

## Componentes de resistencia a *Xanthomonas vesicatoria* raza T2 en genotipos de tomate en condiciones de invernadero y cámara de crecimiento

Berrueta Cecilia<sup>1</sup>, Giménez Gustavo<sup>1</sup>, Galván Guillermo<sup>2</sup>, Borges Alejandra<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Ruta 48 km 10, Canelones, Uruguay. Correo electrónico: ceciagro@yahoo.com

<sup>2</sup>Departamento de Producción Vegetal, Centro Regional Sur (CRS), Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Camino Folle km 36, Canelones, Uruguay.

<sup>3</sup>Departamento de Biometría, Estadística y Computación. Garzón 780, 12900 Montevideo, Uruguay.

Recibido: 20/8/13 Aceptado: 23/4/14

### Resumen

La mancha bacteriana es una de las principales enfermedades que afectan al cultivo de tomate. Los agentes causales son cuatro especies del género *Xanthomonas*. En Uruguay, la especie predominante es *Xanthomonas vesicatoria* raza T2. Debido a la baja efectividad de las herramientas de control, la resistencia genética adquiere gran interés para mejorar el manejo de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue identificar fuentes de resistencia a mancha bacteriana raza T2 en tomate en invernadero y cámara de crecimiento a través de la determinación de los componentes de resistencia. Los componentes evaluados fueron el período de latencia, número de manchas en el foliolo terminal y la población bacteriana en el tejido. También se determinó la severidad en hoja mediante una escala diagramática. Los cultivares Hawaii 7981 y Loica, así como las líneas LB 76 y LB 97 presentaron la menor severidad en el follaje, el menor número de manchas y las poblaciones bacterianas más bajas, resultando los genotipos con mayores niveles de resistencia. Tanto el número de manchas como el monitoreo de la población bacteriana permitieron diferenciar los genotipos por su resistencia a mancha bacteriana en condiciones controladas. Sin embargo, el período de latencia no difirió significativamente entre los genotipos. Las variedades Loica y Hawaii 7981 se identificaron como nuevas fuentes de resistencia parcial a la raza T2.

**Palabras clave:** *Solanum lycopersicum*, resistencia parcial, fuentes de resistencia, mancha bacteriana

### Summary

## Resistance Components to Bacterial Spot Race T2 (*Xanthomonas vesicatoria*) in Tomato Genotypes Under Greenhouse and Growth Chamber Conditions

Bacterial leaf spot is one of the main diseases affecting tomato crops. The causative agents are four species of the *Xanthomonas* genus. In Uruguay, the prevalent species is *Xanthomonas vesicatoria* race T2. Due to the lack of effective control measures, genetic resistance acquires great interest to improve disease management. This research was conducted in order to identify resistance sources to bacterial leaf spot race T2 in tomatoes based on resistance components under greenhouse and growth chamber conditions. Latent period, number of spots in the terminal leaflet, and the bacterial population in the tissue were the components were evaluated. In addition, leaf spot severity was determined by a diagrammatic scale. Cultivars Hawaii 7981 and Loica, as well as the lines LB 76 and LB 97 were the most resistant genotypes displaying the lowest leaf severity, number of leaf lesions, and bacterial population. The leaf spot number, as well as the bacterial population, allowed differentiating genotypes by bacterial spot resistance under controlled conditions. However, latency period did not differ significantly between genotypes. The cultivars Loica and Hawaii 7981 were identified as new sources of partial resistance to race T2.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*, partial resistance, sources of resistance, bacterial spot

## Introducción

La mancha bacteriana es una de las principales enfermedades que afectan a los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) y morrón (*Capsicum annuum*) a campo en las regiones subtropicales y tropicales del mundo (Jones *et al.*, 1995; EPPO y CABI, 2006). En Uruguay, se la considera el problema fitosanitario más importante en años lluviosos y cálidos, distribuyéndose en todas las áreas de producción. Esta enfermedad causa lesiones necróticas en hojas, tallos y frutos. Como consecuencia, produce disminución del área foliar fotosintéticamente activa reduciendo el rendimiento, así como un desmerecimiento de la calidad cosmética del fruto (Blancard, 1992; Jones *et al.*, 1991; Cerkauskas, 2005). Jones *et al.* (2004) determinaron que los agentes causales de la enfermedad son cuatro especies del género *Xanthomonas* (*X.*), *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri* con cinco razas, T1, T2, T3, T4 y T5. En Uruguay, de acuerdo a estudios que se están realizando, en base a una colección de 111 aislamientos nativos, la raza predominante sería T2 (*X. vesicatoria*) (Montelongo com. pers.). Para el control de la enfermedad se recomienda un manejo integrado incluyendo desinfección de semillas, control químico, prácticas culturales y uso de variedades resistentes (Stall *et al.*, 2009). La resistencia genética resulta una herramienta importante para limitar el avance de la enfermedad y minimizar las pérdidas económicas (Stall *et al.*, 2009).

Se han identificado varios genes que confieren resistencia por hipersensibilidad a distintas razas de forma específica. Los genes *rx1*, *rx2* y *rx3* presentes en la línea Hawaii 7998 aportan resistencia completa a la raza T1 (Jones y Scott, 1986; Yu *et al.*, 1995). La variedad Hawaii 7981 tiene el gen *Xv3* que confiere resistencia a la raza T3 (Jones *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1996). Un gen de resistencia a la raza 4 se denominó *Xv4* y se encuentra en *Solanum pennellii* LA716 (Astua-Monge *et al.*, 2000). Sin embargo, debido a la gran diversidad del agente causal y su gran capacidad de mutar y superar las barreras genéticas que se le imponen no se han obtenido variedades con resistencia efectiva y duradera. Por este motivo, la resistencia cuantitativa ha cobrado relevancia para lograr variedades con resistencia más estable en el tiempo (Yang *et al.* 2005, Stall *et al.* 2009).

