y KOTTH.) SHAPT. y BURKH., para:

- Evitar su aparición,
- Localizarla,
- Dominarla para su erradicación,
- Impedir su propagación.

Artículo 2

1. Los Estados miembros practicarán sistemáticamente encuestas oficiales relativas a la necrosis bacteriana de la patata en tubérculos de patata (*Solanum tuberosum* L.) recolectados, almacenados o comercializados en su territorio.

Dichas encuestas comprenderán al menos

inspecciones oficiales de carácter visual en partidas seleccionadas de las que se obtendrán muestras de tubérculos cortados.

2. Los Estados miembros garantizarán que la aparición supuesta y la presencia comprobada de la necrosis bacteriana en patatas en fase de crecimiento o en tubérculos recolectados, almacenados o comercializados se adviertan al servicio oficial encargado de la protección de los vegetales, el cual determinará, mediante una inspección al menos visual, incluida la inspección por corte de los tubérculos, si son necesarias otras investigaciones.

3. Si se apreciaren o sospecharen durante las inspecciones previstas en los apartados 1 y 2 síntomas de la presencia de necrosis bacteriana, se procederá a exámenes oficiales, de acuerdo con métodos adecuados, para confirmar la presencia o no de la plaga en las patatas o tubérculos contemplados en el apartado 2.

4. Cuando se sospeche la aparición de necrosis bacteriana en su territorio, el Estado miembro de que se trate garantizará mediante medidas adecuadas, hasta el momento en que se confirme o invalide la sospecha, que esté excluida una posible propagación de la plaga.

5. Se considerará contaminado un campo, un almacén, un envío o una partida cuando unas pruebas confirmen la presencia de la plaga en una sola plántula o tubérculo.

6. El servicio oficial del Estado miembro responsable de la protección de los vegetales determinará, basándose en principios científicos sólidos y en la biología de la plaga, la extensión de una contaminación.

7. Los Estados miembros informarán inmediatamente a los demás Estados miembros y a la Comisión de cualquier contaminación confirmada, y al menos una vez al año del resultado de las encuestas previstas en el apartado 1.

Los detalles de dicha información serán confidenciales. Se podrá consultar al Comité de acuerdo con el procedimiento previsto en el artículo 16 de la Directiva 77/93/CEE del Consejo, de 21 de diciembre de 1976, refe-

rente a las medidas de protección contra la introducción en los Estados miembros de organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales (DO n.º L 26 de 31-1-1977, p. 20).

8. Podrán adoptarse las disposiciones siguientes de acuerdo con el procedimiento previsto en el artículo 16 de la Directiva 77/93/CEE:

— Las modalidades de las encuestas e inspecciones previstas en el apartado 1, y que deberán realizarse de acuerdo con principios estadísticos y técnicos fundados,

— Los métodos adecuados para los exámenes oficiales previstos en el apartado 3,

— Los criterios y principios que deban tomarse en consideración para la determinación del alcance de la contaminación prevista en el apartado 6,

— Las modalidades de la información prevista en el apartado 7.

Artículo 3

1. Los Estados miembros dispondrán que, cuando se haya confirmado de acuerdo con el apartado 5 del artículo 2 una contaminación que pueda afectar a su producción de patatas, las plántulas de patatas sólo podrán recibir certificación, de acuerdo con la Directiva 66/403/CEE del Consejo, de 14 de junio de 1966, referente a la comercialización de plántulas de patatas (DO n.º 125 de 11-7-1966, p. 2320/66) si se hubieran obtenido en línea directa a partir de plántulas reconocidas como exentas de necrosis bacteriana en pruebas efectuadas oficialmente o bajo control oficial por métodos adecuados.

Las pruebas anteriormente contempladas se llevarán a cabo:

— En las plántulas del material clonal de partida, siempre que la contaminación afecte a la producción de plántulas de patata del Estado o los Estados miembros de que se trate,

— En otros casos, en muestras representativas de las plántulas de base o de las fases anteriores.

