



*Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados*



**CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Xylella fastidiosa*
EN PLANTACIONES DE OLIVO DE ARGENTINA**

Ing. Agr. (MSc.) Patricia A. Tolocka

**Tesis
Para optar al Grado Académico de Doctora en Ciencias Agropecuarias
Mención: Protección Vegetal**

Córdoba, 2022

CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIA *Xylella fastidiosa* EN PLANTACIONES DE OLIVO DE ARGENTINA

Ing. Agr. (MSc.) Patricia A. Tolocka

Comisión Asesora de Tesis

Director: Ing. Agr. (Dra.) Raquel M. Haelterman

Codirectora: Biól. (Dra.) Fabiana A. Guzmán

Asesor: Ing. Agr. (Dr.) Ricardo J. Taborda

Tribunal Examinador de Tesis

Ing. Agr. (Dra.) Mariela Torres

Ing. Agr. (Dr.) Pablo Pizzuolo

Ing. Agr. (Dr.) Ricardo J. Taborda

Presentación Formal Académica

25 de noviembre de 2022

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

AGRADECIMIENTOS

Les quiero agradecer:

- Muy especialmente a mi directora de tesis la Ing. Agr. (Dra.) Raquel M. Haelterman y a mi codirectora Biól. (Dra.) Fabiana A. Guzmán, por estimularme desde un principio en realizar este trabajo científico, acompañándome en todo momento y compartiendo sus amplios conocimientos como investigadoras en el Área de Bacteriología. Considero que fue muy gratificante para mí y a su vez haberlas tenido a las dos por ser excelentes personas y profesionales que siempre me brindaron sus valiosos consejos que resultaron muy fructíferos.

- A mi asesor Ing. Agr. (Dr.) Ricardo Taborda por sus aportes y sugerencias oportunamente brindadas en las correcciones de la redacción y bibliografía suministrada para un desarrollo más completo de este manuscrito.

- A los directores: Ing. Agr. (MSc.) Alejandro Rago y Biól. (Dr.) Alejandro Giayetto, por abrirme las puertas del Centro de Investigación Agropecuaria (CIAP) y del Instituto de Patología Vegetal (IPAVE)-Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola (UFYMA)-Instituto Nacional de tecnología Agropecuaria (INTA) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), respectivamente. Por la empatía y confianza depositada en mí al permitirme desarrollar este trabajo de investigación, poder crecer y enriquecerme en aspectos no solo profesionales sino también personales.

- A la Dra. Cecilia Luciani y a la Dra. Fernanda Mattio por su buena predisposición en enseñarme a realizar e interpretar análisis moleculares y filogenéticos.

- A la Dra. Blanca Landa del Castillo y a la Biól. Olivares García Concepción del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS) del Consejo Superior de Investigaciones Científica (CSIC), Córdoba, España por su calidez humana y por permitirme trabajar en sus laboratorios, capacitándome en técnicas moleculares.

- A la Escuela para Graduados de la Facultad de Ciencias Agropecuarias-FCA de la Universidad Nacional de Córdoba-UNC por mantenerme informada en todo momento.

- A mis queridos compañeros y amigos del INTA: Biól. Dra. Karina Torrico Ramallo, Biól. Dr. Fabián Giolitti, Dra. Vanina Alemandri, Dra. Otero María, Dra. Ana Dumón, Dra. Claudia Nome, Dr. Leandro Ortega, Dra. Liliana Di Feo, Dra. Julia Martino, Dra. Angélica Dal Zotto, Dra. Patricia Rodríguez Pardina, Dra. Mónica Sagadín por su colaboración en eventualidades dudas inherentes al trabajo.

- Agentes del SENASA Ing. Agr. (MSc.) Mónica Roca y a la Ing. Agr. María Giménez por su colaboración en los monitoreos realizados, envió de trabajos y materiales para su posterior análisis.

- Personal técnicos de laboratorio (Srta. Soledad Brandimarte, Sra. Valeria Quevedo), personal de apoyo de laboratorio (Sr. Walter Arce) por su valiosa ayuda brindada en todo momento.

- Agentes del soporte informático y técnico Ing. Carolina Rubiolo y el Sr. Claudio Nikolaus, bibliotecaria Lic. Gisela Benetti, de campo, de recepción, administración, de recursos humanos, de seguridad e higiene y de comunicación/difusión, a todos por su ayuda cotidiana en los quehaceres de la labor diaria.

- A mi familia (Agustina y Martín) y demás familiares, por la tolerancia y paciencia que tuvieron conmigo en la escritura del manuscrito y el apoyo incondicional que me brindaron para seguir adelante.

- A los productores, técnicos y encargados por permitirme el ingreso a sus establecimientos para los relevamientos realizados en la localidad de Aimogasta (La Rioja) y en el Dpto. Cruz del Eje (Córdoba).

A mi familia, Agustina y Martín, con Amor.
A mis abuelos, padre, madre, hermanos, suegros y cuñados

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”

Albert Einstein

RESUMEN

El olivo (*Olea europaea* L.) pertenece a la familia *Oleaceae* que comprende especies de frutales perennes, distribuidas en regiones tropicales y templadas de todo el mundo. Es considerado un cultivo ancestral de gran importancia por sus cualidades y atributos relacionados con la salud humana. A nivel mundial, Argentina se encuentra posicionada en el décimo lugar como productor de aceite, séptimo de aceitunas de mesa y ocupando el primer lugar en el continente americano como exportador. La olivicultura en nuestro país se encuentra afectada por diversas causas siendo la problemática sanitaria uno de los aspectos más preocupantes. A finales del año 2013, la primera detección de la bacteria *Xylella fastidiosa*, complicó aún más este panorama sobre todo para el cultivar Arauco, emblemático de la provincia de La Rioja, donde desde hace varios años, se viene acentuando un marcado decaimiento de olivares tradicionales de más de 50 años de edad. Siguen en orden de importancia el Dpto. Cruz del Eje (Córdoba) y las provincias de Catamarca y Buenos Aires. En La Rioja, el foco de infección se encuentra en el Dpto. Arauco, localidad de Aimogasta donde se observó en varias fincas, el abandono de los olivares debido a que dejó de ser un cultivo rentable para muchos productores de la zona por los problemas fitosanitarios que se detectaban, llegando a causar hasta la muerte de la planta. Debido a esta grave situación sanitaria y junto con SENASA de La Rioja, se realizó una prospección de la bacteria en las principales regiones productoras del país para conocer la distribución de *X. fastidiosa* a nivel nacional. Del total de muestras analizadas entre los años 2013-2021, se obtuvo un 37,2% de plantas enfermas en La Rioja, 39,6% en Córdoba, 33,3% en Catamarca y un 66,7% en Buenos Aires. Se logró el aislamiento de una cepa proveniente de almendro (origen Catamarca) y dos procedentes de olivo (origen La Rioja). Con los cultivos bacterianos, se continuó con la caracterización del patógeno mediante los sistemas de tipificación *Multilocus Sequence Typing* (MLST) y *Variable Number of Tandem Repeat Analysis* (MLVA). Con los MLST, se determinaron dos grupos genéticos o tipos de secuencias-ST, pertenecientes ambos a la subespecie *pauca* y presentes sólo en Argentina: el ST69 presente en fincas de olivo de La Rioja, Córdoba, Catamarca y cítricos del NEArgentino y el ST78 hallado en almendro y olivos de Córdoba. Con el sistema de clasificación MLVA, se obtuvo una marcada variabilidad genética entre cepas pertenecientes al mismo ST, incluso entre las

encontradas en la misma región geográfica. Con el aislamiento de una cepa de *X. fastidiosa* se obtuvieron antisueros que fueron empleados para la puesta a punto de la técnica serológica DAS ELISA. Se obtuvieron resultados importantes en cuanto a sensibilidad y especificidad con el suero AsXf.4, comparables a los obtenidos con el kit comercial AGDIA. Se evaluó, además, la respuesta de tolerancia/susceptibilidad de dos cultivares, Arauco y Frantoio, frente a inoculaciones realizadas con suspensiones bacterianas. De las 11 plantas infectadas de cada cultivar, al año y 4 meses, comenzaron a observarse síntomas atribuibles a la bacteria solamente en el cv. Arauco. A los 24 meses, de las 11 plantas inoculadas de este cultivar, 9 resultaron positivas por qPCR, presentando, además, manifestación de síntomas. Respecto al cv. Frantoio, solo una planta fue positiva a los 2 años de inoculación de la bacteria, pero sin síntomas. De esta manera, con respecto a la patogenicidad, es posible sugerir que el cv. Arauco es notablemente más susceptible a *X. fastidiosa* con respecto al cv. Frantoio, el cual se presentó como tolerante frente al patógeno. Se completaron los postulados de Koch, al lograr re aislar la bacteria a partir de una de las plantas que resultaron positivas para *X. fastidiosa*.

Palabras claves: bacteria vascular, especies leñosas, pruebas inmunológicas.

ABSTRACT

The olive tree (*Olea europaea* L.) belongs to the *Oleaceae* family that includes species of perennial fruit trees, distributed in tropical and temperate regions around the world. It is considered an ancestral crop of great importance for its qualities and attributes related to human health. In the world, Argentina is positioned in the tenth place as an oil producer, seventh in table olives and occupying the first place in the American continent as an exporter. Olive growing in our country is affected by various causes, with health problems being one of the most worrying aspects. At the end of 2013, the first detection of the *Xylella fastidiosa* bacterium further complicated this scenario, especially for the Arauco cultivar, emblematic of the province of La Rioja, where for several years, a marked decline in traditional olive groves has been accentuating. over 50 years of age. Next in order of importance are the Department of Cruz del Eje (Córdoba) and the provinces of Catamarca and Buenos Aires. In La Rioja, the focus of infection is in the Department of Arauco, a town in Aimogasta, where the abandonment of olive groves was observed on several farms because it ceased to be a profitable crop for many producers in the area due to phytosanitary problems. that were detected, even causing the death of the plant. Due to this serious health situation and together with SENASA of La Rioja, a survey of the bacteria was carried out in the main producing regions of the country to find out the distribution of *X. fastidiosa* at the national level. Of the total samples analyzed between the years 2013-2021, 37.2% of sick plants were obtained in La Rioja, 39.6% in Córdoba, 33.3% in Catamarca and 66.7% in Buenos Aires. The isolation of one strain from almond trees (Catamarca origin) and two from olive trees (La Rioja origin) was achieved. With the bacterial cultures, the characterization of the pathogen continued using the *Multilocus Sequence Typing* (MLST) and *Variable Number of Tandem Repeat Analysis* (MLVA) typing systems. With the MLST, two genetic groups or types of ST-sequences were determined, both belonging to the *pauca* subspecies and present only in Argentina: ST69 present in olive farms in La Rioja, Córdoba, Catamarca and citrus in NEArgentino and ST78 found in almond and olive trees of Córdoba. With the MLVA classification system, a marked genetic variability was obtained between strains belonging to the same ST, even between those found in the same geographical region. With the isolation of a strain of *X. fastidiosa*, antisera were obtained that were used to fine-tune the DAS ELISA serological technique. Important results were obtained in terms of sensitivity and specificity with the

As *Xf.4* serum, comparable to those obtained with the AGDIA commercial kit. In addition, the tolerance/susceptibility response of two cultivars, Arauco and Frantoio, was evaluated against inoculations made with bacterial suspensions. Of the 11 infected plants of each cultivar, after a year and 4 months, symptoms attributable to the bacterium began to be observed only in cv. Arauco. At 24 months, of the 11 inoculated plants of this cultivar, 9 were positive by qPCR, also presenting symptoms. Regarding the cv. Frantoio, only one plant was positive 2 years after inoculation of the bacteria, but without symptoms. Thus, regarding pathogenicity, it is possible to suggest that cv. Arauco is notably more susceptible to *X. fastidiosa* than cv. Frantoio, which was presented as tolerant against the pathogen. Koch's postulates were completed by re-isolating the bacterium from one of the plants that were positive for *X. fastidiosa*.

Keywords: vascular bacteria, woody species, immunological tests.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
TABLA DE CONTENIDOS	X
LISTA DE TABLAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS Y/O SÍMBOLOS	XXII
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Taxonomía, origen e importancia del olivo en el mundo	1
El cultivo de olivo en Argentina y su importancia	4
Principales plagas y enfermedades en el cultivo de olivo	7
<i>Xylella fastidiosa</i> a nivel mundial	8
Situación actual del olivo en Argentina respecto a <i>X. fastidiosa</i>	12
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS GENERALES	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
BIBLIOGRAFÍA	18
CAPÍTULO II	26
PROSPECCIÓN DE <i>X. fastidiosa</i> EN LAS PRINCIPALES PROVINCIAS OLIVÍCOLAS DE ARGENTINA	26
INTRODUCCIÓN	26
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Área de estudio, prospección y metodología para el muestreo	32
Muestreo de olivos y potenciales hospedantes de <i>X. fastidiosa</i> en zonas productivas del país	37
Técnicas serológicas y moleculares para el diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i>	38

Métodos de aislamientos y evaluación de diferentes medios de cultivos específicos.....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
Prospección de <i>X. fastidiosa</i> en las principales provincias olivícolas de Argentina.....	45
Métodos de aislamientos y evaluación de diferentes medios de cultivos específicos.....	52
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57
CAPÍTULO III	63
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA, SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS LOCALES DE <i>X. fastidiosa</i>	63
INTRODUCCIÓN	63
MATERIALES Y MÉTODOS	69
Caracterización morfológica de <i>X. fastidiosa</i> mediante microscopía electrónica de transmisión	70
Determinación de la presencia de <i>X. fastidiosa</i> en los vasos xilemáticos a través de microscopía óptica confocal	70
Caracterización bioquímica de <i>X. fastidiosa</i>	70
Identificación de <i>X. fastidiosa</i> por técnicas serológicas y moleculares	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
Caracterización morfológica de <i>X. fastidiosa</i> mediante microscopía electrónica de transmisión	72
Determinación de la presencia de <i>X. fastidiosa</i> en los vasos xilemáticos a través de microscopía óptica confocal	74
Caracterización bioquímica de <i>X. fastidiosa</i>	75
Identificación de <i>X. fastidiosa</i> por técnicas serológicas y moleculares	77
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFIA	83
CAPÍTULO IV	86
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE <i>X. fastidiosa</i> MEDIANTE LOS SISTEMAS DE TIPIFICACIÓN <i>Multilocus Sequence Typing-MLST</i> Y <i>Variable Number of Tandem Repeat Analysis-MLVA</i>	86
INTRODUCCIÓN	86
MATERIALES Y MÉTODOS	91

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE TIPIFICACIÓN MLST Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO	91
Desarrollo del sistema de caracterización MLVA	95
Microsatélites con cebadores diseñados para la cepa CoDiRO	95
Microsatélites con cebadores tradicionales	98
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	102
Sistema de tipificación MLST y análisis filogenético	102
Sistema de clasificación MLVA: microsatélites-SSR con los cebadores MP1- MP2-MP3 y tradicionales RP1-RP2-RP3-RP4	108
Microsatélites con cebadores diseñados para la cepa CoDiRO	108
Microsatélites con cebadores tradicionales	111
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA	123
CAPÍTULO V	130
SISTEMA DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y EVALUACIÓN DE TOLERANCIA/SUSCEPTIBILIDAD DE DOS CULTIVARES DE OLIVO INFECTADOS CON <i>X. fastidiosa</i>.....	130
INTRODUCCIÓN	130
MATERIALES Y MÉTODOS	134
Elaboración de sueros para la detección de <i>X. fastidiosa</i>	134
Obtención del inóculo	134
Proceso de inmunización	134
Prueba de suero preinmune mediante la técnica NC ELISA	135
Titulación y comparación de sueros obtenidos	136
Titulación de los sueros obtenidos mediante Dot Blot	136
Análisis comparativo de los sueros mediante PTA ELISA en placa	137
Implementación de la técnica serológica DAS ELISA para el diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i>	138
Respuesta de dos cultivares de olivo frente a la infección con <i>X. fastidiosa</i>	140
Análisis estadístico.....	144
Postulados de Koch	144
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	145
Elaboración de antisueros para la detección de <i>X. fastidiosa</i>	145

Técnica NC ELISA	145
Titulación y comparación de sueros obtenidos	146
Implementación de la técnica serológica DAS ELISA para el diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i>	149
Respuesta de dos cultivares de olivo frente a la infección con <i>X. fastidiosa</i>	155
Análisis estadístico	161
Postulados de Koch	163
CONCLUSIONES.....	166
BIBLIOGRAFÍA.....	168
CAPÍTULO VI	171
CONCLUSIONES GENERALES	171
FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN	175
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS	176
ANEXO	178

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1. Producción mundial de aceite de oliva expresados en 1000 toneladas (Tn) para España y Argentina	2
Tabla 1.2. Producción mundial de aceituna de mesa expresadas en 1000 toneladas (Tn) para España y Argentina	3
Tabla 2.1. Sitios de estudio y plantaciones de olivo en las principales provincias del país	34
Tabla 2.2. Secuencia de cebadores empleados para PCR convencional con cebadores generales y específicos para la detección de <i>X. fastidiosa</i>	39
Tabla 2.3. Concentraciones y volúmenes de los reactivos para la preparación de la mezcla de amplificación del protocolo de PCR convencional para el diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i> con los cebadores RST31/33	40
Tabla 2.4. Concentraciones y volúmenes de los reactivos para la preparación de la mezcla de amplificación del protocolo de PCR convencional para el diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i> con los cebadores HL5/HL6	40
Tabla 2.5. Condiciones de ciclado y tamaño de banda esperado para los cebadores RST31/ RST 33 y HL5/ HL6	40
Tabla 2.6. Prospección de <i>X. fastidiosa</i> en plantaciones de olivo de las principales provincias productivas de olivo de Argentina (2013-2021) ..	46
Tabla 4.1. Suspensiones bacterianas y materiales vegetales caracterizados a través del sistema de clasificación MLST	91
Tabla 4.2. Protocolo PCR y ciclado para <i>X. fastidiosa</i> con cebadores de los siete genes <i>housekeeping</i> -MLST	92
Tabla 4.3. Ciclado para <i>X. fastidiosa</i> con cebadores de los siete genes <i>housekeeping</i> -MLST	92
Tabla 4.4. Cebadores empleados en el PCR para la caracterización por el sistema de tipificación multilocus de secuencias o <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST), tomado de Yuan <i>et al.</i> , 2010	93
Tablas 4.5. Combinaciones y fluoróforo de cada grupo de cebadores MP1/MP2/MP3	96
Tablas 4.6. Protocolo de PCR con el grupo de cebadores MP1 para la cepa CoDiRO según EPPO (2018)	96
Tablas 4.7. Ciclado con el grupo de cebadores MP1 para la cepa CoDiRO según EPPO (2018)	96
Tabla 4.8. Microsatélites-SSR con cebadores tradicionales	98

Tabla 4.9. Protocolo de PCR con los cebadores SSR tradicionales de Lin <i>et al.</i> (2005) y Coletta-Filho <i>et al.</i> (2001)	99
Tabla 4.10. Ciclado con los cebadores SSR tradicionales de Lin <i>et al.</i> (2005) y Coletta-Filho <i>et al.</i> (2001)	100
Tabla 4.11. Esquema de identificación de los alelos correspondiente a cada gen definiendo el ST o Grupo Genético mediante el sistema de clasificación MLST	102
Tabla 4.12. Caracterización molecular de las cepas y materiales vegetales infectados con <i>X. fastidiosa</i> analizados mediante el sistema de Tipificación MLST	103
Tabla 4.13. Diferencias obtenidas en cuanto a la cantidad de nucleótidos distintos entre grupos genéticos de Argentina ST69 (olivo) y ST78 (olivo y almendro), Brasil ST65 (cítrico) e Italia ST53 (olivo)	106
Tabla 4.14. Número de repeticiones de las tres cepas argentinas con cebadores MP1-MP2-MP3.....	110
Tabla 4.15. Número de repeticiones con los cebadores tradicionales para las tres cepas argentinas	115
Tabla 5.1. Secuencia de cebadores y sondas para qPCR empleados en la detección de <i>X. fastidiosa</i>	143
Tabla 5.2. Protocolo qPCR y ciclado para <i>X. fastidiosa</i> con cebadores Harper (2010) Hp1-Hp2 y control interno COX	143
Tabla 5.3. Condiciones de ciclado para los cebadores Harper <i>et al.</i> (2010, erratum 2013)	144
Tabla 5.4. Volumen obtenido en cada sangría de las dos conejas.....	145
Tabla 5.5. Esquema de siembra de las muestras analizadas en placas de poliestireno mediante la técnica DAS ELISA con reactivo AsXf.4 y kit AGDIA.....	151
Tabla 5.6. Valores de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm (A405) obtenidos con el reactivo AsXf.4 y el kit AGDIA a la hora y 45 min.....	152
Tabla 5.7. Respuesta de los reactivos AsXf.4 y AGDIA frente a diferentes concentraciones de <i>X. fastidiosa</i> y tiempos de lectura	153
Tabla 5.8. qPCR positivos (+) para <i>X. fastidiosa</i> en plantas de olivo cv. Arauco y Frantoio en diferentes momentos de análisis en relación a los días desde la inoculación	159
Tabla 5.9. Parámetros evaluados en función de los dos cv. Arauco y Frantoio en relación a los días desde la inoculación	162

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Distribución de la superficie cultivada con <i>Olea europaea</i> L. en porcentaje registradas en las principales provincias productivas del país. Extraído: INDEC, 2018	6
Figura 1.2. Mapa de distribución mundial de la bacteria <i>X. fastidiosa</i>	10
Figuras 2.1 y 2.2. Departamentos muestreados en las provincias de Catamarca y La Rioja, respectivamente	32
Figuras 2.3 y 2.4. Departamentos monitoreados en las provincias de San Juan y Mendoza, respectivamente	33
Figuras 2.5 y 2.6. Departamentos y partidos relevados en las provincias de Córdoba y Buenos Aires, respectivamente	33
Figura 2.7. Departamento muestreado en la provincia de Rio Negro	34
Figura 2.8. A. Planta de olivo con avanzado decaimiento procedente del Dpto. Cruz del Eje (Córdoba), febrero 2021. B-E. Síntoma de rama seca en el extremo superior de la copa. C. Necrosis apical en las hojas. D-F. Chupones con síntomas atribuibles a <i>X. fastidiosa</i>	36
Figura 2.9. Aislamiento de <i>X. fastidiosa</i> a partir de pecíolos de almendro.....	42
Figura 2.10. Proceso de aislamiento a través de la centrifugación de pecíolos y nervaduras de olivo con <i>X. fastidiosa</i>	43
Figura 2.11. Proceso de aislamiento de la bacteria mediante dilaceración de tejido infectado de olivo.....	43
Figura 2.12. Técnica de aislamiento de <i>X. fastidiosa</i> desde ramas de olivo cv. Arauco	44
Figura 2.13. Distribución de <i>X. fastidiosa</i> en las principales provincias olivícolas del país	45
Figura 2.14. A. Tocones de olivares que fueron cortados en una finca de la localidad de Aimogasta. B. Secado de plantas en otra finca de la misma localidad	47
Figura 2.15. Plantas con “Síndrome de decaimiento rápido del olivo” procedentes de Aimogasta.....	48
Figura 2.16. Plantas con síntomas de secado provenientes del Dpto. Cruz del Eje	49

Figura 2.17. Síntomas observados en hojas de plantas de olivo infectadas con la bacteria	49
Figuras 2.18. A. Colonias de la cepa ALM4 de <i>X. fastidiosa</i> en medio PW, aisladas desde almendro. B. Detalle de una colonia a mayor aumento en micras.....	51
Figuras 2.19. A. Colonias de la cepa OLI17A de <i>X. fastidiosa</i> en medio BCYE, aisladas desde olivo. B. Observación de colonias a mayor aumento en micras.....	51
Figuras 2.20. A. Colonias de la cepa ALM4 de <i>X. fastidiosa</i> en medio PW, aisladas desde almendro. B. Detalle de una colonia a mayor aumento en micras	51
Figuras 2.21. A. Colonias de la cepa OLI17A de <i>X. fastidiosa</i> en medio BCYE, aisladas desde olivo. B. Observación de colonias a mayor aumento en micras	54
Figura 3.1. Ciclo de vida y transmisión de <i>X. fastidiosa</i> al olivo (Almeida, 2016)	65
Figuras 3.2. Observación de <i>X. fastidiosa</i> mediante microscopía electrónica de transmisión. A: Detección de células bacterianas dentro de haces xilemáticos de pecíolos de hojas de olivo a un aumento de X15000, B: Distribución del patógeno en varios vasos del xilema a X6000, C: Determinación de la característica morfológica de los bacilos a X20000....	72
Figuras 3.3. A. Bacilos de <i>X. fastidiosa</i> presente en vasos xilemáticos de hojas de olivo de la planta OLI17A, observados por microscopía electrónica de transmisión. B. Detalles del bacilo a mayor aumento. C. Bacilo de <i>X. fastidiosa</i> a mayor aumento determinando su diámetro	73
Figuras 3.4. Cortes transversales de pecíolos de hojas de olivo en los cuales se observa los vasos xilemáticos. A: taponamiento de los haces vasculares en planta enferma con <i>X. fastidiosa</i> OLI17A. B: vasos xilemáticos de planta sana	74
Figura 3.5. Tinción de Gram de células bacterianas de <i>X. fastidiosa</i> a partir de material vegetal infectado de almendro ALM4	76
Figura 3.6. Tinción de Gram de <i>X. fastidiosa</i> procedente de olivo cepa OLI17A...	76
Figura 3.7. Prueba de solubilidad en K(OH) para <i>X. fastidiosa</i> cepa OLI17A en olivo	76
Figura 3.8. Prueba de oxidasa de <i>X. fastidiosa</i> cepa OLI17A en olivo	76
Figura 3.9. Prueba de catalasa de la cepa OLI17A en olivo	77
Figura 3.10. Prueba del Metabolismo oxidativo-fermentativo de la glucosa para <i>X. fastidiosa</i> en olivo	77

Figuras 3.11. DAS ELISA de colonias individuales de <i>X. fastidiosa</i> ALM4 procedentes de almendro en placas de poliestireno observando reacción positiva con las enzimas peroxidasa (A) y fosfatasa alcalina (B).....	78
Figuras 3.12. DAS ELISA de colonias individuales de <i>X. fastidiosa</i> cepa OLI17A procedentes de olivo en placas de poliestireno observando reacción positiva con las enzimas peroxidasa (A) y fosfatasa alcalina (B)	78
Figuras 3.13. A y B. PCR convencional de colonias de <i>Xylella fastidiosa</i> proveniente de almendro ALM4 con cebadores RST 31/33 para la bacteria. Calles 1 a 15 son colonias obtenidas a partir de aislamiento de la misma planta. Las calles 4 y 6 dieron negativas. TE (testigo enfermo), TS (testigo sano), Agua (control negativo), M (marcador de peso molecular Ladder 100pb.)	79
Figuras 3.14. A y B. PCR convencional de colonias de <i>X. fastidiosa</i> OLI17A a partir de olivo con cebadores RST31/33 para la bacteria. Las calles C5 a C10 son colonias de aislamientos de la misma planta de olivo. La calle C8 dio negativa. TE (testigo enfermo), TS (testigo sano), Agua (control negativo), M (marcador de peso molecular Ladder 100 pb.)	80
Figuras 3.15. PCR convencional de colonias de <i>Xylella fastidiosa</i> OLI17A a partir de olivo con cebadores HL5/HL6 para la bacteria. Calles C1 a la C4 son colonias de aislamientos de la misma planta de olivo. TE (testigo enfermo), Agua (control negativo), M (marcador de peso molecular Ladder 100 pb.)	81
Figura 4.1. Esquema del procedimiento del sistema MLST para definir el ST. Los loci se amplifican mediante PCR, se secuencian y a cada secuencia se le asigna un número de alelo, y la combinación única de los alelos determina el ST	94
Figura 4.2. Árbol filogenético de los tipos de secuencias (ST) de <i>X. fastidiosa</i> subsp <i>pauca</i> provenientes de diferentes hospedantes y países. Realizado a través del método Neighbor-Joining con el programa Mega versión 6.0. Los valores de bootstrap (1000 repeticiones) se indican en cada nodo. La barra indica número de sustituciones/nucleótidos.....	104
Figura 4.3. Ubicación filogenética de los ST de <i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> ST69 de cítricos de Argentina en relación a los ST más emparentadas presentes en Brasil	105
Figura 4.4 Representación gráfica de las distancias entre ST de Argentina y Brasil mediante el análisis del algoritmo de BURST que agrupa ST de <i>X. fastidiosa</i> (olivo, almendro, cítricos) de Argentina y de Brasil (cítricos) en función del recuento en el número de perfiles	107
Figura 4.5. Figura 4.4. Imágenes de los geles de agarosa con el empleo de cebadores de CoDiRO. Pug: Puglia (muestra del sur de Italia). Aislamientos argentinos: <i>Xy_OLI_17A_1-MP1</i> : cepa <i>X. fastidiosa</i> de olivo17A muestra 1, empleando la mezcla de cebadores del grupo 1; <i>Xy_Alm_4</i> : cepa <i>X. fastidiosa</i> de almendro 4, utilizando la mezcla de cebadores del grupo 1 CoDiRO, el grupo de cebadores MP1;	

<p><i>Xy_Angelina_1</i>-MP1: cepa <i>X. fastidiosa</i> de Angelina-AM2 muestra 1, utilizando la mezcla de cebadores MP1. MP2/MP3: mezcla de cebadores del grupo 2 y 3 de CoDiRO, DD-MP1: control positivo De Donno (Italia), para la mezcla de cebadores del grupo 1 CoDiRO, C-MP1: control negativo para la mezcla de cebadores del grupo 1 CoDiRO, Marcador PM (Ladder 100 pb.)</p>	109
<p>Figura 4.6. A, B. Perfil de bandeo con cebadores tradicionales CSSR10 y ASSR9 de las cepas ALM4, AM2-Angelina, OLI17A. C+1961: control positivo, C-: control negativo, Marcador PM (Ladder 100 pb.). Corrida en gel de agarosa al 2%</p>	111
<p>Figura 4.7. C. Perfil de bandeo con cebadores tradicionales ASSR12, OSSR17 y GSSR7 de las cepas ALM4, AM2-Angelina, OLI17A. C+1961: control positivo, C-: control negativo, Marcador PM (Ladder 100 pb.). Corrida en gel de agarosa al 2%</p>	112
<p>Figura 4.8. D. Perfil de bandeo con cebadores tradicionales CSSR6, CSSR7, CSRR13, CSRR17 y CSSR20 de las cepas ALM4, AM2-Angelina, OLI17A. C+1961: control positivo, C-: control negativo, Marcador PM (Ladder 100 pb.). Corrida en gel de agarosa al 2%</p>	112
<p>Figura 4.9. E. Perfil de bandeo con cebadores tradicionales SSR20, SSR28 y SSR40 de las cepas ALM4, AM2-Angelina, OLI17A. C+1961: control positivo, C-: control negativo, Marcador PM (Ladder 100 pb.). Corrida en gel de agarosa al 2%</p>	113
<p>Figura 4.10. Árbol filogenético de las tres cepas argentinas (AM2-Angelina, OLI17A, ALM4) y un aislamiento (C+1961) proveniente de España. Realizado con el método Neighbor-Joining empleando el programa MEGA versión 11</p>	114
<p>Figura 4.11. Perfil de bandeo con combinaciones de cebadores tradicionales (RP3 y RP4) en diferentes muestras de cítricos de nuestro país. Control negativo (agua). Marcados PM (Ladder100 pb.). Corridas en gel de agarosa al 2%</p>	116
<p>Figura 4.12. Perfil de bandeo con combinaciones de cebadores tradicionales (RP3 y RP4) de muestras de olivo infectadas con <i>X. fastidiosa</i> procedentes de La Rioja, Catamarca y Córdoba, marcador PM (Ladder 100 pb.), Control negativo (agua). Corridas en geles de poliacrilamida al 10%</p>	117
<p>Figura 4.13. Perfil de bandeo con combinaciones de cebadores tradicionales (RP3) de muestras de olivo, cítrico y almendro infectadas con <i>X. fastidiosa</i> procedentes de Córdoba, Catamarca, La Rioja, Corrientes. Marcador PM (Ladder 100 pb.), control negativo (agua). Corrida en geles de agarosa al 2%</p>	118

Figura 4.14. Perfil de bandeado con combinaciones de cebadores tradicionales (RP3) de muestras de olivo infectadas con <i>X. fastidiosa</i> , procedentes de diferentes plantaciones de las provincias de Córdoba, La Rioja y Catamarca. Las muestras 1-11 inclusive son del Dpto. Cruz del Eje-(C.E.) (cv. Nevadillo y Frantoio), de la 15-17 inclusive de Córdoba, Capital (C. C.) (cv. Oblonga), de la 20-25 y 28 inclusive son de La Rioja- (L. R.) (cv. Arauco), las muestras 26-27-29 son procedentes de Sumalao, Catamarca-(C.). Las muestras 26 y 28 resaltadas en cuadrante amarillo es la que muestra el perfil de bandeado más diferente en relación a las otras muestras analizadas. TS: olivo, TE: suspensión bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> proveniente de olivo de Cruz del Eje. Marcador PM (Ladder 100 pb.), control negativo (agua). Corridas en gel de poliacrilamida al 10%	119
Figura 5.1. A. Olivo cv. Arauco de 1 año de edad fenológica. B. Colocación de una gota de 7µl del inóculo <i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> , cepa OLI17A sobre la epidermis del tallo principal de cada planta. C. Técnica <i>pinprick</i> (pinchazo de alfiler), en el cual se realizó hasta 5 pinchados en cada entrenudo para el ingreso de dicha gota al sistema vascular (xilema). C. Punto de inoculación (PI) en los tres nudos consecutivos de cada rama principal	141
Figura 5.2. Señalización de la zona de inoculación donde se realizó el <i>pinprick</i> (pinchazo de alfiler) en cada rama de plantas de olivo cv. Arauco (A) y cv. Frantoio (B). Cada flecha roja indica el PI	142
Figura 5.3. Prueba de suero preinmune por la técnica Dot Blot realizado en dos membranas, empleando suspensión bacteriana de <i>X. fastidiosa</i> de la cepa OLI17A, de <i>Xanthomonas</i> spp. y extracto de planta sana de olivo, cítrico, almendro y tampón de extracción	146
Figura 5.4. Técnica Dot Blot. A y B. Membranas de nitrocelulosa sin tratamiento con cloroformo. C. Membrana con tratamiento de cloroformo empleando la dilución 1/1.000 del suero AsXf.1	147
Figura 5.5. Técnica Dot Blot en membranas de nitrocelulosa. Detección de <i>X. fastidiosa</i> , utilizando diluciones de 1/20000, 1/40000, 1/80000, 1/160000 y 1/320000, de los sueros AsXf.2. TS: testigo sano, TE: testigo enfermo, Susp. bact.: suspensión bacteriana	148
Figuras 5.6. Presencia de síntomas incipientes de necrosis en el borde y zona apical en hojas por encima de los puntos de inoculación en plantas cv. Arauco a los 16 meses del momento de inoculación con la suspensión de <i>X. fastidiosa</i>	156
Figura 5.7. Síntomas de rama seca en el extremo y necrosis apical-PF en la planta N°19 cv. Arauco (A, B, C, D). Presencia de síntomas de clorosis con puntos necróticos y necrosis apical en hojas de la planta N°12 cv. Arauco (E). En ambas plantas se observaron estos síntomas a los 24 meses del momento de inoculación con la bacteria	157

Figura 5.8. Análisis de regresión. Probabilidad de que la reacción de qPCR resulte positiva en función de los días desde la inoculación en que se realizaron los análisis mediante esta técnica. Los datos en eje X corresponden a los días desde la inoculación y los datos en el eje Y es la probabilidad $P(x=1)$ de obtener un qPCR positivo	161
Figura 5.9. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. C1: Suspensión de una colonia de <i>X. fastidiosa</i> proveniente de la planta N°19 de olivo cv. Arauco que fue inoculada con la cepa OLI17A, Agua: Control negativo, TS: testigo sano planta de olivo, TE: suspensión bacteriana de la cepa OLI17A. Marcador PM (Ladder100 pb.)	164
Figura 5.10. Planta N°19 cv. Arauco infectada con <i>X. fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> , a partir de la cual se re aisló el patógeno	165

LISTA DE ABREVIATURAS Y/O SÍMBOLOS

BCYE	Agar de extracto de levadura y carbón tamponado
°C	Grados centígrados
cm	Centímetro
COI	Consejo Olivícola Internacional
DAS ELISA	Doble sándwich de anticuerpos
E.E	Error Estándar
EPPO	Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal
h	Hora
ha	Hectárea
LI	Límite Inferior
LS	Límite Superior
min	Minuto
Mín	Valor mínimo
MLST	Multilocus de secuencias
NEA	Noreste Argentino
NOA	Noroeste Argentino
OQDS	Síndrome del declinamiento rápido del olivo
PD	Enfermedad de la vid
PW	Marchitez de vinca
SSR	Repetición de Secuencia Simple
ST	Tipo de secuencia
Tn	Tonelada
µm	Micrones
UE	Unión Europea
VNTR/MLVA	Repetición en Tándem de Número Variable/Múltiples Análisis Locus

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Taxonomía, origen e importancia del olivo en el mundo

El olivo (*Olea europaea* L.) pertenece a la familia *Oleaceae* que comprende especies de frutales perennes, distribuidas en regiones tropicales y templadas del mundo. Del género *Olea* hay aproximadamente unas 35 especies. El olivo es la única especie de esta familia cuyo fruto es comestible, uno de los árboles cultivados más antiguos, cuyos orígenes como cultivo se inicio hace 4000-3000 años antes de Cristo en la región de Palestina, el 95% del área mundial cultivada se encuentra en el área mediterránea (Rapoport, 2008). La domesticación de esta especie surgió en el Medio Oriente hace unos 6000 años. La cuenca del Mediterráneo corresponde a la principal área productora, como así también la que registra el mayor consumo, tanto de aceitunas de mesa como de aceite de oliva (Costero *et al.*, 2021).

Respecto al comercio mundial, se menciona que en la campaña 2021/2022, ocho mercados representan aproximadamente el 80% de las importaciones de aceites de oliva y aceites de oliva vírgenes en todo el mundo, comprendiendo en primer lugar Estados Unidos con el 35%, le sigue la Unión Europea con el 17%, Brasil con el 8%, Japón con el 6%, Canadá con el 5%, China con 4%, Australia con 3% y Rusia con 2% (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2022/02/IOC-Imports-2021-22-1.html>).

España (líder de exportaciones mundiales de aceites) es el principal productor, seguido por Grecia, Italia y Turquía. Aproximadamente, el 75% del total de las exportaciones mundiales lo centraliza España, Italia y Túnez (Informe de cadena de valor, 2018). Los principales proveedores de aceituna de mesa son España, Argentina,

Marruecos, Grecia, Turquía, Egipto y Perú. Argentina (49%), Egipto (23%) y Perú (20%) son los tres principales proveedores de Brasil (https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/06/newsletter_ioc-164-es-final.pdf).

Nuestro país, se encuentra posicionado como el principal productor de aceituna de mesa y aceite de oliva de América y está ubicado en el quinto y sexto lugar, respectivamente. La producción presenta un carácter cíclico vinculado a la vecería propia del cultivo (años de alta producción son seguidos de años de baja producción), a problemas climáticos y prácticas culturales deficitarias (Informe de cadena de valor, 2018). En las Tablas 1.1 y 1.2, se informan valores estadísticos en 1.000 toneladas (Tn) de los principales parámetros productivos de la cadena olivícola de España y Argentina para las campañas 2019 al 2022* <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>.

Tabla 1.1. Producción mundial de aceite de oliva expresados en 1000 toneladas (Tn) para España y Argentina

País	Campañas	Producción	Importaciones	Exportaciones	Consumo
España	2019/2020	1.125,3	151,9	420,7	521,6
	2020/2021	1.389	100,7	464,6	537,8
	2021/2022*	1.300	120	468,1	510
Argentina	2019/2020	30	0,5	23	7,5
	2020/2021	30	1	23	7,5
	2021/2022*	30	0,5	23	7,5

* Valor estimativo para el año 2022. Fuente: Unidad de Asuntos Económicos y Promoción-Consejo Oleícola Argentino-COA.<https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>

Tabla 1.2. Producción mundial de aceituna de mesa expresadas en 1000 toneladas (Tn) para España y Argentina

País	Campañas	Producción	Importaciones	Exportaciones	Consumo
España	2019/2020	458,2	18,1	173,3	176,9
	2020/2021	546,6	16,4	179,4	171,3
	2021/2022*	645	13,9	188	175
Argentina	2019/2020	327	0	54.5	25
	2020/2021	277.5	0	53.5	25
	2021/2022*	326.5	0	53	25

* Valor estimativo para el año 2022. Fuente: Unidad de Asuntos Económicos y Promoción-Consejo Oleícola Argentino-COA. <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures>.

X. fastidiosa es un patógeno nativo de América restringido a los vasos xilemático, destacándose por su capacidad de causar graves patologías en algunas especies vegetales. Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha sido reportado en 664 especies vegetales abarcando desde cultivos de importancia económica como: vid (*Vitis vinifera* L.), café (*Coffea arabica* L.), olivo (*Olea europaea* L.), naranjo (*Citrus sinensis* L.), almendro (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb.), ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.), duraznero (*Prunus persica* (L.) Batsch), alfalfa (*Medicago sativa* L.), pistacho (*Pistacia vera* L.), caqui (*Diospyros kaki* T.), aromáticas, ornamentales y malezas (Delbianco *et al.*, 2022). Entre otras enfermedades, es el agente causal del escaldado de hojas del arándano (*Vaccinium myrtillus* L.), nogal (*Juglans regia* L.), cerezo (*Prunus cerasus* L.) y laurel de adorno (*Nerium oleander* L.).

En América, el cultivo de olivo se inició en el siglo XVI introduciendo árboles procedentes de Sevilla, España que llegaron primero a las Antillas y en el año 1520 al continente, pasando luego de México a California. Alrededor del año 1550 ingresaron cultivares procedentes de Sevilla a Perú y de allí pasaron a Chile desde donde se introdujeron los primeros ejemplares a la Argentina entre los años 1556 y 1558.

Inicialmente estas plantas fueron llevadas y cultivadas en las provincias de Catamarca, Santiago del Estero y La Rioja, encontrando en esta última, en el Dpto. Arauco, las mejores condiciones ambientales para su adaptación (Gómez del Campo *et al.*, 2010; Costero *et al.*, 2021).

En nuestro país, según el Censo Nacional Agropecuario del año 2018, de la superficie total cultivada con olivo, la provincia de La Rioja participa en un 33,4%, le siguen Mendoza con el 20,5%, Catamarca aporta el 20%, San Juan con el 17%, Córdoba el 5,8% y explotaciones menores en las provincias Buenos Aires, Salta, Neuquén, Río Negro, San Luis, Santiago del Estero, Chubut con un 3,23%. Argentina, en el ranking mundial, se posesiona como productor en el 10° y 7° como aceite de oliva y productor de aceituna de mesa, respectivamente. Argentina es el 6° exportador mundial de aceite de oliva (Aceite de Oliva Virgen Extra-AOVE). En 2017 las exportaciones fueron record con un incremento del 155,2% respecto al valor del precio FOB (Informe de cadena de valor, 2018). El mercado español importa desde Argentina calidad extra virgen a granel para mezclar con su producción y exportar con fraccionamiento propio. En 2017, para cumplir con sus compromisos comerciales, los cupos importados desde Argentina incrementaron. Fuente: SSPMicro con base en INDEC.

El cultivo de olivo en Argentina y su importancia

En nuestro país, existen plantaciones tradicionales de más de 50 años. A su vez, en el Dpto. Arauco de la localidad de Aimogasta se encuentra el Olivo cuatricentenario denominado “Padre de la Olivicultura Argentina” origen del cultivar criollo Arauco, única variedad argentina reconocida para nuestro país en el Catálogo Mundial de Variedades de Olivo (Barranco Navero *et al.*, 2000; COI, 2000; Tacchini, 2011). Este cultivar es muy requerido por los productores de la región, por sus atributos de calidad organoléptica, alta producción, gran tamaño del fruto y doble aptitud, preferido en fincas comerciales debido a su aceptación en el mercado de exportación (Searles *et al.*, 2010; Bodoira, 2015). Existen otros cultivares comerciales destinadas a diferentes finalidades,

entre los más destacados se encuentra el cv. Manzanilla común, criolla o aceitera muy requerida por los productores de la provincia de La Rioja por la calidad óptima de sus aceites (tuvo dos reconocimientos importantes a nivel nacional, uno por parte de la Universidad Católica de San Juan en 2015, con panel de cata del Consejo Olivícola Internacional-COI y otro premio como primer puesto en el concurso “Cata de aceite de oliva Extra Virgen, Cuyoliva 2007”, cv. manzanilla por la Escuela Internacional de Turismo, Hotelería y gastronomía de Mendoza) y ancestralmente empleada como polinizadora del cv. Arauco (Abud, com. pers., 2022).

La producción nacional se desarrolla principalmente en la provincia de La Rioja con 25.765,6 ha de superficie cultivada, le sigue Mendoza con 15.825,2 ha, Catamarca con 15.465,3 ha, San Juan con 13.134,3 ha, Córdoba con 4.484,5 ha y Buenos Aires con 1.449,3 ha. También se encuentran algunas explotaciones menores en las provincias de Salta con 374,8 ha, Neuquén con 363,0 ha, Río Negro con 271,5 ha, San Luis con 34,5 ha y Santiago del Estero 1,5 ha y Chubut 0,7 ha (Figura 1.1). El núcleo productor de Argentina se concentra en La Rioja, Mendoza, San Juan y Catamarca. Los perfiles productivos están diferenciados según el cultivar predominante de cada provincia. La producción de aceituna de mesa posee mayor importancia en La Rioja, mientras que en San Juan y Catamarca prevalece la producción aceitera. Por su parte, Mendoza posee importancia en la producción de ambos productos (Informe de cadena de valor, 2018).

Según datos del censo 2018, la superficie total actual es de 77.171 ha (INDEC, 2018), aunque en años anteriores alcanzó valores estimados de 110.000 ha debido al aumento en la rentabilidad de los productos obtenidos, principalmente al precio del aceite de oliva por sus atributos favorables para la salud humana (Gobbee y Gusman, 2012) y a la implementación de políticas favorables para el sector productivo al amparo de la Ley 22.021. Sin embargo, lo anterior se vio comprometido por diversas problemáticas que afectaron a plantaciones modernas y tradicionales, siendo la sanitaria una de las más importantes.

