

DETERMINACION *IN VITRO* DE LA SENSIBILIDAD TÉRMICA DE CEPAS DE *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*, AGENTE CAUSAL DE LA BACTERIOSIS VASCULAR DE LA YUCA

José Alfredo Ramírez B.¹, Elizabeth Alvarez B.¹ y Fernando Marmolejo De la T.²

¹Patología de Yuca, CIAT. A.A. 6713 Cali (Valle), Colombia.

²Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira.

95908

RESUMEN

La bacteriosis vascular de la yuca (CBB, del inglés Cassava Bacterial Blight) es una de las enfermedades más limitantes de la producción en este cultivo en el mundo entero. El agente causal es la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*. Al establecer plantaciones a partir de semilla infectada se han reportado pérdidas hasta del 80 %, de ahí la necesidad de obtener material de siembra sano. Desde principios de siglo se han implementado tratamientos con agua caliente sobre diversos materiales de propagación portadores de pestes y enfermedades. En el presente estudio se evaluó la sensibilidad térmica *in vitro* de diferentes cepas e colectadas en tres zonas ecológicas de Colombia y una de África. Por medio de un análisis de regresión se establecieron las condiciones de tratamientos para los cuales se obtiene una inactivación completa del crecimiento bacteriano. De la misma forma, se estudió el comportamiento de mortalidad en función de las variables temperatura y tiempo de tratamiento. Con los resultados obtenidos se discutió la posibilidad de probar la inhibición *in vivo* de *X. axonopodis* pv *manihotis* y eventualmente el establecimiento de una metodología para limpiar la semilla vegetativa de yuca de este patógeno mediante termoterapia.

Palabras claves: Bacteriosis vascular de la yuca, termoterapia, *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*.

SUMMARY

Cassava Bacterial Blight (CBB) is a destructive disease present in almost all the cassava-growing regions. CBB is caused by the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*. If environmental conditions are favorable and control measures are not adopted, losses can reach 80% in only three crop cycles after incidence started. Furthermore, losses correlate with the number of infected cuttings used for planting. Heat treatment of planting material is a common technique used to control certain plant diseases. Thermotherapy inactivates or kills a pathogen while leaving the host tissue undamaged. In the present study, the thermal sensitivity of different *X. axonopodis* pv *manihotis* strains was established. Strains were collected in three edaphoclimatic zones (ECZ) in Colombia and one in Africa. Using a regression analysis, the ideal conditions for total growth inhibition were evaluated. In the same way, the growth development was assessed when changing the temperature and time of heat treatment. Using the results obtained we discussed the possibility of testing *in vivo* inhibition and the establishment of a protocol to clean the vegetative material using thermotherapy.

Keywords: Cassava Bacterial Blight, thermotherapy, *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*

INTRODUCCIÓN

La yuca, *Manihot esculenta* Crantz, es uno de los cultivos más importantes para la producción de carbohidratos en el trópico. La producción mundial de raíces se ha estimado en 120 millones de toneladas anuales, de las cuales Colombia produce cerca de dos millones de toneladas. El promedio de producción mundial es de 9 tn/ha aun cuando se han obtenido producciones superiores a 40 tn/ha. Si se comparan los rendimientos obtenidos por cultivadores tradicionales, con los obtenidos en centros experimentales o por productos tecnificados, las diferencias en producción son muy grandes. Un alto porcentaje de esta diferencia es debida a la presión ejercida por patógenos del cultivo, aunque otros problemas bióticos o abióticos también pueden reducir severamente los rendimientos (Lozano, 1989).

La bacteriosis vascular de la yuca (CBB, del inglés Cassava Bacterial Blight) es uno de los factores limitantes más importantes en la producción de yuca en el mundo entero. El agente causal de esta enfermedad es *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* (Bondar, 1912), nombre propuesto por Vauterin *et al.* en 1995. Este microorganismo gram-negativo,

es un bastón recto con presencia de un flagelo polar; aeróbico estricto no reductor de nitratos. Su crecimiento óptimo se presenta entre 25 a 30°C, siendo las colonias circulares y de color blanco-marfil. Estudios de patogenicidad y de diversidad genética, por medio de técnicas de biología molecular han permitido demostrar que la variabilidad de la bacteria es elevada en América del Sur, centro de origen y domesticación de la yuca, y más reducida en África y Asia (Verdier *et al.*, 1993).