Para la selección de cultivares resistentes se requiere una evaluación permanente de germoplasma. La técnica de inoculación y el método de cuantificación de los síntomas influyen sobre los resultados obtenidos en las evaluaciones de genotipos (Menezes dos Santos, 1999; Yang y Francis, 2006). Para evitar los grandes ensayos a campo, que im-

plican un gran uso de recursos, tiempo y espacio, se han desarrollado técnicas de inoculación en condiciones controladas. Estas técnicas se basan en el asperjado de plántulas en invernadero (Somodi *et al.*, 1994), o la inmersión de los cotiledones de las plántulas (Emmatty *et al.*, 1982). Para la evaluación de resistencia de herencia cuantitativa se recomienda la determinación de los componentes de resistencia (Van Der Plank, 1963; Somodi *et al.*, 1991; Silva-Lobo *et al.*, 2005). La reducción del crecimiento del patógeno en cada etapa del ciclo de la enfermedad puede ser considerada una forma de resistencia parcial (Zadoks, 1997). Para los patosistemas que incluyen a las bacterias, los componentes más relevantes son el número y tamaño de lesión, frecuencia de estomas, período de latencia y monitoreo de la población bacteriana (Parlevliet, 1979; Silva-Lobo *et al.*, 2005).

La determinación de componentes no es utilizada frecuentemente para seleccionar germoplasma por resistencia a una enfermedad. La principal razón es lo laborioso que resulta su determinación y que no siempre es más exacta que las mediciones a campo (Parlevliet, 1979; Ribeiro do Vale *et al.*, 2001). Sin embargo, los componentes permiten explicar las causas de las diferencias entre los genotipos. Además, los distintos componentes pueden estar controlados por genes diferentes y la recombinación de los genes de distintas fuentes mediante hibridación, puede resultar en un mayor y más durable nivel de resistencia genética (Zadoks, 1997; Silva-Lobo *et al.*, 2005).

En Uruguay, se desarrolla desde el año 2005 un programa nacional de mejoramiento de tomate para industria en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). En la mejora por resistencia a enfermedades, se ha puesto especial énfasis en la mancha bacteriana del tomate debido a la baja efectividad de las otras herramientas de control. En este marco, el presente trabajo tuvo por objetivo identificar fuentes de resistencia a mancha bacteriana del tomate ocasionada por *X. vesicatoria* raza T2 a través de los componentes de resistencia parcial en germoplasma de tomate para industria, en condiciones de invernadero y cámara de crecimiento.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Los experimentos en invernadero y cámara de crecimiento se realizaron en la Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate del INIA (Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay). Para el experimento en invernadero se utilizaron diez genotipos de tomate para industria incluyendo

líneas de mejoramiento, híbridos y variedades comerciales. Para el caso de los experimentos desarrollados en cámara de crecimiento se usaron cinco genotipos (Hawaii 7981, Loica, H 9997, LB 97 y LB 85). La descripción de las variedades se detalla en el Cuadro 1.

Los plantines se obtuvieron mediante siembra en bandejas plásticas de 104 celdas, empleando turba (Treff®, Canelones, Uruguay) como sustrato de crecimiento. Las bandejas se mantuvieron en invernadero por 30 días, y las plantas se trasplantaron a macetas (400 ml) con turba (Treff®) cuando tenían tres hojas verdaderas. Solo se realizó un control químico de insectos antes del trasplante con imidacloprid usando una dosis de 50 ml cada 100 litros de agua. Las plantas en macetas se regaron diariamente y se fertilizaron dos veces antes de la inoculación, mediante pulverizaciones foliares a punto de goteo con nitrato de potasio (3 g por litro de agua).

#### Cepa utilizada y preparación de inóculo

Se utilizó un aislado de *Xanthomonas vesicatoria* perteneciente a la raza T2. El mismo pertenece a la colección del INIA (Montelongo, 2012) y fue seleccionado por su alta virulencia.

Cada serie de producción de inóculo se obtuvo de la cepa conservada en la colección a -70 °C de temperatura. El inóculo se obtuvo a partir de crecimiento bacteriano en medio Nutriente agar (Oxoid), durante 48 horas a 28 °C ± 2. Se diluyó en una solución salina (8 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada) llegando a una concentración de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (ufc)/ml para el experimento 1 y 2. Para el monitoreo de la población bacteriana (experimento 3) se utilizó una concentración de 10<sup>4</sup> ufc/ml. La concentración se ajustó con espectrofotómetro (600 nm) y posteriormente se verificó por conteo en placas.

#### Experimento 1: Componentes de resistencia en invernadero

El experimento se llevó a cabo en octubre del 2010 en un invernadero de vidrio. Durante el período del experimento se registraron la temperatura y la humedad relativa dentro del invernadero por medio de un data logger Hobo (Onset Corporation, Estados Unidos). La temperatura media diaria fue de 23 °C, con una máxima promedio de 30,2 °C y una mínima de 18,4 °C. La humedad relativa promedio fue de 82 %.

**Cuadro 1.** Variedades, híbridos comerciales y líneas avanzadas de mejoramiento de tomate utilizadas en los ensayos de resistencia a mancha bacteriana en cámara de crecimiento e invernadero.

Genotipo	Tipo	Origen
LB 76	Línea de mejoramiento	INIA Uruguay <sup>2</sup>
LB 97	Línea de mejoramiento	INIA Uruguay
LB 85	Línea de mejoramiento	INIA Uruguay
Hawaii 7981	Línea de mejoramiento	Univ. Florida, EEUU <sup>3</sup>
NUN 6011	F1 <sup>1</sup> comercial	Nunhems
H 9997	F1 comercial	Heinz
Loica	Variedad comercial	INTA Argentina <sup>4</sup>
Tospodoro	Variedad comercial	EMBRAPA <sup>5</sup>
Cuyano	F1 comercial	Syngenta
Ohio 8245	Variedad comercial	Ohio St. Univ., EEUU <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Híbrido (F1).

<sup>2</sup>INIA: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

<sup>3</sup>Univ. Florida: University of Florida.

<sup>4</sup>INTA: Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias.

<sup>5</sup>EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria.

<sup>6</sup>Ohio St. Univ.: Ohio State University.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con tres repeticiones. Los bloques se definieron en función de distintas partes de una mesada que diferían en la cercanía al lugar de ventilación. La unidad experimental fue un grupo de cuatro plantas en macetas individuales.

La inoculación se realizó el 4 de octubre del 2010, cuando las plantas presentaban entre 4 y 5 hojas verdaderas expandidas. Se inoculó en horas de la tarde para evitar las altas temperaturas y el pico de evapotranspiración del mediodía, donde ocurre cierre estomático. Se utilizó un pulverizador manual para asperjar las plantas con la suspensión bacteriana hasta punto de goteo. Luego de la inoculación se mantuvieron las plantas con 100 % de humedad relativa por 48 horas para favorecer la penetración bacteriana en el tejido vegetal. Esto se implementó mediante la colocación de una carpa de nylon de 100  $\mu\text{m}$  cubriendo toda la mesada.