2. Podrán adoptarse las disposiciones siguientes de acuerdo con el procedimiento previsto en el artículo 16 de la Directiva 77/93/CEE:

— Decisiones que dispensen total o parcialmente a los Estados miembros individuales de las exigencias previstas en el apartado,

— El plazo de aplicación de las exigencias previstas en el apartado 1,

— Los métodos adecuados para las pruebas previstas en el apartado 1,

— Las modalidades de aplicación del guión primero del párrafo segundo del apartado 1,

— Las muestras representativas previstas en el guión segundo del párrafo segundo del apartado 1,

— Las precauciones que deberán adoptarse para que las plántulas de patata obtenidas a partir de plántulas probadas no se vean afectadas por la plaga.

Artículo 4

Los Estados miembros dispondrán que cuando un campo, un almacén, un envío o una partida se consideren contaminados, se practicarán inspecciones y pruebas en las condiciones previstas en los apartados 2 y 3 del artículo 2:

— En todos los cultivos de plántulas de patatas procedentes del mismo clon que el cultivo considerado de la unidad contaminada y en los que se sospeche, a causa de dicha relación clonal, la presencia de contaminación procedente de las plántulas madres,

— En todos los cultivos de plántulas de patatas que puedan haberse contaminado por contacto con objetos que, a su vez, puedan haberse contaminado.

Las inspecciones y exámenes previstos para los cultivos de plántulas de patata citados en el guión primero del párrafo primero se realizarán preferentemente por orden de grado de riesgo existente y, en caso de necesidad, se repetirán durante el año siguiente; afectarán a todos los cultivos de

plántulas de patatas que se consideren necesarios para determinar la fuente original probable y el alcance de la contaminación de las plántulas madres.

Artículo 5

1. Los Estados miembros dispondrán que las patatas procedentes de un campo, un almacén, un envío o una partida que se consideren contaminados no puedan cultivarse y deban manipularse o utilizarse de forma que se evite la propagación de la plaga o destruirse bajo el control del servicio oficial encargado de la protección de los vegetales.

Las patatas que se cultiven en las explotaciones en donde se considere contaminado un campo, almacén, envío o partida y que estén presentes en el momento de la comprobación de la contaminación, no podrán utilizarse como plántulas de patata en la explotación ni fuera de ésta.

2. Los Estados miembros dispondrán que, en un campo que se considere contaminado, quede prohibido cultivar patatas durante los dos períodos de vegetación siguientes a la comprobación de la contaminación y en tanto el campo considerado contenga plántulas espontáneas de patatas.

3. Los Estados miembros dispondrán que, en las explotaciones en donde se considere contaminado un campo, almacén, envío o partida, quede prohibido, durante el período de vegetación posterior a la aparición de la necrosis bacteriana:

— Plantar patatas para la producción de plántulas de patatas,

— Plantar patatas que no sean plántulas de patatas certificadas oficialmente y producidas en otra explotación.

4. Los Estados miembros dispondrán que los edificios, recipientes, materiales de embalaje, vehículos y aparatos de manipulación, selección o preparación, así como los demás aparatos que puedan haber estado en contacto con patatas de una unidad contaminada durante los seis meses anteriores, deban destruirse o limpiarse y desinfectarse antes de ponerse en contacto con otras pata-

tas, bajo el control del servicio oficial encargado de la protección de los vegetales.

5. Los Estados miembros dispondrán que el servicio oficial encargado de la protección de los vegetales delimite, durante un plazo mínimo de tres años después de la última comprobación de la contaminación, una zona que abarque la superficie en la que la necrosis bacteriana de la patata podría propagarse debido a la organización de las condiciones de producción en dicha superficie.