X. axonopodis pv *manihotis* induce una gran variedad de síntomas en la planta: a) manchas angulares translúcidas en las hojas, las cuales pueden coalescer y formar manchas necróticas. b) exudación de goma, c) en segmentos no lignificados del tallo se presentan manchas de color verde oliva y chancros y d) en individuos fuertemente afectados se presenta la muerte descendente de la planta (Lozano & Sequeira, 1974).

El ciclo de la bacteria se caracteriza por la alternancia de 2 fases; una fase parasitaria en época de lluvias y una fase de supervivencia en época seca (Daniel, 1991). Durante el proceso de infección, en la fase parasitaria, la bacteria puede encontrarse en dos estados: un primer ciclo epífita y un segundo ciclo sistémico.

Las pérdidas inducidas por CBB varían en el mundo, pudiendo ser muy altas. Cuando se siembran estacas provenientes de un campo infectado en un campo libre del patógeno las pérdidas pueden alcanzar 30%. Si las condiciones del medio son favorables y si no son adoptadas medidas de control apropiadas, las pérdidas pueden alcanzar 80% en tres ciclos sucesivos de cultivo (Lozano, 1986). En Colombia la mayor incidencia y severidad se observa en los Llanos Orientales y en la Costa Norte de donde hay registros de plantaciones de más de 100 ha con pérdidas hasta del 90% (Laberry & Martínez, 1994). En general las pérdidas están relacionadas con el número de estacas infectadas usadas en la siembra.

Las pérdidas debidas a CBB han sido reducidas gracias a una combinación de prácticas culturales, métodos de control biológico y medidas de saneamiento de material; sin embargo el método de control preferido en la actualidad es el uso de variedades resistentes. Tratamientos con agua caliente por distintos períodos de tiempo han sido utilizados desde la segunda década de este siglo para tratar bulbos, semillas y otros materiales de propagación portadores de pestes y enfermedades (Elad & Volpin, 1991). La termoterapia es un sistema que permite eliminar, en una forma

rápida, patógenos del material de propagación. Además es ambientalmente compatible, de bajo costo, permitiendo tratar gran cantidad de semilla vegetativa al mismo tiempo. Los microorganismos parásitos son generalmente sensibles a la muerte térmica debido a que tienen sistemas enzimáticos más especializados que los de los microorganismos saprófitos (Baker, 1962). Esto se relaciona con que uno de los probables mecanismos de la muerte térmica es la desnaturalización enzimática.

Los objetivos del presente estudio fueron: establecer el efecto de distintas temperaturas para la inactivación *in vitro* de *X. axonopodis* pv *manihotis*., determinar el tiempo y temperatura necesarios para inhibir las distintas cepas bacteriales, examinar su sensibilidad térmica y relacionarla con características tales como el origen geográfico o el nivel de patogenicidad. Los resultados obtenidos a través de este estudio podrán ser utilizados para realizar ensayos de inhibición *in vivo* y así determinar la posibilidad de reducir la diseminación de CBB, limpiando la semilla vegetativa mediante termoterapia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacteriales

En este estudio se utilizaron cinco cepas previamente caracterizadas tanto patogénica (Restrepo & Verdier, 1997) como genéticamente, aisladas en diferentes ecozonas (ECZ) (CIAT, 1987) de Colombia y de diferentes hospederos (Tabla 1).

Para los tratamientos de termoterapia, las cepas se recuperaron de la colección de CIAT-ORSTOM, almacenadas a -80°C en glicerol al 60 %. El incremento se llevó a cabo en medio LPGA (5 g/l de levadura, 5 g/l de peptona, 5 g/l de glucosa y 15 g/l de agar), ajustando el pH a 7,2

Tabla 1. Cepas de *X. axonopodis* pv *manihotis*, origen geográfico, el hospedero del cual fue aislada y el índice de enfermedad

Cepa	País	EcZ ¹	Hospedero	ÍE ²
CIO-46	Col	2	CM 6787-	5,0
CIO-12	Col	5	SM 600-	5,0
CIO-81	Col	1	19 MBra-886	4,3
CIO-188	Col	5	MCol 1522	1,0
X-27	Togo	7	Desconoc.	4,3