Los componentes de resistencia evaluados fueron el período de latencia y el número de manchas en el folíolo terminal. El período de latencia se consideró como el tiempo en días desde la inoculación hasta que el 50 % de las plantas de la parcela presentaban sintomatología de la enfermedad y se determinó evaluando diariamente el número de plantas con síntomas. El número de manchas se determinó en el folíolo terminal de la hoja de tomate más joven totalmente desarrollada al momento de la inoculación. La hoja se identificó y se evaluó a los 14, 17 y 23 días después de la inoculación. Los valores de cada una de las cuatro plantas fueron promediados.

Complementariamente se determinó el porcentaje de tejido foliar afectado (severidad en hojas). Para ello se usó como base una escala diagramática para mancha bacteriana de tomate, modificada a partir de la escala propuesta por De Mello *et al.* (1997). A la escala original de cinco categorías que refieren a niveles crecientes de severidad en hoja, se le agregaron dos categorías, constituyendo siete niveles: 1-1 %, 2-2,5 %, 3-5 %, 4-10 %, 5-15 %, 6-25 % y 7-50 %. La evaluación de severidad se hizo en la misma hoja en la que se contó el número de manchas. La severidad se determinó a los 14, 17 y 23 días post inoculación. Para su análisis, los valores de cada una de las cuatro plantas fueron promediados.

### **Experimento 2: Componentes de resistencia en cámara de crecimiento**

El experimento se realizó en junio del 2010 en una cámara de crecimiento (Sanyo, 2,3 x 1,8 x 1,8 m, Japón) a 25 °C y 16 horas de fotoperiodo. Se registró la temperatura y la humedad relativa dentro de la cámara por medio de

data logger Hobo. La temperatura media durante el ensayo fue de 27 °C, con una máxima promedio de 28,3 °C y una mínima de 25 °C. La humedad relativa promedio fue de 48 %.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con tres repeticiones. Los bloques se definieron en función de distintos estantes dentro de la cámara. La unidad experimental fue una bandeja con seis plantas.

La inoculación se realizó el 16 de junio del 2010, cuando las plantas tenían entre cuatro y cinco hojas verdaderas expandidas, mediante asperjado manual con la suspensión bacteriana hasta punto de goteo. Luego de inoculadas, las plantas se mantuvieron a 100 % de humedad relativa por 48 horas mediante su embolsado para favorecer la penetración bacteriana en el tejido vegetal.

Los componentes de resistencia evaluados fueron el período de latencia y el número de manchas en el folíolo terminal. Para determinar el período de latencia, se evaluó diariamente el número de plantas con síntoma hasta alcanzar el 50 % de las plantas afectadas. El número de manchas se determinó en el folíolo terminal de la hoja de tomate más joven totalmente desarrollada al momento de la inoculación. La hoja se identificó y se evaluó a los 7, 10 y 14 días después de la inoculación. Para su análisis, los valores de cada una de las seis plantas fueron promediados.

Además, se determinó la severidad en hojas mediante la escala diagramática para mancha bacteriana del tomate propuesta por De Mello *et al.* (1997), que consta de cinco categorías (1-1 %, 2-5 %, 3-15 %, 4-25 % y 5-50 %). La evaluación se hizo en la misma hoja en la que se contó el número de manchas. La severidad se determinó a los 14 días post inoculación. Para su análisis, los valores de cada una de las seis plantas fueron promediados.

### **Experimento 3: Determinación de la población bacteriana**

El experimento se realizó en una cámara de crecimiento a 25 °C y 16 horas de fotoperiodo. La temperatura media durante el ensayo fue de 26 °C, con una máxima promedio de 29,2 °C y una mínima de 23,7 °C. La humedad relativa promedio fue de 40 %.

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones en el tiempo (junio 2010, julio 2010 y febrero 2011). La unidad experimental fue una planta. Las plantas se inocularon cuando presentaban entre cinco y seis hojas verdaderas expandidas. Se inocularon por infiltración 0,3 ml de una suspensión bacteriana de  $10^4$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  en un área aproximada de 1  $\text{cm}^2$  del envés de hojas completamente desarrolladas, midiéndose el alcance del área in-

filtrada. Como control negativo se inoculó una hoja de cada planta con solución salina estéril.

La población bacteriana se determinó cada 24 horas desde la inoculación hasta las 96 horas, momento en el cual la zona infiltrada se presentaba deshidratada y adquiría un color blanquecino. Para ello, se extrajo una muestra de cada genotipo con sacabocado de 2 cm<sup>2</sup> tomando como centro el punto de infiltración. Las muestras se maceraron en mortero con 1 ml de solución salina estéril (8 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada). Luego, se realizaron diluciones en serie, que se sembraron en placas con medio ANG (Agar Nutritivo Glucosa). Las placas sembradas se incubaron a 24 °C por 48 horas. Se cuantificó el número de colonias bacterianas por placa y se calculó el número de células por cm<sup>2</sup> de hoja.

#### Análisis estadístico

Para el período de latencia, se utilizó un modelo lineal general, utilizando como método de estimación máxima verosimilitud restringida. Luego se separaron medias por prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Para el análisis de la variable número de manchas por folíolo, se utilizó un modelo lineal generalizado, asumiendo una distribución binomial negativa. Se realizaron contrastes simples por prueba de razón de verosimilitud para la comparación entre medias.

En lo que refiere a la severidad, se utilizó un modelo lineal generalizado, asumiendo una distribución multinomial. Los perfiles de severidad de cada variedad se compararon mediante contrastes. Se calculó el promedio de severidad ponderado por la probabilidad de cada categoría.

Para el monitoreo de la población bacteriana se trabajó con la variable 'número de células bacterianas por cm<sup>2</sup> de hoja' transformada en log base 10. Se utilizó un modelo lineal general que incluyó el efecto del genotipo, el efecto del tiempo, la interacción entre ambos factores y como covariable el área infiltrada. Adicionalmente, se calculó el área bajo la curva de crecimiento de la población bacteriana (ABC-CP) acumulada en el tiempo. Las áreas bajo la curva de cada genotipo se compararon mediante prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), asumiendo varianzas heterogéneas para los genotipos.