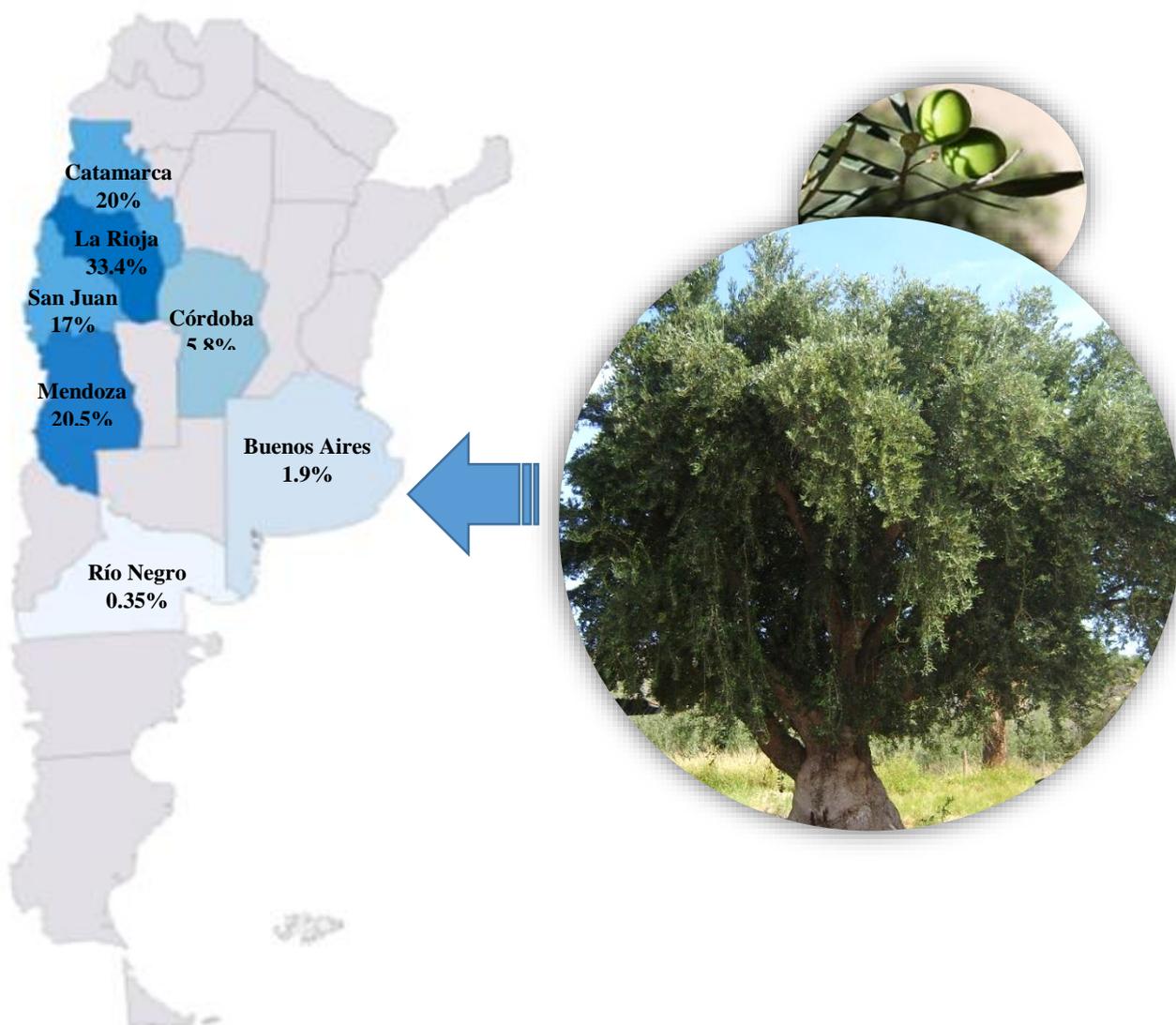


Figura 1.1. Distribución de la superficie cultivada con *Olea europaea* en porcentaje registradas en las principales provincias productivas del país. Extraído: INDEC, 2018

Principales plagas y enfermedades en el cultivo de olivo

Dentro de las plagas más relevantes que afecta al cultivo se encuentran la “mosca blanca de los fresnos” (*Siphoninus phillyreae*), eriófidos (*Aceria oleae* y *Oxycenus maxwelli*), cochinilla de la tizne (*Saissetia oleae*), nematodos como la especie *Meloidogyne javanica* (Costilla, 2000) y la presencia de los géneros *Hemicycliphora*, *Helicotylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Criconemoides* (Roca, 2019b), hongos (*Verticillium dahliae* Kleb., *Phytophthora* spp.) (Gómez del Campo *et al.*, 2010) y bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) (Trapero y Blanco, 1999; Oriolani y Pérez, 2008; Del Toro *et al.*, 2011).

A partir de la década de los 90’, apareció en la provincia de La Rioja una enfermedad denominada por los agricultores como la “seca de las ramas” de los olivos jóvenes, atribuida principalmente a un hongo del suelo, *V. dahliae*. Estudios posteriores identificaron además a otros agentes causales bióticos y abióticos involucrados en dicho complejo. En relación a los primeros, en sucesivos muestreos realizados en dicha provincia, se identificaron los siguientes microorganismos: *Fusarium solani*, *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia*, *Phytium* spp. y *V. dahliae*. En La Rioja, este síndrome se observó en forma marcada en plantaciones jóvenes (Roca, 2015). Dentro de este complejo, *V. dahliae* es uno de los patógenos que más frecuentemente se ha asociado al síndrome, causando por sí mismo severos declinamientos y en algunos casos la muerte del árbol. *V. dahliae*, es el agente causal de la verticilosis del olivo, una de las enfermedades más perjudiciales que afecta al cultivo (Roca, 2019a). Esta patología, además de ocasionar importantes pérdidas económicas, tiene la particularidad de que es muy difícil de erradicar, incluso mediante el uso de diferentes técnicas de manejo (Tjamos, 1993; Hiemstra, 1998; Trapero y Blanco, 1999; López Escudero y Mercado Blanco, 2011; Jiménez Díaz *et al.*, 2012). El hongo puede causar diferentes daños según su grado de virulencia. Existen diferentes razas conocidas con el nombre de defoliantes (D) y no defoliantes (ND), siendo la cepa D la de mayor virulencia (Schnathorst y Sibbet, 1971; Rodríguez Jurado *et al.*, 1993). En el país, sólo se encontraba la ND; sin embargo, en el año 2012, fue detectada por técnicas moleculares la raza D en plantaciones de olivo

del cultivar Picual en la provincia de La Rioja, Argentina (Roca *et al.*, 2012). A partir del 2005, se observa mayor intensidad de síntomas de declinamiento atribuidos a la raza ND de *V. dahliae*, causando importantes mermas en los rendimientos del cultivo, por lo cual el Gobierno de La Rioja promulgó las leyes N°8.804 (año 2010) y N°9.489 (año 2013) de emergencia fitosanitaria y de zona de desastre agropecuario, respectivamente (Rattalino *et al.*, 2021). López-Escudero *et al.* (2004) mencionando al cultivar Frantoio como tolerante a la infección causada por *V. dahliae*, mientras que ‘Arauco’ sería susceptible a este hongo (Matías *et al.*, 2010). Respecto a los principales factores abióticos que afectan al cultivo se menciona a daños por frío o heladas y asfixia radical, y otros como suelos pesados y mal drenados, salinidad, deficiencia o exceso de riego. Los mismos, son considerados como factores que podrían intensificar los síntomas de rama seca. (Roca, 2019a).

***Xylella fastidiosa* a nivel mundial**

X. fastidiosa a nivel mundial es considerada una plaga cuarentenaria y emergente, capaz de causar enfermedades en cultivos de importancia agrícola como en vid, duraznero, olivo, almendro, cítrico, entre otros. La enfermedad en vid denominada *Pierce's disease*-PD fue descrita por primera vez en California, Estados Unidos en 1892, ocurriendo apariciones luego en los años 1929, 1951 y 1976. En 1973, bajo el microscopio electrónico de transmisión se observaron bacterias tipo rickettsias (semejantes a las de animales) en vasos xilemáticos procedentes de plantas enfermas. A partir de ese momento, se infirió que el agente causal estaba relacionado a una bacteria vascular y no a un virus, aislándose por primera vez de vid en 1978 por Davis *et al.* (1978). En 1885, Samuel Rumph observó sobre dos plantas de duraznero cercano a la ciudad de Marshallville, Georgia (EE. UU), por primera vez una sintomatología que era atribuida a un virus causando la enfermedad falsa del duraznero *Phony Peach Disease*-PPD (Johnson *et al.*, 2021). En 1987, *X. fastidiosa* fue descrita como una nueva especie de bacteria, perteneciente a la familia *Xanthomonadaceae* (*Gammaproteobacteria*). Es un hospedante exclusivo de los vasos xilemáticos, Gram (-), mide entre 0,1-0,5 x 1-5 µm con pared

celular ondulada (Wells, 1987). Es muy difícil de aislar y sólo crece en medios nutritivos complejos y enriquecidos (Hopkins, 2001; Cariddi *et al.*, 2014) produciendo colonias muy pequeñas de 1-2 mm de diámetro. A nivel mundial, fue el primer microorganismo fitopatógeno no viral secuenciado completamente, habiéndose llevado a cabo estos estudios en Brasil (Simpson *et al.*, 2000).

En el 2003, en el sur de California, se detectó la presencia de esta bacteria en olivo, constituyendo éste el primer antecedente en América del Norte y en el mundo; estudios realizados por Krügner *et al.* (2014) demostraron que sólo el 17% de las plantas sintomáticas fueron positivas para *X. fastidiosa* mediante PCR y también hubo baja eficiencia de transmisión a plantas indicadoras, sin manifestar síntomas. No se pudo demostrar que *X. fastidiosa* causara enfermedad en olivo debido a que no se completaron los postulados de Koch (Wong *et al.*, 2003; Krügner *et al.*, 2014). En 2013, en plantaciones de olivo del área de Salento (región de Puglia) al sur de Italia, se detectó la bacteria causando el *Olive quick decline síndrome* (QDOS) que provocó la muerte de gran número de plantas productivas en poco tiempo. Los síntomas observados fueron declinamiento súbito y quemado rápido del borde de la hoja, siendo la primera cita de esta bacteria en la Unión Europea (Carlucci *et al.*, 2013; Saponari *et al.*, 2013; Loconsole *et al.*, 2014; Saponari *et al.*, 2014). Más recientemente, ha sido detectada en España, Francia y norte de Portugal (Denancé *et al.*, 2017, Gutiérrez Hernández y García, 2018, Morente *et al.*, 2018; Landa *et al.*, 2019; CAGPDS-JA, 2020) (Figura 1.2). En otras localidades de Apulia (Cerignola, Foggia, Canosa Di Puglia, Andria) se hallaron especies de los géneros *Phaeoacremonium* spp. y *Phaeomoniella* spp. y un minador (*Zeuzera pyrina*) cuya presencia fue asociada a una sintomatología similar a la inducida por la bacteria (Carlucci *et al.*, 2013), considerándose en un primer momento que formaban parte de un complejo etiológico. También, se identificaron hongos pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae* y a los géneros antes mencionados asociados con la presencia de canchales en las ramas y declinamiento en California (USA) y Puglia (Italia) (Urbez-Torres *et al.*, 2013; Carlucci *et al.*, 2015).

Last updated: 2022-02-25

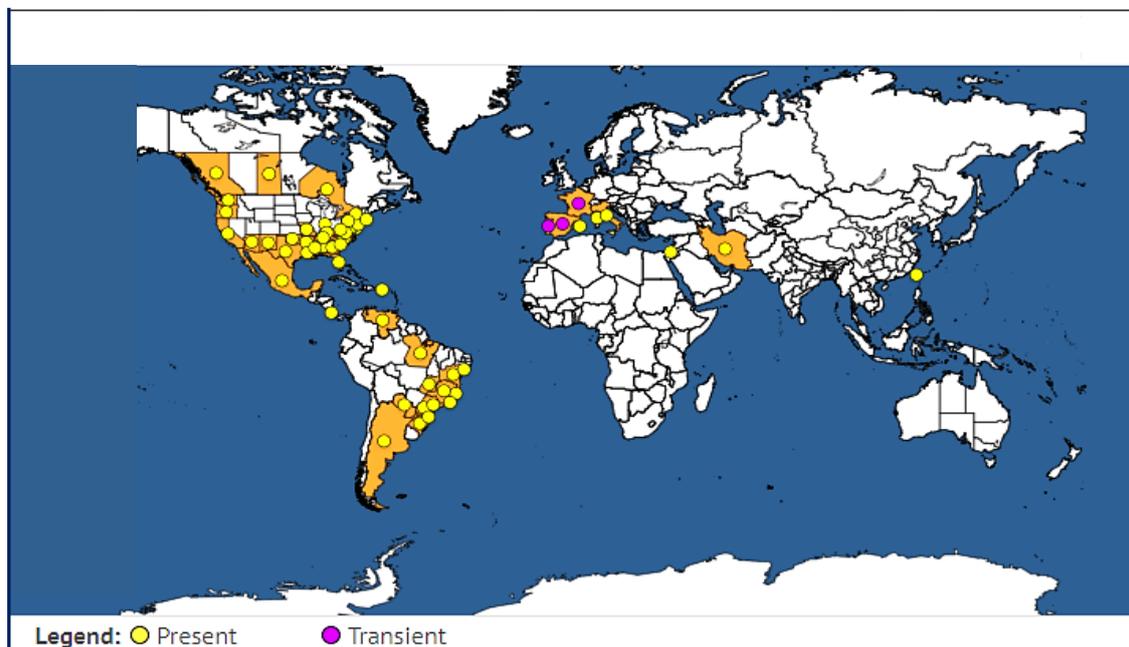


Figura 1.2. Mapa de distribución mundial de la bacteria *X. fastidiosa*

* Las zonas con círculos amarillos indican presencia permanente de la bacteria, mientras que aquellas señaladas con violeta indican una presencia transitoria de *X. fastidiosa*. Fuente: EPPO Global database. <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFA/distributio>

X. fastidiosa produce el taponamiento de los vasos xilemáticos mediante la presencia de compuestos y gomas formadas por la misma planta como respuesta fisiológica ante la invasión del microorganismo, afectando la absorción de agua y nutrientes por parte de la raíz. Las hojas son las primeras en ser afectadas. El quemado (o la necrosis) comienza en la punta y progresa hacia el pecíolo, extendiéndose a toda la hoja. Las hojas muertas permanecen adheridas a las ramitas que también se desecan, poniendo así en evidencia la sintomatología característica de la enfermedad. Los síntomas se inician en la parte superior de la copa y luego se extienden al resto de la planta (Newman *et al.*, 2004; De Benedictis *et al.*, 2017; Martelli y Nigro, 2017). Puede diseminarse por injertos y estacas si el material de propagación se encuentra infectado. De una planta a otra es transmitida de manera persistente mediante insectos vectores denominados chicharritas del orden Hemiptera, Familias *Cicadellidae* (tribus *Proconiini* y *Cicadellini*) y *Cercopidae*. Muchos de estos insectos cumplen su ciclo de vida en

malezas asintomáticas que actúan como reservorio del patógeno, manteniendo una fuente permanente del inóculo (Lee *et al.*, 1991; Hopkins and Purcell, 2002).

Actualmente una de las metodologías empleadas para la caracterización taxonómica de *X. fastidiosa* es el sistema de clasificación multilocus de secuencias o “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST) (Yuan *et al.*, 2010; Nunney *et al.*, 2013; Denancé *et al.*, 2017). Se basa en el análisis de fragmentos de siete genes constitutivos o “housekeeping” que están distribuidos por todo el cromosoma bacteriano: *leuA*, *petC*, *malF*, *cysG*, *holC*, *nuoL* y *gltT*, permitiendo definir un perfil alélico único al cual se le asigna un número arbitrario denominado grupo genético o secuencia tipo (ST) (Scally *et al.*, 2005; Elbeaino *et al.*, 2014; Landa *et al.*, 2017). *X. fastidiosa* es actualmente, una especie genéticamente diversa considerando las siguientes subespecies: *fastidiosa*, *pauca*, *multiplex*, *sandyi*, *morus* y *tashke* (Schaad *et al.*, 2004; Schuenzel *et al.*, 2005; Denancé *et al.*, 2019). Sin embargo, solo *fastidiosa* y *multiplex* han sido reconocidas como subespecies válidas por el “*International Society of Plant Pathology Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria*” (ISPP-CTPPB). Éstas dos subespecies al igual que *pauca* fueron analizadas mediante estudios de hibridación de ADN-ADN (Bull *et al.*, 2012). Las otras subespecies fueron caracterizadas por el sistema de tipificación MLST. Actualmente, se considera como nueva especie: *X. taiwanensis* por presentar características genéticas y fisiológicas diferentes de *X. fastidiosa* (Leu y Su, 1993; Chen y Chang, 2006; Su *et al.*, 2012, 2016; Landa *et al.*, 2017; Denancé *et al.*, 2019). El conocimiento de la subespecie a la que pertenecen las cepas aisladas permite comprender mejor la epidemiología causada por este patógeno y lograr una descripción adecuada de la estructura de la población y su dinámica (Cesbron *et al.*, 2020).

En Argentina, *X. fastidiosa* fue detectada por primera vez en el año 1935, en el Delta del Paraná en plantaciones de ciruelo japonés (*Prunus salicina*) ocasionando la escaldadura del borde la hoja del ciruelo (*plum leaf scald*-PLS), siendo su mayor dispersión después del año 1940. Fernandez Valiela y Bakarcic (1954) logran transmitirla por injerto, por lo que se pensó que se trataba de un virus. Fue declarada plaga de la agricultura (Dec. PENac 15523/56). Causó la muerte de más de 500.000 plantas. (Fernandez Valiela y Bakarcic, 1963). La enfermedad desapareció posteriormente por las

innumerables inundaciones y porque dejó de ser una zona frutícola (Bakarcic y De Santis, 1969). En la década del 90', apareció en la provincia de Catamarca, otra enfermedad también asociada a esta bacteria. Se la conoció como escaldadura de la hoja del almendro (*almond leaf scorch-ALS*), considerada en el país como una de las patologías importantes en este hospedante, debido a que las plantas afectadas no se recuperan (Nome *et al.*, 1992). Otra de las patologías causada por la bacteria es la clorosis variegada de los cítricos (CVC) presente en Misiones, Corrientes y Entre Ríos (Brlansky *et al.*, 1991), llamada inicialmente pecosita (Diamante *et al.*, 1999). En esta misma década la CVC comenzó a manifestarse con una intensidad importante produciendo mermas sobre todo en la producción de naranjas, siendo hasta el momento detectada solamente en el NEA. Esta enfermedad no es considerada de gran importancia en Corrientes debido a que hay años donde los rendimientos no se ven afectados por la presencia de este patógeno (Canteros, comunicación personal). Esta bacteria se ha encontrado además, en malezas con ausencia de síntomas en montes de ciruelos (Nome *et al.*, 1982) almendros (Haelterman, *et al.*, 1995) y cítricos enfermos actuando como hospedantes alternativos (De Coll, 1996).

Situación actual del olivo en Argentina respecto a *X. fastidiosa*

En los últimos 17 años, se incrementó considerablemente la sintomatología del decaimiento principalmente en las plantaciones tradicionales de la variedad Arauco. En forma simultánea a la detección de la bacteria en Italia, en nuestro país, en diciembre de 2013, en la localidad de Aimogasta (Departamento Arauco, provincia de La Rioja,), se observaron en fincas tradicionales de más de 50 años del cv Arauco y posteriormente en plantaciones de Córdoba del mismo cultivar, mostraban en la copa y “chupones” algunas ramas con hojas secas en el extremo, mientras que las basales presentaban el ápice necrosado denominado punta de flecha (PF), síntoma que hacía presumir la presencia de *X. fastidiosa*. Análisis moleculares y serológicos permitieron detectar a la bacteria en plantas con esa sintomatología descripta (Roca *et al.*, 2014). Posteriormente, se confirmó su presencia en la provincia de Córdoba, en árboles sintomáticos de la variedad Arauco

ubicados en parcelas comerciales próximas a la localidad de Paso Viejo, Dpto. Cruz del Eje (Tolocka *et al.*, 2014).

Es grave la situación fitosanitaria por la que están atravesando los olivares de nuestro país debido al marcado decaimiento que se va acentuando con los años. En una finca de la localidad de Aimogasta se analizaron 1.350 plantas durante los años 2008, 2011, 2012 y 2014; siendo la evolución de la “Rama Seca” en plantas enfermas del 6%; 33%, 44 %, 72% y en mortandad del 3%; 39%, 44%, 20%, respectivamente (Ladux *et al.*, 2014a). Este aumento significativo en la incidencia y mortandad de los olivos y la rápida dispersión de la enfermedad, hizo pensar sobre la posibilidad de algún cambio en la virulencia del hongo *V. dahliae*, responsable de la verticilosis del olivo, con la aparición probablemente de una nueva cepa o alternativamente la aparición de una nueva enfermedad. Según estudios realizados en el año 2012 en el departamento Arauco, La Rioja, el porcentaje de plantas con esta sintomatología atribuida a *V. dahliae* alcanzó hasta un 9%, mientras que el de plantas muertas fue del 7% según el distrito analizado, en tanto que la incidencia total en ese departamento fue del 3,1% (Ladux *et al.*, 2014b). Según, las estimaciones realizadas en el año 2014, por profesionales del área (Ortiz, comunicación personal), se concluye un aumento continuo en la incidencia y mortandad de los olivares infiriéndose así en la posibilidad de un mayor grado de agresividad de la cepa ND de *V. dahliae* o la presencia de otro patógeno. Estos valores implican importantes pérdidas tanto en la productividad del cultivo como en los valores inmobiliarios de las fincas afectadas.

Respecto a la bacteria, recién en el 2015 se logró la secuenciación parcial del gen *rpoD* (factor sigma 70 de la RNA polimerasa) presente en *X. fastidiosa* proveniente de plantas sintomáticas de olivos, en Aimogasta y Cruz del Eje (Haelterman *et al.*, 2015; Tolocka *et al.*, 2015).

En Argentina, son escasos los estudios referidos a la caracterización de la diversidad genética de la bacteria, mecanismos de patogenicidad y tolerancia del hospedante. A campo se desconoce la interacción entre *X. fastidiosa* y los cultivares más importantes presentes en las principales regiones productivas. Se atribuye a que la pérdida de casi un 30 % de árboles del cv. Arauco en plantaciones tradicionales es causada por un complejo etiológico dentro del cual se encuentra la bacteria, esto ha provocado una importante crisis

socio-cultural entre los productores, debido al arraigo de este cultivar, autóctono del Dpto. Arauco (Roca, com. pers., 2019). Esta problemática causa un importante impacto debido a que pone en serio riesgo los cultivos de otras zonas olivícolas del país. Es necesario el conocimiento de su distribución, importancia y el comportamiento de algunos cultivares frente a la infección de *X. fastidiosa*, para la implementación de medidas de contingencia y estrategias de manejo que permitan su detección temprana en plantaciones olivícolas del país, evitando su dispersión. Esto nos permitiría implementar buenas practicas agrícolas como el uso de material de propagación agámica libre de patógenos (actualmente en Argentina no hay certificación en esta especie vegetal), el control del insecto-vector, de malezas presentes en las fincas y el estudio de las condiciones agroclimáticas que predisponen la infección del cultivo.

HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta que la presencia de *Xylella fastidiosa* en plantaciones de olivo reviste particular importancia, se plantean las siguientes hipótesis:

- *X. fastidiosa* está presente en todas las regiones olivícolas argentinas, encontrándose también en hospedantes alternativos de plantaciones infectadas con el patógeno, pudiéndose aislar la bacteria desde olivo y otros cultivos de interés agrícola
- Mediante técnicas básicas de caracterización y en conjunto con pruebas serológicas y moleculares se pueden confirmar la existencia de cepas de *X. fastidiosa* presentes en nuestro país
- La subespecie de *X. fastidiosa* encontrada en olivos de Argentina es la misma que está presente en cítricos y almendros de nuestro país
- *X. fastidiosa* es el principal agente causal del complejo etiológico denominado “Decaimineto Rápido del Olivo (DRO)”, siendo el cv. Arauco uno de los más susceptibles a la bacteria, pudiendo ser diagnosticada por sueros elaborados a partir de cepas locales

OBJETIVOS GENERALES

- . - Efectuar una prospección a nivel nacional de la presencia de la bacteria en las principales plantaciones olivícolas y en hospedantes alternativos. Realizar aislamientos de la bacteria a partir de plantas de olivo y otros cultivos de importancia agrícola

- . - Comprobar la existencia de cepas de *X. fastidiosa* presentes en nuestro país a través de técnicas básicas de caracterización y en conjunto con pruebas serológicas y moleculares

- . - Caracterizar la subespecie de *X. fastidiosa* encontrada en plantas de olivo, almendro y cítricos, y producir reactivos serológicos para su detección

- . - Conocer el comportamiento de tolerancia/susceptibilidad de cultivares de olivo frente a la infección de la bacteria

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Monitorear la presencia de *X. fastidiosa* en las principales regiones olivícolas del país

- 2.- Releva hospedantes alternativos en plantaciones tradicional de olivo del departamento de Cruz del Eje, Córdoba infectado con la bacteria

- 3.- Aislar la bacteria *X. fastidiosa* a partir de plantas de olivo y otros hospedantes presentes en el país

- 4.- Caracterizar morfológica, bioquímica, serológica y molecularmente cepas locales de *X. fastidiosa*

- 5.- Caracterizar molecularmente cepas y extractos vegetales infectados con *X. fastidiosa* mediante los sistemas de tipificación *Multilocus Sequence Typing-MLST* y *Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis-MLVA*

- 6.- Poner a punto un método de diagnóstico serológico a partir de un suero elaborado con una cepa local de *X. fastidiosa* para su detección

- 7.- Evaluar la respuesta de tolerancia/suceptibilidad de dos cultivares de olivo frente a la infección con *X. fastidiosa*

BIBLIOGRAFÍA

- Bakarcic, M. y De Santis, M. 1969. Comportamiento a la escaldadura de la hoja de variedades locales de ciruelo. *Delta del Paraná* 9(12):35-42.
- Barranco Navero, D., Cimato, A., Fiorino, P., Rallo, L., Touzani, A., Castañeda, C., Serafini, F., Trujillo, I. 2000. Catálogo Mundial de Variedades de Olivo. Consejo Oleícola Internacional. Madrid. España, 360 pp.
- Bodoira, R., Torres, M., Pierantozzi, P., Taticchi, A., Servili, M., Maestri, D. 2015. Oil biogenesis and antioxidant compounds from “Arauco” olive (*Olea europaea* L.) cultivar during fruit development and ripening. *European Journal Of Lipid Science And Technology*, 117: 377-388.
- Bull, C.T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., Scortichini M., Stead D. E., Takikawa, Y. 2012. List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). Prepared by the International Society of Plant Pathology Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria (ISPP-CTPPB). *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 21-27.
- Brlansky, R. H., Davis, C. L., Timmer, L. W., Howd, D. S., Contreras, J. 1991. Xylem limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus variegated chlorosis. *Phytopathology*, 81:1210.
- Carlucci, A., Lops, F., Cibelli, F., Raimondo, M. L. 2015. *Phaeoacremonium* species associated with olive wilt and decline in southern Italy. *European Journal Plant Pathology*, 141(4): 717-729.
- Carlucci, A., Lops, F., Marchi, G., Mugnai, L., Surico, G. 2013. Has *Xylella fastidiosa* “chosen” olive trees to establish in the Mediterranean basin?. *Phytopathologia Mediterranea Current Topics*, 52(3), 541–544.
- Cariddi, C., Saponari, M., Boscia, D., De Stradis, A., Loconsole, G., Nigro, F., Porcelli, F., Potere, O., Martelli, G. P. 2014. Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology*, 96(3), 1-5.
- CAGPDS-JA (Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía). 2020. Red de Alerta e Información Fitosanitaria de Andalucía (RAIF). Nuevos focos de *Xylella fastidiosa* en Portugal. http://www.juntadeandalucia.es/agriculturapescayderollorural/raif/rss/-/asset_publisher/OpV27pD7buE7/content/id/4915022, verificado 20/10/2020.
- Cesbron, S., Dupas, E., Beaupère, Q., Briand, M., Montes-Borrego, M., Velasco-Amo, M., Landa, B. B., Jacques, M. 2020. Development of a Nested-Multilocus Sequence Typing approach for a highly sensitive and specific identification of *Xylella fastidiosa* subspecies directly from plant samples. *Agronomy*, 1-17 pp. <https://doi:10.3390/agronomy10081099>.

- Chen, J., Su, C., Chang, C. 2006. Multigenic sequence comparison of *Xylella fastidiosa* pear leaf scorch strains from Taiwan to strains from Americas. *Phytopathology*, 96(6), S23.
- COI, 2000. Catálogo mundial de variedades de aceitunas. <https://www.internationaloliveoil.org/product/world-catalogue-of-olive-varieties/>
- Costero, B., Teich, I., Taborda, R. J., Toro, A., Prenol, L. y Torres, L. 2021. Diversidad intravarietal del cv. Manzanilla de olivo (*Olea europaea* L.) y genotipos selectos relacionados de la colección INTA Catamarca y huertos de Cruz del Eje, Córdoba (Argentina). *AgriScientia*, 38(2), 75-88.
- Costilla, M. 2000. Informe para la Comisión Provincial de Sanidad Vegetal Provincia de La Rioja. Fecha de evaluación de nematodos en “Rama Seca”. Estación Experimental Obispo Colombres. Tucumán, 3 pp.
- Davis, M. J., Purcell, A. H. y Thompson, S. V. 1978: “Pierce’s disease of grapevines: Isolation of the causal bacterium”, *Science* 199, 75-77.
- De Benedictis, M., De Caroli, M., Baccelli, I., Marchi, G., Bleve, G., Gallo, A., Ranaldi, F., Falco, V., Pasquali, V., Piro, G., Mita, G., Di Sansebastiano, G. P. 2017. Vessel occlusion in three cultivars of *Olea europaea* naturally exposed to *Xylella fastidiosa* in open field. *Journal of Phytopathology*, 165, 589-594. [https://doi: 10.1111/jph.12596](https://doi.org/10.1111/jph.12596).
- De Coll, O. del R. 1996. Clorosis variegada de los citrus en plantaciones de la zona de Montecarlo, Misisonos, Argentina. Estudio sistemático y bioecológico de los Cicadélidos (homoptera: Cicadellidae) potenciales vectores del patógeno. Tesis Magister Science in protection vegetal, 277 pp.
- Del Toro, M.S., Holgado, M.G., Linardelli, C.E. 2011. Plagas y enfermedades. En *Olivicultura en Mendoza. Raigambre de una actividad que se renueva*. Fundación Marzano (ed.). Buenos Aires, Argentina, 223-254.
- Danancé, N., Briand, M., Gaborieau, R., Gaillard, S., Marie-Agnès, J. 2019. Identification of genetic relationships and subspecies signatures in *Xylella fastidiosa*. *BMC Genomics* 20, 239. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5565-9>.
- Danancé, N.; Legendre, B.; Briand, M.; Olivier, V.; De Boisseson, C.; Poliakoff, F.; Jacques, M. A. 2017. Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France. *Plant Pathology*, 66, 1054-1064. <https://doi.org/10.1111/ppa.12695>.
- Diamante, A., Zubrzycki, H., Docampo, D. y Haelterman, R. 1999. CVC clorosis variegada de los cítricos. Una enfermedad que afecta la citricultura comercial. Informe técnico N°2, serie: mejoramiento cítrico. EEA Bella Vista. ISSN 1515-0755.
- Elbeaino, T., Valentini, F., Abou Kubaa, R., Moubarak, P., Yaseen, T., Digiario, M. 2014. Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* isolated from olive affected by

- “olive quick decline syndrome” in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 533-542.
- Fernandez Valiela, M. V. y Bakarcic, M. 1954. Nuevas enfermedades del ciruelo en el Delta del Paraná. *IDIA* 84: 2-6.
- Fernandez Valiela, M.V. y Bakarcic, M. 1963. Escaldadura del borde de las hojas de ciruelo. Delta del Paraná, 3(3), 39-46.
- Gobbee, F. y Gusman, F. 2012. Argentina: Born to be extra virgin. <http://www.internationaloliveoil.org>.
- Gómez del Campo, M., Morales-Sillero, A., Vita Serman, F., Rousseaux, M. C., Searles, P. S. 2010. El olivar en los valles áridos del noroeste de Argentina (provincia de Catamarca, La Rioja y San Juan). *Olivae edición española N°114*, Consejo Oleícola Internacional, 23-45.
- Gutiérrez Hernández, O. y García, L. V. 2018. Incidencia de *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares y distribución potencial en la península ibérica. *Investigaciones Geográficas* (69), 55-72. <https://doi.org/10.14198/INGEO2018.69.04>.
- Haelterman, R. M., Nome, C.F., Docampo, D.M., Nome, S.F. 1995. Hospedantes de *Xylella fastidiosa*, bacteria causal de la escaldadura del borde de la hoja del almendro (*Prunus amygdalus*), *RIA* 26(2), 65-72.
- Haelterman, R. M., Tolocka, P. A., Roca, M. E., Guzmán, F. A., Fernández, F. D., Otero, M. L. 2015. First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing Olive scorch in Argentina. *Journal Plant Pathology*, 97(2), 393-393. <https://doi.org/104454/JPP.V97I2.023>.
- Hiemstra, J. A. 1998. Some general features of *Verticillium* wilts in trees. En: A compendium of *Verticillium* wilts in tree species. Hiemstra J. A. and Harris D.C., (eds). *Wageningen*, 5-11.
- Hopkins, D. 2001. Gram negative bacteria, *Xylella fastidiosa*. In *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* (3rd. ed.), edited by N. W. Schaad, J. B. Jones and W. Chun. St Paul (US).
- Hopkins, D. L., Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce’s Disease of Grapevine and Other Emer-gent Diseases. *Plant Disease* 86 (10): 1056-1066.
- Informes de cadenas de valor, Olivícola. 2018. Secretaría de Política Económica Subsecretaría de Programación Microeconómica 34:3-23.
- INDEC. Censo Nacional Agropecuario-CNA-Frutales. 2018. Resultados definitivos. Ministerio de Economía Argentina. Instituto Nacional de Estadística y Censos – INCEC. ISBN 978-950-896-607-0.
- Jiménez Díaz, R. M., Cirulli, M., Bubicci, G., Jiménez, Gasco, M. M, Antoniou, P., Tjamos, E. C. 2012. *Verticillium* wilt a major threat to olive production: current status and future prospects for its management, *Plant Disease*, 96(3), 304-329.

- Johnson, K.A., Bock, C.H., Brannen, P.M. 2021. Phony peach disease: past and present impact on the peach industry in the southeastern U.S.A. *CABI Agriculture and Bioscience*, 2, 29. <https://doi.org/10.1186/s43170-021-00049-4>.
- Krügner, R., Sisterson, M. S., Chen, J., Stenger, D. C., Johnson, M. W. 2014. Evaluation of olive as a host of *Xylella fastidiosa* and associated sharpshooter vectors. *Plant Disease*, 98(9), 1186-1193.
- Ladux, J. L., Ortiz, J. M. y Jotayan, L. 2014a. Actualización en el Avance de “Rama Seca”. Departamento Arauco. Jornada de Sanidad Olivícola. Aimogasta, La Rioja. Disertación oral.
- Ladux, J. L., Jotayan, L., Otero, M. L., González Vera, C. and Ortiz, J. 2014b. Incidence of *Verticillium dahliae* in traditional orchards of the olive 'Arauco' in northwest Argentina (La Rioja). *Acta Horticulturae*. (ISHS)1057: 127-131. http://www.actahort.org/books/1057/1057_14.htm.
- Landa, B. B.; Castillo, A. I.; Giampetruzzi, A.; Kahn, A.; Román-Écija, M.; Velasco-Amo, M. P.; Navas-Cortés, J. A.; Marco-Noales, E.; Barbé, S.; Moralejo, E.; Coletta-Filho, H. D.; Saldarelli, P.; Saponari, M.; Almeida, R. P. P. 2019. Emergence of a plant pathogen in Europe associated with multiple intercontinental introductions. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01521-19>.
- Landa, B. B., Navas Cortés, J. A., Montes Borrego, M. 2017. Capítulo 2: Características generales de *X. fastidiosa*. En: Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales Y María Milagros López, (Coord.). Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. *Cajamar Caja Rural* (ed.), España, p.47.
- Lee, R. F., Derrick, K., Verte, M. J. G., Chagas, C.M., Rosetti, V. 1991. *Citrus Industry*, 12-15.
- Leu, L.S., Su, C.C. 1993. Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan, *Plant Disease*, 77, 642-646.
- Loconsole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T., Frasheri, D., Lorusso, D., Palmisano, F., Pollastro, P., Silletti, M.R., Trisciuzzi, N., Valentini, F., Savino, V. and Saponari, M. 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. *Journal of Plant Pathology*, 96(1), 1-8.
- López Escudero, F. J., Del Río, C., Caballero, J. and M. Blanco-López. 2004. Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 79-85.
- López Escudero, F. J. y Mercado Blanco, J. 2011. *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Review Plant Soil*, 344, 1-50.

- Martelli, G. P, Nigro, F. 2017. The olive quick decline síndrome. In- *Xylella fastidiosa* & the Olive Quick Decline Syndrome (OQDS). A serious worldwide challenge for the safeguard of olive tree. *Options Méditerranéennes, A*, 121, 25-27.
- Matías, C., A. Toro, L. Montalvan, P., Del Valle Ortiz, V., Aybar, J., Colica, A., Prata, L., Prenol, J., Amorena, M. E., De Bustos, C., Funes, R., Mamaní y Molina, M. 2010. Variedades de olivo cultivadas en las provincias de Catamarca y La Rioja. Argentina. *INTA*, 70 pp.
- Morente, M.; Cornara, D.; Plaza, M.; Durán, J. M.; Capiscol, C.; Trillo, R.; Ruiz, M.; Ruz, C.; Sanjuan S.; Pereira, J. A.; Moreno, A.; Fereres, A. 2018. Distribution and relative abundance of insect vectors of *Xylella fastidiosa* in olive groves of the Iberian Peninsula. *Insects* 9(4), pii: E175. <https://doi.org/10.3390/insects9040175>.
- Newman, K., Almeida, R., Purcell, A., Lindow, S. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *PNAS*, 101(6), 1737-1742.
- Nome, S.F., Raju, B.C., Docampo, D.M. and Bakarcic, M. 1982. Escaldadura de las hojas del ciruelo: aislamiento del agente causal y posibles hospedantes naturales. *IDIA*, (mayo- agosto), 4-10.
- Nome, S. F., Haelterman, R. M., Docampo, D. M., Prata- Viera, A. G., Di feo, L. Del V. 1992. Escaldadura de las hojas del almendro en Argentina, *Fitopatología Brasileira*, 17, 57-60.
- Nimo, M. 2018. Cadena de valor de Olivo. Consejo Federal Agropecuario. Dirección Nacional de Alimentos y Bebidas. Secretaría de Alimentos y Bioeconomía. Consultado 2-7-2019: https://www.agroindustria.gob.ar/sitio/areas/cfa/regionales/_archivos//000000_2018/000000_Cuyo/000000_1ra%20Reuni%C3%B3n/000000_Material/000000_Cadena%20de%20Valor%20de%20Olivo.pdf
- Nunney, L., Vickerman, D. B., Bromley R. E., Russell, S. A., Hartman, J. R., Morano, L. D., Stouthamer, R. 2013. Recent evolutionary radiation and host plant specialization in the *Xylella fastidiosa* subspecies native to the United States, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7), 2189–2200. <https://doi.org/10.1128/AEM.03208-12>.
- Oriolani, E. J. A. y Pérez, B. A. 2008. Manual de reconocimiento de enfermedades y plagas en olivo. Proyecto INTA PNFRU2184: Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. Módulo olivo: 36-39.
- Rapoport, H. F. 2008. Capítulo 2: Botánica y morfología. En: el cultivo del olivo. Barranco, D.; Fernandez-Escolar, R.; Rallo, L. (Eds.). 6ta edición. Madrid, España, 39-61. ISBN 978-84-8476-329.1.
- Rattalino, D., Otero, M. L., Moriconi, D. N., Rivera, P. C. 2021. Mejora de la detección del patotipo no defoliante de *Verticillium dahliae* en olivo mediante PCR anidada. *AgriScientia*, 38(1), 79–91. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v38.n1.28985>.

- Roca, M. E. 2019a. Síndrome de “Rama Seca”. En: Manual de protocolos de manejo de plagas y patologías del olivo. Eds. https://www.researchgate.net/publication/346397235_Manual_de_protocolos_de_manejo_de_plagas_y_patologias_del_olivo#fullTextFileContent [accessed Jun 23 2021], Pp:119-141.
- Roca, M. E. 2019b. Nematodos. En: Manual de protocolos de manejo de plagas y patologías del olivo. Eds. https://www.researchgate.net/publication/346397235_Manual_de_protocolos_de_manejo_de_plagas_y_patologias_del_olivo#fullTextFileContent [accessed 12/04/2022], Pp.132.
- Roca De Esteva, M. E. 2015. “Revisión de antecedentes, presencia, incidencia, severidad, frecuencia de agentes asociados y mermas de rendimiento para “rama seca” del olivo en la provincia de La Rioja”. Agentes bióticos y abióticos asociados con la “rama seca”. Tesis Magister Scientiae en Protección Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.UNLP. La Rioja, Pp 11.
- Roca, M. E., Tolocka, P.A., Otero, M.L., Pérez, J.C. y Haelterman, R.M. 2014. Primera detección de *Xylella fastidiosa* en olivares en los departamentos Arauco y Castro Barros (La Rioja). 3º Congreso Argentino de Fitopatología, Tucumán, 169 pp.
- Roca, M. E., Pérez, B. A., Simón, M. R., Pastor, S., Zanelli, M. and Otero, M. L. 2012. First report of a defoliant strain and fruit yield reduction of *Verticillium dahliae* in *Olea europaea* cv. Picual in La Rioja province, Argentina. *Revista Internacional Society Horticultural Science* (ISHS). 1ra ed. San Juan: (International Symposium on Olive Growing, 7). ISSN 0567-7572.
- Rodríguez Jurado, D., Blanco López, M., Rapoport, H. and Jiménez Díaz, R. 1993. Present status of *Verticillium* wilt of olive in Andalucía (Southern Spain). *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 23: 513-516.
- Saponari, M., Boscia, D., Nigro, F. and Martelli, G. P. 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 659-668.
- Saponari, M., Boscia, D., Loconsole, G., Palmisano, F., Savino, V., Potere, O. y Martelli, G. P. 2014. New hosts of *Xylella fastidiosa* strain CoDiRO in Apulia. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I3.008>. Abstract.
- Searles, P., Rousseaux, M. C., Ladux, J., Trentacoste, E., Arjona, C., Cólica, J., Matias, C., Bueno, L., Vita Serman, F. 2010. Following Olive Footprints in Argentina. In: Following Olive Footprints (*Olea europaea* L.). Cultivation and culture, folklore and history, traditions and uses, *Internatinal Society for Horticultural Science*, 13, 13-23.
- Simpson, A.J., Reinach, F.C., Arruda, P., Abreu, F.A., Acen-cio, M., Alvarenga, R., Alves, L.M., Araya, J.E., Baia, G.S., and Bap-tista, C.S. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*, *Nature* 406(6792), 151-159.

- Su, C.C., Deng, W.L., Jan, F.J., Chang, C.J., Huang, H., Shih, H.T., Chen, J. 2016. *Xylella taiwanensis* sp. nov. cause of pear leaf scorch disease in Taiwan, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4766-4771.
- Su, C.C., Chang, C.J., Yang, W.J., Hsu, S.T., Tzeng, K.C., Jan, F.J., Deng, W.L. 2012. Specific characters of 16S rRNA gene and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer sequences of *Xylella fastidiosa* pear leaf scorch strains, *European Journal of Plant Pathology*, 132(2), 132-203.
- Scally, M., Schuenzel, E. L., Stouthamer, R. and Nunney, L. 2005. Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity, *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8491-8499.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M. and Chang C. J. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. [correction] *fastidiosa* [correction] subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. Nov, *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 290-300.
- Schnathorst, W. C. and Sibbet, G. S. 1971. The relation of strains of *Verticillium albo-atrum* to severity of *Verticillium* wilt in *Gosypium hirsutum* and *Olea europaea* in California. *Plant Disease Rep*, 9: 780-782.
- Schuenzel, E. L., Scally, M., Stouthamer, R. and Nunney, L. 2005. A Multigene Phylogenetic Study of Clonal Diversity and Divergence in North American Strains of the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3832-3839.
- Tacchini, J. 2011. Historia del olivo y su difusión en Argentina y en Mendoza. En: M. Bauzá, Fundación Marzano (Ed.). Olivicultura en Mendoza. Raigambre de una actividad que se renueva, 19-47 pp.
- Tjamos, E. C. 1993. Prospects and strategies in controlling *Verticillium* wilt of olive, *OEPP/EPPO Bull*, 23, 505-512.
- Trapero, A. y Blanco, M. A. 1999. Capítulo 16: enfermedades. En: El cultivo del olivo. Barranco D., Fernandez Escobar R. y Rallo L. (eds.). Sevilla, 477-532.
- Tolocka, P. A., Guzmán, F. A., Fernández, F. D., Otero, M. L., Paccioretti, M., Stivala, M. P., Matías, C., Haelterman, R. M. 2015. Análisis filogenético y comparación de la secuencia del gen *rpoD* de *Xylella fastidiosa* Wells et al. detectada en plantas de cítricos, almendros y olivos en Argentina. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Santa Fé. 136 pp. ISSN: 2451-8069.busc
- Tolocka, P.A., Otero, M.L., Torres, L., Taborda, R.J., Paccioretti, M., Haelterman, R.M. 2014. Detección de *Xylella fastidiosa* en huertos de olivo de la región noroeste de la provincia de Córdoba. XXXVII Congreso Argentino de Horticultura. Mendoza, 290 pp.
- Urbez-Torres, J.R., Peduto, F., Vossen, P.M., Krueger, W.H., Gubler, W.D. 2013. Olive twig and branch dieback: etiology, incidence, and distribution in California, *Plant Disease*, 97, 231-244.

- Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H.Y., Weisburg, W. G., Mandeco, P., L., Brenner, D.J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37,136- 143.
- Wong, F., Cooksey, D. A., Costa, H. S., Downer, J., Henry, M., Kabashima, J., Karlik, J., LeStrange, M. and Shaw, D. 2003. Documentation and characterization of *Xylella fastidiosa* strains in landscape hosts. En: *Symposium Proceedings. Pierce's disease research symposium*. Coronado, California, 121-123 pp. http://www.Desktop/2003_131-136%20Proceeding%20symposios%202003.pdf.
- Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R. and Nunney, L. 2010. Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States, *Ecology and Epidemiology Phytopathology*, 100(6), 601.

CAPÍTULO II

PROSPECCIÓN DE *X. fastidiosa* EN LAS PRINCIPALES PROVINCIAS OLIVÍCOLAS DE ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

La superficie total implantada de olivo en Argentina estimada alcanza los 77.171 ha, de las cuales, las principales provincias productoras de olivo para aceite y conservas son: La Rioja 25.766 ha (33.4%), Mendoza con 15.825 ha (20.5%), le sigue Catamarca con 15.465 ha (20%), San Juan con 13.134 ha (17%), Córdoba con 4.484 ha (5,8%) y Buenos Aires con 1.449 ha (1,9%). También se encuentran algunas explotaciones menores en las provincias de Río Negro con 271 ha (0,35%), San Luis con 34,5 ha (0,04%) y Neuquén con 363 ha (0,47%). El 32% de las hectáreas cultivadas se destinan a la producción de aceitunas de mesa y el 68% a la elaboración de aceite de oliva (INDEC, 2018). En Argentina se encuentran plantaciones tradicionales donde predominan los cultivares Arbequina, Frantoio, Picual para aceite y Arauco para mesa. Este último cultivar, valorado por su alta producción gran tamaño del fruto y doble aptitud, es el único obtenido en el país presente en el Catálogo Mundial de Variedades de Olivo (Barranco Navero *et al.*, 2000; Tacchini, 2011). La innovación del cultivo operada en la década de los '90, al amparo de la ley 22.021 y complementarias, trajo aparejado numerosos cambios tecnológicos como la alta densidad del marco de plantación, el riego por goteo, la cosecha mecánica, como así también el recambio varietal. Inicialmente se introdujeron numerosos cultivares, aunque luego predominaron los de mayor preferencia a nivel internacional como Manzanilla de Sevilla para mesa y Arbequina, Picual, Frantoio, Leccino, Coratina y Barnea, para aceite, entre otros (Searles *et al.*, 2010). En Argentina, Arbequina es el principal cultivar con este destino.

A nivel mundial, entre las principales enfermedades que causan graves daños al cultivo de olivo se encuentra la bacteria *Xylella fastidiosa*. En el año 2013, se reportó el primer foco de este patógeno en la Unión Europea, en olivares de la región de Apulia al sureste de Italia (Carlucci *et al.*, 2013; Saponari *et al.*, 2013; Loconsole *et al.*, 2014; Saponari *et al.*, 2014), con síntomas de quemado rápido del borde de la hoja que se venían observando desde 2010 y que se asociaron a la enfermedad denominada decaimiento súbito del olivo (*Olive Quick Decline Syndrome*-OQDS) (Saponari *et al.*, 2017). También, ha sido detectada en otros países de la Unión Europea como España, específicamente en las Islas Baleares (Mallorca, Menorca e Ibiza) y Alicante, en Francia (Isla de Córcega, Costa Azul) y en el norte de Portugal (Concelho de Vila Nova de Gaia) (Denancé *et al.*, 2017; Morente *et al.*, 2018; Gutiérrez Hernández y García, 2018; Landa *et al.*, 2019; Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía, 2020). Paralelamente, en diciembre de 2013, fue detectada en Argentina en plantaciones tradicionales de olivo de la provincia de La Rioja (Haelterman *et al.*, 2015) y posteriormente, fue hallada en las provincias de Córdoba (Tolocka *et al.*, 2014) y Catamarca (Von Baczko *et al.*, 2017; Tolocka *et al.*, 2018). Mediante pruebas serológicas y moleculares se confirmó la presencia de la bacteria en la provincia de La Rioja, principalmente en árboles del cultivar Arauco que fue el más afectado por éste patógeno (Haelterman *et al.*, 2015) y también se detectó en otros cultivares como Manzanilla, Arbequina y Picual (Tolocka *et al.*, 2017; Calahorra *et al.*, 2019).