¹ ECZ1, trópico sub-húmedo (costa atlántica); ECZ2, sabanas de suelo ácido (llanos orientales); ECZ5, trópico de altura (cauca); ECZ7, semiárido (Africa). ² La patogenicidad se evaluó según Restrepo & Verdier, 1997

Determinación de la sensibilidad térmica

Para la determinación de la sensibilidad térmica se siguió el procedimiento ilustrado en la figura 1. Las cepas bacteriales fueron incubadas a 30°C por 17 horas. Para cada una, las colonias se resuspendieron en 1000 µl de agua bidestilada estéril en tubos para microcentrifuga estériles y agitando en vortex con el fin de separar las células bacteriales de materias extrañas como restos de medio y desechos celulares. Las bacterias se lavaron una vez por centrifugación a 12000 rpm durante 11 min, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado en un volumen de 200 µl de agua bidestilada estéril. De esta suspensión se tomó una alícuota y se llevó a 10ml de buffer fosfato estéril a 0,1 M (K₂HPO₄: 71,7; KH₂PO₄: 28,3 ajustando el pH a 7,2) la concentración de bacterias se ajustó en 10⁸ ufc/ml (unidades formadoras de colonia/ml), lo cual se estableció por espectrofotometría y equivale a 0,12 de absorbencia a 600 nm.

La suspensión de bacterias en el buffer fosfato se envasó en tubos de ensayo de 50 ml con tapa, los cuales se sumergieron en baño maría con flujo constante de agua ajustado a la temperatura de tratamiento deseada., según las temperaturas programadas (Tabla 2).

En cada combinación temperatura/tiempo se realizaron tres repeticiones, de igual manera

Tabla 2. Temperatura de tratamiento para cada una de las cepas de *X. axonopodis* pv *manihotis* estudiadas

Cepa	Rango de Temperatura °C
CIO-46	50-53
CIO-81	49-52
CIO-12	48-51
CIO-188	47-50
X-27	47-51

se tuvieron tres repeticiones para el control de crecimiento a 30°C. Los tiempos de trata-

miento para todos los casos fueron 15, 30, 45, 60 y 120 minutos.

De las suspensiones bacterianas tratadas o testigos se tomaron alícuotas para cada tratamiento temperatura/tiempo y se procedió a hacer diluciones para la posterior cuantificación. Se pipetearon 200 µl de cada solución de buffer fosfato tratada en tubos para microcentrifuga estériles, éstas fueron consideradas las diluciones iniciales (10⁰). De la dilución inicial se tomaron 5 µl y se llevaron a un volumen final de 500 µl (dilución 10⁻²) y así sucesivamente hasta alcanzar un factor de dilución de 10⁻⁸. De cada dilución se sembraron en cajas de petri con medio LPGA, 3 gotas de 10 µl. Las cajas fueron incubadas a 30°C por 48 horas, al cabo de las cuales se procedió a hacer el conteo de las ufc que germinaron. Cada ensayo o combinación cepa/temperatura/tiempo tuvo 9 repeticiones..

Análisis de datos

Para cada una de las cepas bacteriales se realizó el conteo del número de ufc antes y después de cada tratamiento (combinación temperatura/tiempo) para estimar el efecto de la temperatura y del tiempo sobre la viabilidad de las cepas.

Para cada una de las repeticiones en cada uno de los tratamientos se contaron las colonias y luego se realizó el cálculo de las ufc por mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución en el cual se realizó el conteo. Con base en esta cuantificación, se calculó la probabilidad de muerte (PMT) de las bacterias, según la siguiente ecuación:

$$PMT = (CI - CF) / (CI)$$

en donde CF es concentración final y la concentración inicial (CI) corresponde al número de ufc/ml antes de iniciar el tratamiento.