Para visualizar las diferencias o similitudes entre genotipos, se realizó un análisis de conglomerados en función del número de manchas y de la severidad en hoja. Se utilizó una matriz de distancias euclidianas, el método de agrupamiento fue el de Ward y como criterio de corte para determinar el número de grupos, el índice pseudo F y pseudo t<sup>2</sup>.

En todos los casos se utilizó el paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

## Resultados

### Componentes de resistencia en invernáculo

En el ensayo en invernáculo se encontraron diferencias significativas entre los genotipos en el número de manchas por folíolo en las tres fechas de evaluación ( $p$  valor = 0,016, 0,0061 y 0,0291 para 14, 17 y 23 días post inoculación respectivamente;  $N = 120$ ). A los 14 días post inoculación, la línea de mejoramiento LB 76 presentó un número significativamente menor de manchas en el folíolo terminal que la variedad Tospodoro. El resto de los genotipos tuvo un número de manchas intermedio, que no difirió estadísticamente ni de Tospodoro ni de LB 76. A los 17 días después de la inoculación, el número de manchas en Tospodoro, H 9997 y LB 85 fue significativamente mayor que en los genotipos LB 76, LB 97 y Hawaii 7981. Las variedades Cuyano, NUN 6011, Loica y Ohio 8245 presentaron niveles intermedios de número de manchas en la hoja (Cuadro 2). A los 23 días desde la inoculación algunas hojas no permitieron la cuantificación de manchas, debido a que se formaban zonas necróticas, lo que dificultó el análisis y la interpretación.

El período de latencia varió entre 4,7 (NUN 6011 y H9997) y 7 días (Hawaii 7981), aunque no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos evaluados (Cuadro 2). La severidad en hoja tampoco diferenció los materiales genéticos, si bien los valores variaron entre de 2,2 (LB76 y Hawaii 7981) y 4,6 (H9997) de acuerdo a la escala utilizada (Cuadro 2).

### Componentes de resistencia en cámara de crecimiento

En cámara de crecimiento los genotipos se diferenciaron por el número de manchas en el folíolo terminal a los 7 y 10 días después de la inoculación ( $p$  valor <0,0001 y = 0,0001, respectivamente) (Cuadro 3). El número de manchas en el folíolo terminal de la hoja a los siete días desde la inoculación fue significativamente inferior en Hawaii 7981, la línea LB 97 y Loica en relación a LB 85 y H 9997. A los 10 días de la inoculación también se observó que LB 85 y H 9997 presentaron mayor presencia de manchas. A su vez LB 97 y Loica presentaron un número de manchas significativamente menor que H 9997.

No se detectaron diferencias significativas en el período de latencia entre los cinco genotipos de tomate. Para el conjunto de los materiales la aparición de los síntomas en el 50 % de las plantas de la bandeja ocurrió entre los cuatro y cinco días desde la inoculación (Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Período de latencia, número de manchas en el folíolo terminal a los 14 y 17 días post inoculación y severidad en invernadero.

Genotipo	Período de latencia (días)	Número de manchas		Severidad <sup>1</sup>
		14 dpi <sup>2</sup>	17 dpi	17 dpi
LB 76	5,0 ns <sup>3</sup>	10 a <sup>4</sup>	12 a	2,2
LB 97	5,0	11 ab	19 ab	2,7
Hawaii 7981	7,0	22 ab	22 abc	2,2
Cuyano	5,7	18 ab	24 abcd	3,0
NUN 6011	4,7	16 ab	25 abcd	2,9
Loica	6,7	28 ab	34 abcd	3,4
Ohio 8245	6,0	23 ab	37 cde	3,2
LB 85	4,3	44 ab	61 de	4,2
H 9997	4,7	39 ab	62 de	4,6
Tospodoro	5,3	54 b	74 e	3,6

<sup>1</sup>Severidad: 1-1 %, 2-2,5 %, 3-5 %, 4-10 %, 5-15 %, 6-25 % y 7-50 %.

<sup>2</sup>dpi: días después de la inoculación.

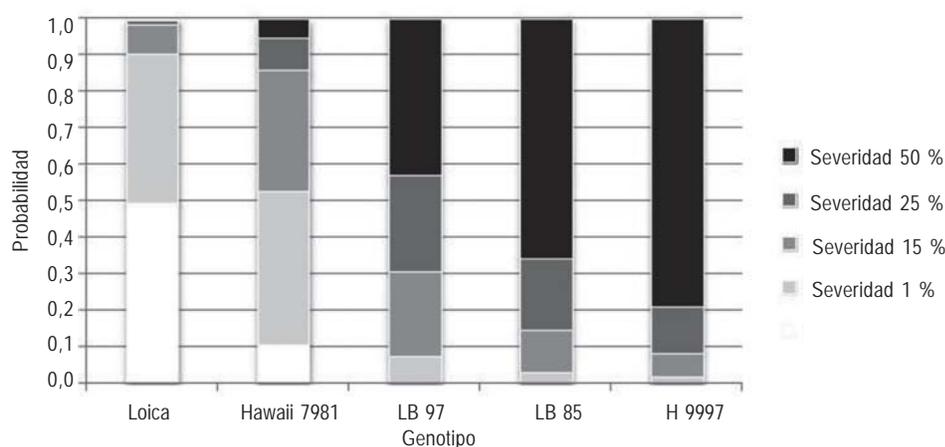
<sup>3</sup>No se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según prueba de Tukey.

<sup>4</sup>Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según prueba de Tukey.

Las diferencias ente los perfiles de severidad en hoja fueron estadísticamente significativas entre los cinco genotipos ( $p$  valor = 0,0043). A partir del análisis se obtuvo un ranking de los materiales según el perfil de probabilidad de ubicarse en cada una de las categorías de severidad (Figura 1). Loica fue el material más resistente, y presentó un 90 % de probabilidad de tener una severidad en hoja baja (1 - 5 % del tejido foliar afectado por mancha bacteriana). Le sigue Hawaii 7981, que no se distingue estadísticamente de la variedad Loica. Las líneas LB 97, LB 85 y la variedad H 9997 tuvieron 70, 85 y 92 % de probabilidad respectivamente de tener severidad alta (entre 25 y 50 % del tejido

foliar afectado), sin diferencias significativas entre sí. Las variedades Loica y Hawaii 7981 se distinguieron estadísticamente, en cuanto al perfil de probabilidad de LB 97, LB 85 y H 9997.