En la zona contemplada en el párrafo anterior, los Estados miembros:

— Se encargarán de la vigilancia, por el servicio oficial de la protección de los vegetales, de la explotación o explotaciones que se dediquen a la producción, el almacenamiento o la manipulación de patatas,

— Prohibirán el fraccionamiento de plántulas de patatas,

— Prohibirán la utilización de las sembradoras-transplantadoras del tipo «pricker»,

— Prohibirán el transporte de vegetales o tubérculos de patata, excepto cuando se hayan encontrado exentos de necrosis bacteriana en inspecciones y pruebas realizadas de acuerdo con los apartados 2 y 4 del artículo 2,

Adoptarán todas las demás medidas necesarias para dominar la necrosis bacteriana de la patata para erradicación y para prevenir su propagación.

Los Estados miembros adoptarán todas las medidas necesarias para combatir la necrosis bacteriana de la patata a fin de suprimirla en la zona y evitar su propagación fuera de ella.

6. Podrán adoptarse las disposiciones siguientes de acuerdo con el procedimiento previsto en el artículo 16 de la Directiva 77/93/CEE:

— Las modalidades relativas a la delimitación de la zona contemplada en el apartado 5,

— Las «demás medidas» mencionadas en el apartado 5.

7. De acuerdo con el procedimiento previsto en el artículo 17 de la Directiva 77/93/CEE, podrá autorizarse a un Estado miembro, si así lo solicitare, a admitir excepciones a los requisitos previstos en el primer guión del apartado 3 para partes determinadas de una explotación, siempre que aparezca descartada cualquier propagación de la plaga.

Artículo 6

Los Estados miembros prohibirán la tenencia de cultivos de *Corynebacterium sepedonicum* (SPIECK. y KOTTH.) SHAPT. y BURKH.

Artículo 7

Sin perjuicio del inciso i) de la letra c) del apartado 1 del artículo 14 de la Directiva 77/93/CEE, los Estados miembros podrán autorizar excepciones a las medidas contempladas en los artículos 4, 5 y 6 para fines de ensayos o científicos, así como para trabajos de selección varietal, siempre que dichas excepciones no obstaculicen la lucha contra la necrosis bacteriana de la patata ni supongan un peligro de propagación de dicha plaga.

Artículo 8

Los Estados miembros podrán adoptar medidas complementarias o más rigurosas para combatir la necrosis bacteriana de la patata o evitar su propagación, siempre que dichas medidas resulten necesarias a estos fines.

Artículo 9

1. Cuando un Estado miembro estime que existe un peligro inminente de introducción en su territorio de la necrosis bacteriana de la patata a partir de otro Estado miembro, podrá adoptar provisionalmente las medidas complementarias necesarias para prevenir dicho peligro.

Un Estado miembro podrá adoptar también medidas de ese tipo cuando otro Estado miembro le informe de una contaminación confirmada de acuerdo con el apartado 7 del artículo 2.

En ambos casos, el Estado miembro considerado comunicará sin demora a los demás estados y a la Comisión las medidas adoptadas, y adjuntarán a su comunicación una exposición de los motivos.

2. Se decidirá, de acuerdo con el procedimiento previsto en el artículo 17 de la Directiva 77/93/CEE, si deben suprimirse o modificarse las medidas adoptadas por un Estado miembro en aplicación del apartado 1. En tanto el Consejo o la Comisión no adopten una decisión de acuerdo con dicho procedimiento, el Estado miembro interesado podrá mantener las medidas que haya adoptado.

Artículo 10

Los Estados miembros aplicarán, a más tardar el 1 de marzo de 1981, las medidas necesarias para cumplir la presente Directiva, e informarán de ello inmediatamente a la Comisión.

Artículo 11

Los destinatarios de la presente Directiva serán los Estados miembros.

Hecho en Luxemburgo el 24 de junio de 1980.

Por el Consejo
El presidente
S. FORMICA

8.2. LEGISLACION NACIONAL

5454

ORDEN de 28 de febrero de 1986 relativa a la prevención y lucha contra el marchitamiento bacteriano de la patata, en aplicación de la Directiva 80/665/CEE del Consejo de las Comunidades Europeas. (BOE 1 de marzo de 1986).