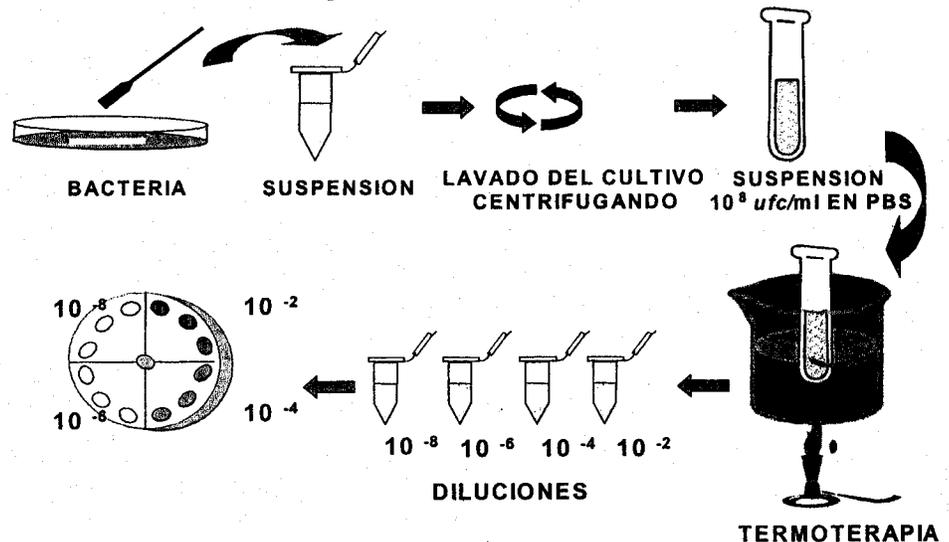


Figura 1. Procedimiento para la determinación de la sensibilidad térmica de las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* estudiadas

Esta concentración se estimó por cuantificación en platos de cultivo con medio LPGA por cuantificación de las *ufc/ml* presentes en la suspensión inicial en buffer fosfato. La concentración debe estar cercana a 10^8 *ufc/ml* según se estableció por espectrofotometría. El resultado de la cuantificación se multiplicó por el número de repeticiones y así se obtuvo el valor la concentración inicial.

La concentración final se obtuvo sumando las cuantificaciones (*ufc/ml*) de las 9 repeticiones luego de tratar cada cepa en los tubos con buffer fosfato. A su vez, los porcentajes de mortandad se utilizaron para graficar las superficies de respuesta para cada cepa en función de la temperatura y tiempo de tratamiento (Figura 2) Estas superficies representan de forma gráfica el efecto de la temperatura, el efecto del tiempo y el efecto de la interacción entre la temperatura y el tiempo sobre la viabilidad de las bacterias. Posteriormente, las superficies de respuesta fueron analizadas por el procedimiento RSREG de SAS; dicho procedimiento ajusta un modelo cuadrático de superficie-respuesta que es útil para la búsqueda de valores que optimicen una respuesta, que en el caso de este estudio es la probabilidad de muerte de las bacterias. Además, se obtiene una prueba de bondad de ajuste del modelo y soluciones para los valores críticos de la superficie, es decir, los valores de temperatura y tiempo para los cuales la PMT alcanza su valor máximo (SAS Institute

primera aparición de cero crecimiento bacterial.

Los tratamientos más prolongados que presentaron total inhibición de crecimiento, fueron descartados con el fin de evitar algún sesgo en el análisis de regresión. Las temperaturas críticas obtenidas mediante este análisis se compararon con las obtenidas mediante el procedimiento RSREG de SAS mediante prueba t con una probabilidad crítica del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el presente estudio se determinó el efecto de la temperatura y el tiempo de tratamiento con calor sobre la viabilidad de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en cultivos *in vitro*. Esto se realizó con la perspectiva final de determinar la factibilidad de establecer un método de control de CBB aplicado a la semilla asexual de yuca mediante termoterapia. En efecto, el tratamiento basado en la inmersión de estacas en agua caliente, presenta una alternativa de control de enfermedades prometedora, eficaz, económica y ambientalmente compatible.

El análisis de puntos críticos de las superficies modelos en el caso de cada cepa permitió encontrar los puntos críticos de temperatura y tiempo para cada cepa. Como punto crítico se entiende la combinación de temperatura y tiempo a partir de la cual se observó la detención del crecimiento. En la tabla 3 se

de inactivación se encontró por fuera de la zona experimental. Los tiempos críticos fueron de 48.17 min y 237 min para las cepas CIO-12 y CIO-188 respectivamente. (Tabla 3.)

Para las cepas CIO-46, CIO-81 y X-27 la estructura de las superficies de respuesta, al menos cerca a los puntos críticos, fue de tipo colina pues para dichas cepas los puntos

Tabla 3. Temperatura y tiempo críticos de tratamiento para las cepas estudiadas, establecidos luego del análisis de las superficies de respuesta por el procedimiento RSREG de SAS.