El análisis de conglomerados sugiere la presencia de tres grupos según porcentaje de tejido afectado y número de lesiones en el folíolo terminal de la hoja. Los grupos explican el 86 % de la variabilidad total ( $R$  cuadrado = 0,86). Loica, Hawaii 7981 y LB 97 integran el grupo de genotipos más resistentes presentando los valores más bajos de severidad en el follaje y las frecuencias más bajas de manchas a los siete días post inoculación (severidad = 1,6-4,0 y

**Figura 1.** Probabilidad de corresponder a cada categoría de severidad en el follaje para cada genotipo de tomate en el experimento en cámara de crecimiento.

**Cuadro 3.** Período de latencia, número de manchas en el folíolo terminal a los 7 y 10 días post inoculación y severidad en cámara de crecimiento.

Genotipo	Período de latencia (días)	Número de manchas		Severidad <sup>1</sup> 14 dpi
		7 dpi <sup>2</sup>	10 dpi	
Hawaii 7981	5 ns <sup>3</sup>	6 a <sup>4</sup>	11 a	2,6
LB 97	5	5 a	13 ab	4,0
Loica	5	6 a	15 ab	1,6
LB 85	4	17 b	24 bc	4,5
H 9997	4	30 b	43 c	4,7
p valor	0,062	<0,0001	0,0001	0,0043

<sup>1</sup>Severidad: 1-1 %, 2-5 %, 3-15 %, 4-25 %, 5-50 %.

<sup>2</sup>dpi: días después de la inoculación.

<sup>3</sup>No se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según prueba de Tukey.

<sup>4</sup>Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) según prueba de Tukey.

número de manchas = 5-6). El segundo grupo, moderadamente resistente, se compone de LB 85 presentando una severidad en hoja promedio de 4,5 y 17 manchas en el folíolo terminal. El grupo más susceptible lo integra H 9997, que tuvo una severidad promedio de 4,7 y un promedio de 30 manchas por folíolo (Figura 2).

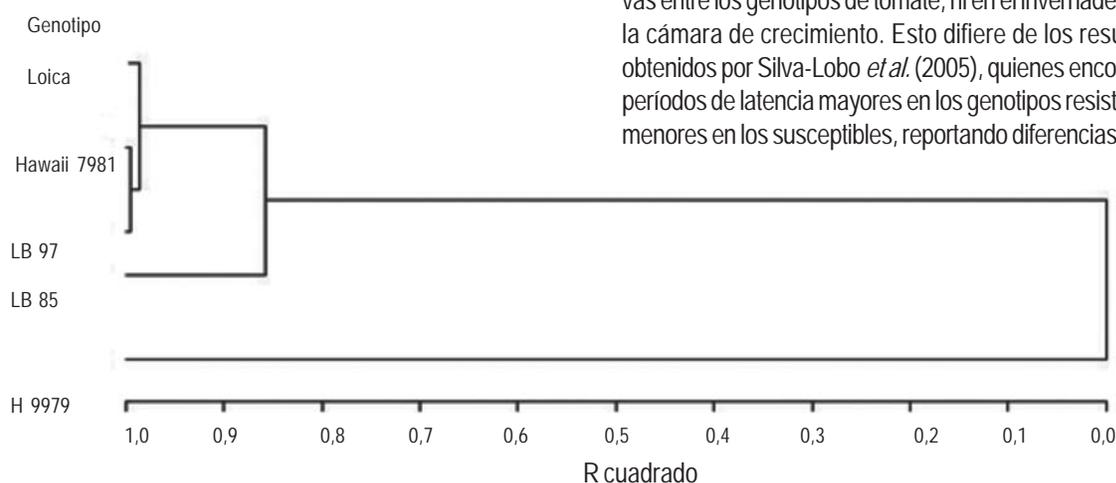
#### Determinación de la población bacteriana

La población bacteriana creció en las hojas infiltradas, pasando de poblaciones promedio de  $10^7$  a  $10^{11}$  ufc/cm<sup>2</sup> de hoja entre las 24 y 96 h posteriores a la inoculación. A su vez esas diferencias poblacionales fueron estadísticamente

significativas ( $p$  valor  $< 0,0001$ ,  $N = 60$ ) (Cuadro 4). El ABCCP presentó diferencias significativas entre los genotipos ( $p$  valor = 0,002,  $N = 60$ ). LB 85 presentó un ABCCP en el mesófilo de la hoja significativamente mayor a la línea Hawaii 7981, LB 97 y Loica. El genotipo H 9997 no se diferenció del resto de los materiales (Cuadro 4). La covarianza área infiltrada no fue significativa. Además, no se pudieron comprobar comportamientos distintos entre los genotipos en el tiempo, debido a que la interacción tiempo por genotipo no fue significativa.

#### Discusión

El período de latencia no presentó diferencias significativas entre los genotipos de tomate, ni en el invernadero ni en la cámara de crecimiento. Esto difiere de los resultados obtenidos por Silva-Lobo *et al.* (2005), quienes encontraron períodos de latencia mayores en los genotipos resistentes y menores en los susceptibles, reportando diferencias de dos



**Figura 2.** Dendrograma de genotipos agrupados por severidad en hojas y número de lesiones de mancha bacteriana en el folíolo terminal de la hoja en el experimento en cámara de crecimiento.

**Cuadro 4.** Número de células bacterianas por cm<sup>2</sup> de hoja inoculada a 24, 48, 72 y 96 horas post inoculación.

Genotipo	Tiempo desde inoculación (horas)				ABCCP <sup>1</sup>
	24	48	72	96	
Hawaii 7981	2,1 x 10 <sup>7</sup>	1,4 x 10 <sup>9</sup>	2,4 x 10 <sup>9</sup>	6,3 x 10 <sup>11</sup>	28,11 a
LB 97	4,1 x 10 <sup>7</sup>	8,5 x 10 <sup>8</sup>	1,1 x 10 <sup>10</sup>	5,6 x 10 <sup>10</sup>	28,18 a
Loica	1,7 x 10 <sup>7</sup>	3,4 x 10 <sup>9</sup>	3,5 x 10 <sup>9</sup>	4,9 x 10 <sup>11</sup>	28,56 a
H 9997	2,6 x 10 <sup>7</sup>	2,8 x 10 <sup>9</sup>	3,7 x 10 <sup>11</sup>	2,0 x 10 <sup>11</sup>	30,40 ab
LB 85	2,6 x 10 <sup>7</sup>	1,7 x 10 <sup>10</sup>	6,5 x 10 <sup>11</sup>	6,9 x 10 <sup>11</sup>	31,67 b
Promedio	2,6 x 10 <sup>7</sup> a <sup>2</sup>	5,1 x 10 <sup>9</sup> b	2,1 x 10 <sup>11</sup> c	4,2 x 10 <sup>11</sup> d	

<sup>1</sup>ABCCP: área bajo la curva de crecimiento poblacional.