Ilustrísimo señor:

En aplicación del artículo 392 del Acta relativa a las condiciones de adhesión del

Reino de España y de la república Portuguesa y a las adaptaciones de los Tratados y de acuerdo con lo previsto en la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas 80/665/CEE, de 24 de junio de 1980, relativa a la lucha contra el marchitamiento bacteriano de la patata, producida por el agente patógeno «*Corynebacterium sepedonicum*» (Spieck. et Kotth.) Skapt. et Burkh., y teniendo en cuenta que esta enfermedad hasta el momento no ha sido detectada en los cultivos de patata de España.

Este Ministerio, a propuesta de la Dirección General de la Producción Agraria, ha tenido a bien disponer:

Primero.—Se declaran de aplicación obligatoria en todo el territorio nacional las medidas mínimas que se prevén en la Directiva 80/665/CEE, del Consejo de las Comunidades Europeas, para la lucha contra el agente patógeno «*Corynebacterium sepedonicum*» (Spieck. et Kotth.) Skapt. et Burkh., productor de la enfermedad conocida por marchitamiento bacteriano de la patata, y con objeto de prevenir su aparición, localizar los posibles focos de introducción, de su erradicación y prevención de su propagación.

Segundo.—Se declaran de interés estatal las campañas de vigilancia y prevención derivadas de la aplicación de las medidas mínimas a que se refiere el punto primero.

Tercero.—El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación colaborará con las Comunidades Autónomas en los planes anuales de actuación y con la asignación de recursos presupuestarios que correspondan.

Cuarto.—La presente Orden entrará en vigor el día 1 de marzo del año en curso.

Lo que comunico a V.I.

Madrid, 28 de febrero de 1986.

ROMERO HERRERA

Ilmo. Sr. Director general de la Producción Agraria.

BIBLIOGRAFIA

- APPEL, O. 1906. Neuere untersuchungen uber kartoffel and tomatenerkrankungen. Jahresber verh angew. Bot. 3, 122-136.
- BARZIC, M.R.; TRIGALET, A. 1982. Détection de *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh). Dowson par la technique ELISA. *Agronomie* 2 (4), 389-398.
- BERCKS, R. 1967. Metodische untersuchungen uber den serologischen nachweis pflanzenpathogener viren mit dem Bentonit-Flodeungster, dem latex-test und dem bariumsulfat test. *Phytopathol. Z.*, 58, 1-17.
- BERGEY, D.H. y otros. Bergey's manual of determinative bacteriology. 1974 - edición n.º 8. R.E. BUCHANAN and N.E. GIBONS. *The Williams and Wilkins BALTIMORE*.
- BERGEY, D.H. y otros. Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume (I), 1984, Volumen (2) 1986. *The Williams and Wilkins*.
- BLAGADAROV, V.A. 1952. Le diagnostic des flétrissements bacterien sur le terrain. Diagnosis of potato ring rot in the field. *Selekcija i Semenovodstvo*, 9.
- BONDE, R. 1939. Bacterial wilt and soft-rot of the potato. *Am. Potato Journal*, 16, 109-114.
- BONDE, R.; JOHNSON, B. 1958. Studies on the additive effect of streptomycin sulfate on different seed potato desinfectants for the control of bacterial ring-rot. *Plant Disease Reporter* 42, 781-784.
- BORDELEAU, L.M.; LACHANCE, R.A. 1968. Exigences en sels minéraux de *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. y Koth.) Skapt. y Burkh. *Canadian Journal of Microbiology*, 14, 467-473.
- BRADBURY, J.F. 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Pl. Path.* 49, 213-218.
- CALZOLARI, A.; BAZZI, C.; MAZZUCCHI, U. 1982. Cross reactions between *Corynebacterium sepedonicum* and *Arthrobacter polychromogenes* in immunofluorescence staining. *Pot. Res.*, 25, 239-246.
- CARLSON, R.R.; VIVADER, A.K. 1982. Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins. *Ent. J. Syst. Bacteriol.* 32: 315-326.
- CLAFLIN, L.E.; SHEPARD, J.F. 1977. An agglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium sepedonicum*. *American Potato Journal*, 54, 331-338.
- CLAFLIN, L.E.; UYEMOTO, J.F. 1977. An agglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium sepedonicum*. *American Potato Journal*, 54, 331-338.
- CLAFIN, L.E.; UYEMOTO, J.K.; SECOR, G.A. 1978. Serodiagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* by enzyme linked immunosorbent assay. *Phytopathol. News*, 12, 156.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34, 475.
- CMI (COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE). *Distribution Maps Plant Diseases*. 1965 - 3th edition 1972 - 4th edition 1983 - 5th edition
- COONS, A.H.; CREECH, H.S.; JONES, R.N. 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47, 200-202.
- CROWLEY, C.F.; DE BOER S.H. 1982. Nonpathogenic bacteria associated with healthy potato stems cross-react with *Corynebacterium sepedonicum* antisera in immunofluorescence. *Am. Pot. J.*, 59, 1-8.

- DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G. Jr.; VIVADER, A.K.; HARRIS, R.W. 1984. Clavibacter A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including Clavibacter xyli subsp. xyli sp. nov., subsp. nov. and Clavibacter xyli subsp. cynodontis subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 107-117.
- DAVIS, M.J. 1986. Taxonomy of plant-pathogenic coryneform bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 115-140.
- DE BOER, S.H.; COPEMAN, R.J. 1974. Endophytic bacteria flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Canadian Journal Plant Science*, 54, 115-122.
- DE BOER, S.H.; COPEMAN, R.J. 1980. Bacterial ring rot testing with the indirect fluorescent antibody staining procedure. *Am. Potato J.* 57, 457-465.
- DE BOER, S.H. 1983. Evaluation of an agar immunodiffusion procedure for confirming bacterial ring rot diagnoses. *Am. Potato J.* 60: 661-669.
- DE BOER, S.H.; SLACK, S.A. 1984. Current status and prospects for detecting and controlling bacterial ring rot of potatoes in North America. *Plant Disease*, 68 (10), 841-844.
- DE BRUYNE, E.; VANTOMME, R.; VAN VAERENBERCH, J.; SWINGS, J.; DE LEY, J. 1986. Evaluation of the identification procedure of *Corynebacterium sepedonicum*. The causal agent of Ring rot in Potatoes. *Med. Fasc. Landbouww. Rijksuniv. Gent*. 51/3 b, 1347-1350.
- DINESEN, I.G. 1984. The extraction and diagnosis of *Corynebacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. *EPPO Bulletin*, 14 (2), 147-152.
- DOETSCH, R.N. 1981. Determinative methods of light microscopy. In: Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, 21-23.
- DOUNINE, M.S. 1960. *Corynebacterium sepedonicum* en Unión Soviétique. Pathogénese, diagnostic et lutte. Rapport de la Conférence Internationale de Paris sur *Corynebacterium sepedonicum* et *Pseudomonas solanacearum*. O.E.P.P. - Paris - 76 pp.
- DUNCAN, J.; GENEREUX, H.; COUTURE, G.R. 1958. Indice de transmission de la flétrissure bactérienne par le doryphore. *Rep. Quebec Soc. Prot. Pl.*, 40, 88-90.
- DUNCAN, J.; GENEREUX, H. 1980. La transmission par les insectes de *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. y Kotth.) Skaptason et Burkholder. *Can. J. Plant. Sci.*, 40, 110-116.
- DYE, D.W.; KEMP, W.J. 1977. A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. *N.Z.J. Agric. Res.* 20, 563-582.
- DYSTRA, T.P. 1941. Results of experiments in control of bacterial ring-rot potatoes in 1940. *Am. Potato Journal*, 18, 27-55.
- DYKSTRA, T. P. 1941. Results of experiments in control of potato ring-rot in 1941. *Am. Potato Journal*, 19, 175-196.
- EASTON, G.D.; NAGLE, M.E.; BAILEY, D.L. 1977. Chemical control of ring-rot bacteria contaminating wooden metal and seed piece surfaces. 16th. Annual Washington State Potato Conference. Washington State Potato Commission, 3-10.
- EASTON, G.D. 1978. Chemical control of ring rot bacteria contaminating wooden, metal and potato seed piece surfaces. *Am. Potato J.*, 55, 374.
- EASTON, G.D. 1979. The biology and epidemiology of potato ring rot. *Am. Potato J.*, 56, 459-460 (Abstr.).
- EASTON, G.D. 1985. Copper 8-Quinolate for control of *Corynebacterium michiganense* *pv. sepedonicum* on potato seed pieces and handling equipment. *Plant Disease*, 69 (5), 422-425.
- EPPO. 1961. Rep. Int. Conf. on *Corynebacterium sepedonicum* and *Pseudomonas solanacearum*. Paris 1960. EPPO Public. Ser. n.º 31, 76 pp.
- EPPO. 1978. *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. & Kotth.) Skaptason & Burkholder. EPPO List A2.
- FRAZZOLI, S.; MAZZUCHI, U.; BAZZI, C. 1984. Evidence against plant to plant transmission in the field of *Corynebacterium sepedonicum* in the Po Valley, Italy. *Phytopath. mediterranea*, 23, 77-78.
- HOOKE, W.J. 1980. La pudrición anular. Compendio de enfermedades de la papa. Centro Internacional de la Papa (CIP).
- HUGH, R.; LEIFSON, F. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *J. Bact.* 66, 24-26.
- IKIN, G.J.; HOPE, H.J.; LACHANCE, R.A. 1978. Des acides aminés stimulateurs et inhibiteurs a la croissance de *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. & Kotth., Skapt. y Burk.) dans des milieux synthétiques. *Can. J. Microbiol.*, 24, 1087-1092.
- IVERSON, V.E.; KELLY, H.C. 1940. Control of