La bacteria se dispersa por medio de la propagación de material agámico infectado y a nivel de campo es transmitida por insectos-vectores denominados chicharritas del orden Hemiptera, Familias *Cicadellidae* (tribus *Proconiini* y *Cicadellini*) y *Cercopidae*. Muchos de estos insectos cumplen su ciclo de vida en malezas asintomáticas que actúan como reservorio del patógeno, manteniendo una fuente permanente del inóculo (Lee *et al.*, 1991; Hopkins and Purcell, 2002). Por otro lado, la proliferación de la bacteria transmitida por estos insectos, podría llevar a una pérdida importante de valor paisajístico, afectando a olivos centenarios y produciendo pérdidas económicas (López *et al.*, 2018). Según Montesinos, 2019 menciona que la transmisión de la bacteria por vectores está influenciada por el aumento de la temperatura teniendo un efecto de acortamiento de la

duración de las etapas de desarrollo e incremento en el número de generaciones del vector, con lo que la diseminación de *X. fastidiosa* podría verse favorecida.

X. fastidiosa es una bacteria mesófila adaptada a zonas con inviernos con temperaturas suaves o moderadas (López *et al.*, 2018). Si bien el cambio climático no implicará variaciones significativas respecto de la presencia de la *X. fastidiosa*, tampoco favorecerá a su desaparición. La enfermedad causada por esta bacteria es responsable de pérdidas en la producción agrícola que podría obligar a un cambio de cultivos en algunos sectores, como se menciona para el cultivo de la almendra en las Islas Baleares (De Vilchez Moragues *et al.*, 2019). En el archipiélago se propone implementar regulaciones específicas que no dejen importar determinadas plantas como la *Polygala myrtifolia* ya que en el caso de que la bacteria afectara a olivos centenarios de la Serra las pérdidas para el sector del aceite serían considerables.

En base a la distribución conocida de *X. fastidiosa* en las distintas zonas del mundo y en el marco de los proyectos PONTE y XF-ACTORS del programa H2020 de la UE se están infiriendo modelos de favorabilidad climática, así como de distribución potencial de la bacteria en Europa. Según Landa *et al.* (2018), las temperaturas mínimas en invierno que prevalecen en las áreas de cultivo de olivos, vid y almendro, principalmente en el sur de España, Grecia, Italia, Portugal o Turquía, podrían permitir la supervivencia y establecimiento de la bacteria, si finalmente llegase a ser introducida y/o no se pudiese erradicar. Por lo mencionado anteriormente, el clima invernal es un factor clave para delimitar áreas infectadas donde *X. fastidiosa* puede sobrevivir de una estación a la siguiente (Purcell, 1989). No obstante, sería necesario estimar los valores umbrales de temperatura mínima invernal para la situación europea, ya que cada una de las subespecies puede presentar condiciones climáticas diferenciadas para su desarrollo y supervivencia y estar también influenciadas por las regiones geográficas o plantas hospedantes (Feil y Purcell, 2001).

Según Purcell, 1997 cita que el potencial establecimiento de la bacteria causante de la enfermedad PD en vid en California (EE. UU) está influenciada por las temperaturas medias mínimas de invierno indicando un rango de riesgo según la siguiente escala: $T^{\circ} < -1,1^{\circ}\text{C}$ es nulo el peligro, de $-1,1^{\circ}\text{C}$ a $1,7^{\circ}\text{C}$ ocasional, de $1,7$ a $4,5^{\circ}\text{C}$ moderado y $>4,5^{\circ}\text{C}$ el riesgo es severo. También, la prevalencia de las enfermedades causadas por *X. fastidiosa* está directamente relacionada con la de sus vectores (López *et al.*, 2018).

Hay protocolos empleados para la amplificación de ADN de todas las subespecies de *X. fastidiosa*; tres de ellos siguen la normativa europea que son: 1) PCR convencional desarrollada por Minsavage *et al.*, 1994 (gen *rpoD*); 2) PCR en tiempo real de Francis *et al.*, 2006 (proteína hipotética conservada, *HL*) y 3) PCR de Harper *et al.* (2010, erratum 2013) (gen *rimM*), siendo este último el más sensible y recomendable para la detección de la bacteria (EPPO, 2018; López *et al.*, 2018). La técnica serológica ELISA es confiable y rápida para la detección de bacterias fitopatógenas, se basa en la relación inmunológica, entre anticuerpos que reconocen y se unen a un antígeno específico, es una técnica confiable y rápida para la detección de bacterias fitopatógenas y se considera como prueba complementaria (Protocolo de Diagnóstico: *Xylella fastidiosa* y sus subespecies, 2020).

Los síntomas inducidos por *X. fastidiosa* pueden variar según la especie hospedante y la cepa bacteriana que causa la infección (Saponari *et al.*, 2017). El aislamiento de este patógeno es fundamental para determinar su identidad y contemplar estudios complejos referidos a su biología, características fenotípicas, conocimientos genéticos y de patogenicidad. Además, para confirmar si es el agente causal de la enfermedad en una especie vegetal determinada y poder reproducir los síntomas observados a campo cumpliendo con los postulados de Koch.

Se conoce que una de las peculiaridades de *X. fastidiosa*, es lo dificultoso de su aislamiento, incluso a partir de plantas sintomáticas. Ésto es debido, entre otras causas, a sus exigencias nutricionales que dificultan su crecimiento *in vitro* (bacteria fastidiosa) y que requiere de medios de cultivos muy complejos y enriquecidos (Marco-Noales y Barbé, 2018). Las complicadas interacciones entre la bacteria, la planta, el vector y el ambiente se podrían conocer partiendo del aislamiento del patógeno (Landa *et al.*, 2017).

Aunque en el protocolo EPPO (2018) se describe la metodología aconsejada para su aislamiento, el éxito del mismo depende de otras condiciones influyentes, como son el tipo de hospedante, la concentración bacteriana presente en la muestra, el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la realización de los aislamientos y la época del año en que se realizan, dado que las condiciones ambientales influyen en la concentración en la planta (Landa *et al.*, 2017).

Para el aislamiento de *X. fastidiosa*, se recomienda el empleo de por lo menos dos medios de cultivos específicos para este microorganismo, con la finalidad de tener mayores posibilidades de éxito para obtener el cultivo bacteriano (EPPO, 2016c). Debido a que es una bacteria de muy lento crecimiento, es fundamental realizar una correcta desinfección superficial del material vegetal del cual se va a realizar el aislamiento, para evitar el crecimiento de otros microorganismos que pueden interferir en la placa de cultivo debido a que crecen más rápidamente que este patógeno. Existen estrategias (EPPO, 2018) que tienen por finalidad aumentar las probabilidades de lograr el aislamiento de la bacteria, como es el empleo de ultrasonido que disgregan las estructuras de la biopelícula que produce la bacteria en los haces vasculares xilemáticos de las plantas infectadas, liberando las células individuales que pueden formar colonias en el medio de cultivo específico. También en muestras leñosas tales como olivo, la impresión directa de secciones de brindillas tras ligera presión facilita la salida de líquido xilemático que se siembra sobre el medio de cultivo específico como el agar de extracto de levadura y carbón tamponado denominado BCYE. Este medio fue citado Wells *et al.* (1981) y Schaad *et al.* (2001) como el más adecuado para el aislamiento de la bacteria a partir de material vegetal de olivo.

La hipótesis planteada para este capítulo fue la siguiente:

- *X. fastidiosa* está presente en todas las regiones olivícolas argentinas, encontrándose también en hospedantes alternativos de plantaciones infectadas con el patógeno, pudiéndose aislar la bacteria desde olivo y otros cultivos de interés agrícola

De la misma, se desprende el siguiente objetivo general para este capítulo:

. - Efectuar una prospección a nivel nacional de la presencia de la bacteria en las principales plantaciones olivícolas y en hospedantes alternativos. Realizar aislamientos de la bacteria a partir de plantas de olivo y otros cultivos de importancia agrícola

Los objetivos específicos fueron:

. - Monitorear la presencia de *X. fastidiosa* en las principales regiones olivícolas del país

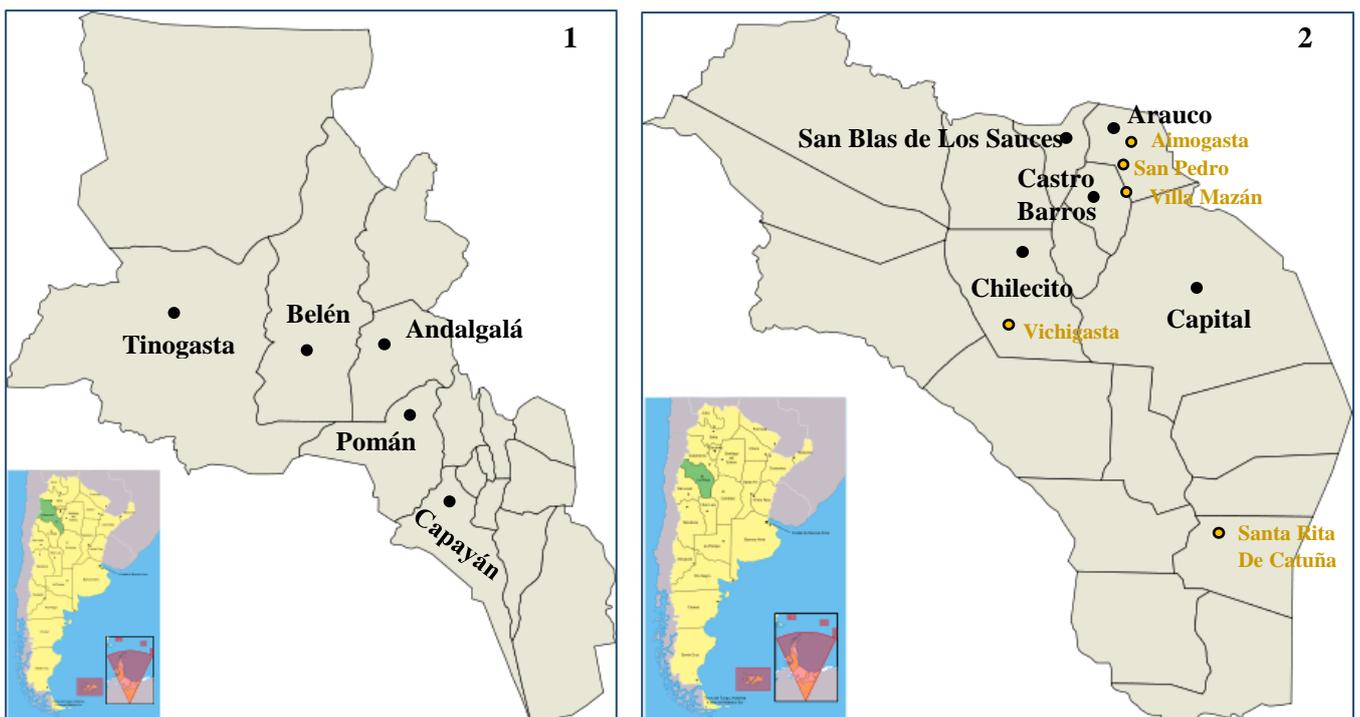
. - Relevar hospedantes alternativos en plantaciones tradicional de olivo del departamento de Cruz del Eje, Córdoba, infectado con la bacteria

. - Aislar la bacteria *X. fastidiosa* a partir de plantas de olivo y otros hospedantes presentes en el país

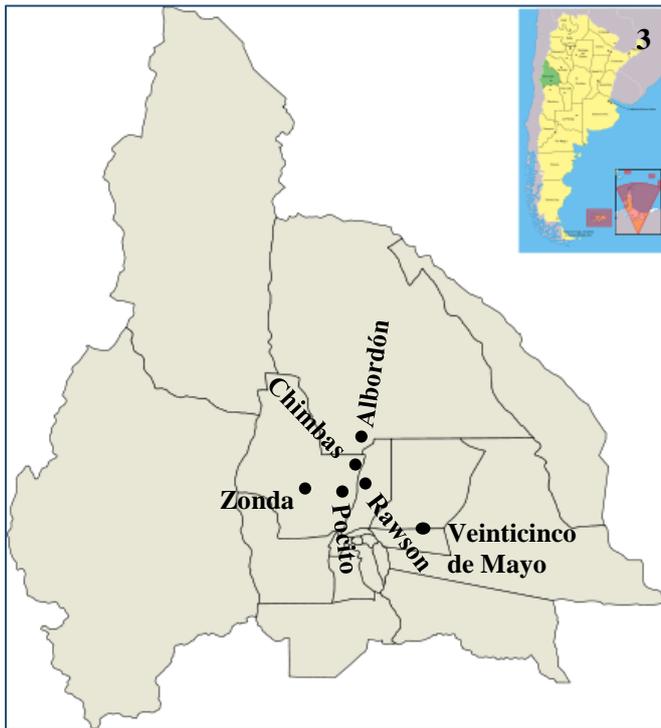
MATERIALES Y MÉTODOS

Area de estudio, prospección y metodología para el muestreo

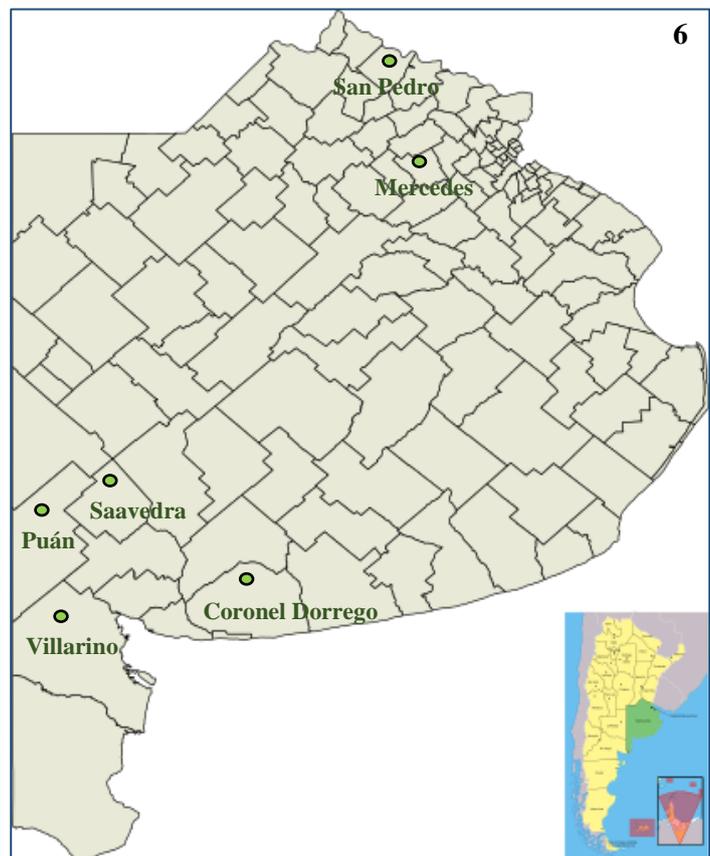
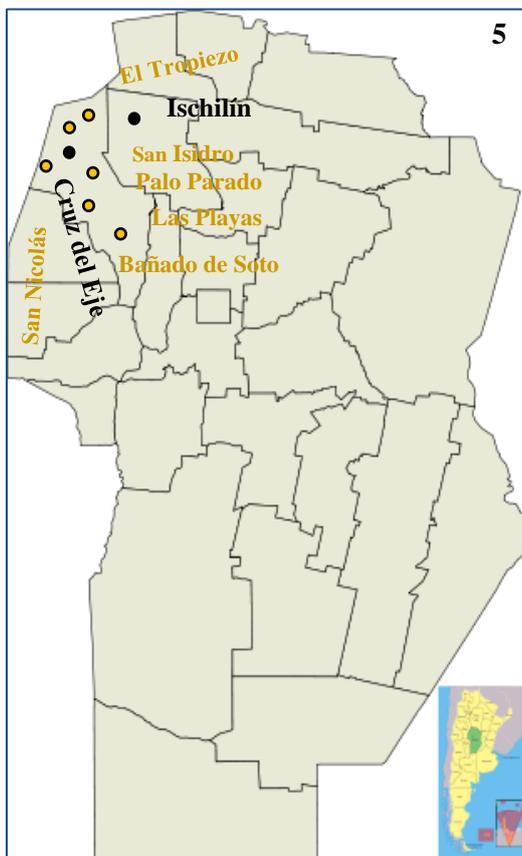
Entre los años 2013 y 2021 se realizaron, en conjunto con el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria-SENASA, prospecciones en campos situados en departamentos de las provincias de Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, Córdoba, Buenos Aires y Río Negro (Figuras 2.1 a 2.7; Tabla 2.1). Se trata de zonas pertenecientes a las principales áreas de producción del país con condiciones agroecológicas adecuadas para el cultivo del olivo. El sistema de plantación adoptado en la gran mayoría de las fincas relevadas, era el tradicional, de baja densidad (entre 70-150 plantas/ha), con un marco de plantación de 10 x 10 m y riego a manto. También, se efectuaron relevamientos en las provincias de Catamarca, La Rioja, Mendoza y San Juan en olivares modernos con mayor número de plantas por hectárea y riego localizado, entre ellos intensivos de baja y alta densidad con 200-400 plantas/ha y 400-800 plantas/ha y marcos de plantación de 6 x 4 m y 6 x 2 m, respectivamente; y superintensivos con densidades mayores a 1500 plantas/ha, con marco de plantación de 3,5 x 1,5 m (Bueno y Oviedo, 2014).



Figuras 2.1 y 2.2: Departamentos muestreados en las provincias de Catamarca y La Rioja, respectivamente



Figuras 2.3 y 2.4: Departamentos monitoreados en las provincias de San Juan y Mendoza, respectivamente



Figuras 2.5 y 2.6: Departamentos y partidos relevados en las provincias de Córdoba y Buenos Aires, respectivamente

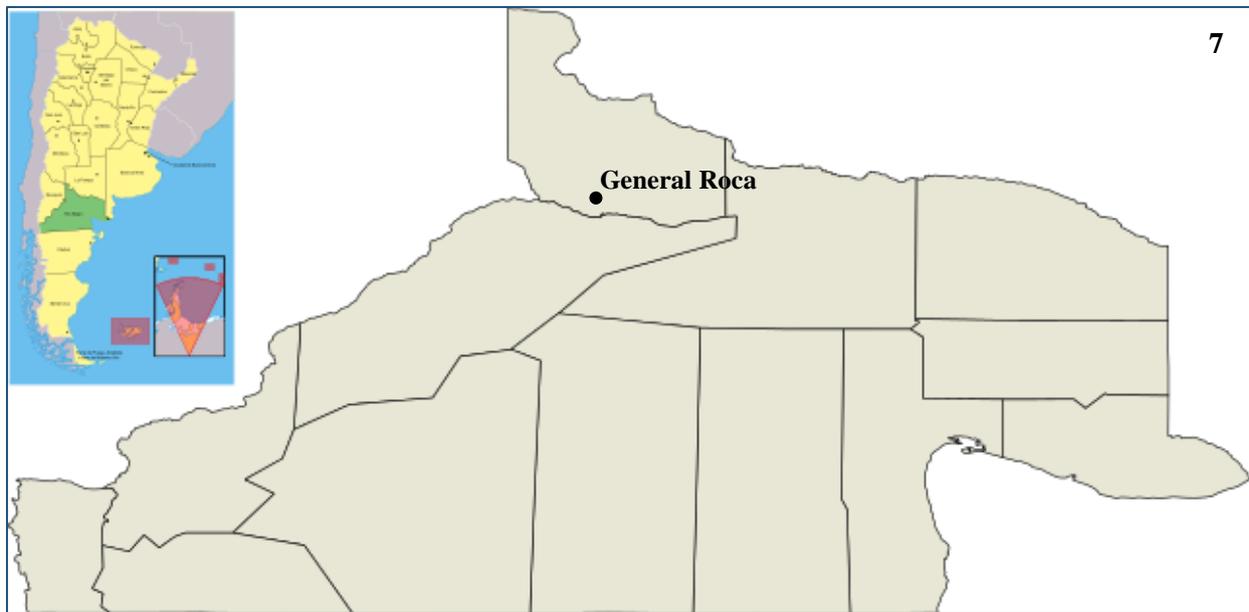


Figura 2.7: Departamento muestreado en la provincia de Río Negro

Tabla 2.1. Sitios de estudio y plantaciones de olivo en las principales provincias del país

Provincias	Departamentos	Localidad	Zonas/Partidos	Cultivares
Catamarca	Andalgalá Pomán Capayán Tinogasta Belén			Arauco Coratina Arbequina
La Rioja	Arauco Castro Barros Chilecito San Blas de los Sauces Capital	Aimogasta San Pedro Vichigasta Villa Mazán Santa Rita de Catuña	Tiro Federal II La Merced	Arauco Picual Manzanilla fina Barnea Nabalis Aloreña Empeltre Frantoio Hojiblanca
San Juan	Rawson Pocito Chimbas Albordón Zonda 25 de Mayo			Arauco Frantoio Farga Arbequina Criolla Changlot Real

Mendoza	Rivadavia San Martín Luján de Cuyo Junín Guaymallén Lavalle Maipú			Arauco Manzanilla Arbequina Frantoio
Córdoba	Ischilín Cruz del Eje Capital	San Isidro cno. Paso Viejo Las Playas San Nicolás Palo Parado El Tropezio		Arauco Frantoio Arbequina Manzanilla Nevadilla Oblonga
Buenos Aires		Villarino La Plata	Mercedes San Pedro Saavedra Puan Coronel Dorrego	Arbequina
Rio Negro	General Roca			s/d del cultivar

Las muestras se tomaron de plantas sintomáticas, por lo general de más de 50 años y preferentemente del cultivar Arauco, considerado susceptible a *X. fastidiosa*. También se muestrearon olivares implantados con los cultivares Frantoio, Arbequina, Picual, Manzanilla, Coratina, Farga, Criolla, Barnea, Nabali, Changlot Real y Nevadillo.

Para la toma de muestras de cada plantación, primero se realizó una apreciación general de las fincas de manera visual y luego una observación particular en cada planta tratando de detectar síntomas de decaimiento, defoliación parcial, rama con hojas secas por lo general en la parte superior de la copa, distribuidas de manera desuniforme y en la parte basal de la misma rama la detección de hojas con quemadura en los bordes o necrosis apical denominada “Punta de Flecha-PF” (Figura 2.8). También se consideraron otros síntomas adicionales como muerte rápida de brotes, hojas con coloración verde seco (opaca), de forma curvada y con los bordes plegados hacia arriba y clorosis en el limbo (Haelterman *et al.*, 2015).

A partir de ramas que presentaban el extremo apical seco, se seleccionaron 6-8 brindillas (de 60 cm de longitud) por debajo de ese sector, que tuvieran hojas con los síntomas anteriormente citados. También, de árboles con marcado decaimiento (desechamiento abrupto de la parte aérea) se seleccionó material vegetal de aquellos que

manifestaron una zona de sobrebrotación detectada desde la base del tronco denominados chupones manifestando los mismos síntomas. A partir de plantas que presentaron escasa sintomatología, se prepararon muestras compuestas, seleccionando 10-12 brindillas de alrededor de toda la copa. Luego, las mismas fueron colocadas dentro de una bolsa plástica identificándola por número de fila y planta o por coordenadas geográficas. Posteriormente, se acondicionaron en conservadoras de poliestireno expandido con refrigerantes hasta su destino final. Una vez en el laboratorio, las muestras se conservaron a 4°C hasta el momento del análisis y diagnóstico (Tolocka *et al.*, 2019).

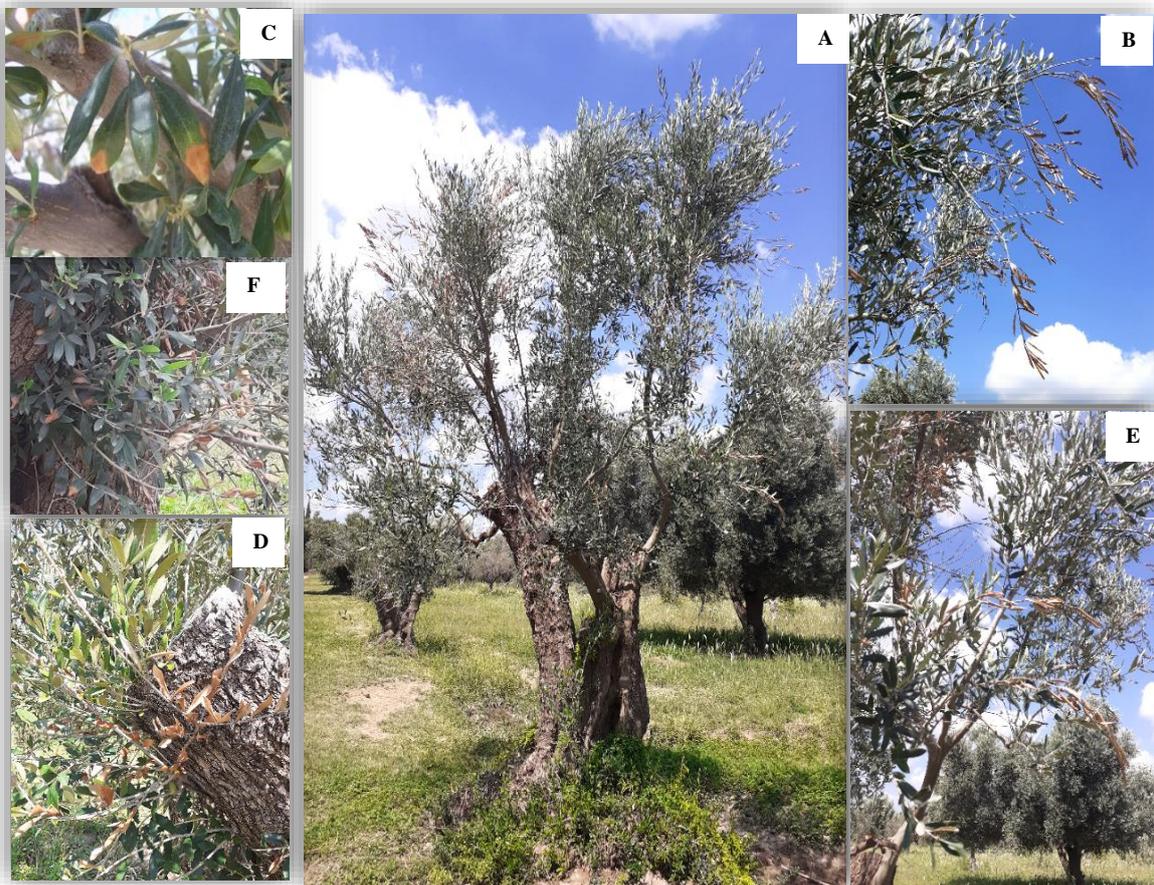


Figura 2.8. A. Planta de olivo con avanzado decaimiento procedente del Dpto. Cruz del Eje (Córdoba), febrero 2021. B-E. Síntoma de rama seca en el extremo superior de la copa. C. Necrosis apical en las hojas. D-F. Chupones con síntomas atribuibles a *X. fastidiosa*. Fotos: P. Tolocka.

Muestreo de olivos y potenciales hospedantes de *X. fastidiosa* en zonas productivas del país

En marzo del año 2017, se realizó un relevamiento en búsqueda de hospedantes alternativos ubicado camino a Paso Viejo, Dpto. Cruz del Eje, en un olivar que tenía antecedentes de la presencia de la bacteria (prospección que se efectuó en dicha finca en el 2014), y que presentaba una alta incidencia de síntomas de declinamiento en plantas añejas. La búsqueda se orienta a hospedantes alternativos que se encontraban aledaños a plantas de olivo enfermas como: fresno (*Fraxinus excelsior* L.), mandarino (*Citrus reticulata* B.), laurel (*Laurus nobilis* L.), jazmín de lluvia (*Trachelospermum jasminoides* (Lindl.) Lem.), cedrón (*Aloysia citrodora* P.), santa rita (*Bougainvillea glabra* C.), vid, bignonia (*Bignonia capreolata* L.), amor seco (*Bidens pilosa* L.), duraznero, *Zinnia peruviana* L., azarero (*Pittosporum tobira* (Thunb.) W.T.Aiton), algarrobo (*Prosopis* L.), siempre verde (*Ligustrum* L.), achira (*Cannaceae indica* L.), menta (*Mentha × piperita*), crisantemo (*Chrysanthemum indicum* L.), moradillo (*Machaerium acutifolium* V.), rosa rococó (*Rosa gallica* L.), aguaribay (*Schinus areira* L.), malvácea (*Malva sylvestris* L.), tala (*Celtis ehrenbergiana* Gillies ex Planch), crasa (Flia *Crassulaceae*), girasolillo (*Helianthus tuberosus* L.), santa lucía (*Commelina erecta* L.), albahaca (*Ocimum basilicum* L.), sanguinaria (*Sanguinaria canadensis* L.), afata (*Sida rhombifolia* L.), girasol guacho (*Helianthus annuus* L.). Se extrajo del olivar una planta de cada especie mencionada, realizándose una muestra compuesta de cada ejemplar, y se analizó un pool de peciolos y nervaduras principales por técnicas serológicas. En ese mismo año, en el Dpto. Chilecito se recolectaron 13 plantas provenientes de huertos de cítricos, almendros y ciruelos que fueron analizados por la técnica serológica DAS ELISA. En otro relevamiento efectuado el mismo año en Chilecito (Capital) se tomaron 17 muestras de plantas de cítricos y olivos que fueron evaluados mediante la misma técnica analítica. En el año 2021, se efectuó un nuevo relevamiento en el lote 1 del huerto mencionado para conocer el estado sanitario de los olivos de en uno de los lotes tradicionales, donde se tomaron 16 muestras de plantas con síntoma de decaimiento rápido.

Técnicas serológicas y moleculares para el diagnóstico de *X. fastidiosa*

DAS ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Para la detección de la bacteria se empleó esta prueba serológica (Clark y Adams, 1977) con reactivos de AGDIA Inc-SRA 34503 en placas de poliestireno. De cada muestra se tomaron 500 mg de trozos de pecíolos y nervadura principal proveniente de hojas sintomáticas que luego se mezclaron convenientemente para obtener una muestra homogénea. A continuación, el material fue molido con tampón de extracción, siguiendo el protocolo propuesto por el laboratorio (Anexo-Protocolo I). Por cada placa se utilizaron como testigos sanos (controles negativos) 6 muestras provenientes de plantas de olivo mantenidas en invernáculos bajo condiciones controladas y cubierta antiáfidos, y como testigos enfermos (controles positivos) una muestra de Aimogasta (La Rioja) y otra de Cruz del Eje (Córdoba), previamente corroboradas en su diagnóstico por técnicas serológicas y moleculares. El sustrato utilizado fue TMB (tetrametil-bencidina) y la placa fue leída a los 10 min (hasta observar coloración en los testigos sanos), en un lector de ELISA BIO-RAD a 655 nm de longitud de onda. La muestra fue considerada positiva cuando el valor de absorbancia superó dos veces la media de los testigos sanos (umbral de corte: 0.100 de absorbancia).

Análisis Molecular. Extracción del ADN y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En el caso de obtener lecturas cercanas al umbral de corte, pero sin superarlo, para confirmar el diagnóstico las muestras fueron analizadas mediante pruebas moleculares. En este caso, el ADN fue extraído mediante el protocolo de Murray y Thompson (1980) modificado (Anexo-Protocolo II). Para determinar la calidad y concentración del ADN obtenido, se sembró 1 ul del mismo, en un gel de agarosa al 1% realizando su corrida en tampón TAE 0,5X. Suscesivamente se teñido con GelRed a una concentración de 2,5X, durante 15 min. Posteriormente, las imágenes fueron capturadas en un equipo Bio-Rad mod: Universal Hool II, EE. UU, observando la banda de ADN bajo luz ultravioleta.

Una vez corroborada la calidad y concentración del ADN extraído, se determinó la presencia de la bacteria a través de la técnica de PCR convencional. Las muestras de ADN fueron diluidas 1/15 en agua miliQ libre de nucleasas, debido a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el olivo que pueden causar inhibición en la reacción dando un falso negativo.

Para esta técnica, se empleó un juego de cebadores generales para *X. fastidiosa* RST31 y RST33 que amplifican la secuencia parcial del gen *rpoD* (Minsavage *et al.*, 1994) y otro específico HL5 y HL6 para *X. fastidiosa*, que amplifican una parte del gen de la proteína hipotética conservada-HL (Francis *et al.*, 2006), siendo las bandas esperadas de 733 y 221 pb, respectivamente (Tablas 2.2). En las tablas 2.3 y 2.4 se detallan los reactivos de la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación respectivamente, para ambos juegos de cebadores (Tabla 2.5). Se tomó una muestra compuesta de cada planta con sintomatología sospechosa haciendo un pool y analizando el mismo. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE 0,5X, teñidos con GelRed 2,5X, y visualizados bajo luz UV en el equipo fotoanizador de imágenes Bio-RAD, Universal Hood II, adquiriéndose las imágenes de los geles.

Tabla 2.2. Secuencia de cebadores empleados para PCR convencional con cebadores generales y específicos para la detección de *X. fastidiosa*

Tipo	Nombre del cebador	Sentido (5' - 3')	Tamaño (pb)	Referencias
Forward (for.)	RST31	GCGTTAATTTTCGAAGTGATT CGATTGC	733	Minsavage <i>et al.</i> , 1994
Reverse (rev.)	RST33	CACCATTCGTATCCCGGTG		
Forward (for.)	HL5	AAGGCAATAAACGCGCACTA	221	Francis <i>et al.</i> , 2006
Reverse (rev.)	HL6	GGTTTTGCTGACTGGCAACA		

Tablas 2.3. Concentraciones y volúmenes de los reactivos para la preparación de la mezcla de amplificación del protocolo de PCR convencional para la detección de *X. fastidiosa* con los cebadores RST31/33

Reactivos	Concentración final/reacción
Tampón	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,2 mM
Pr. RST31	0,5 μM
Pr. RST33	0,5 μM
Taq. DNA polimerasa	1,0 U
ADN molde	2 ul

Tablas 2.4. Concentraciones y volúmenes de los reactivos para la preparación de la mezcla de amplificación del protocolo de PCR convencional para la detección de *X. fastidiosa* con los cebadores HL5/HL6

Reactivos	Concentración final/reacción
Tampón	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Pr.HL5	0,2 μM
Pr./HL6	0,2 μM
Taq. DNA polimerasa	1,0 U
ADN molde	2 ul

Tabla 2.5. Condiciones de ciclado y tamaño de banda esperado para los cebadores RST31/ RST 33 y HL5/ HL6

Cebadores	N° de ciclos	T°C desnaturalización	T°C hibridación	T°C extensión	pb
RST31-RST33	40	95°C 30''	55°C 30''	72°C 45''	733
HL5-HL6	40	95°C 10''	60°C 15''	72°C 30''	221

Métodos de aislamientos y evaluación de diferentes medios de cultivos específicos

El aislamiento de *X. fastidiosa*, a partir de tejido vegetal de diferentes hospedantes, comenzó en diciembre del año 2015, probando distintas técnicas, algunas adaptadas a partir de trabajos científicos procedentes de aislamientos de bacterias fitopatógenas de

otras especies vegetales como caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Iglesia Lozano, 2005) y cafeto (*Coffea arabica*) (Bergsma-Vlami *et al.*, 2017). Se ensayaron cuatro metodologías para el aislamiento de la bacteria, a partir de material vegetal de las siguientes especies: almendro procedente de la provincia de Catamarca, naranjo de la zona de Bella Vista, provincia de Corrientes y olivo de la localidad de Aimogasta, provincia de La Rioja. Los materiales utilizados fueron previamente corroborados positivos para la bacteria por DAS ELISA y por PCR empleando los cebadores generales y específicos para *X. fastidiosa*, RST31/ RST 33 y HL5/ HL6 respectivamente.

a- El primer método que se desarrolló fue el macerado de tejido vegetal de almendro (aprox.1,5-3 g de pecíolos y nervaduras principales) en morteros estériles con 1 ml de tampón fosfato-succinato-citrato (SCP) 1g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (citrato trisódico) y 1g de $\text{NaOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COONa}$ (succinato disódico) por litro en tampón fosfato 0,015 M pH 7 o con tampón fosfato salino (PBS) 0.01 M pH 7,4 (Anexo-Protocolo I), para la liberación de la bacteria de los vasos xilemáticos. Dichos materiales fueron previamente desinfectados con etanol 70% durante 2 min e hipoclorito de sodio al 2,5% de la fórmula comercial (55g Cl/l) durante 4 min y posteriormente se efectuaron 5-6 enjuagues con agua destilada estéril. Luego, se dejaron orear los trozos vegetales sobre papel de filtro estéril durante 3-5 min, previo a su macerado, realizando todo el proceso bajo condiciones controladas de esterilidad en cámara de flujo laminar.

Aquellos materiales que fueron suspendidos con PBS se incubaron durante 30 min en agitación continua, obteniéndose el ENC (extracto no concentrado). Del mismo, se tomaron 50 ul colocándolos dentro de un eppendorf de 1,5ml. Posteriormente, fueron sonicados a una frecuencia de 40 khz en diferentes tiempos (30, 45 y 60 seg), sembrando en ambos casos sobre medio PW y BCYE (Figura 2.9).



Figura 2.9. Aislamiento de *X. fastidiosa* a partir de pecíolos de almendro. Foto: P. Tolocka

b- El segundo método ensayado consistió en introducir 6-8 trozos de pecíolos de naranjo u olivo, previamente desinfectados de la manera que se describió anteriormente, dentro de eppendorf 1,5 ml y centrifugar a 10.000 g durante 10 min. A continuación, se adicionó 50 ul de tampón SCP y se homogeneizó obteniendo una suspensión (Figura 2.10). Adicionalmente se reemplazó el tampón con NaCl (2,5%) o con agua destilada estéril.

c- El tercer método consistió en cortar con bisturí estéril pecíolos y nervaduras principales de las especies anteriormente mencionadas (también previamente desinfectados) en fragmentos muy pequeños de 2-3 mm de longitud, dentro de cajas de Petri con 2 ml del tampón SCP, dejándolo reposar durante 30 min (Figura 2.11).



Figura 2.10. Proceso de aislamiento a través de la centrifugación de pecíolos y nervaduras de olivo con *X. fastidiosa*. Foto: P. Tolocka



Figura 2.11. Proceso de aislamiento de la bacteria mediante dilaceración de tejido infectado de olivo. Foto: P. Tolocka

De cada suspensión obtenida en las tres técnicas mencionadas previamente, se tomaron 50 μ l que fueron sembrados en placas de Petri con espátula de Digrafsky en tres medios de cultivo específicos para esta bacteria: *Periwinkle Wilt* (PW) (Davis *et al.*, 1981a), *Pierce Disease2* (PD2) (Davis *et al.*, 1980) y *Pierce Disease3* (PD3) (Davis *et al.*, 1981b). Las placas se incubaron en estufa a 28°C y se observaron cada 7 días para detectar el momento de aparición de las primeras colonias de este patógeno.

d- El cuarto método empleado fue adaptado a partir de un protocolo que permitió realizar el aislamiento de la bacteria a partir de cultivares de *Citrus sinensis* (Coletta-Fihlo *et al.*, 2001). La misma fue utilizada con material de naranjo y olivo. Respecto a este último, se emplearon trozos de ramas del año, de 0,5-1 cm de diámetro, provenientes de dos plantas enfermas de la localidad de Aimogasta, La Rioja. El material vegetal fue desinfectado con etanol 70% durante 2 min, luego con hipoclorito de sodio 3% durante 3 min y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, el procedimiento se llevó adelante bajo cámara de flujo laminar (Cariddi *et al.*, 2014). Luego, a las ramitas se las dejó orear sobre papel estéril o fueron suavemente flameadas para su secado. A continuación, se cortaron ambos extremos con una tijera de podar estéril y se procedió a presionar las ramitas con una pinza sobre el medio de cultivo agar de extracto de levadura

y carbón tamponado (BCYE) (Wells *et al.*, 1981), en placas de Petri que luego, se incubaron a estufa a 28°C. (Figura 2.12).

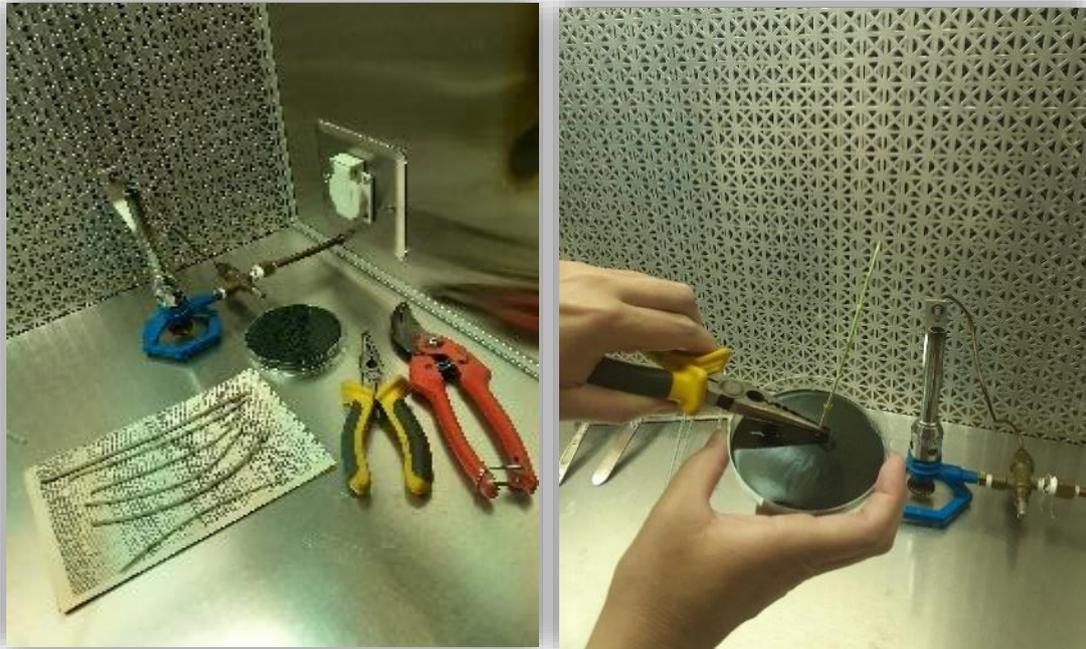


Figura 2.12. Técnica de aislamiento de *X. fastidiosa* desde ramas de olivo cv. Arauco. Fotos: P. Tolocka

En todos los métodos ensayados las cajas de Petri sembradas fueron examinadas semanalmente con el microscopio estereoscópico Nikon SMZ-10, en búsqueda de colonias incipientes de 1-2 mm de diámetro, convexas, transparentes y brillantes. Toda colonia que apareció antes de los 15 días fue eliminada del medio de cultivo y las que aparecieron después de 25-30 días fueron analizadas mediante PCR con los cebadores mencionados anteriormente y repicadas en el mismo medio de cultivo para garantizar la supervivencia y pureza de las cepas. Los cultivos bacterianos de las cepas aisladas se almacenaron en medio líquido PW (almendro) y BCYE (olivo) con 30% de glicerol a -80°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prospección de *X. fastidiosa* en las principales provincias olivícolas de Argentina

De acuerdo a los relevamientos realizados en el periodo comprendido entre 2014 y 2021, *X. fastidiosa* fue detectada en las provincias de La Rioja, Córdoba, Catamarca y Buenos Aires (Figura 2.13). Respecto a esta última provincia cabe consignar que las muestras analizadas dieron positivas a través de pruebas serológicas DAS ELISA, pero no fueron corroboradas por pruebas moleculares (PCR) debido al mal estado de las mismas por la gran invasión de agentes responsables de la fumagina. En análisis posteriores realizados a partir de muestras enviadas por SENASA de Buenos Aires, provenientes de fincas, inicialmente sospechadas de ser positivas, no fue detectada la bacteria. En la Tabla 2.6 se muestran los resultados obtenidos desde 2013 al 2021 de plantas de olivo positivas a la *X. fastidiosa* en las principales provincias del país.

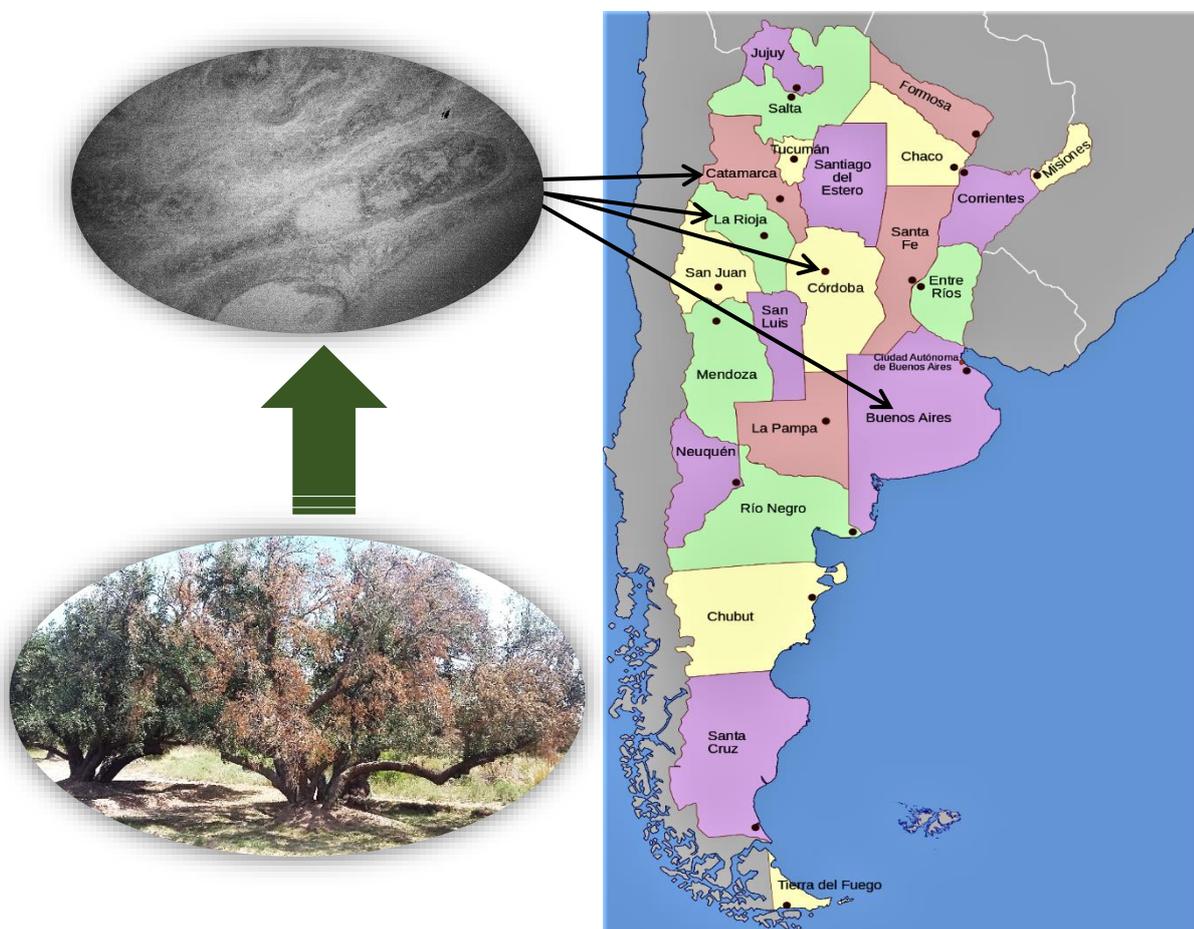


Figura 2.13. Distribución de *X. fastidiosa* en las principales provincias olivícolas del país

Tabla 2.6. Prospección de *X. fastidiosa* en plantaciones de olivo de las principales provincias productoras de olivo de Argentina (2013-2021)

Provincia/Departamento	Dpto.	Muestras analizadas	Muestras positivas y % de plantas enfermas	Cultivares
La Rioja/Arauco	Arauco	242	90 (37.2%)	Arauco, Manzanilla, Picual, Arbequina
Córdoba	Ischilín/Cruz del Eje	91	36 (39.6%)	Arauco, Frantoio, Nevadilla Oblonga
Catamarca		18	6 (33.3%)	Arauco
San Juan		80	0	Arauco Frantoio Farga Arbequina Criolla Changlot Real
Mendoza		114	0	Arauco Manzanilla Arbequina Frantoio
Rio Negro		2	0	S/D
Buenos Aires		21	14 (66.7%)	Arbequina
TOTAL		568	146	

En los sucesivos muestreos realizados en fincas de la localidad de Aimogasta, se observó abandono de algunas plantaciones invadidas por malezas y a las que se le retiró el riego. En otros campos, se observó un marcado decaimiento de los olivares tradiciones principalmente del cv. Arauco que se fue acentuando con los años y que, con el tiempo, el productor tomó la decisión de erradicar aquellas plantas improductivas. (Figuras 2.14. A, B y Figura 2.15).