Cepa	Temperatura	Tiempo
CIO-12	49,65	48.17
CIO-188	52	237
CIO-46	52	78.6
CIO-81	49.59	80.97
X-27	49	86

críticos fueron máximos absolutos representando la única solución posible. En el caso de las cepas CIO-12 y CIO-188, las superficies fueron de tipo ensillaje pues los puntos críticos encontrados no representan puntos máximos. Esto implica que puede haber más de una solución para la búsqueda de puntos críticos y las variables temperatura y/o tiempo pueden haber presentado una alta variabilidad cerca de la solución encontrada por el análisis de regresión.

El análisis de regresión (RSREG) de SAS permitió demostrar que la variable tiempo de tratamiento no es significativa para tres de las cepas consideradas en el estudio (Tabla 4). En consecuencia, la temperatura crítica de inactivación fue determinada por un análisis de regresión en donde la variable de estudio fue $\log(X+1)$ y X correspondía a la concentración de bacterias en *ufc/ml* luego de cada tratamiento. Las temperaturas críticas de inactivación variaron entre 48,6 y 68,3 °C (Tabla 5). El promedio de las temperaturas críticas fue de 53,9°C. La cepa CIO-46 presentó la mayor temperatura (68,3°C). Las otras cepas presentaron temperaturas cercanas a las 50°C. Los resultados de temperatura crítica que se obtuvieron mediante los dos métodos de análisis (RSREG y regresión de la variable $\log(X+1)$) se analizaron por una prueba t de comparación de medias; el resultado obtenido luego de este procedimiento mostró que la diferencia entre las medias no es significativa con una probabilidad crítica del 5%. (Tabla 4)

Para todas las cepas, la temperatura influye de manera significativa sobre la PMT. En cambio, el tiempo de tratamiento sólo es significativo en el caso de dos cepas, CIO-46 y X-27 (Tabla 4).

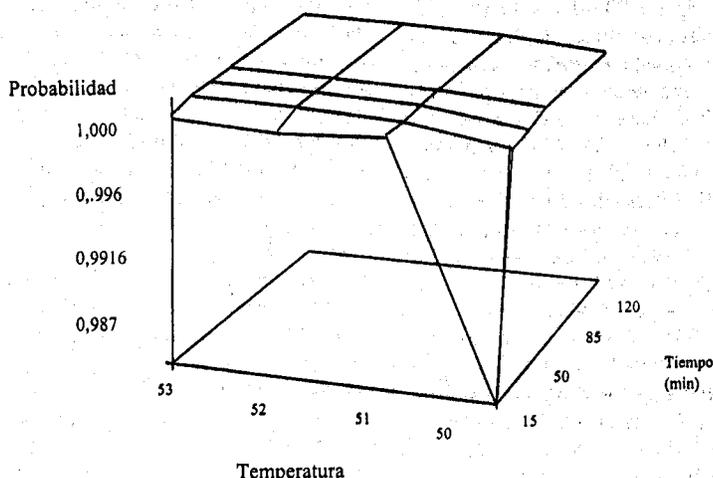


Figura 2. Superficie de respuesta obtenida mediante regresión RSREG de SAS para la cepa CIO-46.

Inc., 1985).

Finalmente, los valores críticos de inhibición obtenidos para cada una de las cepas, se compararon y se relacionaron con las características de las cepas. Las temperaturas de inactivación de crecimiento, es decir, la temperatura mínima de tratamiento para la cual las bacterias son inactivadas, fueron estimadas según la metodología propuesta por Keck *et al* (1995), usando un análisis de regresión con la transformación $\log(X+1)$ donde X es el número de bacterias (*ufc/ml*). Los cálculos se realizaron con todos los datos, incluyendo la

presentan los puntos críticos para cada una de las cepas. Para tres de las cepas las temperaturas críticas estuvieron cerca de 49°C. Sin embargo, en el caso de dos cepas, CIO-46 y CIO-188, las temperaturas críticas fueron de 52°C. Aunque el tiempo no afecta de manera significativa la probabilidad de muerte de las bacterias, el análisis de regresión obtenido por el procedimiento RSREG de SAS permite encontrar una solución para el tiempo crítico en las superficies de respuesta. Estos estuvieron cercanos de 80 minutos. Sin embargo, en el caso de la cepa CIO-188, el tiempo crítico