- bacterial ring rot of potatoes with special reference to the ultra violet light method for selecting disease-free stock. *Bull. Mont. Agric. Exp. Stu.* 386, 1940. Páginas, 1-15.
- IVERSON, V.E.; HARRINGTON, F.M. 1942. Accuracy of the ultraviolet light method for selecting ring rot free potato seed stocks. *Am. Potato J.* 19, 71-74.
- KALTZNELSON, H.; SUTTON, M.D. 1956. Laboratory detection of *Corynebacterium sepedonicum*, causal agent of bacterial ring rot of potatoes. *Can. J. Bot.*, 34, 48-53.
- KOVACS, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature, London*, 178, 703.
- LACHANCE, R.O.; PERRAULT, C.; LACHANCE, R.A. 1962. L'indexage des tubercules de pomme de terre en vue de déceler la flétrissure bactérienne (*Corynebacterium sepedonicum*). *Can. J. Microbiol.*, 8, 65-70.
- LANSADE, M. 1950. Flétrissement bactérien et comportement des variétés de pomme de terre. *Pomme de Terre Française*, 13.
- LARSON, R.H. 1944. The ring rot bacterium in relation to tomato and egg plant. *J. Agric. Res.* 69, 309-325.
- LAZAR, I. 1968. Serological relationships of *Corynebacteria*. *J. gen. Microbiol.* 52, 77-88.
- LELLIOT, R.A. 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. *J. Appl. Bact.*, 29, 114-118.
- LELLIOT, R.A.; BILLING, E.; HAYWARD, D.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bact.*, 29, 470-489.
- LELLIOT, R.A.; SELLAR, P. 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum*, Spieck. & Koth.) Skapt. & Burkh. in potato stocks. *EPPO Bull.* 6 (2), 101-106.
- LIST, G.M.; KREUTZER, W.A. 1942. Transmission of the causal agent of the ring rot disease of Potatoes by insects. *J. Econ. Entomol.*, 35 (3), 455-456.
- LOGSDON, C.E. 1961. Antibiotics and potato ring rot in Alaska. *Am. Pot. J.* 38, 1-5.
- MAC LACHLAN, D.S.; THATCHER, F.S. 1951. Studies in the nutrition of *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. & Koth.) Skapt. & Burkh. *Canad. J. Bot.*, 29, 246-259.
- MAC LACHLAN, D.S.; MONRO, A.V.; RACICOT, H.N.; KING, J.E. 1975. Fumigation of used bags with toxic gases for control of bacteria ring rot of potato. *Can. J. Agric. Sci.* 33, 132-140.