Figuras 2.14. A. Tocones de olivares que fueron cortados en una finca de la localidad de Aimogasta. B. Secado de plantas en otra finca de la misma localidad. Fotos: P. Tolocka

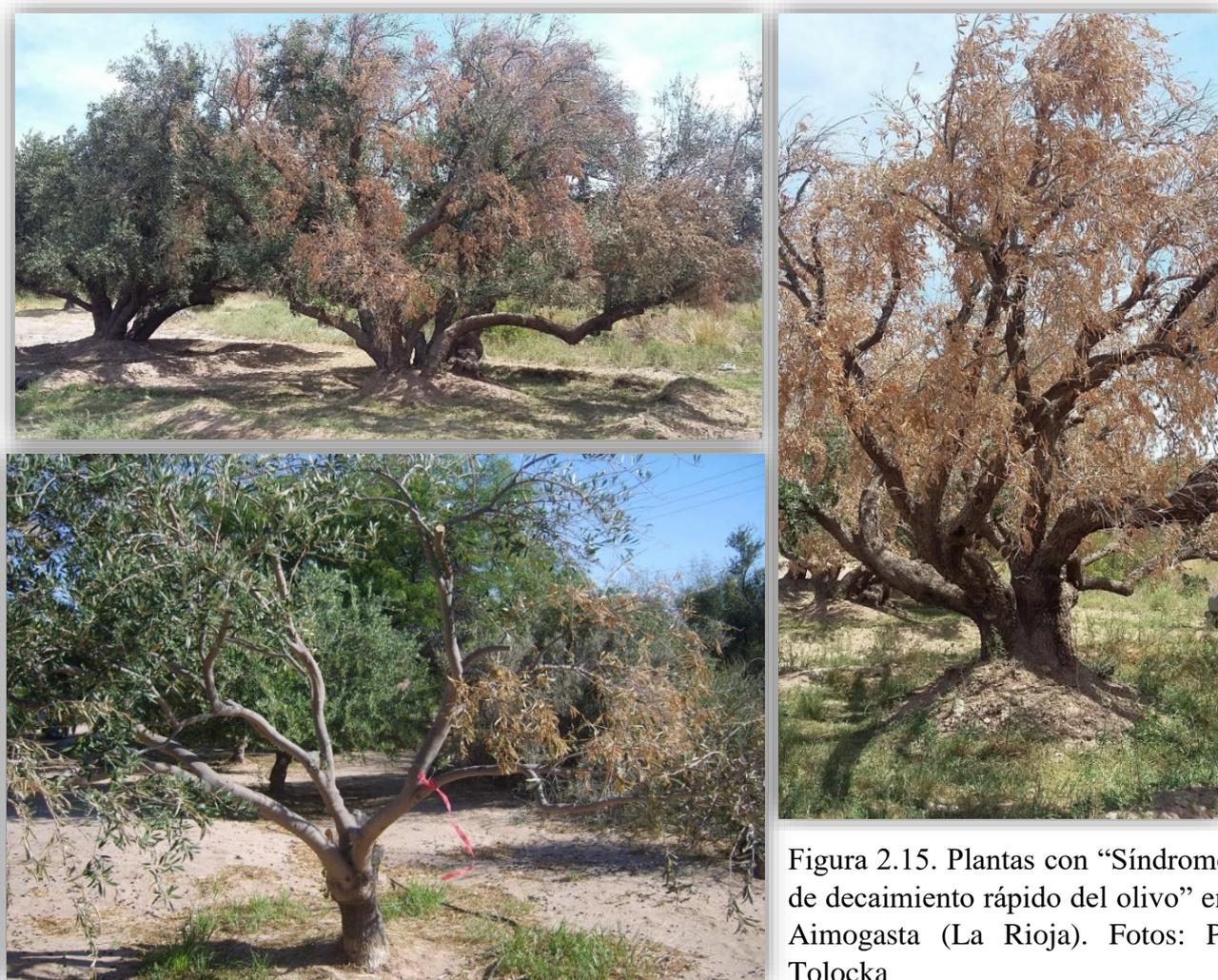


Figura 2.15. Plantas con “Síndrome de decaimiento rápido del olivo” en Aimogasta (La Rioja). Fotos: P. Tolocka

En algunas plantaciones de la localidad de Cruz del Eje, provincia de Córdoba, se observó la misma sintomatología que la descrita en fincas de Aimogasta (Figura 2.16). Sin embargo, en otros campos la situación fue diferente, como es el caso de una finca ubicada en la localidad de Las Playas (Dpto. Cruz del Eje), que estaba abandonada con muchas malezas, sin embargo, las plantas del cv. Frantoio, no manifestaban este decaimiento marcado como lo observado en Aimogasta.

De acuerdo a la sintomatología observada y el material procesado en el laboratorio se obtuvieron muestras positivas para la bacteria en hojas con abarquillamiento hacia el envés, coloración verde mate y necrosis apical y en los bordes del limbo, en materiales provenientes de los diferentes montes olivareros relevados (Figura 2.17).



Figura 2.16. Plantas con síntomas de secado provenientes del Dpto. Cruz del Eje



Figura 2.17. Síntomas observados en hojas de plantas de olivo infectadas con la bacteria.
Fotos: P. Tolocka

Las malezas, plantas ornamentales y aromáticas relevadas en el 2017, del monte ubicado en camino a Paso Viejo del Dpto. Cruz del Eje, resultaron negativas para *X. fastidiosa*. La mayoría no manifestaba síntomas aparentes a los esperados a causa de este patógeno, aunque cabe considerar que, algunas especies de malezas huéspedes, permanecen asintomáticas durante todo su ciclo biológico (EFSA, 2018).

En el departamento de Chilecito, las 13 muestras analizadas de cítricos, almendros y ciruelos fueron negativas a la presencia de la bacteria. Sin embargo, en la zona de Capital de ese Dpto. se detectaron 4 plantas de olivo positivas para *X. fastidiosa*, y en los cítricos no fue encontrado este patógeno.

De acuerdo a las observaciones realizadas a campo, se menciona que el área geográfica más crítica donde se detectó un marcado declinamiento de los olivares fue principalmente en Aimogasta donde se va acentuando la enfermedad con los años, a diferencia de lo observado en Cruz del Eje y Catamarca, ésto podría deberse a varias causas, tales como: condiciones climáticas favorables para el desarrollo y propagación del patógeno y susceptibilidad varietal (Purcell, 1997). En EE. UU, se ha mencionado según este autor, para el caso de la enfermedad *Pierce disease* en vid, hay mayor prevalencia de la bacteria en zonas con inviernos suaves y temperaturas medias mínimas mayores a 4,5°C, considerando así riesgo severo que se instale esta enfermedad. Sí extrapolamos esta información para nuestras zonas analizadas, según datos de temperaturas mínimas medias de los meses de junio y julio de un período comprendido de 50 años extraídas de la Estación Meteorológica SMM y EEAS de INTA (https://inta.gob.ar/sites/default/files/700_agromet.pdf), se obtuvieron registros de temperaturas mínimas medias de junio y julio en un rango de 0 a -2°C en las provincias de Mendoza y San Juan, lo que explicaría el hecho de no encontrar este patógeno en ambas provincias. Una situación diferente ocurre en Chilecito donde el rango de temperaturas mínimas está entre 0 y 2 °C, en Aimogasta entre 2 a 4°C, en Poman y Andalgalá (Catamarca) el rango registrado a sido entre 0 a 2 °C y para Cruz del Eje (Córdoba) de 4 a 6°C. Estos valores de temperatura sugieren un riesgo moderado y severo de establecimiento de la bacteria para el NOA y centro del país (Figuras 2.18 y 2.19) que estaría fundamentado según la escala propuesta por Purcell, 1997.

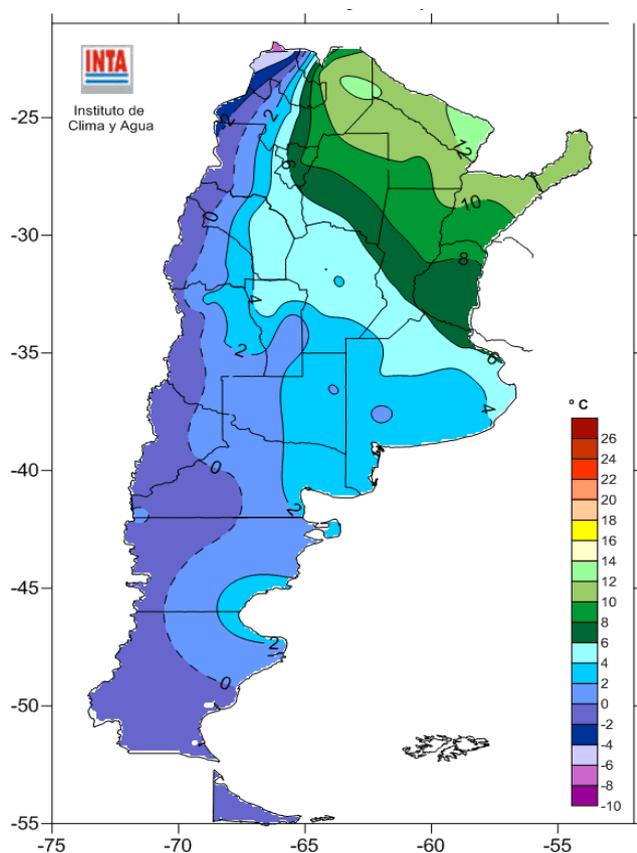


Figura 2.18. Promedio de temperaturas mínimas medias del mes de junio registrada desde 1960-2011 de las Estaciones Meteorológicas SMM y EEAS de INTA

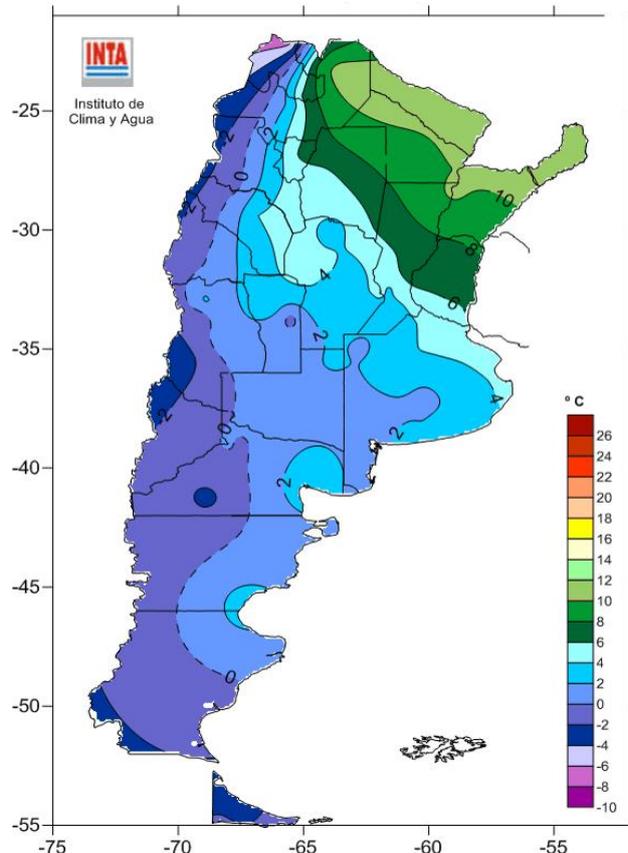


Figura 2.19. Valores de temperaturas mínimas medias del mes de julio registrada desde 1960-2011, extraídas de las Estaciones Meteorológicas SMM y EEAS de INTA

El olivo es un cultivo criófilo, que de acuerdo a sus exigencias bioclimáticas de enfriamiento invernal están adaptados a las bajas temperaturas y no toleran aumento de las mismas. Se viene observando una tendencia de reducción en la cantidad de horas de frío (Damario, 1995), por lo que de esta manera se ve comprometida las necesidades de frío invernal del cultivo durante el descanso vegetativo, lo cual perjudicaría el normal desarrollo del cultivo favoreciendo la invasión de diversos patógenos. También el manejo y las prácticas culturales que se realizan en las fincas, como la prevalencia de malezas en los entresurcos que pueden constituirse en reservorio de inóculo para el patógeno y para la multiplicación del insecto vector transmisor de la bacteria (Trapero, comunicación personal, 2021) unido a la presencia de hospedantes susceptibles como el cv. Arauco,

predisponen a la dispersión de la bacteria en dicho territorio. De las provincias relevadas, Córdoba y La Rioja proporcionaron los mayores valores de incidencia de *X. fastidiosa* con el 41,4% y 32,2%, respectivamente.

Todas las muestras procedentes de los diferentes sitios de estudio que resultaron positivas en los análisis por técnicas serológicas y moleculares, se correspondieron con plantas de olivo que presentaban en hojas síntomas típicos que serían atribuibles a los inducidos por la bacteria como los mencionados anteriormente. Sin embargo, es importante destacar que se analizaron muestras con los síntomas mencionados y las mismas resultaron negativas para la bacteria. Esto demuestra la importancia de realizar su detección en el laboratorio mediante diferentes técnicas de diagnóstico utilizando por lo menos dos técnicas alternas; mediante ELISA, PCR con al menos dos pares de cebadores y PCR tiempo real (Granados *et al.*, 2020). Lo anterior se debe a que los síntomas inducidos por *X. fastidiosa* son considerados inespecíficos y pueden ser también atribuidos a otros agentes bióticos y/o abióticos (Vos *et al.*, 2019). A su vez la gravedad y el momento de aparición de los síntomas difieren según el cultivar de olivo, lo que indica la reacción diferencial de susceptibilidad o tolerancia en el hospedante (Saponari *et al.*, 2017).

Métodos de aislamientos y evaluación de diferentes medios de cultivos específicos

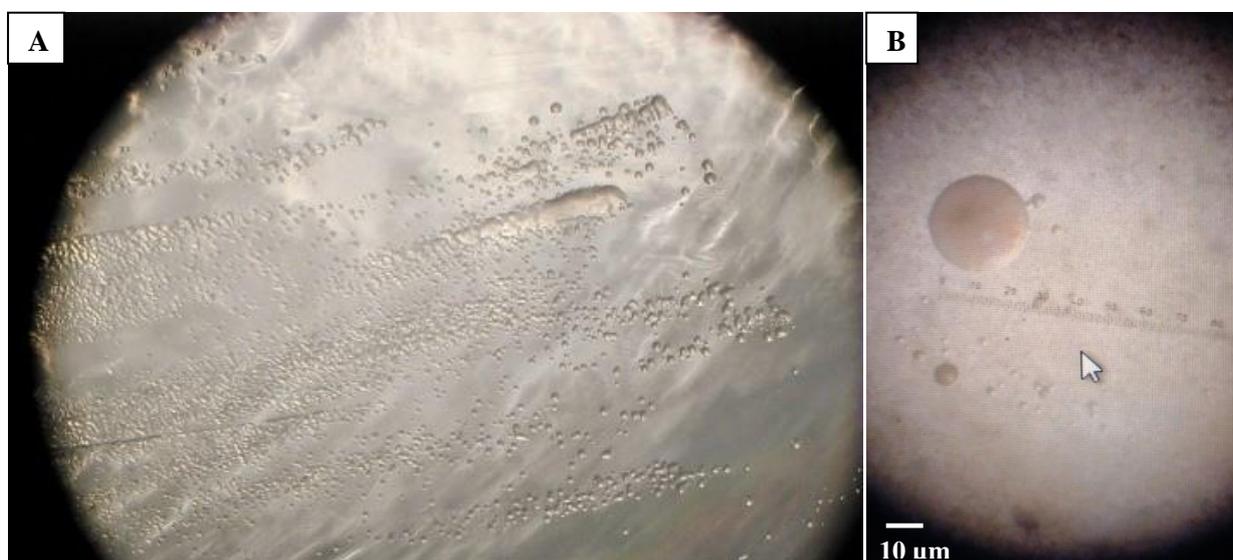
Se logró el aislamiento de cultivos bacterianos de *X. fastidiosa* desde una planta de almendro procedente de Sumalao-Catamarca y de dos plantas de olivo provenientes de Aimogasta (La Rioja), obtenidos a partir de diferentes medios de cultivo. El método de la molienda de pecíolos y nervaduras principales resultó más adecuado para la obtención de cepas provenientes de almendro sembrado en medio PW, mientras que para olivo el aislamiento se logró mediante impresiones realizadas en BCYE. Las cepas fueron denominadas: ALM4 (almendro) aislada en febrero de 2016 y desde olivo OLI17A (diciembre de 2017) y AM2-Angelina (mayo de 2018) procedentes de la zona Tiro Federal II y La Merced, La Rioja, respectivamente. Se realizaron varios intentos para

aislar la bacteria a partir de material sintomático de cítricos, pero las colonias obtenidas no progresaron en los sucesivos repiques de los materiales provenientes de Bella Vista, Corrientes.

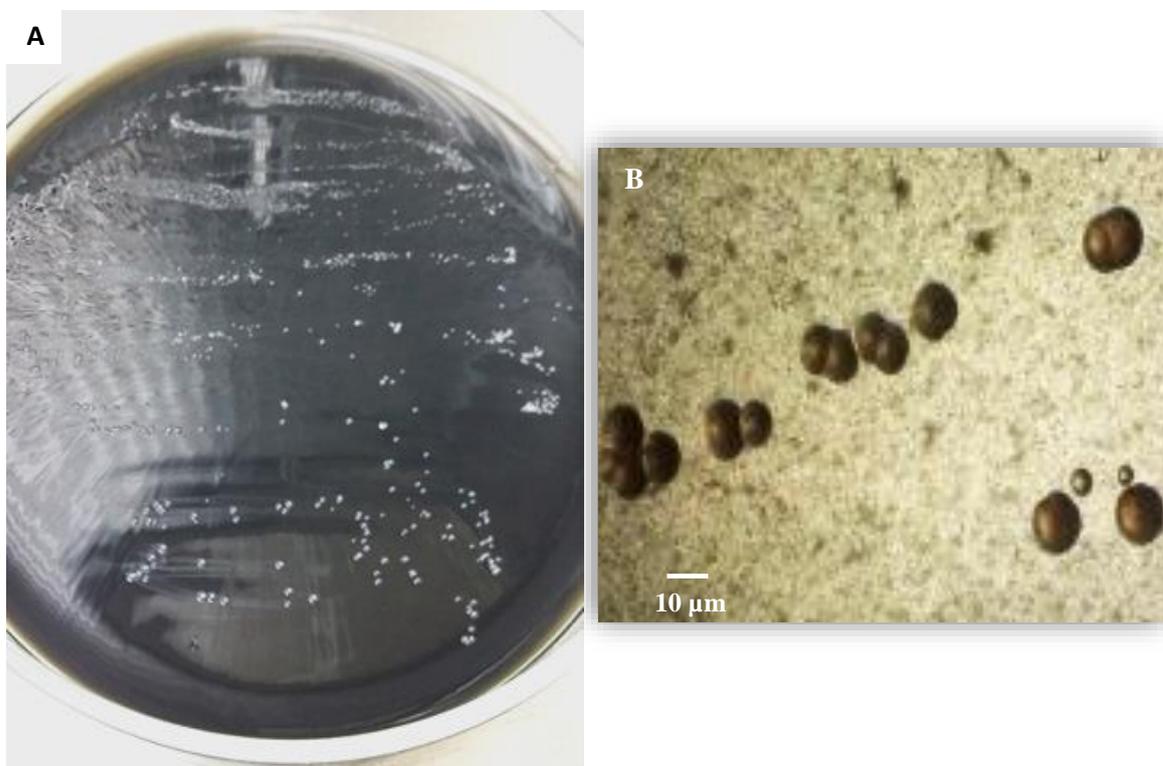
El aislamiento desde almendro se logró en los medios PW, BCYE y PD3. En PW se comenzaron a observar colonias a los 20 días desde la siembra, en BCYE a los 15 días y en PD3 a los 22 días, mostrando mayor y más rápido desarrollo de colonias en comparación a las de olivo. Las colonias fueron muy pequeñas, con un diámetro de 1-1,5 mm después de 3 semanas de incubación a 28°C.

Respecto a olivo, las colonias de ambos aislamientos sólo se desarrollaron mediante impresiones efectuadas en el medio BCYE y fueron observadas a partir de los 34 días posteriores a la siembra. Con los otros métodos implementados no se pudo lograr el aislamiento.

En relación a la morfología de las colonias de *X. fastidiosa* provenientes de ambas especies vegetales, las mismas presentaron aspecto translúcido, convexo y opalescente, de borde circular, algunas con márgenes enteros y otros levemente ondulados, de aspecto superficial suave, de textura viscosa, de tamaño aprox. de 25 micras y carencia de pigmentos. En PW, las colonias se observaron brillantes y translúcidas, tomando el color del medio (caramelo claro) (Figuras 2.20. A y B). Las que crecieron en BCYE contrastaban con el medio negro (carbón) (Figuras 2.21. A y B).



Figuras 2.20. A. Colonias de la cepa ALM4 de *X. fastidiosa* en medio PW, aisladas desde almendro. B. Detalle de una colonia a mayor aumento en micras. Fotos: P. Tolocka



Figuras 2.21. A. Colonias de la cepa OLI17A de *X. fastidiosa* en medio BCYE, aisladas desde olivo. B. Observación de colonias a mayor aumento en micras. Fotos: P. Tolocka

Para el aislamiento de este patógeno, se debe tener en cuenta la época del año, dado que las condiciones ambientales influyen en la concentración del mismo en la planta (Landa *et al.*, 2017). Los aislamientos realizados, a partir del material vegetal procedente de dos diferentes momentos de muestreo (diciembre para OLI17A y mayo para AM2) en el caso de olivo, y en febrero para almendro, fueron exitosos. Respecto a la morfología observada de las colonias aisladas en olivo resultaron con características semejantes a las que cita Cariddi *et al.* (2014).

Cabe resaltar que, en Argentina, éste es el primer trabajo donde se reporta el aislamiento de *X. fastidiosa* a partir de plantas olivo (Tolocka *et al.*, 2021). Para el caso de olivo, el método de aislamientos para *X. fastidiosa* más adecuado fue el de presionar las ramitas y realizar impresiones sobre el medio BCYE. En esta especie vegetal, se probó la técnica de molida, pero no dio resultado con ninguno de los medios mencionados debido al alto nivel de contaminación con hongos y otras bacterias procedentes

de peciolo, nervadura principal y parte de parénquima foliar. Para almendro, la técnica más adecuada fue la molienda de material enfermo sembrado sobre PW, PD3 y BCYE.

CONCLUSIONES

. – En nuestro país, hasta el momento, *X. fastidiosa* se ha detectado en plantaciones olivícolas de las provincias de La Rioja, Córdoba, Catamarca y Buenos Aires. Este patógeno no fue detectado en las provincias de San Juan y Mendoza, ésto podría deberse a las condiciones ambientales no son propicias para la multiplicación de la bacteria y/o a la ausencia del insecto-vector que la transmite.

. - Para Argentina este es el primer informe del aislamiento de cepas de *X. fastidiosa* a partir de olivo OLI17A y AM2-Angelina y almendro ALM4 y. Las colonias aisladas a partir de naranjos no crecieron en los repiques posteriores sobre diferentes medios de cultivo probados.

- Hasta el presente, no se detectó la bacteria en plantas silvestres, ornamentales y aromáticas aledañas en huertos infectados con la bacteria.

. - Debido a la importancia del patógeno, en aquellas nuevas zonas a monitorear, el análisis debe realizarse por lo menos con dos técnicas que pueden ser serológica como DAS ELISA y molecular como PCR convencional, empleando diferentes juegos de pares de cebadores, para confirmar fehacientemente la presencia de la bacteria.

. - En olivo, el método de aislamiento más adecuado fue el de presionar las ramitas y realizar impresiones sobre el medio BCYE. En esta especie vegetal, se probó la técnica de molienda, pero no resultó en ninguno de los medios mencionados, debido al alto nivel de contaminación con hongos y otras bacterias procedentes de pecíolos, nervadura principal y parte de parénquima foliar.

. - Para almendro, la técnica más adecuada fue la molienda de material enfermo sembrado sobre PW, PD3 y BCYE.

. - En relación a las temperaturas medias mínimas invernales registrados en las principales zonas muestreadas, se destaca la importancia de que la bacteria no fue detectada en las provincias de Mendoza y San Juan debido a que las condiciones ambientales no son propicias para su establecimiento y dispersión.

BIBLIOGRAFIA

- Barranco Navero, D., Cimato, A., Fiorino, P., Rallo, L., Touzani, A., Castañeda, C., Serafini, F., Trujillo, I. 2000. Catálogo Mundial de Variedades de Olivo, Consejo Oleícola Internacional, Madrid, España, 360 pp.
- Bergsma-Vlami, M., Bilt, J., Tjou-Tam-Sin, N., Helderma, C. M., Gorkink-Smits, P., Landman, N. M., Nieuwburg, J. G. W., Veen, E.J., Westenberg, M. 2017. Assessment of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* in imported ornamental *Coffea arabica* plants, *Plant Pathology*, 66, 10.1111/ppa.12696. <http://doi.org/10.1111/ppa.12696>.
- Brlansky, R. H., Davis, C.L., Timmer, L. W., Howd, D.S. and Contreras, J. 1991. Xylem limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus variegated chlorosis, *Phytopathology*, 81, 1210.
- Calahorra, A., Paccioletti, M. A., Tolocka, P. A., Otero, M. L., Defea, B., Foieri, A. Pereyra, M., Paradell, S., Roca, M. E., Haelterman, R. M. 2019. Olive crops from Argentina affected by *Xylella fastidiosa*. Segunda Reunión Científica Europea sobre *Xylella fastidiosa* (EFSA), Córcega, Francia, Pp. 60.
- Cariddi, C., Saponari, M., Boscia, D., De Stradis, A., Loconsole, G., Nigro, F., Porcelli, F., Potere, O., Martelli, G. P. 2014. Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy, *Journal of Plant Pathology*, 96(3), 1-5.
- Carlucci, A., Lops, F., Marchi, G., Mugnai, L. y Surico, G. 2013. Has *Xylella fastidiosa* “chosen” olive trees to establish in the Mediterranean basin?, *Phytopathologia Mediterranea Current Topics*, 52, 3, 541-544.
- Censo Nacional Agropecuario-CNA-Frutales. 2018. Resultados definitivos. Abril de 2021. Ministerio de Economía Argentina. Instituto Nacional de Estadística y Censos –INCEC. ISBN 978-950-896-607-0.
- Coletta-Filho, D. H. y Machado, M. A. 2002. Evaluation of the genetic structure of *Xylella fastidiosa* populations from different Citrus sinensis varieties, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3731-3736. <http://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3731-3736.2002>
- Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía 2020. RAIF Red de Alerta e Información Fitosanitaria de Andalucía. *Nuevos focos de Xylella fastidiosa en Portugal*. Recuperado de http://www.juntadeandalucia.es/agriculturapescayderrollorural/raif/rss/-/asset_publisher/OpV27pD7buE7/content/id/4915022

- Clark, M. F., Adams, A. N. 1977. Characteristic of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *Journal of General Virology*, 34, 475-483.
- Damario, E. A. y Pascale, A. J. 1995. Estimación de la temperatura mínima mensual media para estudios agroclimáticos, *Revista de la Facultad de Agronomía*, 15(1), 77-83. <http://ri.agro.uba.ar/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=rfa&d=1995damarioea2>.
- Davis, M. J., Purcell, A.H., Thomson, S. V. 1980. Isolation medium for Pierce`s disease bacterium, *Phytopathology*, 70, 425-429.
- Davis, M. J., French, W.J., Schaad, N. W. 1981a. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald, *Current Microbiology*, 6, 309-314. <http://doi.org/10.1007/BF01566883>.
- Davis, M.J., Whitcomb, R. F., Gillaspie, A.G.J. 1981b. Fastidious bacteria of plant vascular tissue and invertebrates (including so called rickettsia-like bacteria). In: Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A., Schlegel, H. G., (Eds.) *The prokaryotes: a handbook on habits, isolation, and identification of bacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2172-2188 pp.
- De Vilchez Moragues, P., Torres, C. M., Autores, F., Jordà, G., Rita, j., Miranda, M. A., Chuelca, M., Vaquer-Sunyer, R., Canals, V., Cladera, A. 2019. Capítulo 5. El cambio climático. *ResearchGate*, 135-223. <https://www.researchgate.net/publication/337972712>.
- Delbianco, A., Gibin, D., Pasinato, L., Boscia, D., Morelli, M. 2022. Update of the *Xylella* spp. host plant database-systematic literature search up to 31 December 2021. *EFSA Journal*, 20 (6):7356, 1-70. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7356>.
- Denancé, N., Legendre, B., Briand, M., Olivier, V., De Boisseson, C., Poliakoff, F. y Jacques, M. A. 2017. Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France, *Plant Pathology*, 66, 1054-1064. <http://doi.org/10.1111/ppa.12695>.
- EFSA Journal. 2018. Update of the *Xylella* spp. host plant database. Recuperado de <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5408>
- EPPO Bulletin 2018. Diagnostics. PM 7/24 (3) *Xylella fastidiosa*. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, 48 (2), 175-218. ISSN 0250-8052. <http://doi.org/10.1111/epp.12469>.
- EPPO. 2016c. PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin*, 46(3), 463-500.
- Feil, H. y Purcell, A.H. 2001. Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines; *Plant Disease*, 85:1230-1234.
- Francis, M., Lin, H., Cabrera-La Rosa, J., Doddapaneni, H., Civerolo, E. L. 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and

- quantification of *Xylella fastidiosa*, *European Journal of Plant Pathology*, 115, 203- 213.
- Granados, A. A., Hernández Macías, B., Guadarrama Valencia, L., Moya Hernández, S. L. 2020. Protocolo de Diagnóstico: *Xylella fastidiosa* y sus subespecies. Área de Diagnóstico Fitosanitario. Laboratorio de Bacteriología. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Tecámac, Estado de México.
- Gutiérrez Hernández, O. y García, L. V. 2018. Incidencia de *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares y distribución potencial en la península ibérica, *Investigaciones Geográficas*, (69), 55-72. <http://doi.org/10.14198/INGEO2018.69.04>.
- Haelterman, R. M.; Tolocka, P. A.; Roca, M. E.; Guzmán, F. A.; Fernández, F. D. y Otero, M. L. 2015. First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing olive scorch in Argentina, *Journal of Plant Pathology*, 97(2), 393-393. <http://doi.org/104454/JPP.V97I2.023>.
- Hopkins, D.L., Purcell, A.H. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's Disease of Grapevine and Other Emer-gent Diseases, *Plant Disease*, 86(10), 1056-1066.
- Iglesia Lozano, Aleika. 2005. Raquitismo de los retoños de la caña de azúcar (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*): Perfeccionamiento del diagnóstico y evaluación de la Resistencia varietal. Tesis en opción al grado científico de Doctorado en Ciencias Agrícolas. 120 pp.
- Landa, B. B., Navas Cortés, J. A., Montes Borrego, M. 2017. Capítulo 2: Características generales de *X. fastidiosa*. En: Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales y María Milagros López, (Coord.). Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Cajamar Caja Rural (ed.), España, p.47.
- Landa, B. B., Castillo, A. I., Giampetruzzi, A., Kahn, A., Román-Écija, M., Velasco-Amo, M. P., Navas-Cortés, J. A., Marco-Noales, E., Barbé, S., Moralejo, E., Coletta-Filho, H. D., Saldarelli, P., Saponari, M. y Almeida, R. P. P. 2019. Emergence of a plant pathogen in Europe associated with multiple intercontinental introductions. *Applied and Environmental Microbiology*, <http://doi.org/10.1128/AEM.01521-19>.
- Lee, R. F., Derrick, K., Verte, M. J. G., Chagas, C. M., Rosetti, V. 1991. *Citrus Industry*: 12-15.
- Loconsole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T., Frasheri, D., Lorusso, D., Palmisano, F., Pollastro, P., Silletti, M. R., Trisciuzzi, N., Valentini, F., Savino, V. y Saponari, M. 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods, *Journal of Plant Pathology*, 96(1), 1-8.
- López, M. M., Murillo, J., Montesinos, E., Palacio-Bielsa, A. 2018. Enfermedades de plantas causadas por bacterias. En: Capítulo 30. Enfermedades causadas por

- Xylella fastidiosa* en especies leñosas. Landa, B. M., Spotti Lopes, J. R., Navas-Cortés, J. A., Fereres, A. Sociedad Española de Fitopatología, 523-549.
- Marco-Noales, E., Barbé, S. 2018. *Xylella fastidiosa* la amenaza de una bacteria fitopatógena emergente, *Semaforo*, 65, 15-19.
- Minsavage, G.V., Thompson, C.M., Hopkins, D.L., Leite, R. M. V., Stall, R. E. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue, *Phytopathology*, 84, 456-461.
- Montecinos E. 2019. Artículo de revisión II. Cambio climático y enfermedades bacterianas de las plantas. Bacterias fitopatógenas y cambio climático. En: Fitopatología. Cambio Climático y Fitopatología N° 4. Sociedad Española de Fitopatología, 18-24.
- Morente, M., Cornara, D., Plaza, M., Durán, J. M., Capiscol, C., Trillo, R., Ruiz, M., Ruz, C., Sanjuan S., Pereira, J. A., Moreno, A. y Fereres, A. 2018. Distribution and relative abundance of insect vectors of *Xylella fastidiosa* in Olive groves of the iberian peninsula, *Insects*, 9(4), pii: E175. <http://doi.org/10.3390/insects9040175>.
- Murray, M. G., Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res*, 8(19), 4321-4325. PMID: PMC324241.
- Nome, S. F., Haelterman, R. M., Docampo, D. M., Prata-viera, A. G. y Di Feo, L. del V. 1992. Escaldadura de las hojas del almendro en Argentina, *Fitopatologia Brasileira*, 17, 57-60.
- Purcell, A. H. 1989. Homopteran transmission of xylem-inhabiting bacteria. In: Harris, K.F. (Ed.), *Advances in Disease Vector Research*, Springer, New York, 6, 23–266.
- Purcell, A. H. 1997. *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat? *Journal of Plant Pathology*, 97(2), 99-105
- Saponari, M., Boscia, D., Nigro, F. y Martelli, G. P. 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy), *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 659-668.
- Saponari, M., Boscia, D., Loconsole, G., Palmisano, F., Savino, V., Potere, O. y Martelli, G. P. 2014. New hosts of *Xylella fastidiosa* strain CoDiRO in Apulia. <http://doi.org/10.4454/JPP.V96I3.008>. Abstract.
- Saponari, M., Boscia, D., Altamura, G., Loconsole, G., Zicca, S., D'Attoma, G., Morelli, M., Palmisano, F., Saponari, A. y Tavano, D. 2017. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* associated to the olive quick decline syndrome in southern Italy, *Scientific ReportsSci*, 7(1), 17723. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-17957-z>.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M., Chang C. J. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. [correction] *fastidiosa* [correction] subsp. nov., *X.*

fastidiosa subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. Nov., *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 290-300.

- Searles, P., Rousseaux, M. C., Ladux, J., Trentacoste, E., Arjona, C., Cólica, J., Matias, C., Bueno, L., Vita Serman, F. 2010. Following Olive Footprints in Argentina. In: Following Olive Footprints (*Olea europaea* L.). Cultivation and culture, folklore and history, traditions and uses, *International Society for Horticultural Science*, 13, 13-23.
- Tacchini, J. 2011. Historia del olivo y su difusión en Argentina y en Mendoza. En: M. Bauzá, Fundación Marzano (Ed.). Olivicultura en Mendoza. Raigambre de una actividad que se renueva, 19-47 pp.
- Tolocka, P. A., Giolitti, F., Guzmán, F.A., Mattio, M.F., Nome, C.F., Ortega, L.I., Paccioretti, M.A., Roca, M.E., Otero, M.L., Haelterman, R.M. 2021. Caracterización de *Xylella fastidiosa* a partir de materiales vegetales y cepas aisladas de olivo (*Olea europaea* L.) e implementación de un sistema de diagnóstico serológico en Argentina, *RIA*, 47(3), 38-389. <http://ria.inta.gob.ar/trabajosenprensa>.
- Tolocka, P. A., Paccioretti, M. D. y Haelterman, R. M. 2019. Anexo I: Toma de muestras en olivo para diagnóstico de *Xylella fastidiosa*. En: Manual de protocolos de manejo de plagas y patologías del olivo. Eds. https://www.researchgate.net/publication/346397235_Manual_de_protocolos_de_manejo_de_plagas_y_patologias_del_olivo#fullTextFileContent [accessed Jun 23 2021].
- Tolocka, P. A., Mattio, M. F., Otero, M. L., Paccioretti, M. A., Roca, M., Guzmán, F. A. y Haelterman, R. M. 2018. Variante genética de *Xylella fastidiosa* en olivo (*Olea europea* L.) de Córdoba y Catamarca. *Actas del XL Congreso Argentino de Horticultura. Horticultura Argentina*, 37(94), 357.
- Tolocka, P. A., Otero, M. L., Paccioretti, M. D., Roca M. E., Von Baczko, O. H., Kroneberger E. F., Guzmán, F. A., Haelterman R. M. 2017. Presencia de *Xylella fastidiosa* en plantaciones jóvenes de olivo var. arbequina del sur de la provincia de Buenos Aires. *Actas del IV Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza.*, Pp. 181.
- Tolocka, P. A., Otero, M.L, Torres, L., Taborda, R.J. y Haelterman, R.M. 2014. Detección de *Xylella fastidiosa* en huertos de olivo de la región noroeste de la provincia de Córdoba, *Actas del XXXVII Congreso Argentino de Horticultura*, 33(82), 103.
- Vos, S., Camilleri, M., Diakaki, M., Lázaro, E., Parnell, S., Schenk, M., Schrader, G. y Vicent, A. 2019. Pest survey card on *Xylella fastidiosa*. *European Food Safety Authority (EFSA)*. <http://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1667>.
- Von Baczko, O. H., Aguirre, F., Roca, M. E., Battaglia, M. J., Flores, F., Kroneberger, E., Tolocka, P. A., Paccioretti, M., Haelterman, R. M. 2017. Monitoreo de *Xylella*

fastidiosa en zonas olivícolas de Argentina. Actas del IV Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza, Pp. 168.

Wells, J. M., Raju, B. C., Nyland, G., Lowe, S. K. 1981. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases, *Applied and Environmental Microbiology*, 42(2), 357-363.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA, SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS LOCALES DE *X. fastidiosa*

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de agentes causales de enfermedades, de manera precisa y confiable, es la base para la aplicación exitosa de programas de producción de material de propagación certificado (Batista *et al.*, 2008) que garantice al productor que las plantas con las que inicia su plantación se encuentran libres de las enfermedades contempladas en el programa, en particular aquellas que se transmiten por métodos de multiplicación agámica. De allí, surge la necesidad de contar con herramientas que aseguren la identidad de un determinado patógeno a través de su caracterización por medio de variadas técnicas de laboratorio.

La microscopía electrónica es un pilar principal en la detección, ya que permite una identificación morfológica rápida y un diagnóstico diferencial de los diferentes agentes contenidos en una muestra (Hazelton y Gelderblom, 2003). Esta técnica permite obtener información diversa cuando se investiga un patógeno nuevo o emergente, y en un diagnóstico de rutina es útil para confirmar o incluso, en algunos casos, guiar el diagnóstico, por ejemplo, de una infección viral (Buitrago-Sierra *et al.*, 2021.) A través de la microscopía electrónica, en el caso de los cítricos es posible la detección de los virus de la tristeza CTV, la psorosis (CPsV) y de la leprosis (CiLV), además de la bacteria *X. fastidiosa*, *Spiroplasma citri*, *Phytoplasma aurantifolia*, *Ca. Liberibacter* sp, entre otros patógenos (Batista *et al.*, 2008). Para la identificación morfológica de un microorganismo se realizan preparados permanentes para su observación mediante microscopía electrónica. Existen diferentes técnicas de preparación del material para la observación

de un espécimen, entre los cuales se encuentran los preparados *leaf-dip* o preparados rápidos (Kitajima y Nome, 1999) que permiten observar bacterias mediante el empleo del microscopio electrónico de transmisión para determinar dimensiones, forma de la pared celular y presencia o no de flagelos. También se emplean las técnicas de inmovilización -ISEM y cortes ultrafinos, que permiten observar la forma y dimensiones de microorganismos en estudio. Todas estas técnicas son de gran utilidad en virología porque son sencillas y rápidas de realizar; aunque el resultado depende de la concentración de partículas presentes en los tejidos vegetales, ya que cuando es muy baja la concentración del patógeno, se corre el riesgo de no lograr su observación en el material vegetal.

La técnica de cortes ultrafinos es considerada la más idónea para la observación de bacterias a través del microscopio electrónico de transmisión. Esta técnica es más compleja que las dos anteriormente mencionadas, porque requiere de mayor tiempo para su ejecución (entre tres y cinco días aproximadamente) y entrenamiento y habilidad (<http://agro.unc.edu.ar/~fito/teoricos/MICROSCOPIA%20ELECTRONICA.htm>).

Examinar por secciones ultrafinas, es un procedimiento de mucho valor para detectar la presencia de *X. fastidiosa* dentro de los tejidos y células, donde además de la forma, tamaño y estructura se pueden observar alteraciones de la estructura normal de la célula y/o inclusiones del mismo microorganismo. La producción de vesículas en la membrana externa de la pared celular engrosada y ondulada de *X. fastidiosa* (que genera partículas nanométricas de un lípido con el objetivo de transitar y propagarse más fácilmente por la planta), le confiere una morfología característica cuya visualización en cortes ultrafinos de los haces vasculares del xilema respalda otros análisis para su diagnóstico (Ionescu *et al.*, 2014).

El ciclo de vida de *X. fastidiosa* acontece una parte en los insectos vectores que logran transmitirla y otra parte en el hospedante que infecta, donde puede o no ocasionarle enfermedad. Según Almeida, 2016 en primavera los insectos vectores de *X. fastidiosa* se multiplican en las malezas. Luego, llegando el verano, las mismas se secan y los insectos se dirigen a los arboles de olivo, transmitiendo la bacteria de un árbol infectado a otro sano (Figura 3.1).

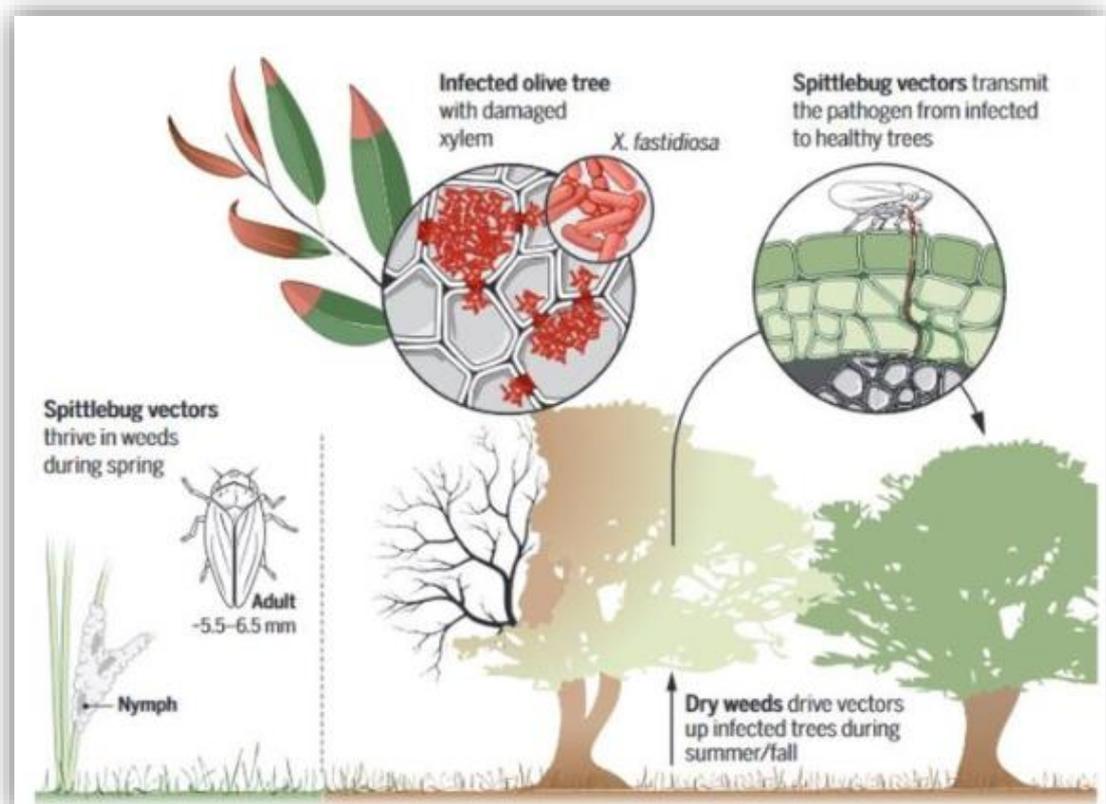


Figura 3.1. Ciclo de vida y transmisión de *X. fastidiosa* al olivo (Almeida, 2016)

En hospedantes susceptibles como la vid, cuando la infección llega a ser sistémica en las células conductoras del xilema, los elementos traqueales, desencadenan una respuesta de oclusión en los vasos vasculares impidiendo la absorción de agua por parte de las raíces. Las oclusiones a nivel de xilema se pueden visualizar mediante el empleo de un microscopio confocal en modalidad de campo claro. La bacteria se multiplica y se extiende ampliamente desde el sitio de infección habitando el xilema, donde las células bacterianas se adhieren a las paredes de los vasos xilemáticos, formándose las biopelículas. Estas consisten en conglomerado de células bacterianas dentro de una matriz de diferentes biopolímeros extracelulares producidas por ellas mismas y adheridos a la superficie de los haces vasculares, la biopelícula tapona el/los haces vasculares e impide el traslado de agua y nutrientes por el tejido vegetal. La diseminación sistémica del patógeno, está limitada por las membranas de los haces xilemáticos que pueden ser

degradadas por enzimas del tipo poligalacturonasa producidas por la bacteria, y también esta dispersión está bloqueada por la producción de tilosas y geles ricos en polisacáridos producidas por las propias plantas como reacción de defensa, que hace que los haces vasculares del xilema se bloqueen después de la infección. Se desconoce aún, hasta qué punto los síntomas de la enfermedad son causados por el bloqueo bacteriano directo de los vasos, o por la oclusión derivada de la producción de geles y gomas producidas por la misma planta, pero se infiere que la respuesta de la misma está directamente relacionada con una elevada colonización bacteriana (Chatterjee *et al.*, 2008). Con todo, hay evidencias que el taponamiento de los vasos por sí mismo no explicaría los síntomas por *Pierce disease*-PD en vid. Algunos investigadores interpretan que determinados compuestos presentes en la planta son los responsables del desarrollo de síntomas en vid y no el estrés hídrico. No existe correlación entre la población del patógeno y el desarrollo de síntomas, lo que sugiere que la obstrucción de los vasos xilemáticos no es necesaria para que la enfermedad se produzca. Sin embargo, la formación de biopelículas es importante para la colonización de la planta e infectividad de por vida de los insectos vectores adultos (López *et al.*, 2018).

La identificación de una cepa bacteriana puede realizarse utilizando diferentes procedimientos o pruebas de acuerdo a las características del microorganismo y distintas pautas en el momento de evaluar similitudes en relación a otro. Tradicionalmente, las primeras pruebas básicas que se realizan en el laboratorio para la identificación de bacterias son los llamados test o pruebas bioquímicas convencionales que tiene la particularidad de determinar la actividad de una vía metabólica donde se generan conjuntos de reacciones químicas, a partir de la incorporación de un sustrato en un medio de cultivo que, en presencia de la bacteria, puede o no generar una reacción química ocurriendo una transformación en el medio de cultivo donde fue sembrado (Aracel y Martínez, 2007). Estas pruebas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias. Algunas son técnicas rápidas, preliminares, con observación inmediata ya que evalúan la presencia de una enzima preformada, y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas (la mayoría) requieren un periodo de incubación previa de 18 hasta 48 hs para observar reacciones químicas de componentes metabólicos, otros test evalúan la sensibilidad de un microorganismo al sembrarlo en un medio de

cultivo específico que contiene un sustrato a metabolizar, pudiéndose observar reacción en forma rápida luego de un período de incubación de 2-6 hs; en general, se trata de reacciones enzimáticas o pruebas convencionales modificadas mediante el empleo de discos o tabletas comercializados con sustratos cromogénicos para uso individualizado (Olmos *et al.*, 2010).