<sup>2</sup>Letras distintas indican diferencias significativas (P<0,05).

a tres días entre ellos. Silva-Lobo *et al.* (2005) utilizaron una concentración bacteriana de inóculo de 10<sup>6</sup> ufc ml<sup>-1</sup>, inferior a la empleada en este trabajo (10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup>). La menor concentración puede implicar un desarrollo más lento de la infección y la expresión de los síntomas, que permita una mejor discriminación de los genotipos (Beattie y Lindow, 1995). Por su parte, Lugon Lima *et al.* (2005) y Mendes de Souza *et al.* (2008) utilizaron el período de latencia para seleccionar materiales resistentes a mancha bacteriana de una colección de germoplasma encontrando diferencias significativas, pero inoculando por infiltración en el mesófilo, superando barreras estructurales de la hoja. Según Ramos y Volin (1987), la inoculación mediante aspersión es más adecuada que la infiltración para comparar la resistencia ya que tiene en cuenta la resistencia estructural de la planta, asemejándose al modo de inoculación que ocurre en las condiciones del cultivo en donde se disemina con el agua de lluvia. Además, este método de inoculación tiene la ventaja de ser más simple y fácil de aplicar a gran escala.

A pesar de la falta de significancia estadística existen diferencias de entre dos y tres días en el período de latencia entre algunos materiales. Estos valores son similares a los reportados por Silva-Lobo *et al.* (2005), Lugon Lima *et al.* (2005) y Mendes de Souza *et al.* (2008) entre materiales resistentes y susceptibles. Un período de latencia más largo indicaría una mayor resistencia a la colonización del tejido por el patógeno, reduciendo el número potencial de ciclos de la enfermedad y minimizando el daño final. Por lo tanto, un genotipo con mayor período de latencia tiene mayor probabilidad de reducir la tasa de progreso de la enfermedad, retrasando la epidemia y reduciendo el inóculo cuando las condiciones son favorables a la enfermedad (Bergamim Filho *et al.*, 1995; Ribeiro do Vale *et al.*, 2001;

Silva-Lobo *et al.*, 2005). Esto se confirma ya que los materiales con mayor período de latencia, a pesar de la falta de significancia estadística, Hawaii 7981 y Loica (7 y 6,7 días en invernáculo, 5 días en cámara de crecimiento) tuvieron baja severidad y número de manchas en las hojas. Además, estudios previos demostraron que Hawaii 7981 y Loica presentan resistencia en evaluaciones realizadas a campo (Berrueta, 2012).

El componente número de manchas representa el número de infecciones exitosas, lo que indica el nivel de resistencia en la etapa de penetración del patógeno en el tejido vegetal (Parlevliet, 1979). Las líneas LB 97 y Hawaii 7981 presentaron los menores números de manchas en las hojas en el experimento en cámara de crecimiento e invernadero. LB 76 se destacó por presentar bajo número de manchas en hojas en el experimento en invernadero donde fue evaluada. Loica tuvo baja presencia de manchas foliares en el experimento en cámara de crecimiento, no comportándose de igual manera en el invernadero. En ambos experimento, los genotipos con más manchas en hojas fueron LB 85 y H 9997. La mancha bacteriana tiene una penetración pasiva a través de los estomas, por lo tanto el número de manchas está relacionado con la frecuencia y el tamaño de los estomas. Ramos *et al.* (1992), encontraron una correlación positiva y alta entre la frecuencia ( $r = 0,7$ ) y el tamaño de los estomas ( $r = 0,68$ ) de distintas especies de *Lycopersicum* con el número de manchas por superficie de hoja. Por lo tanto, se podría proponer la hipótesis de que uno de los mecanismos de resistencia de LB 76, LB 97, Hawaii 7981 y Loica frente al patógeno está relacionado a los estomas y la penetración de la bacteria al tejido. La línea LB 97 según los resultados del experimento en cámara de crecimiento tuvo un número de manchas bajo. Sin embar-

go, la severidad fue alta, por la presencia de manchas de mayor tamaño que Loica y Hawaii 7981. A pesar de que no se cuantificó el tamaño de las manchas, se observó que las manchas de LB 97 crecieron más que las de Loica y las de Hawaii 7981. Cuanto mayor es el tamaño de las manchas, mayor es la colonización del tejido (Parlevliet, 1979). Es decir que LB 97 parecería tener mayor resistencia a la penetración en el tejido (similar a Loica y Hawaii 7981) lo que se vincula con una baja densidad de estomas, más que a la colonización del tejido luego del ingreso al mesófilo de la hoja (mecanismo de resistencia interno de la planta).

En cámara de crecimiento, a los 10 días desde la inoculación se encontraron dificultades para el conteo de manchas foliares debido a que comenzaron a coalescer entre ellas. Además, las hojas con muchas manchas se tornaban amarillentas y tendían a caer. Esto coincide con lo obtenido por Montelongo (2012), que propone que lo más apropiado es medir el número de manchas entre los 9 y los 13 días desde la inoculación. En el experimento en invernadero, el avance de la enfermedad se produjo más lento y se pudieron contabilizar manchas sin dificultad hasta los 17 días desde la inoculación. Esto se podría explicar por la menor temperatura promedio registrada en el invernadero.

El número de manchas es un componente de resistencia adecuado para la selección en condiciones controladas cuando se trabaja con gran número de plantas en los programas de mejoramiento. Las ventajas que presenta son, la facilidad de evaluación, rapidez y confiabilidad comparado con otros componentes como el tamaño de las manchas, que es más difícil y es altamente influenciado por el ambiente (Silva-Lobo *et al.*, 2005). La principal desventaja es que no se puede implementar fácilmente en experimentos de campo. Además, las manchas coalescen a medida que avanza la infección, por lo que la cuantificación se hace difícil si no se realiza en el momento oportuno (Montelongo, 2012).