- MAGROU, J. 1937. *Phytomonas sepedonica* (Spieck.) n. comb. In Handuroy et al Editors. Dictionnaire des bacteries pathogenes. Masson et Co. Paris, pp. 411.
- MANZER, F.E.; SLACK, S.A. 1979. Report of the pathology section committee on bacterial ring rot diagnosis. *Am. Potato J.*, 56, 551-555.
- MAZZUCCHI, U.; BAZZI, C.; CALZOLARI, A. 1983. Diagnosi del marciume anulare della patata. *Informatore Fitopatologico*, 23 (5), 26-36.
- MILLER, H.J. 1984. Cross reactions of *C. sepedonicum* antisera with soil bacteria associated with potato tubers. *Neth. J. Pl. Path.* 90, 23-28.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION (MAPA). 1985. El sector hortofrutícola español. Una panorámica actual. *Dirección General de la Producción Agraria*.
- NELSON, G.A.; TORFASON, W.E. 1974. Association effects of leaf roll and ring rot on disease expression and yield of potatoes. *Am. Potato J.* 51, 12-15.
- NELSON, G.A. 1979. Persistence of *Corynebacterium sepedonicum* in soil and in buried potato stems. *Am. Potato J.* 56, 71-77.
- NELSON, G.A. 1980. Long-term survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces and in infected potato stems. *Am. Potato J.* 57, 595-600.
- O'BRIEN, M.J.; RICH, A.E. 1976. Potato diseases. *U.S. Dep. Agric. Handb.*, 474.
- OLSSON, K. 1976. Experience of ring-rot caused by *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. & Koth.) Skapt. & Burkh. in Sweden. Particularity detection of the disease in its latent form. *EPPO Bull.*, 6(4), 209-219.
- OUTCHERLONY, O. 1949. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progr. in Allergy*, 5, 1-78.
- PAQUIN, R.; PELLETIER, G. 1966. Etude du pH des milieux de culture synthétiques et naturels en fonction de la résistance des pommes de terre au flétrissement bactérien. *Phytoprotection*, 47, 95-103.
- PAQUIN, R.; PELLETIER, G. 1969. Etude du rôle des sucres dans la résistance des pommes de terre au flétrissement bactérien. *Can. J. Microbiol.*, 15, 907-916.
- PAQUIN, R.; LACHANCE, R.A. 1970. Sur la nutrition aminée de *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. & Koth.) Skapt. & Burkh. et la résistance de la pomme de terre au flétrissement bactérien. *Can. J. Microbiol.* 16, 719-726.