El nacimiento de la serología para la identificación de determinados patógenos, como los virus que afectan a los vegetales, comenzó con el descubrimiento de Beale en 1928 demostrando que las plantas infectadas por el *Tobacco mosaic virus* (TMV) contenían un antígeno específico diferente a los de la planta sana, cuando ambas savias eran inyectadas en conejos diferentes. Posteriormente, Gratia en 1933, demostró que las plantas infectadas con diferentes virus, contenían antígenos específicos diferentes y por último Chester en 1935 y 1936 demostró que diferentes aislamientos de TMV y del PVX podían ser distinguidos serológicamente (Hull, 2004). Actualmente, las técnicas más empleadas para la caracterización de *X. fastidiosa* son las pruebas serológicas y moleculares. Las pruebas serológicas, consisten en la inmovilización en una fase sólida del antígeno o el anticuerpo, sobre el cual se adicionan de forma secuencial y previo lavado para eliminar los elementos deficientemente fijados o no fijados, los demás componentes de la reacción. La presencia de la reacción antígeno-anticuerpo se revela mediante la adición del sustrato específico de la enzima y la consiguiente formación de productos coloreados, que permiten la evaluación de los resultados de forma visual, cualitativamente, o mediante la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Batista *et al.*, 2008). Las pruebas inmunoenzimáticas denominadas ELISA “*Enzyme linked Immunosorbent Assay*”, se vienen realizando desde la década de los 90. Son pruebas consideradas de alta sensibilidad en un rango de 1-10 ng/ml, rápidas ya que permite obtener los resultados en pocas horas, masiva en el cual se pueden probar muchas muestras simultáneamente, se emplea el extracto crudo o purificado y son poco influenciadas por la morfología del antígeno (Conci, 1999). Dentro de éstas, la más empleada es DAS ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay Double Sandwich Antibody*) que permite la identificación de la bacteria a través de un anticuerpo específico o inmunoglobulina G-IgG que se fija a un soporte sólido, luego se le adiciona el antígeno que se quiere analizar; posteriormente se le agrega el mismo anticuerpo

conjugado con una enzima y finalmente el sustrato correspondiente a la enzima empleada (Nome *et al.*, 1980).

A nivel molecular, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR que se basa en el principio de la complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos y la capacidad de síntesis del ADN por parte de la enzima polimerasa, es la más empleada actualmente. Para la síntesis *in vitro* del ácido nucleico de interés se emplean oligonucleótidos cebadores que se unen a ambos lados en la cadena de nucleótidos. Este proceso se realiza mediante ciclos sucesivos de desnaturalización térmica del ADN, unión de los cebadores a las secuencias complementarias y extensión de la cadena de los cebadores mediante la enzima ADN polimerasa termoestable. Esta técnica posee una elevada fidelidad debido a la constante estabilidad de la Taq polimerasa durante la síntesis de diferentes productos. La detección del ADN amplificado, puede realizarse mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio o nitrato de plata, por hibridación con sondas específicas marcadas o mediante ensayos colorimétricos (Batista *et al.*, 2008). Actualmente, se trata de emplear intercalantes de pares de bases que no sean tan nocivos para el hombre (mutagénicos/cancerígenos) ni contaminantes para el medio ambiente. Esta técnica molecular de alta fidelidad, permite detectar a *X. fastidiosa* en bajas concentraciones, siendo más sensible que las técnicas serológicas, ya sea empleando cebadores generales como específicos para este patógeno (Minsavage *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 2006).

La hipótesis planteada para este capítulo fue: mediante técnicas básicas de caracterización y en conjunto con pruebas serológicas y moleculares se pueden confirmar la existencia de cepas de *X. fastidiosa* presentes en nuestro país

El objetivo general fue comprobar la existencia de cepas de *X. fastidiosa* presentes en nuestro país a través de técnicas básicas de caracterización y en conjunto con pruebas serológicas y moleculares.

El objetivo específico fue caracterizar morfológica, bioquímica, serológica y molecularmente cepas locales de *X. fastidiosa*

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización morfológica de *X. fastidiosa* mediante microscopía electrónica de transmisión

Para la caracterización morfológica de la bacteria, se realizaron observaciones al microscopio electrónico, a través de la técnica de cortes ultrafinos. Para ello se cortaron pequeños trozos (3 x 2 mm) de material vegetal (pecíolo, parénquima y nervadura principal de hojas) sintomático de olivo del cual se aisló la cepa OLI17A y de la planta de almendro de la que se obtuvo el aislamiento ALM4. Los mismos fueron sometidos a un proceso de fijación con glutaraldehído (C₅H₈O₂), que permitió detener los procesos *post-mortem* del tejido vegetal para evitar los fenómenos autolíticos que llevarían a la alteración de los mismos, logrando su preservación; y por último se realizaron lavados con agua destilada. También, se incluyó un fragmento de un cultivo bacteriano en agar, proveniente de almendro. El material de estudio fijado, fue infiltrado gradualmente con resinas epóxicas de baja viscosidad (*Spurr low viscosity*) que no son miscibles en agua, por lo que el tejido debe ser previamente deshidratado, eliminando el agua que se encuentra en su interior permitiendo así la penetración lenta de la resina en el interior del mismo. Finalmente, el material de estudio tratado, fue colocado en un molde conteniendo resina pura nueva y en estufa a 70 °C por 48 hs para permitir la solidificación de la resina al polimerizar por acción del calor.

Se obtuvo un bloque compacto con el material incluido a partir del cual se hicieron cortes ultrafinos (50-100 nm de espesor) con un ultramicrotomo Reichert-Jung. Los cortes fueron contrastados con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo concentración 0,7% pH 12, para su observación al microscopio electrónico (Kitajima y Nome, 1999). Se incluyeron controles tanto para los tejidos examinados (sanos vs. enfermos) como para las repeticiones de los experimentos realizados. Los preparados se observaron al microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM EXII (Jeol, Tokio, Japón) a magnificaciones de 10.000 y 250.000X.

Determinación de la presencia de *X. fastidiosa* en los vasos xilemáticos a través de microscopía óptica confocal

Para observar la presencia de la bacteria en los vasos xilemáticos de olivo, se efectuaron cortes a mano alzada, de secciones de pecíolos y nervadura principal de hojas sintomáticas, sometiendo el material a luz UV durante toda la noche. Las secciones se hidrataron en agua destilada, y posteriormente se tiñeron con una solución rojo de rutenio al 0,005% durante 10 minutos. Este colorante tiñe los glicopolisacáridos de la pared celular bacteriana (De Benedictis *et al.*, 2017). Posteriormente, los cortes se enjuagaron en agua y se observaron en un microscopio Nikon Eclipse CS1 en modalidad de campo claro, a un aumento de 200 y 400X. Las imágenes se adquirieron mediante el software Nikon Elements. Esta metodología sólo se llevó a cabo en olivo infectado con la bacteria.

Caracterización bioquímica de *X. fastidiosa*

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas de acuerdo a los protocolos establecidos por Harring (1998); Schaad *et al.*, 2001; Voges and Proskauer (1898) y Contreras *et al.* (2008): Tinción de Gram, Prueba de solubilidad en KOH, Test de Catalasa, Test de Oxidasa y la Prueba del Metabolismo oxidativo-fermentativo de la glucosa, respectivamente.

Identificación de *X. fastidiosa* por técnicas serológicas y moleculares

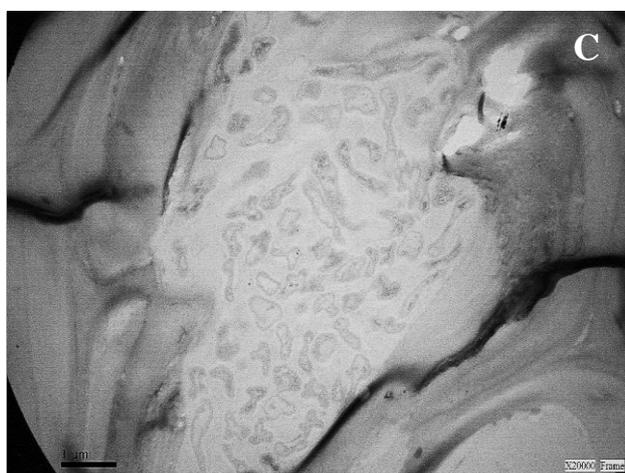
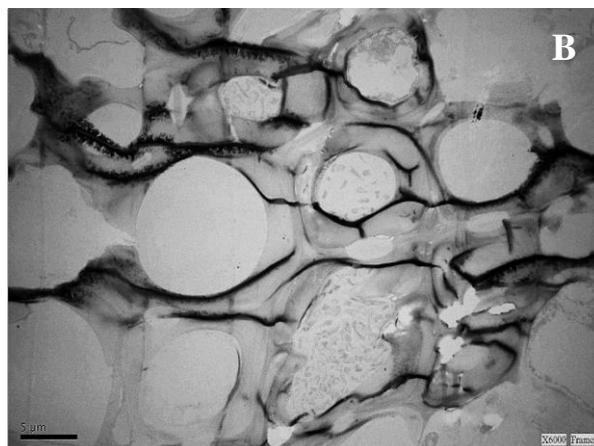
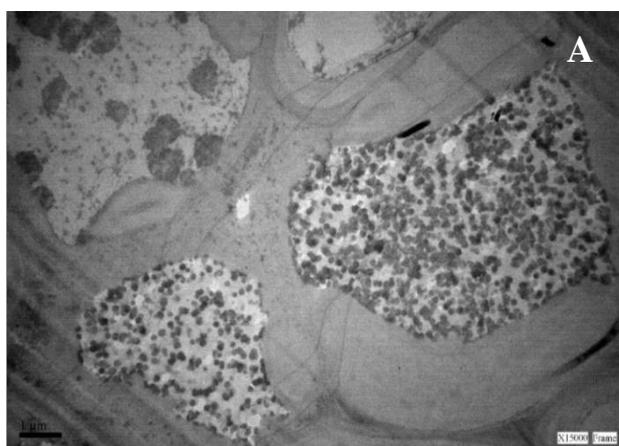
Las colonias empleadas para la caracterización morfológica y test bioquímicos, fueron analizadas por DAS-ELISA con dos reactivos de Agdia, uno con enzima peroxidasa y el otro con fosfatasa alcalina. El procedimiento fue desarrollado de igual manera que la mencionada en el Capítulo 2. Además, para corroborar la identidad de las mismas, se empleó la técnica de PCR con los cebadores generales RST31/RST33 y específicos HL5/HL6 para *X. fastidiosa*, a partir de ADN extraído de las colonias aisladas,

implementando el protocolo Murray y Thompson, 1980 modificado. Posteriormente, los productos de PCR, empleando los cebadores RST31/RST33, fueron purificados con el “kit PCR QIAquick” (Qiagen) y secuenciados mediante tecnología Sanger. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el genBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

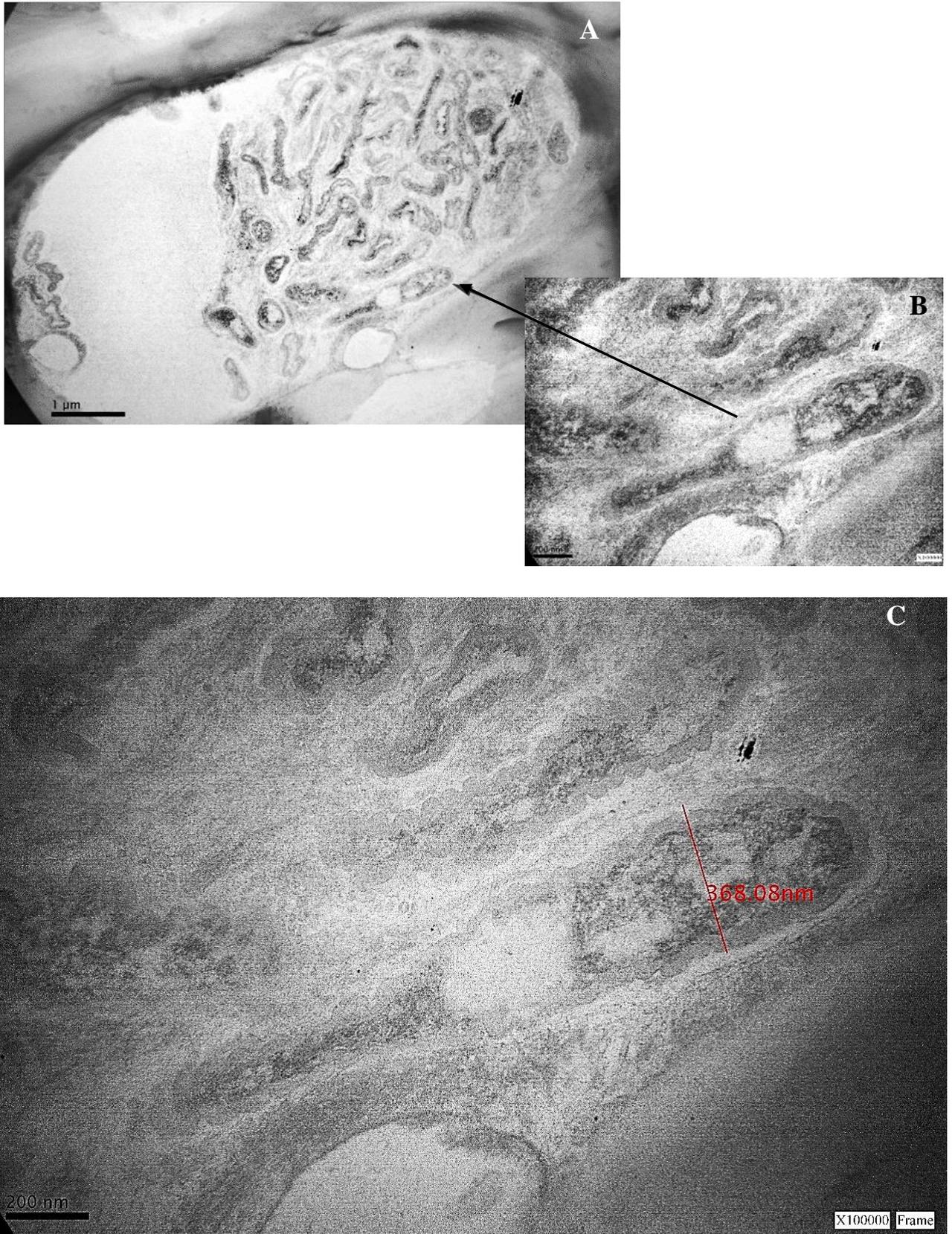
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica de *X. fastidiosa* mediante microscopía electrónica de transmisión

En la observación morfológica de la bacteria mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) fue posible determinar, a través de la técnica de cortes ultrafinos, la presencia de células bacterianas sin flagelo ubicadas dentro de los vasos xilemáticos de pecíolos infectados de olivo (Figuras 3.2. A, B y C). Las mismas presentaban forma de bacilos rectos con su particularidad de pared celular ondulada y de morfología y dimensiones comprendidas entre $0,30 \times 2,5 \mu\text{m}$, con diámetro de $0,368 \mu\text{m}$, semejantes a los descritos en la bibliografía Landa *et al.* (2017) para *X. fastidiosa* (Figuras 3.3. A, B y C).



Figuras 3.2. Observación de *X. fastidiosa* mediante microscopía electrónica de transmisión. A: Detección de células bacterianas dentro de haces xilemáticos de pecíolos de hojas de olivo a un aumento de X15000, B: Distribución del patógeno en varios vasos del xilema a X6000, C: Determinación de la característica morfológica de los bacilos a X20000. Fotos: Dra. Nome

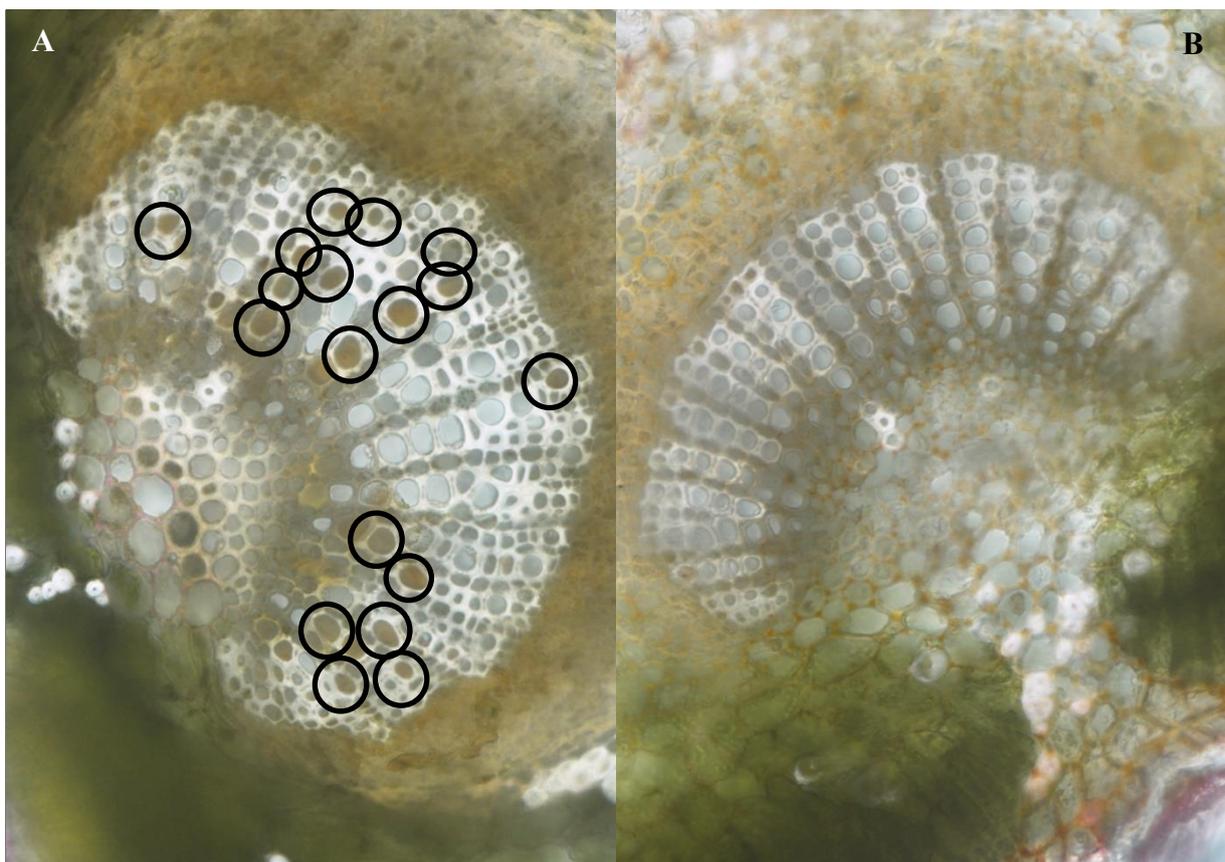


Figuras 3.3. A. Bacilos de *X. fastidiosa* presente en vasos xilemáticos de hojas de olivo de la planta OLI17A, observados por microscopía electrónica de transmisión. B. Detalles del bacilo a mayor aumento. C. Bacilo de *X. fastidiosa* a mayor aumento determinando su diámetro. Fotos: Dra. Nome

En la caracterización morfológica de las células de *X. fastidiosa*, se observaron dimensiones y características fenotípicas semejantes a las indicadas en el trabajo de Wells *et al.* (1981), donde se menciona que las mismas se presentan sin flagelo y en forma de bacilos rectos de 0,25-0,35 x 0,9-3,5 μm .

Determinación de la presencia de *X. fastidiosa* en los vasos xilemáticos a través de microscopía óptica confocal

En cortes de pecíolo de olivo colonizados con la bacteria, se observaron mediante la microscopía confocal oclusiones típicas de la bacteria en algunos vasos xilemáticos completamente desarrollados. Ésto no fue observado en las muestras de material vegetal de olivo sano (Figuras 3.4. A y B).



Figuras 3.4. Cortes transversales de pecíolos de hojas de olivo en los cuales se observa los vasos xilemáticos. A: taponamiento de los haces vasculares en planta enferma con *X. fastidiosa* OLI17A. B: vasos xilemáticos de planta sana. Fotos: Dr. Ortega

Respecto a los taponamientos observados en los vasos xilemáticos de material vegetal infectado con la bacteria, no se puede inferir que los mismos sean ocasionados por la producción de biopelícula y/o la presencia del patógeno, ya que se ha comprobado que plantas infectadas por este patógeno, dan una reacción funcional por la invasión de *X. fastidiosa*, produciendo gomas y pectinas. De Benedictis *et al.* (2017) en Italia, llevaron a cabo estudios, demostrando que estas oclusiones están constituidas por tilosas y/o pectinas producidas por respuestas fisiológicas de la planta ante la infección, las cuales no pueden diferenciarse de los posibles agregados producidos por la bacteria. En dicho trabajo, compararon los cv. Ogliarola y Cellina Di Nardó, con el cv. Leccino, presentando este último un comportamiento más tolerante que los dos cv. mencionados anteriormente, manifestando un menor número de oclusiones. En la enfermedad de PD en vid se ha comprobado que la planta ocluye sus propios vasos xilemáticos para frenar la dispersión bacteriana dentro de la planta (Fritschi *et al.*, 2008). Si bien De Benedictis *et al.* (2017), no considera esta respuesta como un indicador de tolerancia/resistencia a la enfermedad, podría ser tenida en cuenta para la selección de genotipos más tolerantes a *X. fastidiosa*. La obtención de materiales de mejor comportamiento frente a la bacteria es considerada como la estrategia más adecuada para el recambio varietal en olivares implantados con cultivares sensibles, tal como ocurre con ‘Arauco’.

Caracterización bioquímica de *X. fastidiosa*

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, mostraron que las células de *X. fastidiosa* procedentes de material enfermo de almendro y olivo, fueron Gram (-). La prueba de oxidasa resultó negativa, mientras que la solubilidad en hidróxido de potasio (KOH) y de catalasa dieron positivas, observándose el hilo característico que forma cuando reaccionan el agua con el ADN liberado de la pared celular y la hidrólisis que se produce con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o agua oxigenada, ocurriendo una efervescencia rápida o burbujeo por liberación de oxígeno gaseoso y agua. Tuvo, además, un comportamiento de metabolismo aeróbico estricto (no fermentativo), donde se observó

la misma coloración que la del control negativo (-) como *Xanthomonas* sp. (Figuras 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10), coincidiendo con lo citado por Wells *et al.* (1981).

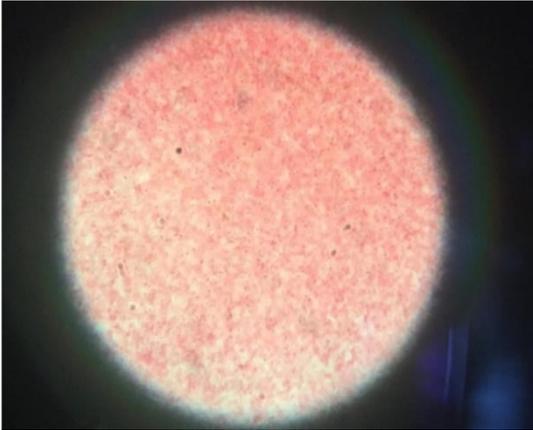


Figura. 3.5. Tinción de Gram de células bacterianas de *X. fastidiosa* a partir de material vegetal infectado de almendro ALM4

Figura. 3.6. Tinción de Gram de *X. fastidiosa* procedente de olivo cepa

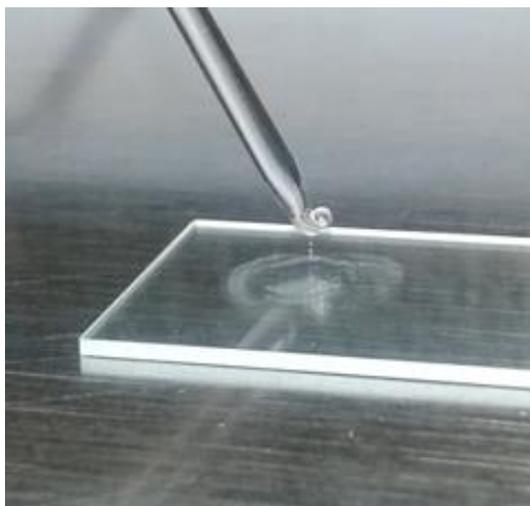
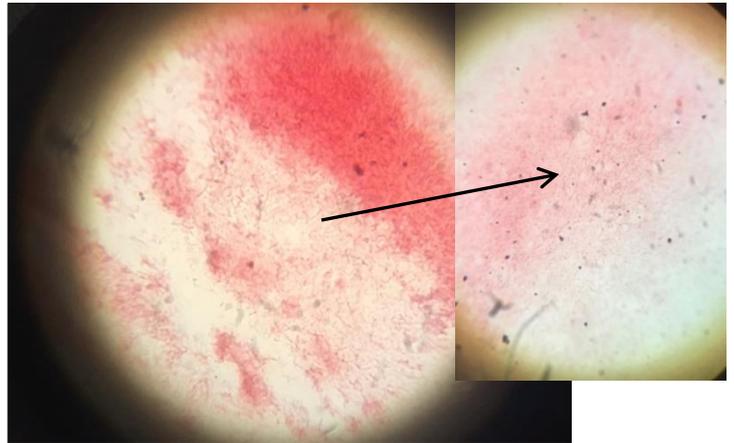


Figura 3.7. Prueba de solubilidad en KOH para *X. fastidiosa* cepa OLI17A



Figura 3.8. Prueba de oxidasa de *X. fastidiosa* cepa OLI17A en olivo



Figura 3.9. Prueba de catalasa de la cepa OLI17A en olivo

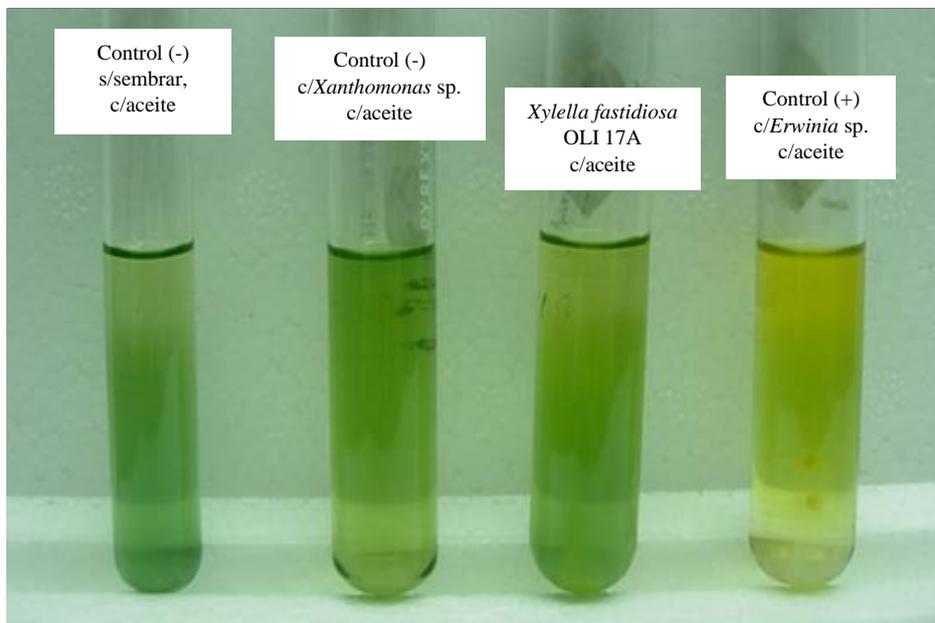
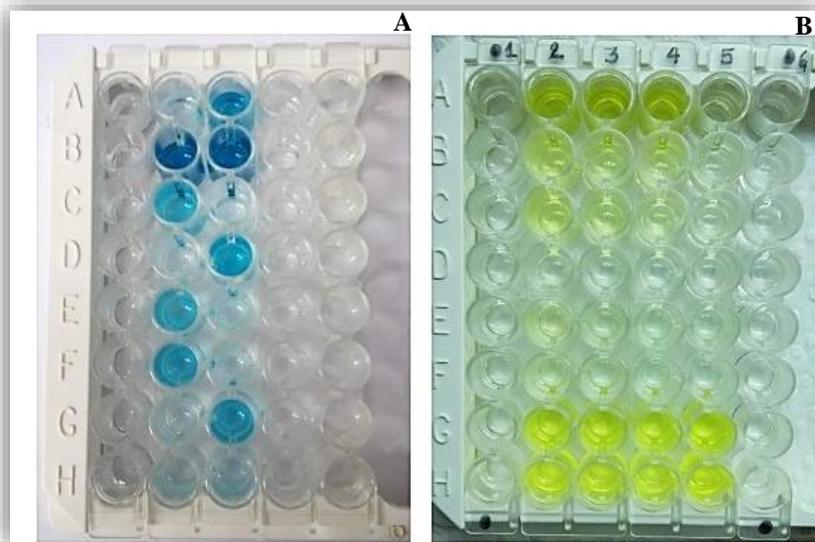


Figura 3.10. Prueba del Metabolismo oxidativo-fermentativo de la glucosa para *X. fastidiosa* en olivo

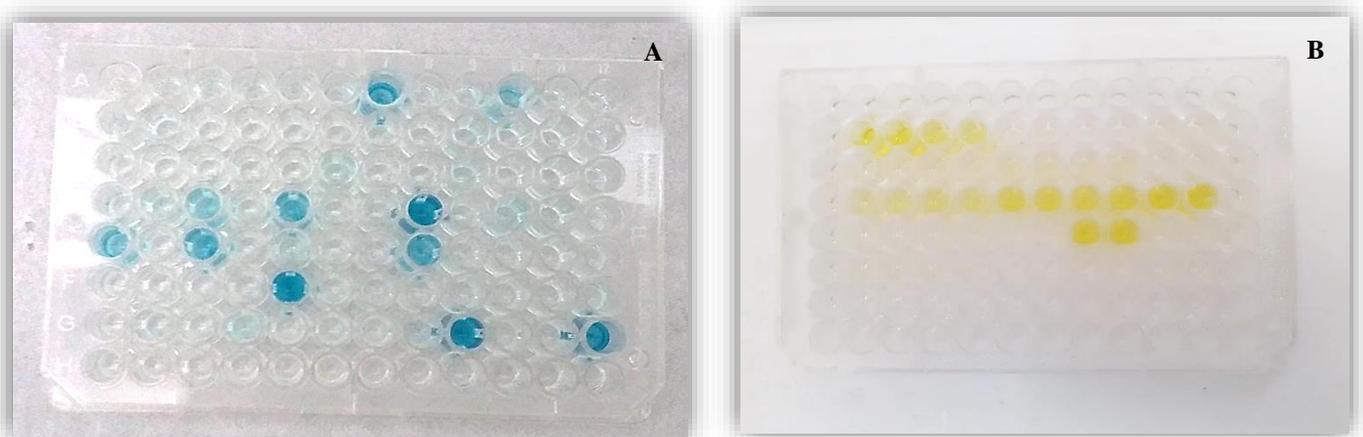
Identificación de *X. fastidiosa* por técnicas serológicas y moleculares

La identidad de las colonias aisladas, a partir de material infectado procedente de almendro (ALM4) y olivo (OLI17A), fue confirmada por la técnica serológica DAS ELISA y la prueba molecular PCR convencional. Respecto a la primera, se analizaron colonias individuales con el kit comercial AGDIA resultando colonias positivas para *X.*

fastidiosa tanto con el empleo de la enzima peroxidasa como con la fosfatasa alcalina. A su vez, fueron corroboradas positivas para la bacteria por PCR empleando los cebadores RST31/33 (Minsavage *et al.*, 1994) y HL5/6 Francis *et al.*, 2006), tanto para colonias provenientes de almendro como de olivo (Figuras 3.11 A, B; 3.12 A, B; 3.13 A, B; 3.14 A, B; 3.15). Con los productos de PCR purificados de los primeros cebadores empleados, se obtuvieron las secuencias parciales del gen *rpoD* (factor sigma 70 de la RNA polimerasa), posteriormente las mismas fueron depositados en el GenBank con los siguientes números de acceso: KX093246.1, KU724102.1, KT625424.1, KT625423.1, KM206741.1, MT863563 confirmando así la identidad de la bacteria en cada hospedante.

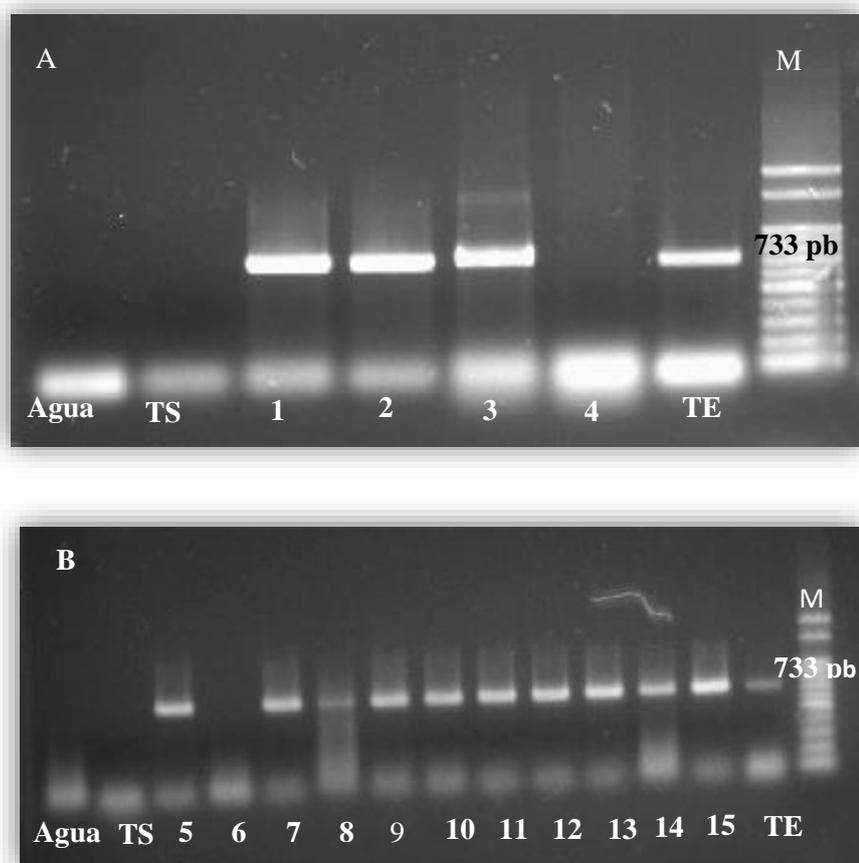


Figuras 3.11. DAS ELISA de colonias individuales de *X. fastidiosa* ALM4 procedentes de almendro en placas de poliestireno observando reacción positiva con las enzimas peroxidasa (A) y fosfatasa alcalina (B)

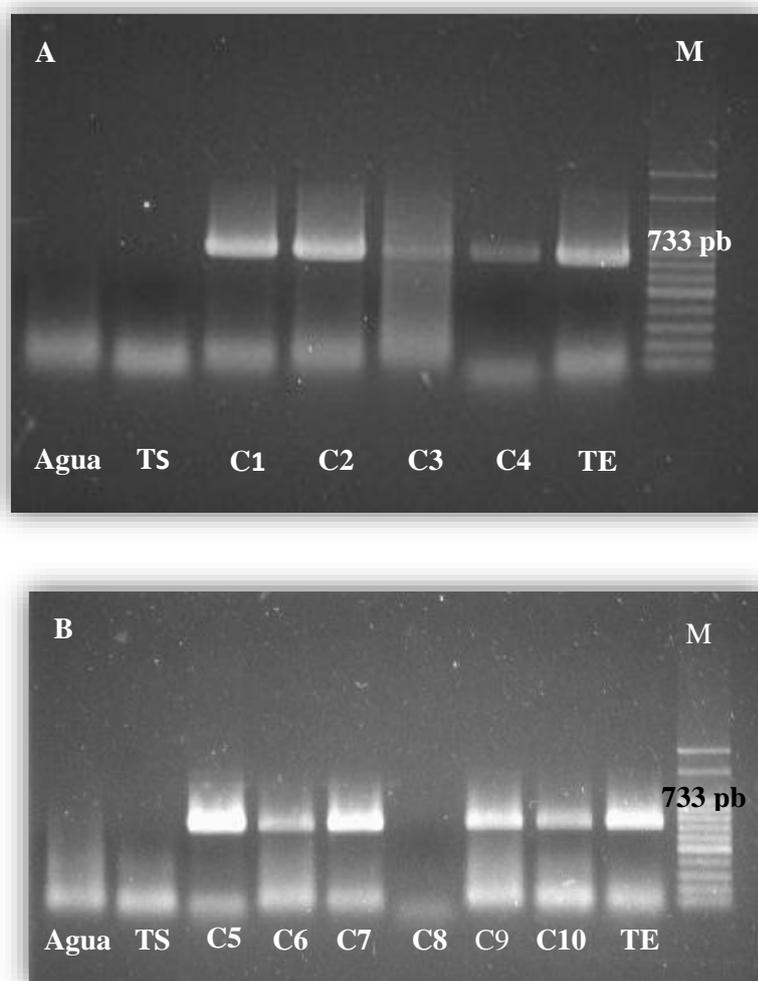


Figuras 3.12. DAS ELISA de colonias individuales de *X. fastidiosa* cepa OLI17A procedentes de olivo en placas de poliestireno observando reacción positiva con las enzimas peroxidasa (A) y fosfatasa alcalina (B)

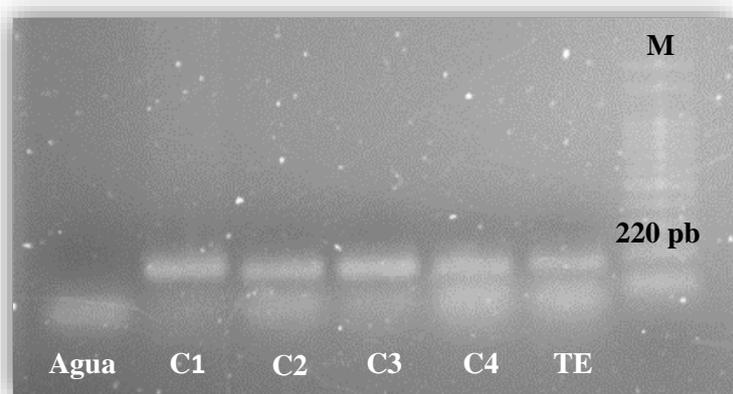
Las técnicas serológicas y moleculares empleadas para la identificación de este patógeno, resultaron muy satisfactorias ya que la mayoría de las colonias obtenidas provenientes de los aislamientos realizados a partir de material infectado de almendro y olivo, resultaron positivas en el diagnóstico. Estas técnicas también fueron empleadas para el diagnóstico y confirmación de la bacteria mediante protocolos empleados por la EPPO (2018).



Figuras 3.13. A y B. PCR convencional de colonias de *Xylella fastidiosa* proveniente de almendro ALM4 con cebadores RST 31/33 para la bacteria. Calles 1 a 15 son colonias obtenidas a partir de aislamiento de la misma planta. Las calles 4 y 6 dieron negativas. TE (testigo enfermo), TS (testigo sano), Agua (control negativo), M (marcador de peso molecular Ladder 100pb.)



Figuras 3.14. A y B. PCR convencional de colonias de *Xylella fastidiosa* OLI17A a partir de olivo con cebadores RST31/33 para la bacteria. Calles C1 a la C10 son colonias de aislamientos de la misma planta de olivo. La calle C8 dio negativa. TE (testigo enfermo), TS (testigo sano), Agua (control negativo), M (marcador de peso molecular Ladder 100 pb.)



Figuras 3.15. PCR convencional de colonias de *Xylella fastidiosa* OLI17A a partir de olivo con cebadores HL5/HL6 para la bacteria. Calles C1 a la C4 son colonias de aislamientos de la misma planta de olivo. TE (testigo enfermo), Agua (control negativo), M (marcador de peso molecular Ladder 100 pb.)

CONCLUSIONES

. - La morfología de las células bacterianas obtenidas y las características de los bacilos observados mediante MET, aislados desde olivo y almendro, corresponden a *X. fastidiosa*.

. - Con la microscopía óptica confocal se observó oclusiones en vasos xilemáticos, proveniente de material vegetal enfermo con *X. fastidiosa*. Sin embargo, con esta microscopía de modalidad de campo claro no se puede diferenciar los posibles agregados producidos por la bacteria de las gomas y pectinas que produce la planta como respuesta fisiológica por la invasión del patógeno.

. - Mediante las técnicas serológicas DAS ELISA y moleculares PCR con dos juegos de cebadores generales y específicos para *X. fastidiosa* se confirmó la identidad de las colonias aisladas desde almendro y olivo.

BIBLIOGRAFIA

- Almeida, R. P., 2016. Can Apulia's olive trees be saved? *Science*, 353(6297), 346-348.
- Aracel, H. y Martínez B. 2007. Propuesta de guía de aplicación de técnicas de microbiología (bacterias y hongos) para ser utilizado en microbiología general. Trabajo de graduación para optar al grado de: licenciatura en química y farmacia. <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4768/1/16100029.pdf>
- Batista, L., Peña, I., López, D., Pérez, J. M. y Llauger, R. T. 2008. Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba, pp. 1-12. <http://concitver.com/manualdesaneamientoydiagnostico/T%C3%89CNICAS%20DE%20DIAGN%C3%93STICO%20DE%20ENFERMEDADES%20QUE%20AFECTAN%20A%20LOS.pdf>
- Buitrago-Sierra, R., Guzmán, A., Santa-Marín, J. F. 2021. Caracterización morfológica del SARS-CoV-2 mediante microscopía electrónica. *Tecnológicas* 24, N°50. <https://doi.org/10.22430/22565337.1675>
- Chatterjee, S., Newman K. L., Lindow, S. E. 2008. Cell-to-Cell Signaling in *Xylella fastidiosa* suppresses movement and xylem vessel colonization in Grape. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21 (10), pp. 1309-1315. <http://doi.org/10.1094 /MPMI -21-10-1309>.
- Conci, V. 1999. Técnicas serológicas. En: Métodos para detectar patógenos sistémicos. Eds: Docampo, D. M.; Lenardón, S. L. IFFIVE-INTA-JICA. 23-39.
- Contreras, N., Jimenez O., Bonilla, M. y Nass, H. 2008. Identificación y caracterización de *Leifsonia xyli* subespecie *xyli* como patógeno de la caña de azúcar (*Saccharum* sp.) en la región centrooccidental de Venezuela, *Bioagro* 20(2), 111-118.
- De Benedictis, M., De Caroli, M., Baccelli, I., Marchi, G., Bleve, G., Gallo, A., Ranaldi, F., Falco, V., Pasquali, V., Piro, G., Mita, G., Di Sansebastiano, G P. 2017. Vessel occlusion in three cultivars of *Olea europaea* naturally exposed to *Xylella fastidiosa* in open field. *Journal of Phytopathology* 165, 589-594. <http://doi.org/10.1111/jph.12596>.
- EPPO Bulletin 2018. Diagnostics. PM 7/24 (3) *Xylella fastidiosa*, *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, 4 (2), 175-218. ISSN 0250-8052. <https://doi.org/10.1111/epp.12469>.
- Francis, M., Lin, H., Cabrera- La Rosa, J., Doddapaneni, H., Civerolo, E. L. 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*, *European Journal of Plant Pathology*, 115, 203- 213.

- Fritschi, F. B., Lin, H., and Walker, M. A. 2008. Scanning electron microscopy reveals different response pattern of four *Vitis* genotypes to *Xylella fastidiosa* infection, *Plant Disease*, 92, 276-286.
- Harrigan, W. F. 1998. Biochemical tests for identification of microorganisms: reactions involving carbohydrate and other carbon compounds. In: laboratory methods in food microbiology. Third edition. Harrigan W. F. (ed.). California, USA, pp. 100-115.
- Hazelton, P. R., Gelderblom, H. R. 2003. Electron Microscopy for Rapid Diagnosis of Emerging Infectious Agents, *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 294-303. <https://dx.doi.org/10.3201/eid0903.020327>
- Hull, R. 2014. Matthew's Plant Virology. Elsevier, *Academic Press*. 1001 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384871-0.00023-6>
- Ionescu, M., Zaini, P. A., Baccari, C., Tran, S., da Silva, A. M., Lindow, S. E. 2014. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), E3910-E3918. <https://agencia.fapesp.br/una-plaga-agricola-produce-una-sustancia-antiadherente-como-estrategia-de-adaptacion/20167/>
- Kitajima, E.W. y Nome, C. F. 1999. Microscopía electrónica en virología vegetal. En: Métodos para detectar patógenos sistémicos (D. M. Docampo y S. L. Lenardon, eds.). Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) INTA-JICA. pp: 75-77.
- Landa, B. B., Navas Cortés, J. A., Montes Borrego, Miguel. 2017. Capítulo 2: Características generales de *X. fastidiosa*. En: Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales Y María Milagros López, (Coord.). Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Cajamar Caja Rural (ed.), España, p.47-48.
- Landa, B. B., Spotti Lopes, J. R.; Navas-Cortés, J. A., Fereres, A. 2018. Capítulo 30. Enfermedades causadas por *Xylella fastidiosa* en especies leñosas. Epidemiología. En: López, M. M., Murillo, J., Montesinos, E., Palacio-Bielsa, A. Enfermedades de plantas causadas por bacterias. Sociedad Española de Fitopatología, 537-538.
- López, M. M., Murillo, J., Montesinos, E., Palacio-Bielsa, A. 2018. Enfermedades de plantas causadas por bacterias. En: Capítulo 30. Enfermedades causadas por *Xylella fastidiosa* en especies leñosas. Ciclo de patogénesis. Landa, B. M., Spotti Lopes, J. R., Navas-Cortés, J. A., Fereres, A. Sociedad Española de Fitopatología, 537-538.
- Minsavage, G. V., Thompson, C.M., Hopkins, D.L., Leite, R. M. V., Stall, R.E. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue, *Phytopathology*, 84, 456-461.

- Nome, S. F., Raju, B. C., Goheen, A. C., Nyland, G., Docampo, D. M. 1980. Enzymelinked immunosorbent assay for Pierce's Disease bacterium in plant tissues, *Phytopathology*, 70, 746-749.
- Olmos, A. F., García De la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A.; Valdezate Ramos, S. 2010. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciones y Microbiología Clínica. ISBN-978-84-614-7932-0.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2001. Third edition. *The American Phytopathological Society*, USA, 201-213.
- Voges, O. and Proskauer, B., 1898, *Z. Hyg, Infektionskr*, 28:20.
- Wells, J. M., Raju, B. C., Nyland, G., Lowe, S. K. 1981. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases, *Applied and Environmental Microbiology*, 42(2), 357-363.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *X. fastidiosa* MEDIANTE LOS SISTEMAS DE TIPIFICACIÓN *Multilocus Sequence Typing-MLST Y Variable Number of Tandem Repeat Analysis-MLVA*

INTRODUCCIÓN

Desde hace tiempo *X. fastidiosa* fue considerada como una bacteria endémica del continente americano debido a que la mayoría de las enfermedades ocasionadas por este patógeno, procedían de América del Norte y del Sur (Baldi y La Porta, 2017). Se confirmó que la bacteriosis causada por este patógeno de la subespecie *pauca* fue hallada en Brasil y en áreas restringidas de Argentina, Paraguay y Costa Rica (Brlansky *et al.*, 1991; Hartung *et al.*, 1994; Coletta y Machado, 2003; Aguilar *et al.*, 2005). Sin embargo, en el año 2012 se produjo una primera alarma en Francia porque fue detectada en plantas de café (*Coffea arabica* y *C. canephora*), que procedían de Ecuador y México (Legendre *et al.*, 2014), eran plantas que se encontraban confinadas en invernadero y el brote fue erradicado (ANSES, 2012; EPPO 2012; EFSA, 2015). Luego, en el año 2013 se detectó un foco de este patógeno en la región de Apulia al sureste de Italia, siendo ésta su primera cita en la Unión Europea (Carlucci *et al.*, 2013; Saponari *et al.*, 2013; Loconsole *et al.*, 2014; Saponari *et al.*, 2014), en árboles de olivo con síntomas de declinamiento súbito y quemado rápido del borde de la hoja, ocasionando la enfermedad denominada *Olive Quick Decline Syndrome* (OQDS), sintomatología que se venía observando desde el año 2010 (Saponari *et al.*, 2017). Paralelamente, en Argentina, también a finales de 2013 fue detectada por primera vez en plantaciones tradicionales de olivo (de más de 50 años) en

la localidad de Aimogasta, provincia de La Rioja (Roca *et al.*, 2014). Posteriormente, fue hallada en plantas de olivo de la localidad de Cruz del Eje, (Córdoba) y en las provincias de Buenos Aires y Catamarca (Haelterman *et al.*, 2015; Tolocka *et al.*, 2017). En esta última provincia, desde la década del 90 está presente la bacteria en fincas de almendro, y es considerada una problemática a nivel regional donde se observaban años en los cuales ocasionaba pérdidas productivas de relativa importancia y otros en los que mermaba su incidencia (Nome, *et al.*, 1992). En la misma década fue hallada en naranjos (Brlansky *et al.*, 1991) causando la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC), esta es considerada actualmente en Corrientes (Bella Vista) una enfermedad manejable por el productor, habiendo años de incidencia moderada y otros donde no se manifestaba por el adecuado manejo que se lleva a campo (Canteros, B. I., com. pers. 2019). En relación al cultivo de olivo, actualmente es muy grave la condición sanitaria, principalmente en las plantaciones del cv. Arauco en el Dpto. Arauco, localidad de Aimogasta y en menor medida en Dpto. Cruz del Eje (Tolocka *et al.*, 2014; Paccioletti *et al.*, 2015; Von Baczko *et al.*, 2017).