En lo que refiere al monitoreo de la población bacteriana, se encontró un aumento sostenido de la población cada día de evaluación en todos los genotipos. La línea Hawaii 7981, LB 97 y Loica presentaron mayor resistencia que LB 85 a la multiplicación bacteriana dentro del tejido vegetal. Los mecanismos de resistencia dentro de la hoja están vinculados con la limitación de nutrientes esenciales, presencia de inhibidores preformados o inducidos por la bacteria (Chand y Walker, 1964; Niks y Lindhout, 2004). Según Silva-Lobo *et al.* (2005), antes de la presencia de síntomas visibles, el crecimiento de la población bacteriana se correlaciona con el nivel de resistencia a campo. Esto se comprobó ya que

los genotipos con mayor resistencia a la multiplicación bacteriana en el tejido (Hawaii 7981, LB 97 y Loica) presentaron mayor resistencia en los experimentos 1 y 2, así como en estudios previos realizados a campo (Berrueta, 2012). Somodi *et al.* (1991) también encontraron una correlación alta y significativa entre la severidad en el campo y el número de células bacterianas por lesión ( $r = 0,96$ ).

A las 72 horas desde la inoculación, la variedad H 9997 y la línea LB 85 presentaron un aumento importante en la población bacteriana por superficie de hoja en relación al resto de los genotipos. Estas diferencias, a pesar de no ser significativas, parecerían indicar que estos materiales permitieron una mayor multiplicación bacteriana dentro del tejido. Esto coincide con los resultados obtenidos en número de manchas y severidad en las hojas, donde H9997 y LB 85 presentaron los valores más altos.

El monitoreo de la población bacteriana no se adapta a la evaluación de un gran número de genotipos en condiciones controladas debido a que es un procedimiento muy difícil y no se aplica como herramienta para el tamizado de materiales de mejoramiento. Sin embargo, es de interés a la hora de buscar explicación a los resultados obtenidos en severidad en hoja, período de latencia o número de manchas. En este trabajo se tomaron muestras circulares con sacabocados tomando como centro el punto de inoculación por infiltración. Dado que las hojas presentan diferencias morfológicas y que resulta difícil inocular una misma cantidad de suspensión bacteriana en la hoja, es esperable que la distribución del inóculo en el tejido sea diferente en cada hoja. Una estrategia que podría uniformizar la muestra sería tomar toda la hoja y medir el área de la misma para determinar la concentración de células por superficie de hoja.

Analizando las variables en conjunto en las dos condiciones evaluadas, se destacaron la variedad Loica, Hawaii 7981, LB 97 y LB 76, como las más resistentes en los experimentos. La variedad Loica y las líneas LB 97 y 76 presentaron altos niveles de resistencia parcial a mancha bacteriana raza T2 en estudios a campo realizados en Uruguay coincidentemente con lo obtenido en este trabajo (Berrueta, 2012). La variedad Loica fue originada en 1973 en Argentina a partir del cruzamiento entre las variedades de tomate Roma y Platense (Gallardo y Calvar, 1992; Díez *et al.*, 1993; Lopez-Lambertini, 2003). Esta variedad se introdujo al Uruguay en los años 70 y se cultiva comercialmente hasta la actualidad. Durante todo el período de cultivo en el país se ha realizado un proceso de selección por los productores comerciales. Además, desde el año 2001 se

incorporó en el programa nacional de mejoramiento de tomate para industria en el INIA Uruguay. Presenta adaptación a las condiciones de producción del país, rusticidad y tolerancia a enfermedades, como al virus de la peste negra del tomate TSWV (Gallardo y Calvar, 1992). Las líneas LB 76 y LB 97 se originaron a partir de cruzamientos utilizando a Loica como parental. Es posible que la resistencia parcial observada en las líneas LB 97 y LB 76 provenga de Loica.

Hawaii 7981 mostró un alto nivel de resistencia parcial a mancha bacteriana raza T2, a diferencia de lo obtenido por Scott *et al.* (1997) en experimentos realizados a campo y en condiciones controladas. En estos trabajos esta variedad no se encontró dentro de las de mayor resistencia a la raza T2 pero tampoco se diferenció estadísticamente de la variedad Hawaii 7998, que presenta resistencia intermedia (Scott *et al.*, 1997). Sin embargo, en estudios realizados en Uruguay por Berrueta (2012), se encontró un alto nivel de resistencia parcial de Hawaii 7981 a la raza T2 en experimentos a campo, coincidiendo con lo obtenido en este trabajo. Además, Hawaii 7981 resulta interesante para los programas de mejoramiento ya que contiene el gen Xv3 que confiere resistencia por hipersensibilidad a la raza T3 (Jones *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1996).

A partir de la determinación de componentes de resistencia en cámara de crecimiento e invernadero se concluye que las líneas LB 76 y LB 97, y las variedades Loica y Hawaii 7981 presentan resistencia parcial a mancha bacteriana. Estos materiales pueden ser interesantes para incorporarse a programas de mejoramiento por resistencia a *Xanthomonas vesicatoria* raza T2. De los componentes determinados se destacó el número de manchas, que permitió diferenciar materiales por resistencia de manera fácil, confiable y permite trabajar con gran número de plantas en condiciones controladas. En contraposición el período de latencia no fue eficiente en este estudio para distinguir genotipos por resistencia a la enfermedad. El monitoreo de la población bacteriana es difícil de realizar y no se adapta a ensayos de gran número de plantas.