Tabla 4. Análisis del efecto de las variables temperatura y tiempo sobre la probabilidad de muerte de las cepas de *X. axonopodis* pv *manihotis*, obtenido mediante el procedimiento RSREG de SAS

Cepa	Tiempo		Temperatura		Tiempo	Temp	Temp x Tiempo
	Regresión Lineal	Regresión Cuadrática	Regresión Lineal	Regresión Cuadrática			
CIO-12	NS ¹	NS	S	NS	NS	S	NS
CIO-188	NS	NS	S	NS	NS	S	NS
CIO-46	S ²	S	S	S	S	S	NS
CIO-81	NS	S	S	S	NS	S	NS
X-27	NS	S	NS	S	S	S	NS

NS = No significativo al nivel de P del 0,05 S= Significativo al nivel de P del 0,05

Para algunas cepas el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de las bacterias es de tipo lineal (CIO-12, CIO-188, CIO-46 y CIO-

Tabla 5: Temperaturas de tratamiento, log de X+1 para cada temperatura de tratamiento y la temperatura crítica de inactivación obtenida por análisis de regresión.

Cepa	Temp. Trat. °C	Log (X+1)	Temp. crítica °C
CIO-46	50	6,20	
	51	6,05	
	52	5,63	
	53	5,39	68,3
	49	10,02	
CIO-81	50	4,11	
	51	2,42	
	52	0,00	51,3
CIO-12	48	5,28	
	49	2,83	
	50	1,75	
	51	0,00	50,9
CIO-188	47	7,14	
	48	2,76	
	49	0,00	48,6
X-27	47	6,62	
	48	2,69	
	50	1,23	
	51	0,00	50,5

X = el promedio de ufc/ml

81) y para la cepa X-27 la temperatura afecta significativamente la PMT de manera cuadrática (variable temperatura X temperatura). Como se dijo anteriormente, el tiempo afecta significativamente la PMT sólo en el caso de dos cepas. Para CIO-46 el efecto del tiempo es lineal y en el caso de X-27 es de tipo cuadrático. La interacción temperatura X tiempo no es significativa sobre la probabilidad de muerte para ninguna de las cepas.

Se demostró que la interacción temperatura por tiempo no tiene un efecto significativo sobre la probabilidad de muerte de las bacterias, contrariamente a lo que se ha reportado para otro patógeno vascular de la yuca como

Phytophthora spp. (Ramirez *et al.*, 1997). En el caso de, las variables temperatura y tiempo se deben considerar por separado y de esta manera establecer el efecto que cada una tiene sobre la viabilidad del patógeno.

La temperatura es el factor más significativo sobre la probabilidad de muerte de la bacteria. En promedio, la temperatura crítica fue de 50,46°C (+ - 1,4°C). Esto significa que para que un método de control de *X. axonopodis* pv *manihotis* mediante termoterapia sea eficaz, la semilla de yuca debe ser tratada a una temperatura no menor de 50,46°C. En estudios anteriores se demostró que temperaturas mayores de 50°C son necesarias para tratar bacterias fitopatógenas mediante termoterapia (Keck *et al.*, 1995). Por otro lado, se pudo establecer que existe variabilidad en la sensibilidad térmica de las cepas in vitro. En efecto, las cepas CIO-46 y CIO-188 presentaron temperaturas críticas de inactivación de 52°C mientras que la temperatura crítica de las otras cepas consideradas se mantuvo alrededor de los 50°C. En el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, Burr *et al.* (1989) demostraron que la variabilidad de la termosensibilidad de las diferentes cepas tratadas se relaciona con la raza (aunque la variabilidad intra-biovar fue igualmente demostrada). En el caso de *X. axonopodis* pv *manihotis*, la variabilidad en la sensibilidad térmica no pudo relacionarse con ninguna de las características conocidas como la ecozona de origen de cada una o la patogenicidad. "La temperatura requerida para matar una planta o un animal depende del rango de temperatura al cual el organismo haya estado previamente adaptado". De acuerdo con esta cita de Giese presentada por Baker (Baker, 1962) se podría esperar que cepas aisladas de habitats de clima frío fueran menos tolerantes a la temperatura que cepas aisladas de zonas de clima calido. En el caso de *X. axonopodis* pv *manihotis*, dos cepas (CIO-12 y CIO-188) fueron aisladas de la ecozona 5, la cual según la clasificación hecha en el CIAT (1977) corresponde al trópico de altura, en donde la temperatura promedio es de 18°C Sin embargo, una de estas dos cepas (CIO-188) presentó la temperatura crítica más elevada. Sin embargo se pudo encontrar una relación entre el nivel de enfermedad y la temperatura crítica de inactivación de cada cepa. Esta relación se