X. fastidiosa fue encontrada en el año 2017 plantaciones de almendro en Alicante y en cerezo en las Islas Baleares, España. En el año 2016 y en el año 2015 en plantas ornamentales en la Isla de Córcega, Francia y norte de Portugal (Denancé *et al.*, 2017; Olmo *et al.*, 2017a; Olmo *et al.*, 2017b; Morente *et al.*, 2018; Gutiérrez Hernández y García, 2018; Landa *et al.*, 2019; CAGPDS-JA, 2020; Marco-Noales *et al.*, 2021).

Existe variabilidad genética dentro de la especie *X. fastidiosa* por tal motivo se propone dividirla en las siguientes subespecies: *fastidiosa*, *pauca*, *multiplex*, *sandyi*, *morus* y *tashke* (Schaad *et al.*, 2004; Schuenzel *et al.*, 2005; Denancé *et al.*, 2019), diferenciándose entre sí por sus perfiles genéticos. Sin embargo, solo *fastidiosa* y *multiplex* han sido reconocidas como subespecies válidas por el *International Society of Plant Pathology Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria* (ISPP-CTPPB). Estas dos subespecies al igual que *pauca* fueron analizadas mediante estudios de hibridación de ADN-ADN (Bull *et al.*, 2012). Las otras subespecies fueron caracterizadas por el sistema de tipificación multilocus de secuencias o “*Multilocus Sequence Typing*” (MLST) (Yuan *et al.*, 2010; Nunney *et al.*, 2013, Denancé *et al.*, 2017), siendo éste uno de los métodos actualmente más empleado para la caracterización

taxonómica y epidemiológica de la bacteria (Denancé *et al.*, 2017). En cepas de *X. fastidiosa* se caracterizaron genes que exhiben altos niveles de conservación o diversidad. Los mismos son candidatos prometedores para futuros estudios funcionales dedicados a investigar los mecanismos moleculares de la virulencia de la bacteria como es el caso de *X. taiwanensis* que tiene amplias variaciones genéticas causando efectos devastadores sobre la agricultura (Ling-Wei *et al.*, 2021).

Dada la dificultad que presenta su aislamiento, la forma más fiable y rápida de realizar la caracterización taxonómica de este patógeno es a través de diferentes procedimientos moleculares. Con los MLST, se logra definir subespecies y asignar el grupo genético o tipo de secuencia (*SequenceType-ST*) a cada aislamiento bacteriano. El MLST está basado en el análisis comparativo de las secuencias de siete genes constitutivos denominados *housekeeping* que cumplen funciones vitales en el ciclo de vida de *X. fastidiosa* y que están distribuidos por todo el cromosoma bacteriano, definiendo un perfil alélico único para cada ST (Sally *et al.*, 2005, Elbeaino *et al.*, 2014; Landa *et al.*, 2017). Para la asignación de los aislados a especie, subespecie, caracterizarlos a nivel de subgrupo dentro de una subespecie (ST), o analizar la diversidad genética, se pueden utilizar protocolos de PCR múltiple específicos, análisis basados en SSR, y análisis filogenéticos de secuencias de la región 16S e ITS del ADNr, genes conservados (MLST), o de genes influenciados por factores ambientales (MLST-E) (Rodrigues *et al.*, 2003; Sally *et al.*, 2005; Schuenzel *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 2012; Retchless *et al.*, 2014).

La mayor información de una cepa en estudio es obtenida mediante la secuenciación del genoma completo de la misma; sin embargo, para este análisis se necesita personal que sea altamente idóneo, requiere de mucho tiempo y es costoso, por lo que es poco adecuado para secuenciaciones rápidas y a gran escala (Li *et al.*, 2009). En cambio, sistemas de caracterización basados en marcadores con una adecuada discriminación como la repetición de secuencia simple (SSR), también conocida como repetición en tándem de número variable o múltiples análisis locus (VNTR/MLVA), son interesantes para analizar bacterias genéticamente homogéneas, donde el número de repeticiones puede determinarse mediante amplificación por PCR utilizando cebadores

complementarios a las secuencias bien conservadas que flanquean las repeticiones en tándem. Este método es rápido, fácil de realizar, económico y altamente reproducible (Van Belkum, 2007; Li *et al.*, 2009). A su vez, el análisis MLVA ha sido adoptado por microbiólogos para estudiar la estructura de la población de varios patógenos bacterianos humanos y animales, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Mycobacterium bovis* (Lindstedt, 2005).

La herramienta MLVA para *X. fastidiosa*, tiene como objetivo la búsqueda de variabilidad genética que es observada a través del polimorfismo definido por el perfil de bandeo entre cepas de la bacteria, buscando loci o fragmentos de secuencias simples-SSR repetidos en tándem, detectando diferencias o variabilidad genética entre cepas bacterianas, incluso dentro del mismo ST. Estas diferencias están dadas por repeticiones cortas en tándem de nucleótidos que comprenden secuencias repetitivas cortas que están por fuera de las regiones de codificación de genes presentes en el genoma completo de la bacteria. Involucra el empleo de una mezcla de cebadores tradicionales y/o marcados que muestran amplificaciones específicas. Con estas diferencias se podría explicar la prevalencia de una cepa a nivel regional, cuál es su origen realizando un estudio epidemiológico de la enfermedad en un determinado hospedante, conociendo la genética y la genómica de las cepas asociadas a las infecciones localizadas (Landa, comunicación personal. 2019).

Con los cebadores microsatélites-SSR se busca profundizar los estudios genéticos sobre este patógeno vinculados a la diversidad de la estructura genética de población de la o las cepas presentes en nuestro país y su evolución en el tiempo. Es una herramienta molecular útil para diferenciar poblaciones de este patógeno. Fue aplicado con éxito a diferentes subespecies de *X. fastidiosa* de varios huéspedes vegetales (Mazzaglia *et al.*, 2020). Ésto resultaría de relevancia para analizar el riesgo de *X. fastidiosa* en una determinada zona productiva y poder llevar a cabo estrategias adecuadas de contención y determinar el posible origen y control de la epidemia (Giampetruzzi *et al.*, 2018). Los cebadores tradicionales marcados con un fluoróforo y sin marcar fueron los primeros empleados para detectar variabilidad genética entre cepas de *X. fastidiosa* de diferentes

hospedantes como de cafeto, cítrico y olivo (Coletta-Filho *et al.*, 2001; 2002; Lin *et al.*, 2005; Coletta-Filho *et al.*, 2017).

Con el objetivo de inferir correlaciones genéticas, con cepas conocidas de la bacteria de nuestro país con las existentes en otras regiones geográficas, se podría determinar cómo ocurrieron los brotes de la enfermedad descubiertos inicialmente y los que surgieron posteriormente, pero para ello se necesitan analizar muchas muestras. Con El empleo de microsátélites permite aumentar el conocimiento sobre: 1) la estructura genética de las poblaciones de *X. fastidiosa* presente en una determinada región y 2) su evolución en el tiempo, que puede ser de importancia crítica para la evaluación del riesgo de plagas y para desarrollar estrategias apropiadas para la contención y el control de la epidemia. De esta manera es posible llevar a cabo estudios microevolutivos y epidemiológicos de la enfermedad causada por la bacteria (Lin *et al.*, 2005).

Para este tipo de estudios de caracterización molecular (MLST/MLVA), particularmente útil para la detección de infecciones a gran escala y para el fortalecimiento de las medidas de contención, es requisito fundamental partir de ADN de calidad, extraído de tejidos infectados de diferentes plantas hospedantes. En Argentina, en los cultivos de almendro, cítrico y olivo había un total desconocimiento sobre las subespecies de *X. fastidiosa* presente en estos frutales.

La hipótesis planteada para este capítulo fue: La subespecie de *X. fastidiosa* encontrada en olivos de Argentina es la misma que está presente en cítricos y almendros de nuestro país

De la misma, se desprende como objetivo general, caracterizar la subespecie de *X. fastidiosa* encontrada en plantas de olivo, almendro y cítricos, y producir reactivos serológicos para su detección

El objetivo específico fue caracterizar molecularmente cepas y extractos vegetales infectados con *X. fastidiosa* mediante los sistemas de tipificación *Multilocus Sequence Typing-MLST* y *Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis-MLVA*.

MATERIALES Y MÉTODOS

DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE TIPIFICACIÓN MLST Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Mediante el sistema de clasificación multilocus de secuencias, se caracterizaron dos cepas de *X. fastidiosa*, provenientes de olivo (Aimogasta, La Rioja) y otra de almendro (Sumalao, Catamarca). También, se incluyeron en dicha caracterización cinco ADNs extraídos de plantas de olivo y uno de cítrico infectados con la bacteria (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Suspensiones bacterianas y materiales vegetales caracterizados a través del sistema de clasificación MLST

Denominación	Material del cual se realizó la caracterización	Hospedante	Origen/Provincia/Dpto. /localidad	Año en que se analizaron los materiales
OLI 17A	colonia bacteriana pura	olivo	La Rioja/Arauco/Aimogasta/Tiro Federal II	2015-2016
ALM4	colonia bacteriana pura	almendro	Catamarca	2016
CITRI1	material vegetal	naranja	Corrientes/Bella Vista	2016
CE1	material vegetal	olivo	Córdoba/Cruz del Eje/San Isidro	2017
CATA1	material vegetal	olivo	Catamarca/Pomán	2018
AM2-Angelina	colonia bacteriana pura	olivo	La Rioja/Arauco/Aimogasta/ La Merced	2019
MF4 P1	material vegetal	olivo	Córdoba/Dpto. Cruz del Eje/ Camino a Paso Viejo	2021
OLI V	material vegetal	olivo	Córdoba/Capital	2021

La extracción de ADNs provenientes de los extractos de plantas enfermas se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Murray y Thompson (1980) (Anexo-Protocolo II), para lo cual se utilizaron 100 mg de pecíolos y nervaduras principales. En el caso de las colonias bacterianas puras se empleó directamente suspensión de colonias de *X. fastidiosa*, tomando un loop bacterial con el empleo de un ansa de Kolle, que fue suspendido en 50 µl de agua miliQ libre de nucleasas, obteniéndose la suspensión bacteriana para ingresar a las pruebas moleculares. A continuación, el procedimiento fue el siguiente: mediante PCR, se realizó por duplicado la amplificación de los siete genes involucrados (*leuA*, *petC*, *malF*, *cysG*, *holC*, *nuoL* y *gltT*) (Yuan *et al.*, 2010) en el sistema de caracterización MLST (Tablas 4.2, 4.3 y 4.4).

Tabla 4.2. Protocolo PCR y ciclado para *X. fastidiosa* con cebadores de los siete genes *housekeeping*-MLST

Reactivos	Concentración final /reacción	Concentración de reactivo	Cantidad de reactivo/reacción (µl)
Tampón Promega	1x	5X	5 µl
MgCl ₂	2 mM (0,5 mM)	25mM	0,5 µl
dNTPs	0,1 mM	5mM	0,5 µl
Cebador for de cada gen	0,3 µM	3 µM	2,5 µl
Cebador rev de cada gen	0,3 µM	3 µM	2,5 µl
Taq. DNA Polimerasa Promega	1,0 U	5U/µl	0,2 µl
ADN molde			2 µl
AGUA sin nucleasas c.s.p.			25 µl
			11,8 ul

Tabla 4.3. Ciclado para *X. fastidiosa* con cebadores de los siete genes *housekeeping*-MLST

Etapas	T°C	Tpo	Ciclado
Desnat. inicial	94	4 min.	x 39 ciclos
Desnat.	94	45 seg.	
Hibridación (T° Anneling)		30 seg.	
Extensión	72	1 min.	
Extensión final	72	5 min.	
Mantenimiento	12	24hs	

Tabla 4.4. Cebadores empleados en el PCR para la caracterización por el sistema de tipificación multilocus de secuencias o *Multilocus Sequence Typing* (MLST), tomado de Yuan *et al.* (2010)

Gen	Secuencia de los cebadores	Tamaño (pb)	Función bioquímica
<i>holC</i>	for, 5' ATGGC ACGCG CCGAC TTCT 3'	379	Replicación
	rev, 5' ATGTC GTGTT TGTTT ATGTG CAGG 3'		
<i>nuoL</i>	for, 5' TAGCG ACTTA CGGTT ACTGG GC 3'	557	Respiración aeróbica
	rev, 5' ACCAC CGATC CACAA CGCAT 3'		
<i>gltT</i>	for, 5' TCATG ATCCA AATCA CTCGC TT 3'	654	Transporte de aminoácidos
	rev, 5' ACTGG ACGCT GCCTC GTAAA CC 3'		
<i>cysG</i>	for, 5' GCCGA AGCAG TGCTG GAAG 3'	600	Biosíntesis de hemo porfirina
	rev, 5' GCCAT TTTCG ATCAG TGCAA AAG 3'		
<i>petC</i>	for, 5' GCTGC CATTC GTTGA AGTAC CT 3'	533	Transporte de electrones
	rev, 5' GCACG TCCTC CCAAT AAGCC T 3'		
<i>leuA</i>	for, 5' GGTGC ACGCC AAATC GAATG 3'	708	Biosíntesis de aminoácidos
	rev, 5' GTATC GTTGT GCGT AACT G 3'		
<i>malF</i>	for, 5' TTGCT GGTCC TGCGG TGTTG 3'	730	Transporte de carbohidratos
	rev, 5' GACAG CAGAA GCACG TCCCA GAT 3'		

Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 1,5% mediante electroforesis. En el fotoanalizador de imágenes BIO-RAD modelo Universal Hood II, USA, se observó si la amplificación de la banda esperada de cada gen era de calidad. Los productos fueron purificados usando el “kit PCR QIAquick” (Qiagen), siguiendo las indicaciones descritas por el proveedor, y luego secuenciados en la Unidad de Genómica CICVYA-INTA-Castelar, mediante secuenciación Sanger, empleando los iniciadores correspondientes de cada gen.

Las secuencias de cada locus fueron como primera medida, analizadas evaluando su calidad a través del cromatograma del programa bioinformático Chromas Lite 2.0.1 (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). Posteriormente, fueron alineadas y editadas

(en el caso que fuera necesario) mediante el programa BioEdit versión 7.2 (<https://bioedit.software.informer.com/>). Luego, se realizó la confrontación de las secuencias obtenidas con las secuencias de los siete loci presentes en la base de datos de MLST de *Xylella fastidiosa* (<https://pubmlst.org/xfastidiosa/>) definiendo su grupo genético o ST de la combinación de los siete alelos (Figura 4.1).

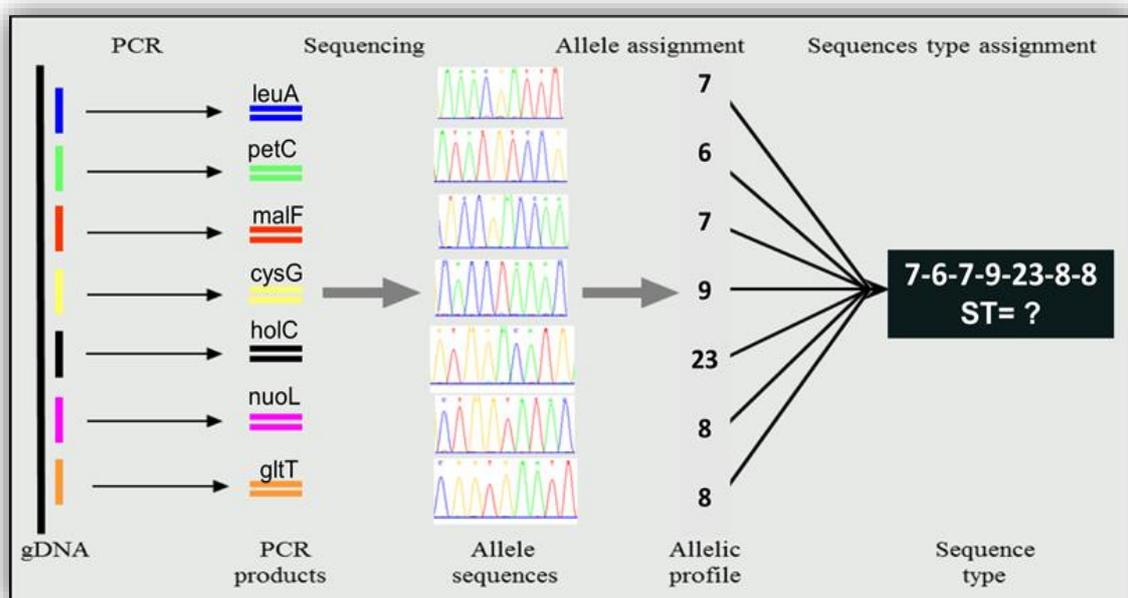


Figura 4.1. Esquema del procedimiento del sistema MLST para definir el ST. Los loci se amplifican mediante PCR, se secuencian y a cada secuencia se le asigna un número de alelo, y la combinación única de los alelos determina el ST. Adaptado de <https://www.hsph.harvard.edu/william-hanage/home/mlst/>

Con la información obtenida, se construyó un árbol filogenético partiendo del alineamiento de las secuencias realizado con Clustal W (Tompson *et al.*, 1994), utilizando el método Neighbor-joining de Saitou y Nei (1987), con un valor de bootstrap de 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985) mediante el programa MEGA versión 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). En dicho análisis se incluyeron los STs de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* más emparentadas a los STs en estudio.

Desarrollo del sistema de caracterización MLVA

Microsatélites con cebadores diseñados para la cepa CoDiRO

Esta técnica fue realizada en el Instituto de Agricultura Sostenible-IAS dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC en Córdoba, España, bajo la supervisión de la Dra. Blanca M. Landa del Castillo y la Biól. Concepción Olivares García. Se considera un complemento más, además de los MLST, para realizar un estudio en profundidad sobre la caracterización de las cepas presentes en nuestro país. El procedimiento fue el siguiente: se realizaron PCR convencionales en placa, con doce juegos de cebadores combinados en tres grupos:

- **MP1:** COD_4, COD_6b, COD_9, COD_10

- **MP2:** COD_14, COD_16, COD_17, COD_25

- **MP3:** COD_8, COD_18, COD_20, COD_22

El cebador sentido forward-for. de cada juego estaba previamente unido a uno de los siguientes fluoróforos: ATTO550, ATTO 565, 6FAM, BO530. Los cebadores fueron diseñados para la cepa CoDiRO (*X. fastidiosa* subsp. *pauca*) por investigadores italianos (datos no publicados Landa, com. pers., 2019). Las reacciones de PCR y ciclados fueron realizados siguiendo el protocolo de la EPPO (2018) (Tablas 4.5, 4.6 y 4.7). En este estudio fueron analizadas las cepas OLI17A (olivo), AM2-Angelina (olivo) y ALM4 (almendro) de nuestro país, cuyo ADN fue previamente purificado mediante el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen GMBH). Junto a las anteriores se analizaron otras 27 muestras procedentes de la región de Apulia al sur de Italia. Las placas donde se sembraron los materiales de Italia y los de Argentina, correspondieron a la matrix G5, empleando el marcador molecular de Thermo Scientific 0´GeneRuler DNA Ladder LIZ 500 pb (0,1 µg/µl). La concentración de los componentes de la PCR fue similar en las tres

combinaciones (MP1, MP2 y MP3). Los tamaños máximo y mínimo de los fragmentos esperados fueron de 600 y 100 pb, respectivamente.

Tablas 4.5. Combinaciones y fluoróforo de cada grupo de cebadores MP1/MP2/MP3

Cebadores	Fluoróforo	Denominación
COD_4	6FAM	MPI
COD_6b	BO530	
COD_9	ATTO550	
COD_10	ATTO565	
COD_14	6FAM	MP2
COD_16	BO530	
COD_17	ATTO550	
COD_25	ATTO565	
COD_8	6FAM	MP3
COD_18	BO530	
COD_20	ATTO550	
COD_22	ATTO565	

Tablas 4.6. Protocolo de PCR con el grupo de cebadores MP1 para la cepa CoDiRO según EPPO (2018)

Componentes del PCR (MP1)			
Ci (µM)	Cf (µM)	1X (µl)	
	H ₂ O		3,1
2	Master Mix 2X	1	7,5
10	COD-F (COD-4)	0,2	0,3
10	COD-R (COD-4)	0,2	0,3
10	COD-F (COD_6b)	0,2	0,3
10	COD-R (COD_6b)	0,2	0,3
10	COD-F (COD_9)	0,2	0,3
10	COD-R (COD_9)	0,2	0,3
10	COD-F (COD_10)	0,2	0,3
10	COD-R (COD_10)	0,2	0,3
	DNA		2
	Vol final		15 µl

Tablas 4.7. Ciclado con el grupo de cebadores MP1 para la cepa CoDiRO según EPPO (2018)

Etapas	T°C	Tpo	Ciclado
Desnat. inicial	94	2 min.	
Desnat.	94	30 seg.	
Hibridación (T° Anneling)	58/60	30 seg.	x 35 ciclos
Extensión	72	45 seg.	
Extensión final	72	7 min.	
Mantenimiento	12	∞	

Los productos de PCR fueron secuenciados por electroforesis capilar (CE) para estimar con precisión el tamaño de los amplicones. Consistió en sembrar cada muestra en un capilar, observando los picos de diferentes colores según el fluoróforo empleado. Así, el electroferograma de la CE de cada grupo de cada muestra indica los perfiles genéticos de las mismas, permitiendo observar variabilidad genética (polimorfismo) entre las cepas bacterianas estudiadas y a través de los softwares Bionumerics o Peak scanner 2.0, informando directamente los tamaños de los fragmentos amplificados mediante los picos obtenidos de cada muestra analizada. Para este estudio se empleó el primer software mencionado. La CE es una tecnología basada en la separación de fragmentos iónicos por tamaño, utilizando un analizador genético. En *Thermo Fisher Scientific CE*, se utiliza una inyección electrocinética que introduce fragmentos de ADN de la solución y en cada capilar. Durante la electroforesis capilar, los productos de extensión de la reacción de PCR, entran en el capilar como resultado de la inyección electrocinética. Luego, una alta carga de voltaje es aplicada a cada muestra obligando la movilidad de los fragmentos cargados negativamente en cada capilar. Los productos de extensión están separados por tamaño en función de su carga total. La movilidad electroforética de cada muestra puede verse afectada por las condiciones de ejecución como: tipo de tampón, concentración y pH; la temperatura de ejecución; la cantidad de voltaje aplicado; y el tipo de polímero utilizado. Poco antes de llegar al electrodo positivo, el ADN de los fragmentos marcado con fluorescencia, separados por tamaño, se mueven a lo largo de la trayectoria de un rayo láser que hace que los colorantes adheridos a los fragmentos emitan fluorescencia. Las señales del colorante fluorescente, se separan por un sistema de difracción, y una cámara CCD detecta la fluorescencia. Con este proceso se visualiza con mayor exactitud las secuencias o el número de repeticiones en tándem en cada locus, restando el tamaño de las regiones flanqueantes del tamaño del amplicón y dividiendo el resto por la longitud de la unidad de repetición (http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch.php/sequest/foruser/dna_fragment_analysis_by_capillary_electroforesis.pdf).

Microsatélites con cebadores tradicionales

También para el análisis de los microsatélites de nuestros materiales, se consideró de importancia realizar otros ensayos con cebadores tradicionales propuestos por Lin *et al.*, (2005) y Coletta Filo *et al.* (2001). El número de repeticiones en tándem que corresponde a cada juego de cebadores, define la variabilidad. Por ejemplo: si una cepa presenta dos repeticiones y otras cinco repeticiones con el mismo juego de cebadores, son cepas diferentes. Con las mismas muestras anteriores, a partir de trece cebadores tradicionales se realizaron los PCR convencionales en placas como las mencionadas anteriormente (Tablas 4.8, 4.9 y 4.10).

Tabla 4.8. Microsatélites-SSR con cebadores tradicionales

Cebadores	Secuencias de los cebadores	Denominación (ORF)
SSR20	for, 5' ATGAAGAAGCCAGGATACAT 3' rev, 5' GCTACACGTGCAACAAC 3'	ARN polimerasa gen de la subunidad B (<i>rpoB</i>)
SSR40	for, 5' ACCTTGACGACGGATG 3' rev, 5' TAGGAACTGCTGCTACTGAT 3'	ARN polimerasa gen de la subunidad B (<i>rpoB</i>)
CSSR7	for, 5' CACAGCGAACAGGCATTG 3' rev, 5' AGCAACCAAGACGGGAAC 3'	Fosfatasa alcalina
CSSR13	for, 5' CAATGTCACTCAGGTCAG 3' rev, 5' TTCTGGAATACATCAAATGC 3'	Proteína hipotética
CSSR20	for, 5' GGTATCGCCTTTGGTTCTGG 3' rev, 5' GACAACCGACATCCTCATGG 3'	Fosfoglicolato fosfatasa
ASSR12	for, 5' TGCTCATTGTGGCGAAGG 3' rev, 5' CGCAACGTGCATTCATCG 3'	Fructosa-bifosfato aldolasa
SSR28	for, 5' TCAAGCACACTTCCTACG 3' rev, 5' GCAACGCTGTTATCTCAAT 3'	ARN polimerasa gen de la subunidad B (<i>rpoB</i>)
CSSR6	for, 5' CGCACTGTCATCCATTTAATC 3' rev, 5' GCTGCTTCATCTAGACGTG 3'	Proteína hipotética

CSSR10	for, 5' rev, 5'	GCAACCACAAAGCCGCAG 3' AGCACCTCTTAGCATCACTGG 3'	ARNt/ARNr metilasa
CSSR17	for, 5' rev, 5'	AGAAGTATTCGCTACGCTACG 3' GGTGATGATTCAGTTGGTGTG 3'	Hidroxiacilgluta tión hidrolasa
ASSR9	for, 5' rev, 5'	GGTTGTCGGGCTCATTCC 3' TTGTCACAGCATCACTATTCTC 3'	50S proteína ribosomal L13
OSSR17	for, 5' rev, 5'	AGTACAGCGAACAGGCATTG 3' AGCAACCAGGACGGGAAC 3'	Proteína del ciclo celular
GSSR7	for, 5' rev, 5'	ATCATGTCGTGTCGTTTC 3' CAATAAAGCACCGAATTAGC 3'	Ninguna codificación

Los cebadores SSR20, SSR28 y SSR40 están basados en la secuencia del genoma de la cepa de *X. fastidiosa* 9a5c de *Citrus sinensis* (Coletta-Filho *et al.*, 2001). Los demás cebadores fueron diseñados a partir de cepas de laurel de adorno, cítrico, almendro y vid. La definición de marco de lectura abierto (ORF) se refiere al gen en el que se encuentra el locus SSR o cerca de él (Lin *et al.*, 2005)

Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 2%, sembrando 5 µl de loading y 7 µl de producto de PCR. Los 8 µl restantes del producto de PCR con los cebadores fueron enviados al Servicio de Análisis de Fragmentos de la empresa STABVIDA (infoSTABVIDA) para su secuenciación por la tecnología Sanger. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas con los programas DNASTar o Bioedit, observando segmentos de nucleótidos que se repiten en tándem, contabilizando las repeticiones obtenidas, diferenciando así las cepas de acuerdo a la cantidad de repeticiones.

Tabla 4.9. Protocolo de PCR y ciclado con los cebadores SSR tradicionales de Lin *et al.* (2005) y Coletta-Filho *et al.* (2001)

Reactivos	Concentración final /reacción	Concentración de reactivo	Cantidad de reactivo/reacción (µl)
Tampón	1x	10X	2,5
MgCl ₂	1m M	25 mM	1,0
dNTPs	0,2 mM	5 mM	1,0
Cebador for	0,5 µM	25 pmol/µl	0,5
Cebador rev	0,5 µM	25 pmol/µl	0,5
Taq. DNA polimerasa Promega	1,0 U	5 U/µl	0,2
ADN molde			1
AGUA sin nucleasas c.s.p. 25 µl			18,3

Tabla 4.10. Ciclado con los cebadores SSR tradicionales de Lin *et al.* (2005) y Coletta-Filho *et al.* (2001)

Etapas	T°C	Tpo	Ciclado
Desnat. inicial	94	5 min.	
Desnat.	94	30 seg.	
Hibridación (T° Anneling)	60	30 seg.	x 35 ciclos
Extensión	72	1 min.	
Extensión final	72	7 min.	
Mantenimiento	12	∞	

Con las secuencias obtenidas de los cebadores tradicionales se construyó un árbol filogenético partiendo del alineamiento de 4 secuencias nucleotídicas. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) que fue el que mejor se ajustó para este estudio. Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (Tamura *et al.*, 2004) y los análisis evolutivos se realizaron mediante el programa MEGA versión 11 (Tamura *et al.*, 2021).

También se utilizaron combinaciones de 2 y 4 cebadores tradicionales, a fin de observar mayor polimorfismo entre nuestras cepas dentro de un mismo tipo de secuencia-ST de acuerdo a los siguientes grupos:

-RP1: CSSR6/CSSR7/CSSR10/ASSR9 (250-300pb.)

-RP2: CSSR17/CSSR20/GSSR7/OSSR17 (200-300pb.)

-RP3: CSSR7/CSSR10 (204-258 pb.)

-RP4: CSSR6/CSSR20 (244-283 pb.)

Otro ensayo realizado consistió en emplear solamente la combinación de los cebadores RP3 (que tuvo mejor respuesta), siguiendo el mismo protocolo citado anteriormente. El procedimiento fue el siguiente: de un total de 30 muestras de olivos infectadas con la bacteria procedentes de fincas de La Rioja, Córdoba y Catamarca, se

analizaron 24 (tomadas al azar) y el Testigo Enfermo-TE. Los productos de PCR fueron corridos en geles de poliacrilamida al 10% y en agarosa al 2%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sistema de tipificación MLST y análisis filogenético

En América del Sur, a pesar de la importancia económica que tiene *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, se conoce poco sobre su diversidad genética (Coletta-Fihlo *et al.*, 2017).

Tabla 4.11. Esquema de identificación de los alelos correspondiente a cada gen definiendo el ST o Grupo Genético mediante el sistema de clasificación MLST https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_xfastidiosa_seqdef&page=downloadProfiles&scheme_id=1

La tipificación por MLST para *X. fastidiosa* en diferentes hospedantes permitió determinar que las cepas OLI17A, ALM4, AM2-Angelina, al igual que las detectadas en muestras de plantas infectadas (CE1, CATA1, MF4P1, Oli V), pertenecen a la subespecie *pauca*, obteniéndose dos ST diferentes en olivo (ST69 y ST78) hallados en la misma finca del Dpto de Cruz del Eje (Tablas 4.11 y 4.12). A su vez, el ST78 se encontró también presente en plantas de almendro de Catamarca, estos resultados son considerados de relevancia por el impacto que podría tener en relación a la diseminación de la bacteria en diferentes hospedantes (Tolocka *et al.*, 2017a, b). Cabe consignar que el ST69 fue detectado en trabajos previos por Coletta-Filho *et al.* (2017), en materiales argentinos provenientes de cítricos.

ST	leuA	petC	malF	cysG	holC	nuoL	gtT
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	4	1	1	1	1
3	1	1	1	20	1	1	1
4	1	1	1	4	1	1	1
5	2	2	2	2	2	2	2
6	3	3	3	3	3	3	3
7	3	3	3	7	3	3	3
8	3	3	5	5	4	3	7
9	3	3	5	5	4	3	4
60	9	1	1	13	14	5	1
61	11	9	11	15	16	12	10
62	4	3	6	18	5	6	3
63	5	6	3	3	6	3	5
64	7	7	7	9	10	7	8
65	7	6	7	9	10	8	8
66	7	8	8	10	11	8	8
67	5	3	8	3	12	3	5
68	14	8	8	11	12	9	8
69	7	6	7	9	23	17	8
70	14	7	8	11	22	9	8
71	5	8	8	11	12	9	9
72	12	12	15	26	24	18	1
73	7	6	8	27	10	16	8
74	7	6	8	28	25	16	8
75	9	1	10	29	1	19	1
76	12	13	15	26	24	18	1
77	1	1	6	30	26	5	1
78	7	6	7	9	23	8	8
83	6	3	5	33	7	4	7
84	7	6	7	34	10	20	8
85	7	6	8	10	10	8	8
86	7	6	8	10	11	20	8

Tabla 4.12. Caracterización molecular de las cepas y materiales vegetales infectados con *Xylella fastidiosa* analizados mediante el sistema de Tipificación MLST

Cepa (denominación)	Hospedante/ Sistema de cultivo	Provincia/Dpto/Loc./barrio	subespecie	Secuencia Tipo-ST
OLI 17A	olivo cv. Arauco/tradicional	La Rioja/Arauco/Aimogasta/ Tiro Federal II	<i>pauca</i>	69
ALM4	almendro/tradicional	Catamarca/EEA-INTA	<i>pauca</i>	78
CITRICO	naranja cv. Valencia/tradicional	Corrientes/Bella Vista		69
CE1	olivo cv. Frantoio/tradicional	Córdoba/Cruz del Eje/San Isidro	<i>pauca</i>	69
CATA1	olivo cv. Arauco/tradicional	Catamarca/Pomán	<i>pauca</i>	69
AM2-Angelina	olivo cv. Arauco/tradicional	La Rioja/Arauco/Aimogasta/La Merced	<i>pauca</i>	69
MF4P1	olivo cv. Nevadillo/tradicional	Córdoba/Cruz del Eje/ Cno. Paso Viejo	<i>pauca</i>	78
Oli V	Olivo. Cultivar no identificado	Córdoba/Capital	<i>pauca</i>	69
MF9P4	olivo cv. Arauco/tradicional	Córdoba/Cruz del Eje/ Cno. Paso Viejo	-----	-----

Según Coletta-Filho *et al.* (2017) la subsp. *pauca* parece tener más diversidad que las subespecies *morus*, *fastidiosa* y *multiplex*, a pesar de que se ha informado previamente que la recombinación afecta la diversidad alélica de todas las subespecies de *X. fastidiosa*. Los estudios de diversidad genética basados en muestras recolectadas a campo, en las que solo se dispone de información sobre la planta hospedante de origen para cada aislado, han indicado que la recombinación dentro y entre las subespecies de *X. fastidiosa* es frecuente (Nunney *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2010). Además, *X. fastidiosa* es naturalmente competente (Kung y Almeida, 2011), la recombinación puede ocurrir en frecuencias de órdenes de magnitud más altas que la mutación, y los alelos pueden transferirse de manera eficiente sin selección (Kung y Almeida, 2014).

La presencia de la subsp. *multiplex* en America del Sur (Brasil) se considera que es la consecuencia de una sola introducción desde su área de distribución nativa en America del Norte hace más de 80 años (Coletta-Filho *et al.*, 2017). El origen de la infección de *X. fastidiosa* en Italia se supone que proviene de café de Costa Rica, que es el único lugar donde fue hallado el ST53 (Nunney *et al.*, 2014). Hay evidencia de recombinación homóloga entre subsp. *pauca* y *multiplex* en Brasil. De hecho, la única cepa de subsp.

pauca aislada de una planta de ciruela tenía un alelo que se originó en la subsp. *múltiplex*. Este tipo de recombinación homóloga bidireccional entre ST endémica e introducida indican que el flujo de genes ocurre en marcos de tiempo evolutivos cortos en *X. fastidiosa* (Coletta-Filho *et al.*, 2017).

Respecto al análisis filogenético de los ST caracterizados en este trabajo en relación a los STs de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* más relacionados, se observó que el ST69 y ST78 de olivo y el ST78 de almendro de Argentina (Tolocka *et al.*, 2017 a, c), se encuentran alejados del grupo genético ST53 de olivo procedente de Italia denominado CoDiRO y más emparentados al ST65 de cítricos de Brasil (Figura 4.2). El ST53 difiere en 5 genes (*malF*, *cysG*, *holC*, *nuoL*, *glT*) contemplando un total de 61 nucleótidos diferentes en relación al ST69 de Argentina (Tabla 4.13). En relación a cítricos podemos observar que el ST69 difiere en tres genes (*petC*, *holC* y *nuoL*) en relación a los ST11, ST12 y ST64 y dos genes con el ST13 y ST65 (*holC* y *nuoL*) procedentes de Brasil (Figura 4.3).

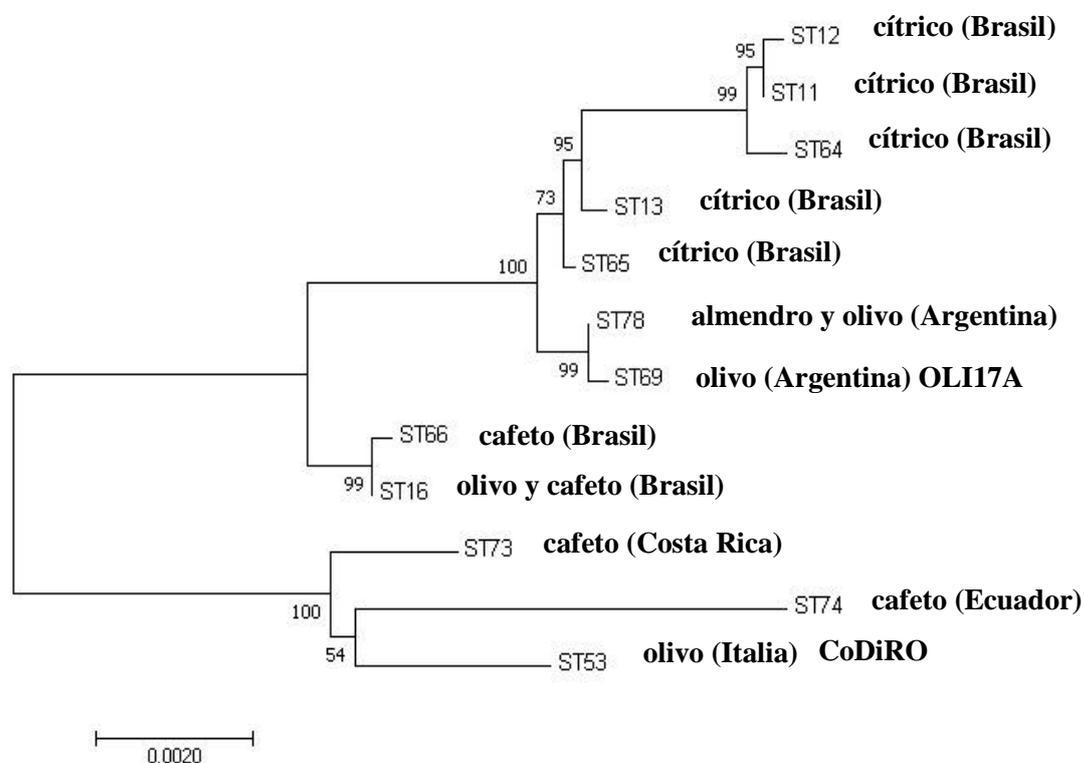


Figura 4.2. Árbol filogenético de los tipos de secuencias (ST) de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* provenientes de diferentes hospedantes y países. Realizado a través del método Neighbor-Joining con el programa Mega versión 6.0. Los valores de *bootstrap* (1000 repeticiones) se indican en cada nodo. La barra indica número de sustituciones/nucleótidos

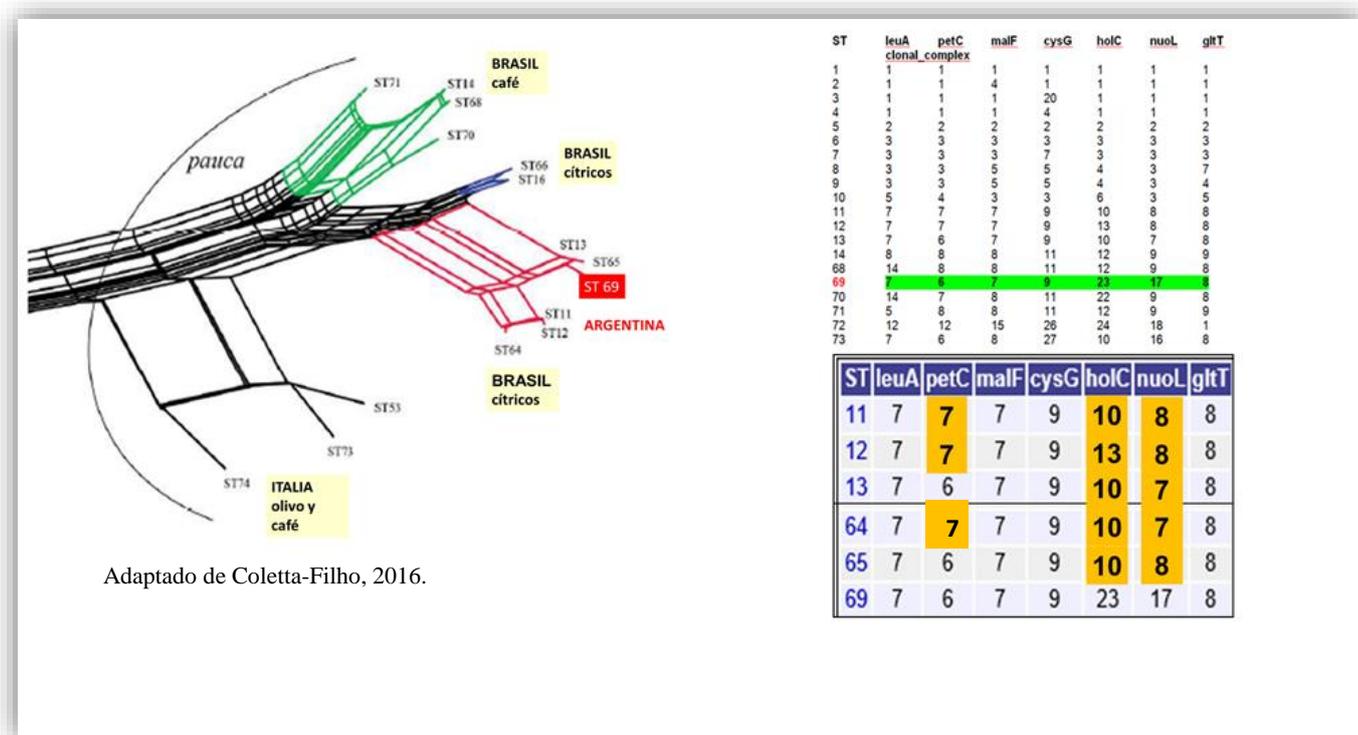


Figura 4.3. Ubicación filogenética de los ST de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* ST69 de cítricos de Argentina en relación a los ST más emparentadas presentes en Brasil

El análisis por MLST de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* aislado de plantas de café en Costa Rica y posteriormente en olivos en Italia que resultó identificado como ST53, proporcionó información importante sobre el origen del brote en ese país (Nunney *et al.*, 2014; Elbaino *et al.*, 2014; Loconsole *et al.*, 2016). El ST16 está presente en olivo y cafeto en Brasil, pero no en cítricos (Coletta-Filho *et al.*, 2017). En el 2016, la misma situación se observó con el ST53 De Donno (DD) que estaba causando la destrucción de los olivares al sur de Italia y que fue a su vez detectado en otros hospedantes susceptibles como laurel de adorno (*Nerium oleander* L.) y la lechera del cabo (*Polygala myrtifolia* L.); sin embargo, en la región de Apulia, *X. fastidiosa* no fue detectada en los cítricos, vid y la ornamental encina (*Quercus ilex* L.), que parecieron ser tolerantes a esta subespecie (<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160329>).

Haber encontrado el tipo de secuencia ST78 en olivo resulta preocupante si se comprueba que puede transmitirse de un hospedante a otro, favoreciendo su dispersión a

través del insecto vector en plantaciones aledañas con cultivares de almendro debido a que compraten la misma ST.

Tabla 4.13. Diferencias obtenidas en cuanto a la cantidad de nucleótidos distintos entre grupos genéticos de Argentina ST69 (olivo) y ST78 (olivo y almendro), Brasil ST65 (cítrico) e Italia ST53 (olivo)

Grupo genético	Genes <i>housekeeping</i>							Total de nucleótidos distintos
	<i>leuA</i>	<i>petC</i>	<i>malF</i>	<i>cysG</i>	<i>holC</i>	<i>nuoL</i>	<i>gltT</i>	
ST69	7	6	7	9	23	17	8	
ST78	7	6	7	9	23	8	8	
Nucleótidos diferentes al ST69						1		1
ST65	7	6	7	9	10	8	8	
Nucleótidos diferentes al ST69					4	1		5
ST53	7	6	16	24	10	16	14	
Nucleótidos diferentes al ST69			14	24	4	19	1	61

Un aspecto fundamental para comprender la dinámica de propagación de un patógeno es conocer la identidad de genotipos de interés, mediante diferentes técnicas moleculares de caracterización como MLST y la repetición de secuencia simple-SSR/MLVA-microsatélites. MLST es el método de elección para el genotipado de *X. fastidiosa* a nivel de subespecies y más allá, basado en la detección tipos de secuencias (ST) diferentes (Mazzaglia *et al.*, 2014). Además, es el método de referencia utilizado para tipificar *X. fastidiosa* a nivel infrasubespecífico (Dupas *et al.*, 2022), por debajo de la categoría taxonómica de especie, lo cual es esencial para comparar cepas presentes en diferentes zonas de estudio, aisladas en distintos momentos, determinando si representan una misma población bacteriana (Cesbron *et al.*, 2020). Sin embargo, MLST tiene algunas limitantes, ya que, al depender de solo siete genes del genoma podría tener un rendimiento

menor para diferenciar entre cepas muy estrechamente emparentadas y, además, no es una herramienta adecuada para el seguimiento de rutina y a gran escala debido a los costos de secuenciación (Baldi y La Porta, 2017; Denancé *et al.*, 2017; Coletta-Filho *et al.*, 2017; Marcelletti y Scortichini, 2016).

En la figura 4.4, se observa dos clústers bien diferenciados y distanciados que contemplan dos STs de Argentina (ST69 olivo, ST78 almendro y olivo) y cuatro de Brasil (ST65, ST13, ST12, ST11, ST64) todos de cítricos. La interpretación de esta figura consiste en conocer la cantidad de alelos que comparten en común cada ST. El análisis se parte del círculo central donde se encuentra ubicado el ST65. Se conoce que tiene 6 alelos en común con el ST13 y el ST78, a su vez entre ellos comparten 5 alelos formando un anillo por fuera del ST65. El ST69 tiene 5 alelos en común con el ST65, por tal motivo está ubicado en un anillo más externo. A su vez, el ST65 se relaciona con el ST11 que cuentan con 6 alelos en común; sin embargo, el alelo diferente (*petC*) es el que muestra mayores números de nucleótidos distintos (10 nucleótidos) de todos los ST analizados en este gráfico. Por eso se ubican en los dos círculos centrales de los distintos cluster. De la misma forma, el ST11 tiene 6 alelos en común con el ST12 y el ST64 y entre ellos comparten 5 alelos por eso están en el mismo círculo (ver Figura. 4.3).