## Bibliografía

- Astua-Monge G, Minsavage GV, Stall RE, Vallejos CE, Davis MJ, Jones JB. 2000. Xv4-vrx4: A new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* sp. *vesicatoria* race T3 and the wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 13(12): 1346-1355.
- Beattie GA, Lindow SE. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 145-172.
- Bergamim Filho A, Kimati H, Amorim L. 1995. Manual de fitopatología: Principios e conceitos. 3a ed. São Paulo: Ceres. 317p.
- Berrueta MC. 2012. Evaluación de germoplasma de tomate para industria y determinación de los componentes de resistencia a mancha bacteriana raza T3 [Tesis de Magister]. Montevideo: Facultad de Agronomía. 86p.
- Blancard D. 1992. Enfermedades del tomate. Madrid: Mundiprensa. 212p.
- Cerkauskas R. 2005. Tomato Diseases: Bacterial Spot: *Xanthomonas campestris* sp. *vesicatoria* [en línea]. Shanhua: AVRDC. 2p. Consultado 1 julio 2013. Disponible en: <http://www.lsuagcenter.com/MCMS/RelatedFiles/%7B878A92AC-6EB2-4222-B0F8-BF6DDDE1B82A%7D/Bacterial+Spot.pdf>.
- Chand JN, Walker JC. 1964. Relation of age of leaf and varietal resistance to bacterial multiplication in cucumber inoculated with *Pseudomonas lachrymans*. *Phytopathology*, 54: 49-50.
- De Mello SCM, Takatsu A, Lopes CA. 1997. Escala diagramática para avaliação da mancha-bacteriana do tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 22(3): 447-448.
- Diez MJ, Nuez F, Jordá C, Juárez M, Ortega A. 1993. Búsqueda de fuentes de resistencia al virus del bronceado (Tomato spotted wilt virus) para la mejora de tomate y pimiento. En: II Congreso Ibérico de ciencias hortícolas; 27-30 abril, 1993; Zaragoza, España. Comunicaciones. Zaragoza: SECH. pp. 1286-1291.
- Emmatty A, Schott MD, George BF. 1982. Inoculation technique to screen for bacterial speck resistance of tomatoes. *Plant Disease*, 66: 993-994.
- EPPO, CABI. 2006. Data Sheets on quarantine pest: *Xanthomonas vesicatoria* [en línea]. Consultado 2 julio 2013. Disponible en: [http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacterial/Xanthomonas\\_vesicatoria/XANTVE\\_ds.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacterial/Xanthomonas_vesicatoria/XANTVE_ds.pdf).
- Gallardo GS, Calvar DJ. 1992. Tomato for industry breeding program in Argentina. *Acta Horticulturae*, 301: 87-90.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. 2004. Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27: 755-762.
- Jones JB, Stall RE, Scott JW, Somodi GC, Bouzar H, Hodge NC. 1995. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* sp. *vesicatoria*. *Plant Disease*, 79: 395-398.
- Jones JB, Stall RE, Zitter TA. 1991. Compendium of tomato diseases. Minnesota: APS press. 73p.
- Jones JB, Scott JW. 1986. Hypersensitive response in tomato to *Xanthomonas campestris* sp. *vesicatoria*. *Plant Disease*, 70: 337-339.
- López-Lambertini P, Biderbost E, Di Feo L, Mollinedo VA. 2003. Relación entre la concentración viral y la tolerancia al TSWV determinado por el gen «platense» en tomate. *Fitopatología*, 38 (1): 23-31.
- Lugon Lima M, Moulin M, Bentos CS, Sudré CP, Riva-Souza EM, Silva MP, Rodrigues R, Araujo JS. 2005. Acessos de tomateiro resistentes as raças T1, T2 e T3 de *Xanthomonas campestris* sp. *vesicatoria*. En: 45° Congresso Brasileiro de Olericultura; 7-12 agosto, 2005; Fortaleza, Brasil. Anais. Piracicaba: ABH. pp. 89-93.
- Mendes de Souza MF, Rodrigues R, Texeira do Amaral A, Pombo C. 2008. Genetic parameters of resistance components to *Xanthomonas* spp. in tomato. *Crop Breeding and applied Biotechnology*, 8: 155-162.
- Menezes dos Santos JR. 1999. Protocolo de tecnologia: Seleção para resistência a doenças em hortaliças. Brasília: Embrapa Hortaliças. 4p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico; 11).
- Montelongo MJ. 2012. Caracterización de *Xanthomonas* spp. causantes de la mancha bacteriana del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Uruguay [Tesis de Maestría]. Montevideo: Facultad de Agronomía. 70p.
- Niks RE, Lindhout WH. 2004. Curso sobre mejoramiento Resistencia durable a patógenos especializados. 3a ed. Netherland: Wageningen Agricultural University. 205p.
- Parlevliet JE. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology*, 17: 203-222.

- Ramos LJ, Narayanan KR, McMillan RT.** 1992. Association of stomatal frequency and morphology in *Lycopersicon* species with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant pathology*, 41(2): 157 - 164.
- Ramos LJ, Volin RB.** 1987. Role of stomatal opening and frequency on infection of *Lycopersicon* spp. by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, 77: 1311 - 1317.
- Ribeiro Do Vale FX, Parlevliet JE, Zambolim L.** 2001. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, 26(3): 577 - 589.
- Scott JW, Miller SA, Stall RE, Jones JB, Somodi GC, Barbosa V, Francis DL, Sahin F.** 1997. Resistance to race T2 of the bacterial spot pathogen in tomato. *HortScience*, 32(4): 724 - 727.
- Scott JW, Stall RE, Jones JB, Somodi GC.** 1996. A single gene controls the hypersensitive response of Hawaii 7981 to race 3 (T3) of the bacterial spot pathogen. *Report of the tomato genetics cooperative*, 46: 23 - 26.
- Silva-Lobo VL, Lopes CA, Giordano LB.** 2005. Componentes da Resistência a mancha-bacteriana e crescimento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, raça T2, em genótipos de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, 30(1): 17 - 20.
- Somodi GC, Jones JB, Scott JW, Jones JP.** 1994. Screening tomato seedlings for resistance to bacterial spot. *HortScience*, 29(6): 680 - 682.
- Somodi GC, Jones JB, Scott JW.** 1991. Populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in lesions of susceptible and resistant tomato genotypes. *Plant Disease*, 75: 357-360.
- Stall RE, Jones JB, Minsavage GV.** 2009. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 265 - 284.
- Van Der Plank JE.** 1963. Plant disease: epidemic and control. London: Academic Press. 349p.
- Yang W, Francis DM.** 2006. Genetics and breeding for resistance to bacterial diseases in tomato : prospects for marker-assisted selection. En: Razdan MK, Mattoo AK. [Eds.]. Genetic improvement of Solanaceous crops. Volume 2: Tomato. Jersey: Science publishers. pp. 379 - 419.
- Yang W, Sacks EJ, Lewis ML, Miller SA, Francis DM.** 2005. Resistance in *Lycopersicon esculentum* intraspecific crosses to race T1 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* causing bacterial spot of tomato. *Phytopathology*, 95: 519 - 527.
- Yu ZH, Wang JF, Stall RE, Vallejos CE.** 1995. Genomic localization of tomato genes that control a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. *Genetics*, 141: 675 - 682.
- Zadoks JC.** 1997. Disease resistance testing in cocoa: A review on behalf of FAO/INGENIC. Reading: INGENIC. 73p.