- RAMAMURTHI, C.S. 1959. Comparative studies on some gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. *Mem. Cornell Agric. Exp. Sta.*, 366, 52 pp.
- RICH, A.E. 1968. Potato diseases. In «Potatoes: Production, Storing, Processing» (O. Smith), 397-437. Avi. Publ. Westport, Connecticut.
- RICH, A.E. 1983. Potato diseases. *Academic Press. Ed.*
- RICHARDSON, L.T.; BUCKLAND, C.T. 1958. Eradication of ring rot bacteria from contaminated potato bags by moist heat treatment. *Plant. Dis. Rep.*, 42, 241-245.
- SAMSON, R.; POUTIER, F. 1979. Comparaison de trois méthodes d'identification de *Corynebacterium sepedonicum* dans les tubercules de pomme de terre. *Potato Research.*, 22, 133-147.
- SAVILE, D.B.O.; RACICOT, H.N. 1937. Bacterial Wilt and Rot of Potatoes. *Sci. Agric.* 17, 518-522.
- SHEPARD, J.E.; CLAFLIN, L.E. 1975. Critical analyses of the principles of seed potato certification. *Ann. Rev. of Phytopathology*, 13, 271-293.
- SKAPTASON, J.B.; BURKHOLDER, W.H. 1942. Classification and nomenclature of the pathogen causing bacterial ring rot of potatoes. *Phytopathology*, 32, 439-441.
- SKERMAN, V.B.D. 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2nd. ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- SLACK, S.A.; SANFORD, H.A.; MANZER, R.E. 1979. The latex agglutination test as a rapid serological assay for *Corynebacterium sepedonicum*. *Am. Pot. J.*, 56, 441-446.
- SMITH, E.F. 1920. An introduction to bacterial diseases of plants. *W.B. Saunders, Philadelphia*, pp 1-688.
- SNEATH, P.H.A.; COLLINS, V.G. 1974. A study in test reproducibility between laboratories: report of a *Pseudomonas* working party. *Antonie van Leeuwenboek*, 40, 481-527.
- SPIECKERMANN, A.; KOTTHOFF, P. 1914. Untersuchungen über die kartoffelpflanze und ihre Krankheiten. I. *Die Bakterienringfäule der kartoffelpflanze. Landw. Jahrb.*, 46, 659-732.
- STAPP, C. 1956. Maladies bactériennes. *Eu Handbuch für Pflanzenkrankheiten*. Vol. II (2), 391-419.
- STROBEL, G.A.; RAI, P.V. 1968. A rapid serodiagnosis test for potato ring rot. *Plant. Dis. Rep.* 52, 502-504.
- TIPOGRAF, D.Y. 1942. (A rapid method of diagnosing ring rot of potato). Doklady Vsesoyuznoi akademii sel'sko-khozyaistvennykh nauk im. V.I. Lenin, 15, 35-38. *Abs. in Rev. applied. Mycol.* 21, 40, 1972.
- VAN VUURDE, J.W.L.; VAN HEUTEN, C. 1983. Immunosorbent immunofluorescence microscopy (ISIF) and immunosorbent dilution-plating (ISDP): New methods for the detection of plant pathogenic bacteria. *Seed Science and Technology*, 11, 523-533.
- VAVILOV, N.I. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. (Traducción de K.S. Chester) 364 p. N.Y.
- VRUGGINK, H. 1978. Enzyme linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of plant pathogenic bacteria. *Proc. 4th. Int. Conf. Plant. Path. Bact., Angers.*, 307-310.
- WALKER, J.C. 1965. Patología Vegetal. Ediciones Omega.
- WARREN, H.L.; HOOKER, W.J. 1962. Tomato infection for verification of gram stain test in routine identification of ring rot. *Am. Potato J.*, 39, 397 (Abstract.).

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION
DIRECCION GENERAL DE LA PRODUCCION AGRARIA
SUBDIRECCION GENERAL DE SANIDAD VEGETAL

CORYNEBACTERIUM SEPEDONICUM
(Spieck. y Kotth.) Skapt. y Burkh.

agente productor de

LA PODREDUMBRE ANULAR
DE LA PATATA

Fuera de Serie n.º 9

Cristina Noval Alonso (*)
Ramón Fisac Pedrajas (**)
Jesús Fresno Pérez (**)
Serafina Castro Robleda (**)

(*) SUBDIRECCION GENERAL DE SANIDAD VEGETAL.
(**) INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRARIAS.

*La responsabilidad por las opiniones emitidas
en esta publicación corresponde, exclusivamente,
a los autores de las mismas.*

Edita: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
Secretaría General Técnica
NIPO: 251-87-099-0
ISBN: 84-7479-615-6
Depósito legal: M. 37.824-1987
Imprime: Gráficas Monterreina, S. A.
Avda. de Córdoba, 15. 28026 Madrid.



**PUBLICACIONES DEL
MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACION
SECRETARIA GENERAL TECNICA
Centro de Publicaciones
Paseo de Infanta Isabel, 1 - 28014 Madrid**