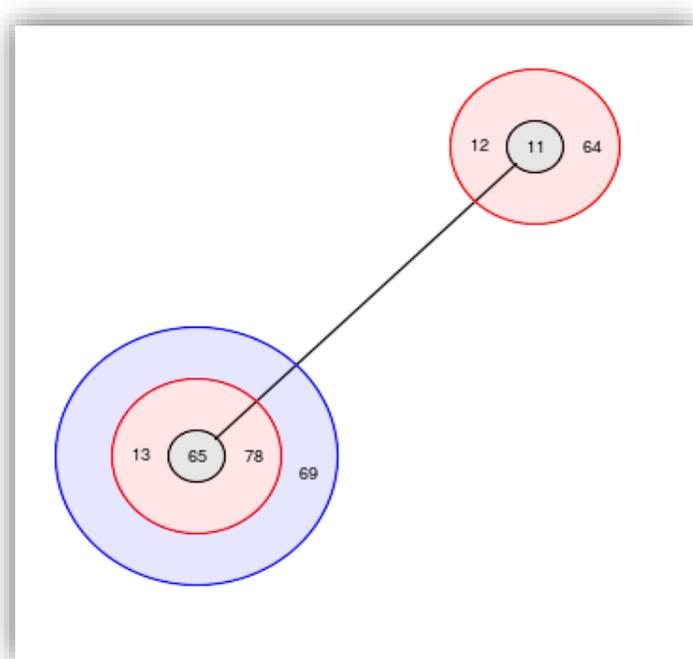


Figura 4.4. Representación gráfica de las distancias entre ST de Argentina y Brasil mediante el análisis del algoritmo de BURST que agrupa ST de *X. fastidiosa* (olivo, almendro, cítricos) de Argentina y de Brasil (cítricos) en función del recuento en el número de perfiles

Sistema de clasificación MLVA: microsatélites-SSR con los cebadores MP1-MP2-MP3 y tradicionales RP1-RP2-RP3-RP4

La introducción de cepas extranjeras de *X. fastidiosa* en nuevas áreas geográficas y la posterior recombinación con cepas endémicas pueden ser relevantes para aumentar la variabilidad genética, cambiando el hospedante y, por lo tanto, induciendo nuevas enfermedades en los cultivos (Nunney *et al.*, 2014). Se reconoce que la recombinación es el principal promotor de la diversidad en *X. fastidiosa*, lo que podría explicar los cambios ocurridos entre las subespecies que facilita la invasión hacia nuevos hospedantes. La frecuencia de recombinación entre subespecies difiere entre cepas, incluso dentro de las subespecies. Esto podría reflejar el aislamiento geográfico, donde la recombinación entre subespecies ha ocurrido solo cuando las cepas se han introducido en nuevas regiones donde ya se establecieron otras subespecies (Vanhove *et al.*, 2019).

Microsatélites con cebadores diseñados para la cepa CoDiRO

Se observó que existe variabilidad entre las cepas OLI 17A (olivo), AM2-Angelina (olivo) y ALM4 (almendro), mostrando polimorfismo (perfil de bandeo) diferente, incluso entre las de olivo y a su vez con las muestras de Apulia-Italia (Figura 4.5).

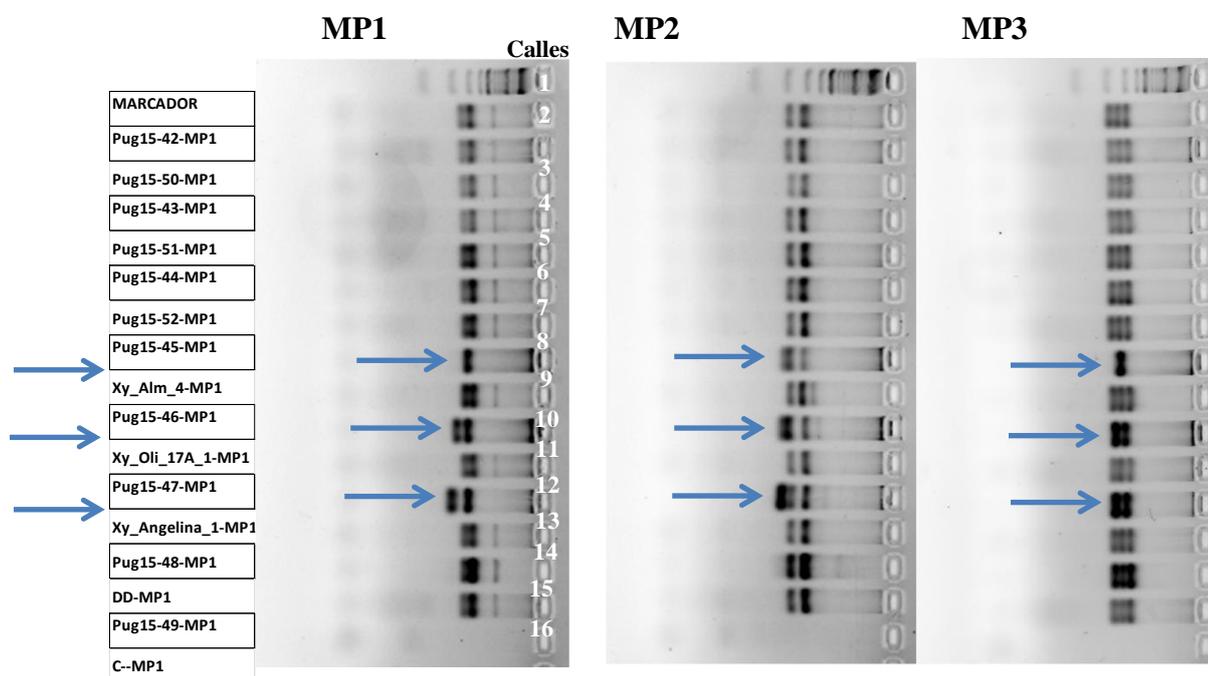


Figura 4.5. Imágenes de los geles de agarosa con el empleo de cebadores de CoDiRO. Pug: Puglia (muestra del sur de Italia). Aislamientos argentinos: Xy_OLI_17A_1-MP1: cepa *X. fastidiosa* de olivo17A muestra 1, empleando la mezcla de cebadores del grupo 1; Xy_Alm_4: cepa *X. fastidiosa* de almendro 4, utilizando la mezcla de cebadores del grupo 1 CoDiRO, el grupo de cebadores MP1; Xy_Angelina_1-MP1: cepa *X. fastidiosa* de Angelina-AM2 muestra 1, utilizando la mezcla de cebadores MP1. MP2/MP3: mezcla de cebadores del grupo 2 y 3 de CoDiRO, DD-MP1: control positivo De Donno (Italia), para la mezcla de cebadores del grupo 1 CoDiRO, C-MP1: control negativo para la mezcla de cebadores del grupo 1 CoDiRO, Marcador PM (Ladder 100 pb.)

Estos diferentes perfiles de bandeos fueron observados en las tres combinaciones de MP1-MP2-MP3. Esto es interesante porque con solo tres cepas (OLI17A, AM2-Angelina, ALM4) se obtuvo una notable variabilidad en comparación a las muestras italianas que no manifestaron estas diferencias. Las cepas fueron analizadas mediante la base de datos empleada para el análisis de microsatélites denominada Bionumerics.

Con dicho programa se obtuvo el número de repeticiones/replicones o repit para cada cepa analizada. Los cebadores que mostraron mayor variabilidad para las tres cepas argentinas fueron: COD_14, COD_17, COD_8 y COD_20 dentro de las combinaciones MP2 y MP3, porque dieron diferentes números de repeticiones. No hay repeticiones (na)

en COD_4, COD_6b, COD_18, COD_22. En el caso del COD_10 y COD_16 no hay repeticiones en ALM4, pero si diferencias en OLI17A y AM2-Angelina, el cebador COD_25 que dio 20 repeticiones en ALM4, pero ninguna en OLI17A y AM2-Angelina. En el COD_9 las tres cepas tienen el mismo número de repeticiones (1), por lo que no muestra diferencias (Tabla 4.14).

Tabla 4.14. Número de repeticiones de las tres cepas argentinas con cebadores MP1-MP2-MP3

Cebadores	Fluoróforo	Cepa ALM4	Cepa OLI17A	Cepa AM2-Angelina	
COD_4	6FAM	na	na	na	MP1
COD_6b	BO530	na	na	na	
COD_9	ATTO550	1	1	1	
COD_10	ATTO565	na	7	4	
Cebadores	Fluoróforo	Cepa ALM4	Cepa OLI17A	Cepa AM2-Angelina	
COD_14	6FAM	13	12	7	MP2
COD_16	BO530	na	14	13	
COD_17	ATTO550	4	3	7	
COD_25	ATTO565	20	na	na	
Cebadores	Fluoróforo	Cepa ALM4	Cepa OLI17A	Cepa AM2-Angelina	
COD_8	6FAM	1	3	4	MP3
COD_18	BO530	na	na	na	
COD_20	ATTO550	14	8	7	
COD_22	ATTO565	na	na	na	

Nota: na (sin repeticiones). COD_: cebadores empleados para el análisis de muestras CoDiRO de Italia y empleados también para muestras de Argentina

Microsatélites con cebadores tradicionales

Con los cebadores tradicionales, el que mostró mayor polimorfismo entre las cepas argentinas fue el CSSR13, con un perfil de bandeo que fue diferente entre las cepas ALM4, OLI17A y AM2-Angelina, seguido por el CSSR17 (Figura 4.9.D). Luego, los CSSR6/OSSR17/CSSR20/CSSR7/SSR20/SSR28/SSR40 tuvieron comportamientos muy semejantes en cuanto a la variabilidad observada entre sí y los ASSR12/ASSR9/CSSR10/GSSR7 tuvieron el mismo perfil de bandeo por lo que no mostraron diferencias (Figuras 4.6.A, B; 4.7.C; 4.8.D; 4.9.E). Según Giampetruzzi *et al.* (2019), un genotipado preciso de las cepas responsables de un brote es crucial para comprender de dónde proviene la enfermedad, como se dispersa en las áreas infectadas y monitorear si aparecen nuevas variantes o si el tipo actual puede evolucionar a nuevas variantes atacando a hospedantes susceptibles.

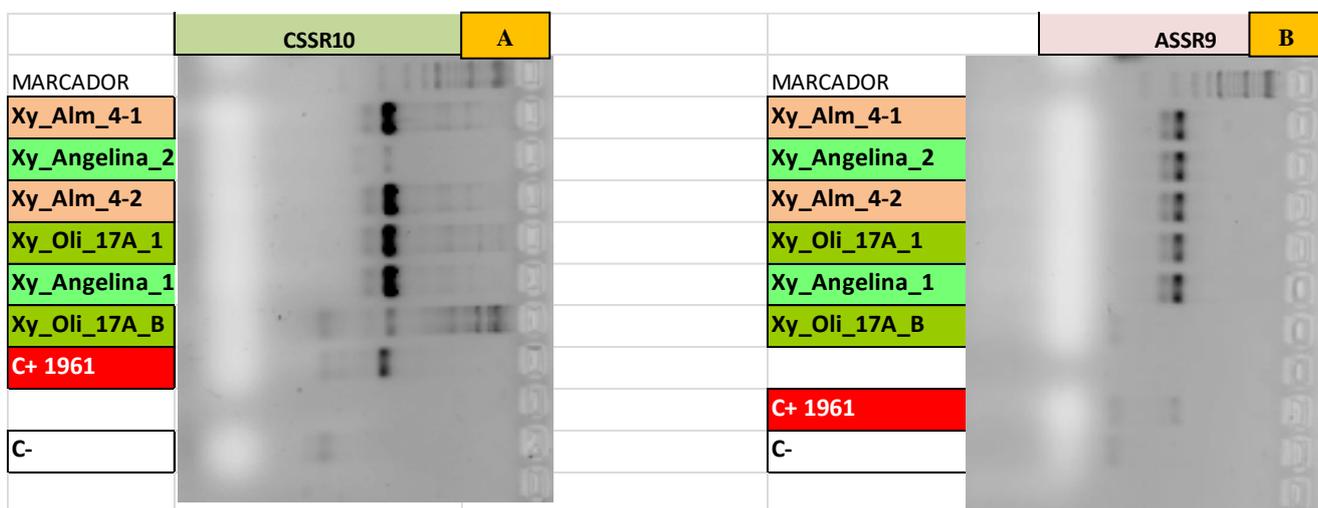


Figura 4.6. A, B. Perfil de bandeo con cebadores tradicionales CSSR10 y ASSR9 de las cepas ALM4, AM2-Angelina, OLI17A. C+1961: control positivo, C-: control negativo, Marcador PM (Ladder 100 pb.). Corrida en gel de agarosa al 2%

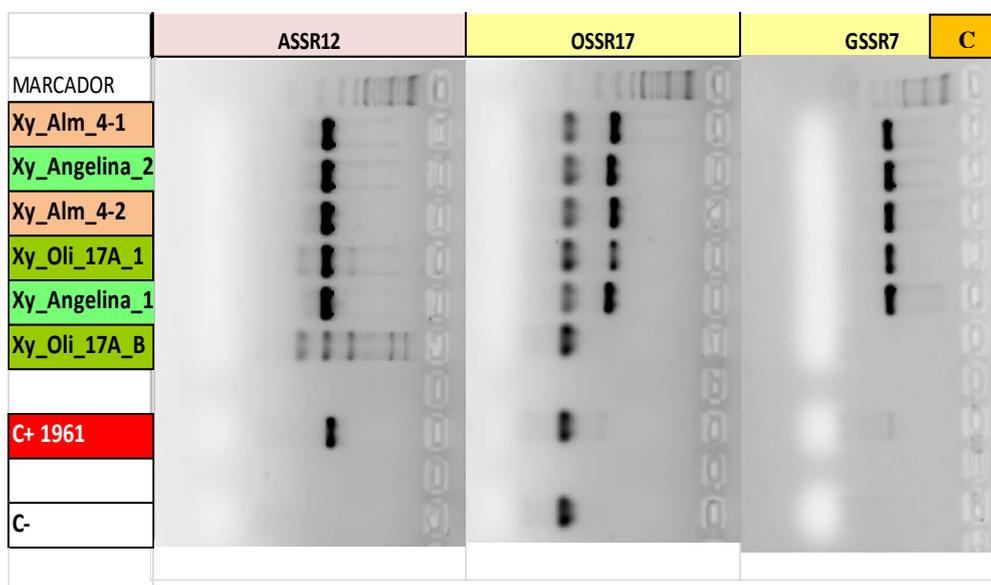


Figura 4.7. C. Perfil de bandeo con cebadores tradicionales ASSR12, OSSR17 y GSSR7 de las cepas ALM4, AM2-Angelina, OLI17A. C+1961: control positivo, C-: control negativo, Marcador PM (Ladder 100 pb.). Corrida en gel de agarosa al 2%

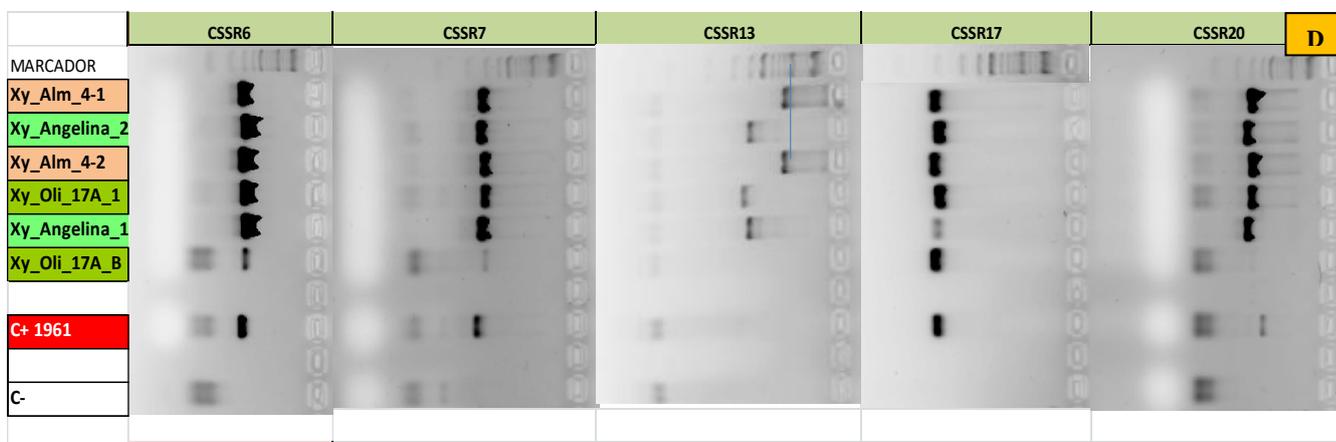


Figura 4.8. D. Perfil de bandeo con cebadores tradicionales CSSR6, CSSR7, CSRR13, CSRR17 y CSSR20 de las cepas ALM4, AM2-Angelina, OLI17A. C+1961: control positivo, C-: control negativo, Marcador PM (Ladder 100 pb.). Corrida en gel de agarosa al 2%

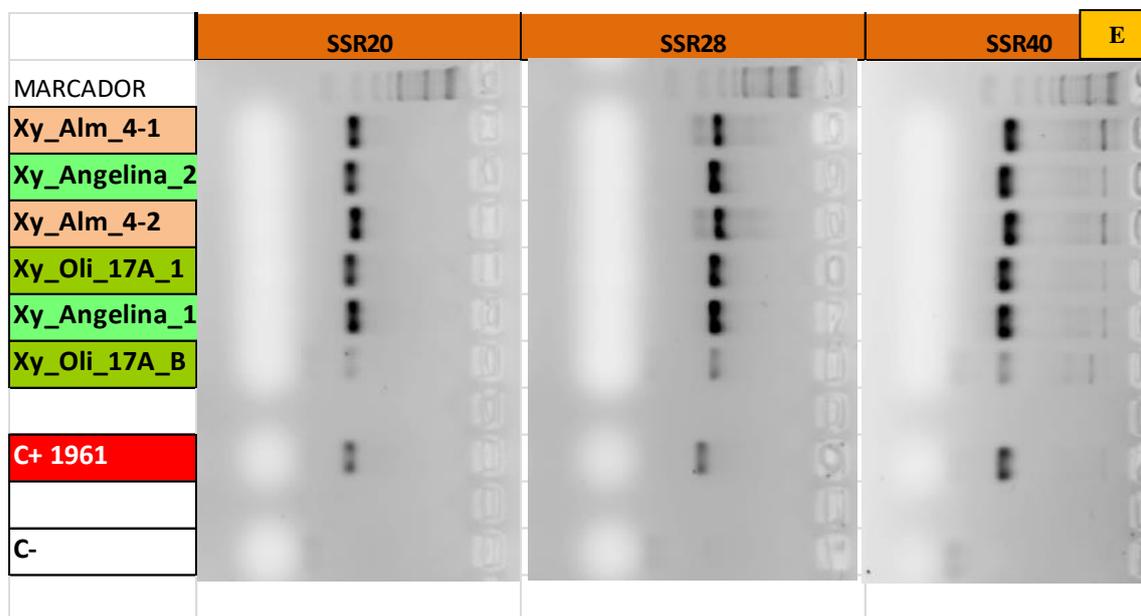


Figura 4.9. E. Perfil de bandeo con cebadores tradicionales SSR20, SSR28 y SSR40 de las cepas ALM4, AM2-Angelina, OLI17A. C+1961: control positivo, C-: control negativo, Marcador PM (Ladder 100 pb.). Corrida en gel de agarosa al 2%

Todos los cebadores SSR tradicionales de Lin *et al.* (2005) y Coletta-Filho *et al.* (2001) amplificaron en las tres cepas argentinas analizadas, observándose mayor variabilidad entre ellas que en relación al empleo de la combinación de cebadores de CoDiRO (MP1/MP2/MP3). Por lo tanto, con los SSR tradicionales, las cepas de Argentina se logran discriminar respondieron mejor en relación a las diferencias observadas en los perfiles alélicos apreciados visualmente. Esto podría deberse a que las cepas locales se encuentran filogenéticamente más relacionadas con los ST de Brasil que con el ST53 CoDiRO.

Se realizó un análisis filogenético con los cebadores SSR tradicionales anteriormente citados empleando las tres cepas argentinas (ALM4, OLI17A y AM2-Angelina) y un aislamiento de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* de olivo proveniente de la isla de Ibiza (España), utilizada como testigo enfermo (C⁺1961) (Figura 4.10). Los resultados arrojaron que las cepas AM2-Angelina y OLI17 se encuentran más relacionadas entre sí de acuerdo a la ubicación de la rama y separadas de la del ALM4 y a su vez, las tres están

alejadas de la cepa (C+ 1961). Estos resultados coinciden con lo observado en el perfil de bandeo de las corridas electroforéticas de esos microsátélites analizados individualmente en las Figuras 4.6.A, B; 4.7.C; 4.8.D; 4.9.E.

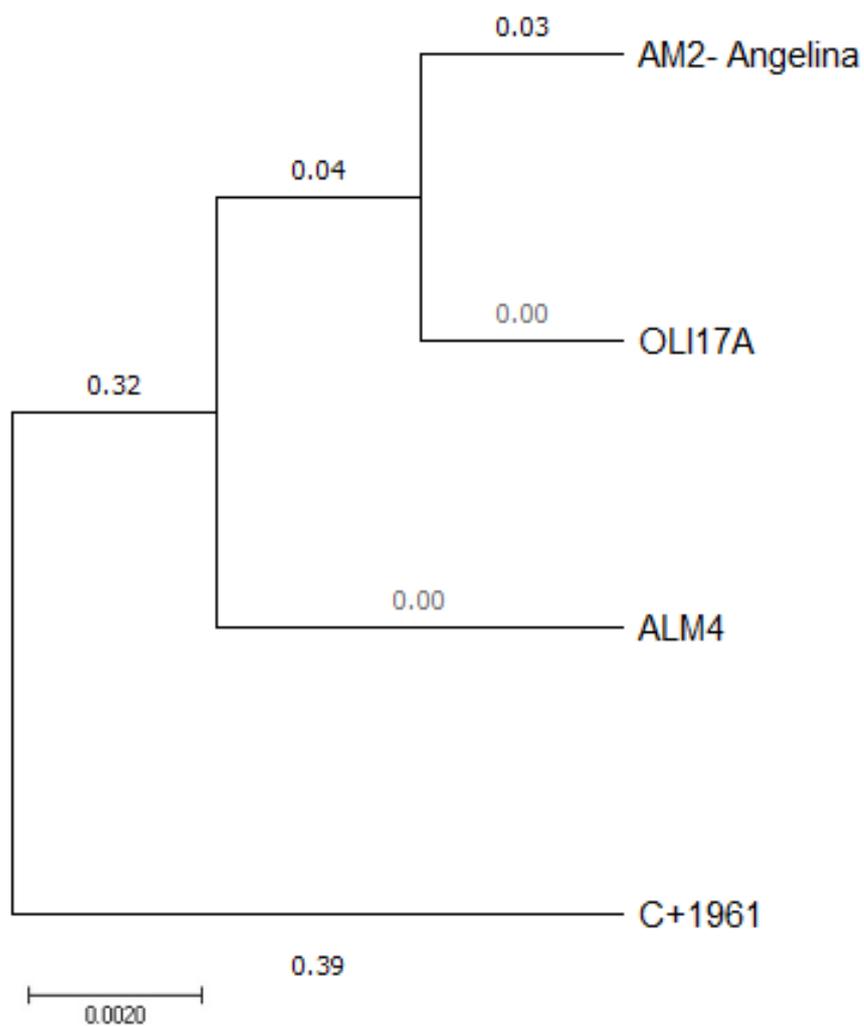


Figura 4.10. Árbol filogenético de las tres cepas argentinas (AM2-Angelina, OLI17A, ALM4) y un aislamiento (C⁺1961) proveniente de España. Realizado con el método Neighbor-Joining empleando el programa MEGA versión 11

Los resultados obtenidos a través de la secuenciación Sanger de los productos de PCR de las tres cepas ALM4, OLI17A y AM2-Angelina obtenidas fueron analizadas mediante el programa BioEdit en busca de las repeticiones de secuencias en tándem. Para las tres cepas analizadas las mayores diferencias en cuanto a número de repeticiones fue con los cebadores CSSR20, CSSR7 y el OSSR17. Con ASSR9, ASSR12 y CSSR10, se obtuvieron en los tres iguales números de repeticiones (2, 2 y 10, respectivamente) y con el GSSR7 no se tuvo repeticiones en ningún caso (Tabla 4.15).

Tabla 4.15. Número de repeticiones con los cebadores tradicionales para las tres cepas argentinas

Cebadores tradicionales	Secuencia repetida en tándem	Cepa ALM4 (repeticiones)	Cepa OLI17A (repeticiones)	Cepa AM2-Angelina (repeticiones)
SSR20	(ATTGCTG)	8	2	4
SSR40	(GAAGGCGTA)	5	3	na
CSSR7	(CTGTGC)	11	11	8
CSSR13	(TGTTGGGG)	8	12	16
CSSR20	(GTAGCA)	13	12	7
ASSR12	(GATTCAG)	2	2	2
SSR28	(GTGTGCCT)	na	9	9
CSSR6	(GCTGTA)	4	6	8
CSSR10	(CAATGA)	10	10	10
CSSR17	(CTGATGTG)	7	5	5
ASSR9	(CAAGTAC)	2	2	2
OSSR17	(TGCCTG)	11	11	8
GSSR7	(GGCAAC)	na	na	na

Nota: na (sin repeticiones)

Con la combinación de cebadores RP1 (CSSR6/CSSR7/CSSR10/ASSR9) y RP2 (CSSR17/CSSR20/GSSR7/OSSR17) no se obtuvo un marcado polimorfismo. Esto podría deberse que al ser cuatro cebadores por grupo hubo competencia entre ellos, por lo tanto, no fueron considerados para su posterior estudio.

Por su parte, las combinaciones RP3 (CSSR7/CSSR10) y RP4 (CSSR6/CSSR20), resultaron muy satisfactorios observándose polimorfismo con ambos grupos de cebadores en muestras de cítrico (Figura 4.11) y en olivo una marcada variabilidad, mostrando diferentes perfiles genéticos incluso en cepas de la misma región geográfica (Dpto. Arauco). La cepa de Córdoba también difirió en su patrón de bandeo respecto a las demás muestras. Fueron considerados los más adecuados por la notable variabilidad observada entre las cepas analizadas por la cantidad de repeticiones (Tabla 4.15). El cebador OSSR17 tiene un buen número de repeticiones como así también el CSSR6. Sin embargo, en las combinaciones de los dos juegos de cebadores se observó mayor polimorfismo de bandeo con el CSSR6 por tal motivo fue empleado este cebador (resultados no mostrados).

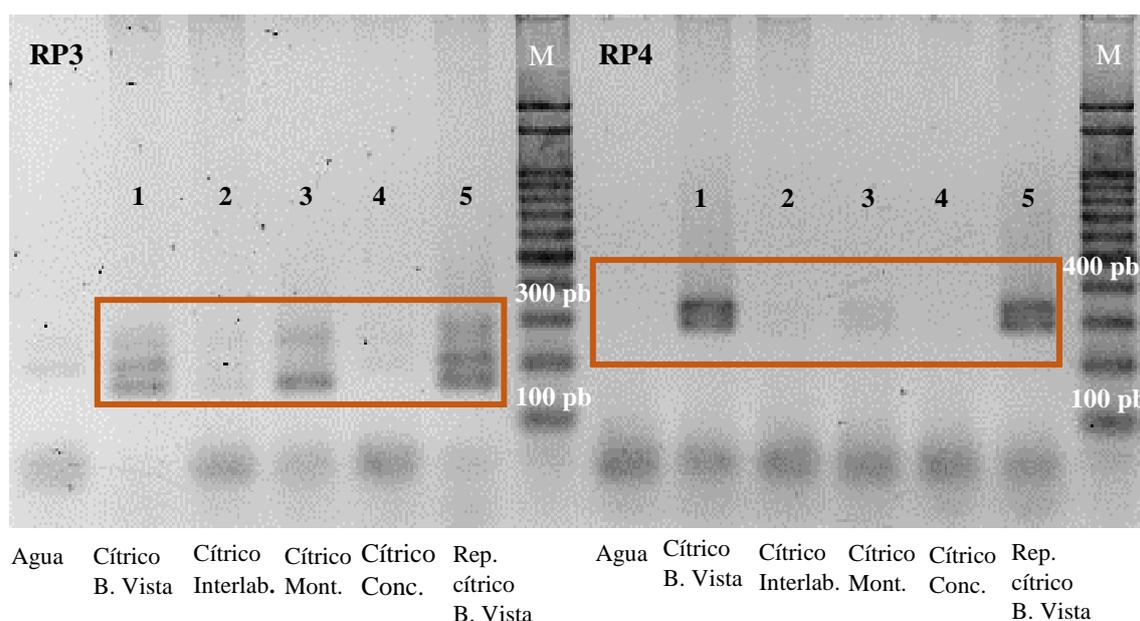


Figura 4.11. Perfil de bandeo con combinaciones de cebadores tradicionales (RP3 y RP4) en diferentes muestras de cítricos de nuestro país. Control negativo (agua). Marcados PM (Ladder100 pb.). Corridas en gel de agarosa al 2%

Un ensayo realizado por Giampetruzzi *et al.* (2019), distinguió claramente diferencias entre subespecies de *X. fastidiosa* e incluso tipos de secuencia (ST), pero también señaló variantes dentro de un mismo ST, que mediante los SSR se puede estimar con precisión los cambios de las características genéticas para comprender la dinámica,

el proceso evolutivo de las poblaciones, las vías de difusión, así como la adaptación a diferentes huéspedes y entornos. De ahí la importancia de seguir profundizando los estudios de este patógeno a nivel intraespecífico-genético, para conocer la existencia de diferentes poblaciones o variantes, su origen y la posibilidad de volverse patógena en hospedantes aún no informados, reforzando medidas de contención en nuestro país.

Según Coletta Filho *et al.* (2001), describieron la eficacia de la combinación de un conjunto de 9 cebadores SSR para evaluar la diversidad genética de cepas brasileñas de *X. fastidiosa* subsp. *pauca* que son responsables de la clorosis variegada de los cítricos (CVC).

Se observó con los cebadores tradicionales, mayor número de repeticiones comparado con los cebadores de la cepa CoDiRO de Italia, por lo tanto, las cepas argentinas, muestran mejor comportamiento con los cebadores de Lin *et al.* (2005) y de Coletta-Filho *et al.* (2001). A su vez, con las combinaciones RP3/RP4 de cebadores tradicionales se logró observar incluso, mayor polimorfismo, destacándose RP3 de RP4, visualizando una mayor diferencia a favor de la combinación RP3 (Figura 4.12) (Tolocka *et al.*, 2020).

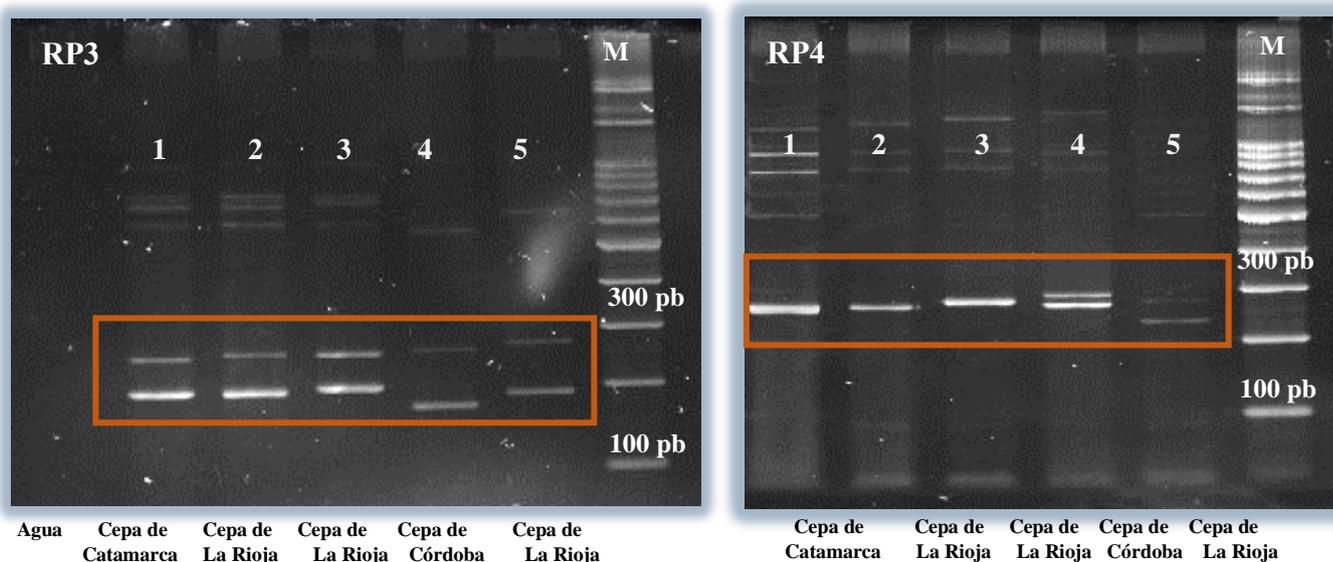


Figura 4.12. Perfil de bandeo con combinaciones de cebadores tradicionales (RP3 y RP4) de muestras de olivo infectadas con *X. fastidiosa* procedentes de La Rioja, Catamarca y Córdoba, marcador PM (Ladder 100 pb.), Control negativo (agua). Corridas en gels de poliacrilamida al 10%. Foto: Brandimarte, S.

Con la combinación de los pares de cebadores de RP3 se detectó variabilidad según el hospedante de la bacteria con el mismo ST. Se encontraron dos perfiles de bandeo diferentes correspondientes a muestras de cítrico y olivo, en tanto que sólo una banda se detectó en la muestra proveniente de almendro (Alm4) (Figura 4.13).

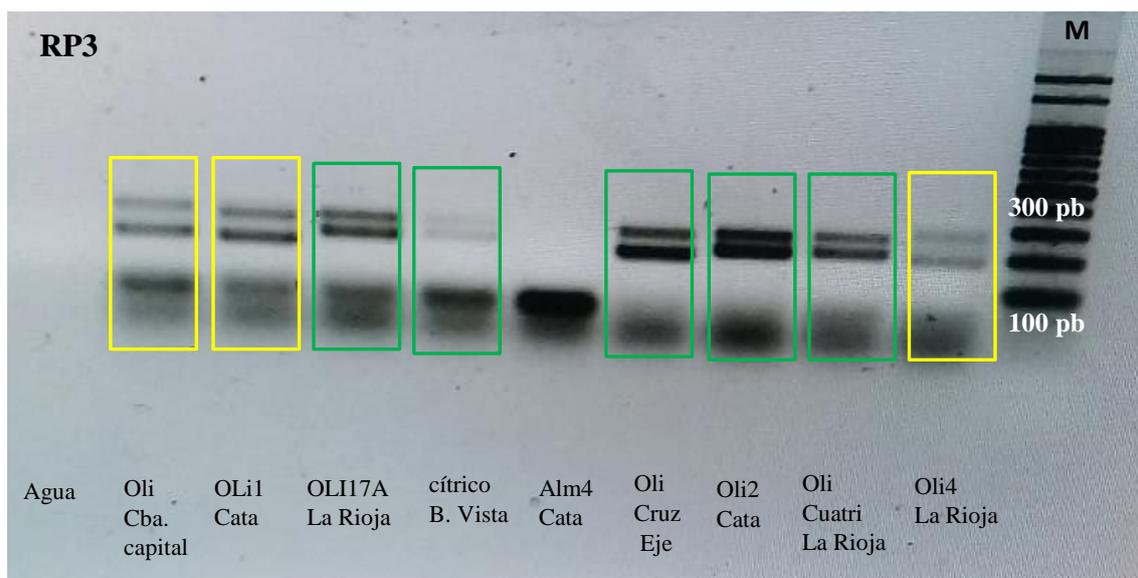


Figura 4.13. Perfil de bandeo con combinaciones de cebadores tradicionales (RP3) de muestras de olivo, cítrico y almendro infectadas con *X. fastidiosa* procedentes de Córdoba, Catamarca, La Rioja, Corrientes. Marcador PM (Ladder 100 pb.), control negativo (agua). Corrida en geles de agarosa al 2%. Foto: Brandimarte, S.

El análisis de las 24 muestras de olivo infectados con *X. fastidiosa*, incluyendo al testigo enfermo, procedentes de fincas de La Rioja, Córdoba y Catamarca usando la combinación de cebadores RP3, reveló diferentes polimorfismos dando diferente variabilidad genética tanto entre muestras procedentes de diferentes provincias como de la misma región geográfica. Se observó polimorfismos incluso entre el ST69 y ST78 de olivo, obteniéndose un total de 9 perfiles de bandeos distintos. En las muestras 1 y 2 hubo amplificación de bandeo, en la 3, 4 y TE el perfil de bandeo son semejantes, en la 5 se observó diferente polimorfismo de bandas, en la 6 un polimorfismo levemente diferente a las demás muestras, en 7 y 11 se detectó un diferente perfil de bandas entre ellas y también difieren del resto, 8 y 9 con polimorfismo similar entre sí, del mismo lote, distintas al resto de las muestras del gel 2, en la muestras 15,16, 17, 20 y 21 las muestras

presentan un perfil de bandeo semejante entre ellas, 26 y 28 tienen el polimorfismo más diferente de todas las muestras analizadas, 22, 23, 25 y 27 son similar en su perfil de bandeo y 24, 29 muestran distintos polimorfismos (Figura 4.14).

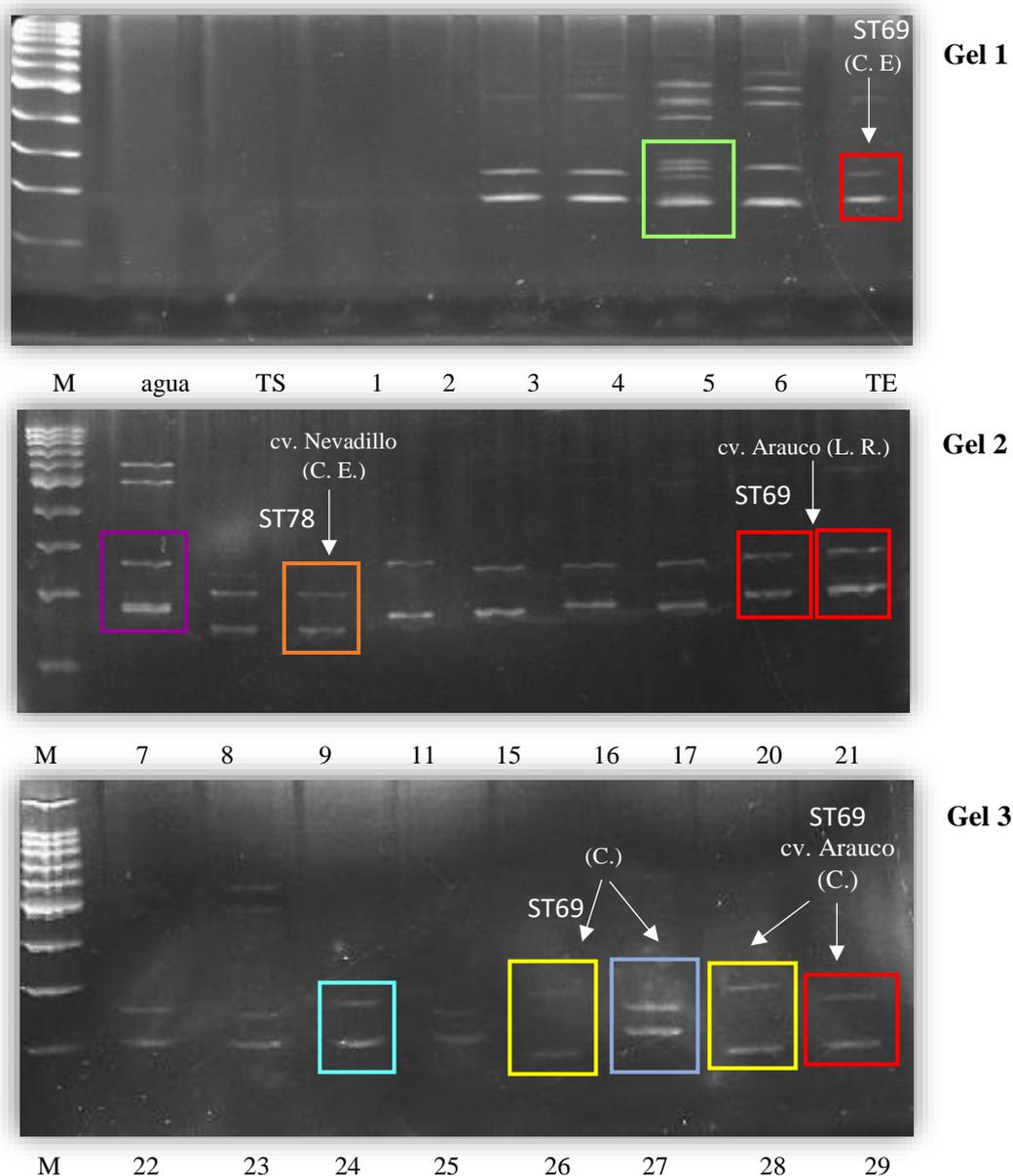


Figura 4.14. Perfil de bandeo con combinaciones de cebadores tradicionales (RP3) de muestras de olivo infectadas con *X. fastidiosa*, procedentes de diferentes plantaciones de las provincias de Córdoba, La Rioja y Catamarca. Las muestras 1-11 inclusive son del Dpto. Cruz del Eje-(C.E.) (cv. Nevadillo y Frantoio), de la 15-17 inclusive de Córdoba, Capital (C. C.) (cv. Oblonga), de la 20-25 y 28 inclusive son de La Rioja- (L. R.) (cv. Arauco), las muestras 26-27-29 son procedentes de Sumalao, Catamarca-(C.). Las muestras 26 y 28 resaltadas en cuadrante amarillo es la que muestra el perfil de bandeo más diferente en relación a las otras muestras analizadas. TS: olivo, TE: suspensión bacteriana de *X. fastidiosa* proveniente de olivo de Cruz del Eje, Marcador PM (Ladder 100 pb.), control negativo (agua). Corridas en gel de poliacrilamida al 10%. Foto: Brandimarte, S.

En el 2020, en la región de Apulia se llevaron a cabo ensayos con 37 pares de cebadores seleccionados de Coletta-Filho *et al.* (2001), Lin *et al.* (2005), Francisco *et al.* (2017) y cebadores propios de dicho estudio, analizando ADN genómico de cepas provenientes de plantas infectadas de dicha región y de otras y de representantes de la subespecie *pauca*, *fastidiosa*, *multiplex* y *sandy*. Con estos cebadores se obtuvieron amplificaciones donde se observó variantes dentro del mismo ST (Mazzaglia *et al.*, 2020), como los resultados obtenidos en este trabajo.

En nuestro caso, sólo con la combinación de dos juegos de cebadores (RP3) se encontró suficiente variabilidad como para diferenciar cepas y/o ADN infectado con la bacteria, dentro de un mismo grupo genético, con la posibilidad de incorporar otras posibles combinaciones de cebadores.

CONCLUSIONES

. - Se confirma la hipótesis que la subespecie *pauca* de *Xylella fastidiosa* encontrada en olivos de Argentina es la misma que está afectando plantas de cítricos y almendros.

. - En nuestro país, mediante el sistema MLST, se identificaron los grupos genéticos ST69 en cítricos y olivos, y ST78 en olivo y almendro. Por el momento, ambos grupos genéticos sólo han sido hallados en Argentina.

. - El análisis filogenético de las secuencias analizadas, mostró que el ST69 y ST78 están más relacionados genéticamente con el ST65 de cítricos que con el ST16 de olivo, ambos de Brasil (diferenciando con los STs de cítricos de Brasil en un par de alelos) y se encuentra menos emparentada con el ST53 CoDiRO, presente en olivares de Italia.

. - Hasta el presente, en Argentina, se han encontrado dos ST en muestras de olivo procedentes de diferentes provincias. Sin embargo, en cítricos de Brasil se obtuvieron, siete ST de la subsp. *pauca* y dos ST correspondientes a la subsp. *multiplex*, por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que estén presenten más variantes genéticas u otra subespecie en nuestro país.

. - Los tipos de secuencias de *X. fastidiosa* caracterizados en olivos provenientes de la región del Noroeste Argentino (NOA) y las de naranjos del Noreste Argentino (NEA) son iguales (ST69), constituyendo así un riesgo potencial de transmisión para las plantaciones cítrícolas de la región del NOA, donde aún no ha sido detectada la presencia de *X. fastidiosa*.

. - Se observó mayor polimorfismo con los cebadores SSR tradicionales de Lin *et al.* (2005) y Coletta-Filho *et al.* (2001) que con los cebadores CoDiRO (MP1/MP2/MP3); ésto podría deberse a que nuestras cepas se encuentran más emparentadas filogenéticamente a las de Brasil que a las de Italia.

. - Se puede inferir, además, que las cepas OLI17A, AM2-Angelina y ALM4 difieren entre sí de acuerdo al polimorfismo observado y al número de repeticiones. En

relación a la combinación de cebadores, RP3 permite detectar mayor variabilidad que RP4.

. – Respecto al análisis del árbol filogenético realizado con los microsatélites tradicionales, se mostró que las dos cepas de olivo (AM2-Angelina, OLI17A) procedentes de La Rioja están estrechamente emparentadas entre sí, pero distantes de la cepa de almendro (ALM4) originaria de Catamarca.

. - Los cebadores diseñados para la cepa CoDiRO (*X. fastidiosa* subsp. *pauca*) resultaron efectivos para visualizar variabilidad entre las cepas OLI17A, AM2-Angelina y ALM4 y de éstas respecto a las 27 cepas italianas analizadas en el IAS-CSIC en el año 2019 en Córdoba, España, donde se registró menor diferencia entre sus perfiles alélicos.

. - El sistema de caracterización MLVA constituye una herramienta adecuada para el análisis de nuevas cepas y proporcionar información sobre la dinámica de difusión del patógeno.

BIBLIOGRAFIA

- Almeida, R.P P., Nascimento, F.E., Chau, J., Prado, S.S., Tsai, C.W., Lopes, S. A., y Lopes, J.R.S. 2008. Genetic structure and biology of *Xylella fastidiosa* causing disease in citrus and coffee in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3690-3701.
- Aguilar, E., Villalobos, W., Moreira, L. y Rodríguez, C. M. 2005. First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica; *Plant Disease*, (89), 687.
- Anses. 2012. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à. Evaluation du Risque Simplifiée de *Xylella fastidiosa*. Avis de l'Anses Saisine n° 2012-SA-0121. [hrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.anses.fr%2Ffr%2Fsystem%2Ffiles%2FSVEG2012sa0121Ra.pdf&clen=1350776](http://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.anses.fr%2Ffr%2Fsystem%2Ffiles%2FSVEG2012sa0121Ra.pdf&clen=1350776).
- Baldi, P. y La Porta, N. 2017. *Xylella fastidiosa*: Host range and advance in molecular identification techniques. *Frontiers in Plant Science*. 8, 944. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00944>.
- Brlansky, R. H., Davis, C. L., Timmer, T. W., Howd, D. S. y Contreras, J. 1991. Xylem-limited bacteria in citrus from Argentina with symptoms of citrus (Abstract); *Phytopathology* (81), 1210.
- Bull, C.T.; De Boer, S.H., Denny, T.P; Firrao, G.; Fischer-Le Saux, M.; Saddler, G.S.; Scortichini, M.; Stead, D.E. and Takikawa, Y. 2012. List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). Prepared by the International Society of Plant Pathology Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria (ISPP-CTPPB). *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 21-27.
- Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible de la Junta de Andalucía (CAGPDS-JA) 2020. Red de Alerta e Información Fitosanitaria de Andalucía (RAIF). Nuevos focos de *Xylella fastidiosa* en Portugal. (http://www.juntadeandalucia.es/agriculturapescaydesarrollorural/raif/rss/-/asset_publisher/OpV27pD7buE7/content/id/4915022, verificado 18/05/2022).
- Carlucci, A., Lops, F., Marchi, G., Mugnai, L., Surico, G. 2013. Has *Xylella fastidiosa* “chosen” olive trees to establish in the Mediterranean basin?. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(3), 541–544.
- Cesbron, S., Dupas, E., Beaupère, Q., Briand, M., Montes-Borrego, M., Velasco-Amo, M., Landa, B. B., Jacques, M. 2020. Development of a Nested-Multilocus Sequence Typing approach for a highly sensitive and specific identification of *Xylella fastidiosa* subspecies directly from plant samples. *Agronomy*, 1-17 pp. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081099>.