considera sólo si se tiene en cuenta el análisis de regresión de la variable log (X+1), es decir si la variable tiempo de tratamiento no se considera. Con este supuesto se tendría que a mayor patogenicidad mayor debe ser la temperatura de tratamiento necesaria para inactivar la cepa considerada. La característica fenotípica de la bacteria que le confiere mayor resistencia al tratamiento térmico podría ser la presencia o la calidad de los exopolisacáridos (EPS) de superficie de la bacteria. Algunas de las funciones atribuidas a los EPS durante el proceso de infección son la contribución a la formación de las manchas translúcidas en las hojas y a la oclusión vascular, dos aspectos importantes de la patogenicidad. Se ha establecido que los EPS están involucrados en la degradación de las paredes celulares y ayudan a proteger al patógeno de sustancias excretadas por las células vegetales como por ejemplo compuestos fenólicos (Boher *et al.*, 1995). La capa de EPS funciona como una capa protectora eficaz. Se podría pensar que esta capa también protege a las bacterias de la temperatura.

El tiempo de tratamiento no tiene efecto significativo sobre la viabilidad de las bacterias en el caso de ciertas cepas. Esto podría explicarse por la variabilidad de la respuesta probabilidad de muerte con respecto al tiempo de tratamiento.

Los tiempos de inactivación térmica es decir el tiempo mínimo de tratamiento que se requiere para inactivar las bacterias, pueden ser estimados según la metodología propuesta por Keck *et al.* (1995), al igual que se estimaron las temperaturas de inactivación en el presente estudio. Sin embargo, en el caso de *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* el tiempo no influye significativamente sobre la variable probabilidad de muerte y por consiguiente no se calcularon los tiempos de inactivación. En cuanto a las temperaturas de inactivación, al calcularlas según esta metodología, se puede estudiar su efecto directo sobre la variable probabilidad de muerte sin la influencia de la variable tiempo. Los resultados de este análisis confirman la variabilidad de las temperaturas críticas que existe entre las cepas e igualmente confirma que, excluyendo la cepa CIO-46, el promedio de la temperatura de inactivación se encuentra cerca a los 50°C.

Con los datos obtenidos en este estudio, sería prematuro concluir que es viable la aplicación de termoterapia para controlar CBB. Se debe tener cuidado con varios factores que podrían demostrar que la aplicación de termoterapia no es un método adecuado para el control de *X. axonopodis* pv *manihotis*. Por ejemplo: la variabilidad de la temperatura de inactivación, la alta temperatura de inactivación y el hecho que la interacción temperatura por tiempo no sea significativa.

La variabilidad de sensibilidad térmica entre cepas de la bacteria es sólo un aspecto de la alta variabilidad que presenta esta bacte-

ria. Así, estudios anteriores han demostrado la gran diversidad genética (Restrepo & Verdier, 1997; Verdier, 1993), bioquímica y fisiológica (Grousson *et al.*, 1990), patogénica (Maraite *et al.*, 1981) haciendo que el control de esta enfermedad tanto por la utilización de materiales resistentes como por otras alternativas de control sea difícil.

La temperatura de inactivación de algunas cepas de *X. axonopodis* pv *manihotis* se encuentra por encima del punto óptimo de tolerancia de las estacas de yuca para mantener un porcentaje de germinación aceptable; Ramírez *et al.* (1997) determinaron el punto máximo de tolerancia de la yuca en 50°C. Lo que conlleva a que el control no será total y dependerá de la cepa que esté infectando al material.

La interacción temperatura por tiempo no afecta significativamente la probabilidad de muerte de las cepas. De esta forma, todo el tratamiento reposa en el poder de la temperatura ya que el tiempo no afecta la variable de estudio. Si el tiempo afectara significativamente la inactivación de las bacterias, se podría proponer la reducción de la temperatura (la cual está cerca al punto crítico de la estaca) aumentando el tiempo de exposición y obteniéndose un tratamiento menos perjudicial para la germinación de la estaca.

CONCLUSIONES

- La temperatura de tratamiento influye de manera significativa sobre la probabilidad de muerte de las cepas de *X. axonopodis* pv *manihotis*
- El tiempo de tratamiento ni la interacción temperatura por tiempo de tratamiento afectan significativamente la variable de estudio probabilidad de muerte de las cepas de *X. axonopodis* pv *manihotis*
- Con base en diferentes métodos estadísticos se estableció que la temperatura promedio de inactivación es cercana a 50°C.
- Entre las cepas *X. axonopodis* pv *manihotis* de consideradas para este estudio, existe variabilidad de respuesta frente a la tem-

peratura, encontrándose diferentes temperaturas de inactivación.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal de Patología de Yuca por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo. A la doctora Valerie Verdier por proveer las cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* y por sus valiosas sugerencias al iniciar el proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, K. F. 1962. Thermoherapy of Planting Material. *Phytopathology*. 52: 1244-1255.
- Boher, B.; Kpemoua, K.; Nicole, M.; Luisetti, J.; Geiger, J. P. 1995. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. *Phytopathology* 85: 777-788.
- Bondar, G. 1912. Uma nova molestia bacteriana das hastes da mandioca. *Characas e Quintais, Sao Paulo* 5:15-18.
- Burr, T. J.; Ophel, K.; Katz, B. H.; Kerr, A. 1989. Effect of hot water treatments on systemic Agrobacterium tumefaciens Boivar3 in dormant grape cuttings. *Plant Disease* 73: 242-245.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Annual report 1987. Cali, Colombia.
- Daniel, J.F. 1991. Contribution à l'étude de la biologie de *X. c.* pv. *manihotis*, agent responsable de la bactériose vasculaire du manioc. Thèse de doctorat. Université de Paris XI, 182 pages.
- Elad, Y., and VolpinKeck, M.; Chartier, R.; Zislavsky, W.; , H. 1991. Heat treatment for the control of rose and carnation grey mould (*Botrytis cinerea*). *Plant Pathology* 40: 278-286.
- Grousson, F., Pages, J., Boher, B. 1990. Etude de la variabilité d'un agent pathogène, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, par l'analyse factorielle multiple. *Agronomie* 4: 627-640.
- Lecomte, P.; Paulin, J. P. 1995. Heat treatment of plant propagation material for the control of fire blight. *Plant Pathology* 44: 124-129.
- Laberry, R.; Martinez, D. 1994. Manejo integrado del añublo bacterial de la yuca. pp 7,8 en Simposio sobre enfermedades de la Yuca: pasado y presente. CIAT. Cali.
- Lozano, J. C. 1986. Cassava bacterial blight: a manageable disease. *Plant Disease* 70:1089-1093Lozano, 1986
- Lozano, J.C. 1989. Outbreaks of cassava diseases and losses induced. *Trop. Agr. Res. Center., Min. Agr., Forestry and Fisheries, Japan. Series* 22:113-119
- Lozano, J. C. & Sequeira, L. 1974. Bacterial Blight of Cassava in Colombia: etiology. *Phytopathology*. 64: 74-82.
- Maraite, H.; Weyns, J.; Yimkwan, O.; Lipembra, P.; Perreaux, D. 1981. Physiological and pathogenic variations in *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *Proc. Fifth Int. Conf. Plant Path. Bact., Cali*, 1981.
- Ramírez, J. A.; Alvarez, E.; Loke, J. B. 1997. Termoterapia en semilla asxual de yuca para el control de *Phytophthora* spp. Memorias del XVIII congreso ASCOLFI. CIAT, Cali, Colombia.
- Restrepo, S., and Verdier, V.. 1997. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Applied and environmental microbiology*. In press.
- SAS Institute Inc. 1985. SAS User's Guide: Statics, version 5 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc. 956 pp.
- Vauterin, L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45:472-489.
- Verdier, V., P. Dongo and B. Boher. 1993. Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *J. Gen. Microbiol.* 139:2591-2601.

Reprinted with permission from ASCOLFI. Originally published in *Fitopatología Colombiana* 23(2):87-91, Copyright 1999.