- Coletta-Filho, H. D., Francisco, C. S., Lopes, J. R. S., Muller, C., Almeida, R. P. P. 2017. Homologous Recombination and *Xylella fastidiosa* host-pathogen associations in south america. *Phytopathology. Ecology and Epidemiology*, 107, 305-312. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0321-R>.
- Coletta-Filho, H. D., Takita, M. A., Souza, A. A., Aguilar-Vildoso, C. I., Machado, M. A. 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4091-4095.
- Coletta-Filho, H. D., and Machado, M. A. 2002. Evaluation of genetic structure of populations of *Xylella fastidiosa* from different *Citrus sinensis* varieties. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3731-3736.
- Coletta, F. H. D. y Machado, M. A. 2003. Geographical genetic structure of *Xylella fastidiosa* from citrus in São Paulo state, Brazil; *Phytopathology* (93), 28-34.
- Denancé, N.; Briand, M.; Gaborieau, R.; Gaillard, S.; Marie-Agnès, J. 2019. Identification of genetic relationships and subspecies signatures in *Xylella fastidiosa*. *BMC Genomics* 20, 239. doi.org/10.1186/s12864-019-5565-9.
- Denancé, N., Legendre, B., Briand, M., Olivier, V., De Boisseson, C., Poliakoff, F. y Jacques, M. A. 2017. Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France. *Plant Pathology*, 66, 1054-1064. <https://doi.org/10.1111/ppa.12695>.
- Dupas, E., Durand, K., Rieux, A., Briand, M., Pruvost, O., Cuntty, A., Denancé, N., Donnadiou, C., Legendre, B., Lopez-Roques, C., Cesbron, S., Ravigné, V., Jacques, M.-A. 2022. Two bridgehead invasions of *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* in France. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.02.11.480026>.
- EFSA Journal. EFSA Panel on Plant Health (PLH). 2015. Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction. *Options*, 13(1), 3989. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3989>.
- Elbeaino, T., Valentini, F., Abou Kubaa, R., Moubarak, P., Yaseen, T. y Digiario, M. 2014. Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* isolated from olive affected by “Olive Quick Decline Syndrome” in Italy, *Phytopathologia Mediterranea*, 53(3), 533-542. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr_15000
- EPPO Bulletin 2018. Diagnostics. PM 7/24 (3) *Xylella fastidiosa*, *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, 48 (2), 175-218. ISSN 0250-8052. <https://doi.org/10.1111/epp.12469>.
- EPPO, 2012. *Xylella fastidiosa* detected in a containment facility in France. <https://gd.eppo.int/reporting/article-2371>
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

- Francisco, C. S.; Ceresini, P. C.; Almeida, R. P. P. & Coletta-Filho, H. D. 2017. Spatial genetic structure of coffee-associated *Xylella fastidiosa* populations indicates that cross infection does not occur with sympatric citrus orchards, *Phytopathology* 107, 395-402. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-16-0300-R>.
- Giampetruzzi, A., Olivares, C., Loconsole, G., Saldarelli, P., Essaki, S., Saponari, M., Landa, B.B. 2019. Identification of multilocus SSR markers to assess genetic diversity of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, ST53, spreading in Apulia (southern Italy). 2nd European conference on *Xylella fastidiosa* (how research can support solutions). Pp. 50. <http://hdl.handle.net/10261/214972>
- Gutiérrez Hernández, O. y García, L. V. 2018. Incidencia de *Xylella fastidiosa* en las Islas Baleares y distribución potencial en la península ibérica, *Investigaciones Geográficas*, (69), 55-72. <https://doi.org/10.14198/INGEO2018.69.04>.
- Haelterman, R. M., Tolocka, P. A., Roca, M. E., Guzmán, F. A., Fernández, F. D., Otero, M. L. 2015. *Journal of Plant Pathology*, 97(2), 393. <https://doi.org/104454/JPP.V97I2.023>.
- Hartung, J. S., Beretta, J., Brlansky, R. H., Spisso, J. y Lee, R. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*, *Phytopathology*, (84), 591- 597.
- Kung, S.H. y Almeida, R.P.P. 2014. Factores biológicos y genéticos que regulan la competencia natural en un patógeno vegetal bacteriano. *Microbiología*, 160, 37-46. <https://doi.org/10.1099/mic.0.070581-0>.
- Kung, S. H. y Almeida, R. P. P. 2011. Natural Competence and Recombination in the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied And Environmental Microbiology*. 77(15) 5278–5284. <https://doi.org/10.1128/AEM.00730-11>
- Landa, B. B., Navas Cortés, J. A. y Montes Borrego, Miguel. 2017. Capítulo 2: Características generales de *X. fastidiosa*. En: Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. (Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales y María Milagros López, coord.). *Cajamar Caja Rural* (ed.) p.47.
- Landa, B. B., Castillo, A. I., Giampetruzzi, A., Kahn, A., Román-Écija, M., Velasco-Amo, M. P., Navas-Cortés, J. A., Marco-Noales, E., Barbé, S., Moralejo, E., Coletta-Filho, H. D.; Saldarelli, P., Saponari, M.; Almenida, R. P. P. 2020. Emergence of a plant pathogen in Europe associated with multiple intercontinental introductions, *Applied and Environmental Microbiology*, <https://doi.org/10.1128/AEM.01521-19>.
- Legendre, B., Mississippi, S., Oliver, V., Morel, E., Cruzillat, D., Durand, K., Portier P., Poliakoff, F., Jacques, M. A. 2014. Identification and characterisation of *Xylella fastidiosa* isolated from Coffee plants in France, *Journal of Plant Pathology*, 96, S4.100.

- Li, W., Raoult, D. y Fournier, P. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era, *Fems Microbiology Reviews*, 33, 892-916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x>.
- Lin H., Civerolo E. L., Hu, R.; Barros S., Francis M., Walker A. 2005. Multilocus Simple Sequence Repeat Markers for Differentiating Strains and Evaluating Genetic Diversity of *Xylella fastidiosa*. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4888-4892. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4888-4892.2005>.
- Lindstedt, B. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria, *Electrophoresis*, 26, 2567-2582. <https://doi.org/10.1002/elps.200500096>.
- Ling-Wei, W., Yu-Chen, L., Chiou-Chu, S., Ching-Ting, H., Shu-Ting, C. Ai-Ping, C., Shu-Jen, C., Chi-Wei, T., Chih-Horng, K. 2021. Complete Genome Sequence of *Xylella taiwanensis* and Comparative Analysis of Virulence Gene Content with *Xylella fastidiosa*, *Journal Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.684092>.
- Loconsole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T., Frasherri, D., Lorusso, D., Palmisano, F., Pollastro, P., Silletti, M. R., Trisciuzzi, N., Valentini F., Savino, V., Saponari, M. 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods, *Journal of Plant Pathology*, 96(1), 1-8.
- Loconsole, G., Saponari, M., Boscia, D., D'Attoma, G., Morelli, M., Martelli, G. P., Almeida, R. P. P. 2016. Intercepted isolates of *Xylella fastidiosa* in Europe reveal novel genetic diversity, *European Journal of Plant Pathology*, 146(1), 85-94. <https://escholarship.org/uc/item/2nh5b3vg> o <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0894-x>.
- Marcelletti, S. y Scortichini, M. 2016. Genome-wide comparison and taxonomic relatedness of multiple *Xylella fastidiosa* strains reveal the occurrence of three subspecies and a new *Xylella* species, *Archives of Microbiology*, 198, 803-812. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1245-1>.
- Marco-Noales, E., Barbé, S., Monterde, A., Navarro-Herrero, I., Ferrer, A., Dalmau V., Aure, C. M., Domingo-Calap, M. L., Landa, B. B., Roselló, M. 2021. Evidence that *Xylella fastidiosa* is the causal agent of Almond Leaf Scorch Disease in Alicante, Mainland Spain (Iberian Peninsula), *Plant Disease*, 105(11), 3349-3352, <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0625-SC>.
- Mazzaglia, A., Rahi, Y.J., Taratufolo, M.C., Tatí M., Turco S., Ciarroni, S., Tagliavento, V., Valentini, F., D'Onghia A. M., Balestra, G. M. 2020. A new inclusive MLVA assay to investigate genetic variability of *Xylella fastidiosa* with a specific focus on the Apulian outbreak in Italy, *Scientific Reports*, 10, 10856 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68072-5>.

- Morente, M., Cornara, D., Plaza, M., Durán, J. M., Capiscol, C., Trillo, R., Ruiz, M., Ruz, C., Sanjuan S., Pereira, J. A., Moreno, A., Fereres, A. 2018. Distribution and relative abundance of insect vectors of *Xylella fastidiosa* in Olive groves of the Iberian peninsula, *Insects*, 9(4). pii: E175. <https://doi.org/10.3390/insects9040175>.
- Nome, S. F., Haelterman, R. M., Docampo, D. M., Prata-Viera, A. G., Di feo, L. Del V. 1992. Escaldadura de las hojas del almendro en Argentina, *Fitopatología Brasileira*, 17, 57-60.
- Nunney, L., Vickerman, D. B., Bromley R. E., Russell, S. A., Hartman, J. R., Morano, L. D. y Stouthamer, R. 2013. Recent evolutionary radiation and host plant specialization in the *Xylella fastidiosa* subspecies native to the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7): 2189–2200. <https://doi.org/10.1128/AEM.03208-12>.
- Nunney, L., Ortiz, B., Russel, S. A., Sánchez, R. R., Stouthamer, R. 2014. The complex biogeography of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*: Genetic evidence of introductions and subspecific introgression in Central America, *Plos One*, 9(11), e112463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112463>.
- Olmo, D., Nieto, A., Borràs, D., Montesinos, M., Adrover, F., Urbano, A.; Pascual, A., Moralejo, E., García, J., Beidas O., Juan, Andreu. 2017a. *X. fastidiosa* en las Islas Baleares. En: Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. E. Marco-Noales, B. Landa y M. López (Coord.) Cajamar (ed). España, pp 231-261.
- Olmo, D., Nieto, A., Adrover, F., Urbano, A., Beidas, O., Juan, A., Landa, B. B. 2017b. First detection of *Xylella fastidiosa* infecting cherry (*Prunus avium*) and *Polygala myrtzfolia* plants, in Mallorca island, Spain, *Plant Disease*, (101)10, pp.1820. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0590-PDN>.
- Paccioretti, M., Roca, M., Tolocka, P. A., Otero, M. L., Gonzalez V., Taborda, R., Guzmán, F. A., Stivala, M. P., Bataglia, M. J., Beorchia Nigris, V., Haelterman, R. M. 2015. Relevamiento preliminar de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* en olivares de la República Argentina. XV Jornada Fitosanitaria Argentina. Santa Fe., Pp. 117. ISSN: 2451 – 8069.
- Parker, J.K., Havird, J.C., y De La Fuente, L. 2012. Differentiation of *Xylella fastidiosa* strains via Multilocus Sequence Analysis of Environmentally Mediated Genes (MLSA-E), *Applied and Environmental Microbiology*. 78:1385-1396.
- Retchless, A.C., Labroussaa, F., Shapiro, L., Stenger, D.C., Lindow, S.E., y Almeida, R.P.P. 2014. Genomic insights into *Xylella fastidiosa* interactions with plant and insect hosts. Pp. 177-202 En: Genomics of plant-associated bacteria. D.C. Gross, A. Lichens-Park, C. Kole, eds. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Roca, M. E., Tolocka, P. A., Otero, M. L., Pérez, J. C. y Haelterman, R. M. 2014. 3^{er} Congreso Argentino de Fitopatología. San Miguel de Tucumán. Pp. 169.

- Rodrigues, J.L.M., Silva-Stenico, M.E., Gomes, J.E., Lopes, J.R.S., y Tsai, S.M. 2003. Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and *gyrB* sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4249-4255.
- Saitou, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Saponari, M., Boscia, D., Altamura, G., Loconsole, G., Zicca, S., D'Attoma, G., Morelli, M., Palmisano, F., Saponari, A., Tavano D., Savino, V. N., Dongiovanni, C. y Martelli, G. P. 2017. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* associated to the olive quick decline syndrome in southern Italy, *Science Reporter*, 7(1), 17723. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17957-z>.
- Saponari, M., Boscia, D., Loconsole, G., Palmisano, F., Savino, V., Potere, O. y Martelli G. P. 2014. New hosts of *Xylella fastidiosa* strain CoDiRO in Apulia. <https://doi.org/10.4454/JPP.V96I3.008>. Abstract.
- Saponari, M., Boscia D., Nigro, F., Martelli G. P. 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 659-668.
- Scally, M., Schuenzel, E. L., Stouthamer, R. y Nunney, L. 2005. Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8491-8499.
- Schaad, N. W., Postnikova, E, Lacy, G., Fatmi, M. y Chang, C. J. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. [correction] *fastidiosa* [correction] subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(3), 290-300.
- Schuenzel, E. L., Scally, M., Stouthamer, R. y Nunney, L. 2005. A Multigene Phylogenetic Study of Clonal Diversity and Divergence in North American Strains of the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3832-3839.
- Sneath, P. H. A., Sokal R. R. 1973. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Tamura K., Nei M., Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.

- Tamura, K., Stecher, G., Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tolocka, P. A., Olivares García, C., Guzmán F. A., Landa Del Castillo, B. M., Haelterman, R. M. 2020. Variabilidad en cepas de *Xylella fastidiosa* procedentes de olivo (*Olea europaea* L.) de Argentina. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Naves Universitaria y Cultural de la ciudad de Mendoza. Modalidad virtual, 59 Pp. <https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/handle/20.500.12123/8405>.
- Tolocka, P. A., Mattio, M. F., Paccioretti M. A., Otero, M. L., Roca, M. E., Guzmán, F.A., Haelterman, R. M. 2017a. *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST69 in olive in Argentina. *Journal of Plant Pathology*, 99(3), 799-818. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3965>.
- Tolocka, P. A., Mattio, M.F., Otero, M. L., Paccioretti, M. D., Roca, M. E., Guzmán F.A., Haelterman, R.M. 2017b. Nueva secuencia tipo de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST78, obtenida de un aislamiento de almendro de Argentina. IV Congreso Argentino de Fitopatología, Pp 177.
- Tolocka, P. A., Otero, M. L., Torres, L., Taborda, R. J., Haelterman, R. M. 2014. Detección de *Xylella fastidiosa* en huertos de olivo de la región noroeste de la provincia de Córdoba. Actas del XXXVII Congreso Argentino de Horticultura-ASAHO, 33(82), Pp 103.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Van Belkum, A. 2007. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 49, 22-27. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00173.x>.
- Von Baczko, O. H., Aguirre, F., Roca, M. E., Battaglia, M. J., Flores, F., Kroneberger, E., Tolocka, P. A., Paccioretti, M., Haelterman, R.M. 2017. Monitoreo de *Xylella fastidiosa* en zonas olivícolas de Argentina. IV Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza, Pp. 168.
- Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R. y Nunney, L. 2010. Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Ecology and Epidemiology. Phytopathology*, 100 (6): 601-610.
- Vanhove, M., Retchless, A. C., Sicard, A., Rieux, A., Coletta-Filho, H. D., De La Fuente, L., Stenger, D. C., Almeida, R. P. P. 2019. Genomic Diversity and Recombination among *Xylella fastidiosa* Subspecies Crossref. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(13), 1-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02972-18>.

CAPÍTULO 5

SISTEMA DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y EVALUACIÓN DE TOLERANCIA/SUSCEPTIBILIDAD DE DOS CULTIVARES DE OLIVO INFECTADOS CON *X. fastidiosa*

INTRODUCCIÓN

Xylella fastidiosa fue descrita por primera vez hace 40 años y desde entonces se implementaron distintas técnicas para su detección. Técnicas serológicas como ELISA (Sherald y Lei, 1991), han sido validadas para cultivos de olivo, laurel de adorno, almendro, cítricos, roble, vid y otras especies vegetales, empleándose para la detección en tejidos de hojas (como pecíolos y nervaduras principales), tallos o ramillas descortezadas (Loconsole *et al.*, 2014). La muestra se prepara con tampón, utilizando morteros, homogeneizador de tejido o robots apropiados. También se desarrolló la técnica de inmunofluorescencia con fijación en membrana (MEIF, *membrane entrapment immunofluorescence*) (Hartung *et al.*, 1994), que se basa en la retención de las bacterias en membranas negras de policarbonato de 0,2 µm mediante filtración secuencial del extracto vegetal, y posterior tinción con sueros específicos. Las membranas se observan después en el microscopio de epifluorescencia.

En el año 2004, se estableció un protocolo para la identificación microscópica de la bacteria por inmunofluorescencia indirecta (Carbajal *et al.*, 2004), concluyéndose que era un método novedoso para la evaluación de la infección *in situ* de *X. fastidiosa* en plantas hospedantes. La técnica de inmunopresión (DTBIA, *direct tissue blot immunoassay*) para este patógeno (Djelouah *et al.*, 2014), es muy interesante porque permite la impresión directa en membrana, y posterior revelado de secciones directas de tejido

(pecíolos, ramillas) de olivo y otros huéspedes. La sensibilidad de todas estas técnicas es menor que la de las técnicas moleculares, pero pueden ser muy útiles en zonas donde ya está presente la enfermedad porque permiten procesar un gran número de muestras con rapidez y a un costo inferior al de las técnicas moleculares (López *et al.*, 2017). La técnica DAS ELISA es la que más comúnmente se emplea para el diagnóstico de *X. fastidiosa*. Sin embargo, la misma presenta dos limitantes para nuestro país, por un lado los kits comerciales han sido elaborados a partir de cepas de otras regiones, lo que podría interferir en la especificidad de detección de las cepas locales y por otro lado el costo que implica para el país la importación de tales reactivos.

En Argentina, no existe información acerca de la transmisión de *X. fastidiosa* en el cultivo de olivo. Se conoce que una vez que la bacteria es inoculada por el vector que la transmite, se dispersa por los elementos traqueales de los vasos xilemáticos. Los síntomas de la enfermedad aparecen varias semanas o incluso meses después de la inoculación y se manifiestan mucho más claramente durante los meses de verano y otoño, cuando existe la máxima demanda hídrica de la planta, que no puede ser satisfecha debido a la oclusión de sus haces vasculares (McElrone *et al.*, 2001). La severidad de la enfermedad parece que está directamente relacionada con la capacidad del patógeno para producir una infección sistémica, alcanzar alta concentración y colonizar el tejido vascular infectado (Hopkins, 1989). Posiblemente, la diferencia que existe en ciertas cepas de colonizar extensamente algunas plantas hospedantes susceptibles es lo que las distingue de otras en las que la colonización es mínima y en la que el patógeno se desarrolla como un endófito relativamente inofensivo sin causar síntomas (Chatterjee *et al.*, 2008a). Las enfermedades causadas por esta bacteria se han asociado con introducciones a larga distancia, la expansión geográfica de un vector invasivo y, posiblemente, con la adaptación del hospedante, a través de la recombinación homóloga (Almeida y Nunney 2015).

Comprobar la patogenicidad de *X. fastidiosa* es una tarea por lo general bastante compleja y requiere de varios meses incluso años en el caso de hospedantes perennes longevos. Se emplean plantas susceptibles y tolerantes a la bacteria. Las pruebas se realizan en macetas seleccionando hospedantes susceptibles y tolerantes. Las plantas deben estar mantenidas en invernáculos bajo condiciones controladas de fotoperiodo,

humedad a capacidad de campo y protegidas de insectos. Es importante que al momento de realizar las inoculaciones el sustrato de la maceta se encuentre seco y las condiciones ambientales favorezcan la transpiración de las plantas para la rápida absorción del inóculo inyectado. Se pueden incluir unas 10-15 plantas por ensayo y al menos 3-5 plantas como controles negativos (López *et al.*, 2017; EPPO, 2019). Las técnicas de inoculación deben asegurar la infiltración directa en los haces xilemáticos para que la bacteria comience a multiplicarse en los mismos, ya que es el único sitio donde se la encuentra. El método más utilizado es la punción con aguja en el tallo (técnica *pinprick*), al nivel de inserción del pecíolo, o un procedimiento general de pinchazo (Hill y Purcell, 1995; Almeida *et al.*, 2001). Para preparar el inóculo, las células bacterianas procedentes de medio de cultivo sólido se resuspenden en PBS o tampón succinato-citrato, intentando que la concentración de la suspensión sea alta (aproximadamente 10^9 UFC/ml). Se deposita una gota (de 10-50 μ l) de la suspensión en la axila de la hoja, pinchando varias veces con una aguja fina y repitiendo la inoculación en varias partes de la planta. Se espera de 5 a 10 minutos hasta que el inóculo se absorba. Alternativamente, puede pincharse directamente la planta con una aguja cargada con gotas de inóculo. Para incrementar la efectividad, las plantas se pueden volver a inocular a las 3-8 semanas después de la primera (López *et al.*, 2017). En olivo se han realizado pruebas de patogenicidad mediante inoculaciones en los cultivares Cellina Di Nardò, Frantoio, Leccino, Coratina, comprobándose una respuesta diferencial a la infección según susceptibilidad del cultivar (Saponari *et al.*, 2017). En nuestro país, se observó una elevada mortandad de plantas de olivo del cultivar Arauco en la localidad de Aimogasta, La Rioja, atribuyéndose a la susceptibilidad de este cultivar frente a infecciones por *X. fastidiosa*, y si bien se han utilizado otros métodos de diagnóstico, no se han realizado pruebas de patogenicidad que corroboren la sintomatología observada con la provocada por la bacteria.

La hipótesis planteada para este capítulo:

- *X. fastidiosa* es el principal agente causal del complejo etiológico denominado “Decaimineto Rápido del Olivo (DRO)”, siendo el cv. Arauco uno de los más susceptibles a la bacteria, pudiendo ser diagnosticada por sueros elaborados a partir de cepas locales

El objetivo general para este capítulo fue conocer el comportamiento de tolerancia/susceptibilidad de cultivares de olivo frente a la infección de la bacteria

Por lo tanto, los objetivos específicos fueron:

. - Poner a punto un método de diagnóstico serológico a partir de un suero elaborado con una cepa local de *X. fastidiosa* para su detección

. - Evaluar la respuesta de tolerancia/susceptibilidad de dos cultivares de olivo frente a la infección con *X. fastidiosa*

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de antisueros para la detección de *X. fastidiosa*

Obtención del inóculo

Para la elaboración del antisuero se utilizó la cepa ALM4 de *X. fastidiosa* proveniente de almendro debido a su mayor velocidad de crecimiento en comparación con la OLI17A, la primera aislada de olivo. El procedimiento fue el siguiente: partiendo de un adecuado crecimiento bacteriano de la cepa ALM4 de *X. fastidiosa* proveniente de almendro, en condiciones de esterilidad (cámara de flujo laminar), se agregaron 2 ml de solución fisiológica (0,85 % de NaCl estéril) a 15 cajas de Petri donde se encontraban las colonias bacterianas crecidas y repicadas en medio de cultivo PW. Como resultado se obtuvieron 30 ml de una suspensión bacteriana concentrada que fue trasvasada a microtubos, realizando tres lavados en solución fisiológica y centrifugado a 9.300 g durante 5 min. El precipitado obtenido fue resuspendido y se ajustó a una concentración de $1,9 \times 10^8$ UFC/ml ($OD_{600} = 0,24$) con la misma solución obteniéndose un total de 32 ml que fueron conservados a -20°C en alícuotas de 1 ml.

Proceso de Inmunización

Para la obtención de los sueros, se inmunizaron dos conejas de la raza Nueva Zelanda con la suspensión bacteriana e igual volumen de adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich, USA) en una relación 1:1 generando una emulsión. Antes de comenzar las inmunizaciones, se sangraron las conejas para obtener el suero preinmune.

Se realizaron en total nueve inmunizaciones y el esquema de inyecciones y obtención de los sueros fue el siguiente: primera inoculación con 4 inyecciones subcutáneas de 200 μ l en el lomo y dos intramusculares de 500 μ l en las patas traseras; segunda y tercera: a los 15 y 30 días de la primera inoculación aplicando únicamente inyecciones intramusculares de 500 μ l en cada pata trasera, siguiendo este esquema cada 15-20 días hasta la novena inmunización. La primera obtención de suero se realizó a los 21 días de la tercera inmunización. Luego se hicieron otras seis sangrías a intervalos de 15 días. De cada coneja se obtuvieron en total siete sueros con un volumen aproximado de 14-37 ml cada uno. Es de importancia destacar que el lugar donde se llevaron a cabo estos ensayos, fue el bioterio del Instituto de Patología Vegetal-IPAVE dependiente del Centro de Investigaciones Agropecuarias-INTA que se encuentra adherido al Sistema Nacional de Bioterio (SNB), RESOL-2018-681-APN-CD#INTA. Este reconocimiento es fundamental ya que se trabajó bajo directivas internacionales o estándares de referencias que promueven el cuidado y uso de animales de experimentación, priorizando el bienestar de los mismos. La sangre obtenida de cada sangría fue llevada a 37°C durante 2 ó 3 horas y luego a 4°C para que se forme el coágulo; a continuación, se centrifugó a 4500 g durante 5 min separándose el coágulo del sobrenadante. Cada suero fue alicuotado en volúmenes de 1 ml, almacenado a -20°C, previa adición de 50 % de glicerol para evitar la cristalización (Ball *et al.*, 1990) y 15 μ l/ml de 1,2 % de azida sódica (NaN₃) para la preservación de los mismos (Giolitti, com. pers., 2018).

Prueba de suero preinmune mediante la técnica NC ELISA

Con el primer sangrado de cada coneja se obtuvo el suero preinmune que fue analizado a través de la prueba de Dot Blot en membrana de nitrocelulosa (Fuente Delgado, 1990 y Hammond y Jordan, 1990) también denominado NC ELISA para verificar que el mismo no reaccione contra proteínas de planta sana (Anexo-Protocolo III). El procedimiento fue el siguiente: sobre dos membranas (una para cada coneja) se sembraron 6 μ l de tampón extracción, de extracto de planta sana de cítrico, olivo y almendro en dilución 1/10 (p/v) de tampón extracción con Tritón al 5%, y también de

suspensión bacteriana de *Xanthomonas* spp. y cultivo bacteriano de *X. fastidiosa* de olivo (cepa OLI17A) diluidos en TBS 1X. En este preinmune se empleó el tampón extracción para la preparación de muestras, ya que evita la fijación de restos vegetales y es el que se usa para las pruebas de DAS ELISA (Giolitti, com. pers., 2018). Las membranas aún húmedas fueron bloqueadas dentro de bolsitas de polietileno con TBS 1X, 5% leche descremada, y 5% Tritón para la remoción de restos de clorofila, en constante agitación durante 3-4 hs. Posteriormente las membranas fueron lavadas con el tampón TBS 1X. Los sueros se diluyeron 1/1000 en tampón antisuero y se colocaron en cada membrana en agitación constante durante 2 hs. Se realizaron 3 lavados de TBS 1X con Tween-20 cada 5 min. A continuación, las dos membranas fueron incubadas durante 1 h con el antisuero anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Goat anti-Rabbit (H+L)-AP conjugate, BIO-RAD) diluido 1/3000 en tampón antisuero). Posteriormente, se realizaron los lavados mencionados anteriormente en agitación constante y se revelaron las membranas con sustrato NBT-BCIP SIGMA-ALDRICH (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium) para la enzima fosfatasa alcalina, a una concentración de 0,5 mg/ml de agua, en un recipiente tapado con papel de aluminio. A la media hora, se detuvo la reacción con agua y se dejó secar las membranas evitando la exposición a la luz.

Titulación y comparación de sueros obtenidos

Titulación de los sueros obtenidos mediante Dot Blot

Los sueros de las distintas sangrías fueron titulados con la técnica de Dot Blot. Con el suero AsXf.1 (antisuero de *X. fastidiosa* correspondiente a la primera sangría), se emplearon diluciones de 1/5000, 1/10000, 1/15000 y 1/20000, frente a extractos de plantas sanas de almendro y olivo e infectadas con la bacteria, en una dilución de 1/10 (p/v) en tampón extracción, suspensión de *X. fastidiosa* como control positivo y tampón extracción como control negativo. La finalidad de esta prueba fue analizar el grado de reconocimiento y especificidad hacia antígenos de *X. fastidiosa*, comprobando que no

exista alguna reacción inespecífica contra planta sana y determinando el título de dicho suero. Dado que se observó una leve reacción en planta sana, los extractos vegetales fueron tratados con cloroformo en una relación muestra:cloroformo 2:1 (v/v) buscando eliminar el excedente de clorofila pero evitando el lavado de las proteínas (Giolitti, com. pers., 2018). Para los sueros AsXf.2 y 3 (antisueros de *X. fastidiosa* correspondientes a la segunda y tercera sangría) se realizaron diluciones seriadas desde 1/20000 a 1/320000 con las mismas muestras empleadas para el AsXf.1, continuando con la titulación de los mismos.

Los sueros AsXf.4,5,6 (antisueros de *X. fastidiosa* correspondiente a la cuarta, quinta y sexta sangría) fueron titulados con diluciones seriadas partiendo desde 1/80000 hasta 1/1280000 utilizando los mismos controles que se venían usando desde un principio. Respecto al suero AsXf.7 (antisuero de *X. fastidiosa* correspondiente a la séptima sangría), fue probado en las diluciones 1/500000, 1/1000000, 1/1500000, 1/2000000, 1/2500000.

Análisis comparativo de los sueros mediante PTA ELISA en placa

Se compararon los siete sueros obtenidos (AsXf.1-7) mediante ELISA indirecto en placa (PTA ELISA, “Plate Trapped Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) (Lommel *et al.*, 1982). La finalidad de esta prueba fue seleccionar el suero que mostrara mayor diferencia entre los valores de absorbancia de los testigos sanos y enfermos, para emplearlo en el desarrollo de otra técnica serológica que involucre el uso de inmunoglobulinas y conjugados. En los ensayos inmunológicos utilizados anteriormente (PTA ELISA y NC ELISA), se utilizó el suero crudo. Los sueros se emplearon en diluciones 1/500, 1/1000 y 1/2000 frente a suspensiones bacterianas (10^8 , 10^7 , 10^6 UFC/ml), extracto de planta sana y enferma de olivo 1/10 (p/v) y control positivo de AGDIA Inc-SRA 34503 para *X. fastidiosa*, diluidos en tampón de cobertura (Anexo-Protocolo IV). Las lecturas se realizaron cada 15 minutos hasta las dos horas de reacción leyendo a una longitud de onda de 405 nm (A405) utilizando el lector de microplaca multidetectores Synergy™ HTX.

Implementación de la técnica serológica DAS ELISA para el diagnóstico de *X. fastidiosa*

Se procedió a la puesta a punto de la técnica de DAS ELISA (Clark y Adams, 1977) (Anexo) con el suero seleccionado en la sección anterior, para lo cual se purificó la IgG precipitando 1 ml del mismo más 9 ml de agua con 10 ml de sulfato de amonio saturado y pasando a través de columna de celulosa o DEAE Sephacel-SIGMA. Con una fracción de IgG purificada, de concentración 1 mg/ml, ($OD_{280} = 1,4$), se elaboró el conjugado enzimático con fosfatasa alcalina de acuerdo al protocolo propuesto por Clark y Adams (1977) (Anexo-Protocolo V y VI).

Primera prueba: Se realizó la calibración del reactivo elaborado empleando diluciones de 1/500, 1/1000 y 1/2000 de la IgG con diluciones 1/500 y 1/1000 del conjugado enzimático. Se probaron suspensiones bacterianas de 10^7 y 10^5 UFC/ml de la cepa OLI17A y extractos de planta enferma 1/10 y 1/100 (p/v) procedente de olivo, control positivo AGDIA para *X. fastidiosa* y extractos de plantas sanas de olivo 1/10 (p/v), todos diluidos en tampón de extracción. Se desarrolló según especificaciones detalladas en el Anexo, dejando 2hs el conjugado (similar al protocolo utilizado en AGDIA). Las placas se leyeron con la misma modalidad realizada en el PTA ELISA, utilizando el equipo de lector de microplaca ya mencionado anteriormente, leyendo a una longitud de onda de 405 nm (A405).

Segunda prueba: En este ensayo se emplearon diluciones 1/1000 y 1/2000 de la IgG y conjugado, enfrentando extractos de plantas sanas de olivo y almendro, y extracto de planta de olivo enfermo, diluidos 1/10 y 1/100 (p/v) en tampón de extracción, empleándose como control positivo el de AGDIA. En este caso, el conjugado se dejó reaccionar 4hs a 28°C.

Tercera prueba: Para evaluar la calidad del reactivo elaborado con el kit comercial de AGDIA y analizar su especificidad con otras bacterias, se realizó un nuevo ensayo. Se utilizó la dilución 1/1000 para la IgG y conjugado. El kit comercial se lo empleó según las indicaciones del fabricante (1/200 IgG y conjugado). Se probó con *Xanthomonas citri*

subsp. *citri*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. savastanoi*, *Acidovorax avenae*, y suspensiones bacterianas de *X. fastidiosa* de 10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/ml de la cepa OLI17A, todas diluidas en tampón de extracción.

Cuarta prueba: Este ensayo se realizó para determinar si había inhibición en los análisis, debido al alto contenido de compuestos fenólicos presentes en plantas leñosas y perennes. El reactivo AsXf.4 y el kit AGDIA se utilizaron en las mismas diluciones probadas anteriormente, 1/1000 y 1/200, respectivamente. Se emplearon suspensiones bacterianas 10^5 y 10^4 UFC/ml en tampón de extracción, y 10^5 y 10^4 y 10^3 UFC/ml diluidas en extracto de plantas sanas de olivo de los cv. Manzanilla y cv. Farga de 1/10, 1/50 y 1/100 (p/v) en tampón extracción. Como control positivo se utilizó suspensión bacteriana del kit comercial.

Quinta prueba: Con las mismas diluciones del reactivo utilizado en el ensayo anterior, se incorporaron nuevas diluciones. A las suspensiones de la cepa OLI17A (10^5 y 10^4 UFC/ml en tampón de extracción, y 10^5 y 10^4 y 10^3 UFC/ml diluidas en extracto de planta sana de 1/10, 1/50 y 1/100 (p/v) en tampón extracción.) también se incorporó extracto de planta de olivo enfermo 1/10, 1/50 y 1/100 (p/v). Los controles sano y enfermo fueron los mismos que los empleados en la cuarta prueba, testigos sanos de olivo en diluciones 1/10 y 1/50 (p/v), ambos en tampón de extracción y como control positivo la suspensión bacteriana del kit comercial.

Sexta prueba: Para comparar la respuesta del AsXf.4 con el kit comercial de AGDIA se llevó a cabo otra prueba con una dilución del reactivo tanto para la IgG como para el conjugado, igual a la utilizada en el kit AGDIA: 1/200. Se emplearon como muestras en ambas placas: tampón de extracción, suspensiones bacterianas de 10^6 , 10^5 y 10^4 UFC/ml diluidas en 1/10 y 1/30 (p/v) de extracto de plantas sanas (de la dilución 1/50 se pasó a 1/30 para trabajar con aquella que sea más apta para los análisis), extractos de planta de olivo enferma 1/10 y 1/30 (p/v), y como controles sanos y enfermos se emplearon cuatros extracto de plantas sanas dilución 1/10 y 1/30 (p/v), y suspensiones bacterianas del testigo enfermo AGDIA diluido en 10^6 , 10^5 y 10^4 UFC/ml (v/v), todos en tampón de extracción.

Para esta última prueba, y en cada concentración bacteriana se realizó un análisis estadístico de varianza a través de modelos lineales mixtos para comparar los niveles de absorbancia entre los diferentes reactivos. Los sistemas quedaron definidos como la combinación de los factores reactivos (AGDIA y AsXf.4), las concentraciones del extracto de planta sana 1/10 y 1/30, las tres concentraciones bacterianas probadas (10^4 , 10^5 , 10^6 UFC/ml) y dos tiempos de lecturas (60 y 120 min).

Respuesta de dos cultivares de olivo frente a la infección con *X. fastidiosa*

Para verificar la patogenicidad de la bacteria en plantas de olivo, se realizaron pruebas de transmisión que consistieron en inoculaciones mecánicas a partir de la cepa OLI17A en plantas de olivo de los cvs. Arauco y Frantoio, previamente corroborada su sanidad por PCR. Los cultivares elegidos para estas pruebas fueron seleccionados de acuerdo al grado de susceptibilidad-tolerancia (Arauco-Frantoio) hacia la infección ocasionada por *V. dahliae* que se tomó como referencia para la comparación y extrapolación en relación a *X. fastidiosa*. El comportamiento de un cultivar frente a *V. dahliae* ha sido basado como criterio de selección de genotipos para ser evaluado frente a *X. fastidiosa* (Leon *et al.*, 2019).

Para la preparación del inóculo se emplearon 12 cajas de cultivo bacteriano en medio BCYE donde crecían las colonias de la cepa OLI17A C6 (4^{10} repique). Las mismas fueron extraídas con un ansa en rulo o Kolle y los loops bacterianos fueron colocados en un tubo que contenía 500 μ l de tampón fosfato de potasio estéril 0,05M, pH: 7,2. Luego, se ajustó a una concentración de $5,2 \times 10^8$ UFC/ml obteniendo 550 μ l totales que fueron inoculados en ambos cultivares.

El procedimiento fue el siguiente: se inocularon 11 plantas de olivo cv. Arauco (considerado susceptible) y 11 del cv. Frantoio (calificada como tolerante) de 1 año de edad fenológica, y como control sano 3 plantas de cada cultivar con tampón fosfato de potasio. El método de inoculación que se empleó fue el denominado *pinprick* (pinchazo de alfiler) (Lopes *et al.*, 2005) contemplando el protocolo establecido por Saponari *et al.*

(2017). Los puntos de inoculación-PI fueron 3 nudos consecutivos del tallo principal (mediante el empleo de una aguja hipodérmica estéril), realizando hasta 5 pinchazos en cada PI e introduciendo 7 μ l de inóculo en cada PI (Figuras 5.1 y 5.2). En plantas de dos ejes se realizaron en total 6 inoculaciones, mientras que en aquellas plantas de un único tallo se efectuaron 3 inoculaciones, este procedimiento se respetó para ambos cultivares.

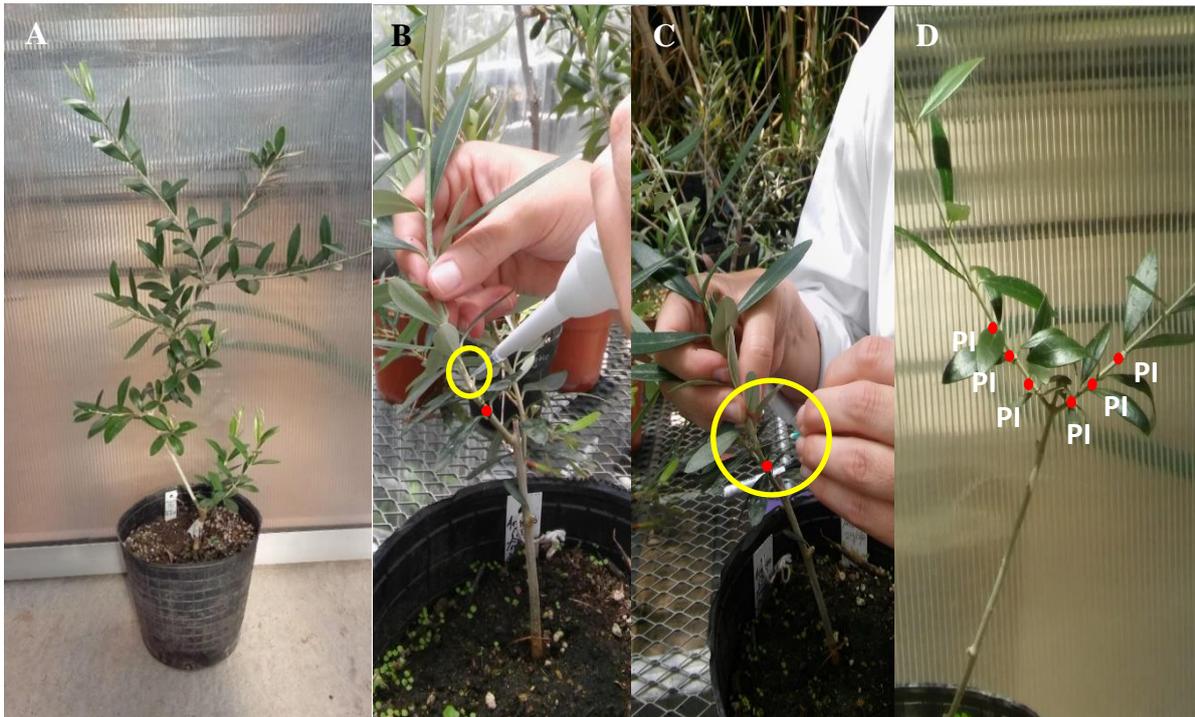


Figura 5.1. A. Olivo cv. Arauco de 1 año de edad fenológica. B. Colocación de una gota de 7 μ l del inóculo *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, cepa OLI17A sobre la epidermis del tallo principal de cada planta. C. Técnica *pinprick* (pinchazo de alfiler), en el cual se realizó hasta 5 pinchazos en cada entrenudo para el ingreso de dicha gota al sistema vascular (xilema). C. Punto de inoculación (PI) en los tres nudos consecutivos de cada rama principal

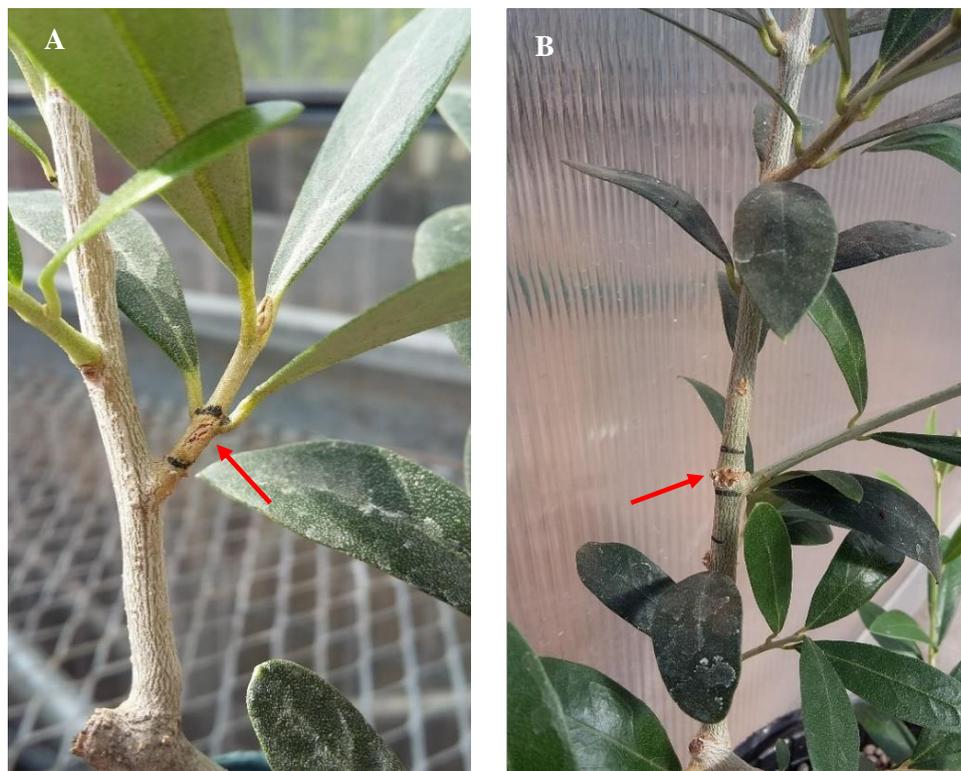


Figura 5.2. Señalización de la zona de inoculación donde se realizó el *pinprick* (pinchazo de alfiler) en cada rama de plantas de olivo cv. Arauco (A) y cv. Frantoio (B). Cada flecha roja indica el PI

Todas las plantas del ensayo fueron mantenidas en invernadero a temperaturas entre 32-38°C, riego a capacidad de campo dos veces por semana, libre de insectos y monitoreadas en espera del desarrollo de síntomas. Las plantas inoculadas con la bacteria fueron evaluadas por qPCR empleando los cebadores de Harper *et al.* (2010, erratum 2013) (XF-F, XF-R y sonda XF-P); FAO-IPPC, 2018 y cebadores que amplifican una parte del gen citocromo oxidasa de plantas (COX) (Tabla 5.1 y 5.2) como control interno positivo para evaluar la calidad de los extractos de ADN vegetal y la mezcla de dicha reacción (Li *et al.*, 2006). Se consideró positiva la reacción hasta un ciclo umbral (Ct) de 33 (Tabla 5.3). En las plantas con dos ramas inoculadas se analizó por separado cada rama. Este procedimiento fue contemplado de esta manera debido a que se desconoce la distribución de la bacteria dentro de la planta. Se tomaron hojas ubicadas en los PI (a) y

del nudo superior (b) para el primer análisis (3 meses) y de los nudos siguientes (b) para los 7 meses, 12 meses, 1 año y 4 meses y 2 años.

Tabla 5.1. Secuencia de cebadores y sondas para qPCR empleados en la detección de *X. fastidiosa*

Tipo	Nombre del cebador	Sentido (5' - 3')	Referencias
Forward (for.)	XF-F	CACGGCTGGTAACGGAAGA	Harper <i>et al.</i> (2010, erratum 2013)
Reverse (rev.)	XF-R	GGGTTGCGTGGTCAAATCAAG	
Sonda	XF-P	6-FAM-TCGCATCCCGTGGCTCAGTCC-BHQ-1	
Forward (for.)	COXf	GTATGCCACGTCGCATTCCAG	Li <i>et al.</i> , 2006
Reverse (rev.)	COXr	GCCAAAAGTCTAAGGGCATTCC	
Sonda	COXp	TET/ATCCAGATGCTTACGCTGG/BHQ_2	

Tabla 5.2. Protocolo qPCR y ciclado para *Xylella fastidiosa* con cebadores Harper *et al.* (2010, erratum 2013) (XF-F/XF-R) y control interno (COX)

Reactivos	Concentración final /reacción	Concentración de reactivo	Cantidad de reactivo/reacción (µl)
Tampón	1x	5X	5 µl
MgCl ₂	4 mM (2,5 mM)	25 mM	0,5 µl
dNTPs	0,2 mM	5 mM	0,5 µl
Cebador XF-F	0,3 µM	3 µM	2,5 µl
Cebador XF-R	0,3 µM	3 µM	2,5 µl
Sonda XF-P	0,1 µM	1 µM	2,5 µl
COX-F (control interno)	0,30 µM	6 µM	1,25 µl
COX-R (control interno)	0,30 µM	6 µM	1,25 µl
Sonda COX-P (control interno)	0,15 µM	3 µM	1,25 µl
Taq. DNA Polimerasa Promega	1,0 U	5 U/µl	0,2 µl
ADN molde			2 µl
AGUA sin nucleasas c.s.p.			3,05 µl

Tabla 5.3. Condiciones de ciclado para los cebadores Harper *et al.* (2010, erratum 2013)

Etapas	T°C	Tpo	Ciclado
Desnaturalización inicial	95	10 min.	
Desnaturalización	94	10 seg.	
Hibridación (T° Anneling)	62	40 seg.	x 39 ciclos

Análisis estadístico

Se realizó un estudio estadístico correspondiente a un modelo de análisis de regresión logística con valores de variables binarias 0 (qPCR negativo) y 1 (qPCR positivo), evaluando la probabilidad de obtener valores positivos para *X. fastidiosa* en ambos cultivares, de los diferentes sectores de las plantas analizadas (muestras) y en los distintos períodos de tiempos evaluados.

Postulados de Koch

Se efectuó el re-aislamiento de la bacteria en el cv. Arauco a los dos años de realizadas las inoculaciones. El procedimiento fue el mismo que el llevado a cabo en el Capítulo 2 del apartado: Métodos de aislamiento y evaluación de diferentes medios de cultivos específicos, empleando el BCYE (Schaad *et al.*, 2004; Krugner *et al.*, 2014). Para la comprobación de las colonias obtenidas se utilizaron los cebadores generales para *X. fastidiosa*. Según Saponari *et al.*, (2017), la bacteria debe ser re-aislada de tejidos sintomáticos alejados del punto de inoculación para completar los postulados de Koch.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elaboración de antisueros para la detección de *X. fastidiosa*

Técnica NC ELISA

De los sueros obtenidos, se obtuvo un volumen total de 169 ml (Tabla 5.4). Respecto a la prueba del preinmune se observó que las membranas de nitrocelulosa no quedaron totalmente bloqueadas ya que se visualizó un halo oscuro donde se sembraron los testigos sanos de olivo y almendro (Figura 5.3). Ésto podría deberse a los compuestos fenólicos y /o aceites esenciales que producen estos frutales (Muhittin y Hakan, 2018). Respecto a las demás suspensiones bacterianas no se observó reacción con *Xanthomonas* spp. ni *X. fastidiosa*.

Tabla 5.4. Volumen obtenido en cada sangría de las dos conejas

	Suero 1	Suero 2	Suero 3	Suero 4	Suero 5	Suero 6	Suero 7
	(ml)						
Total	26	22	37	32	14	14	24

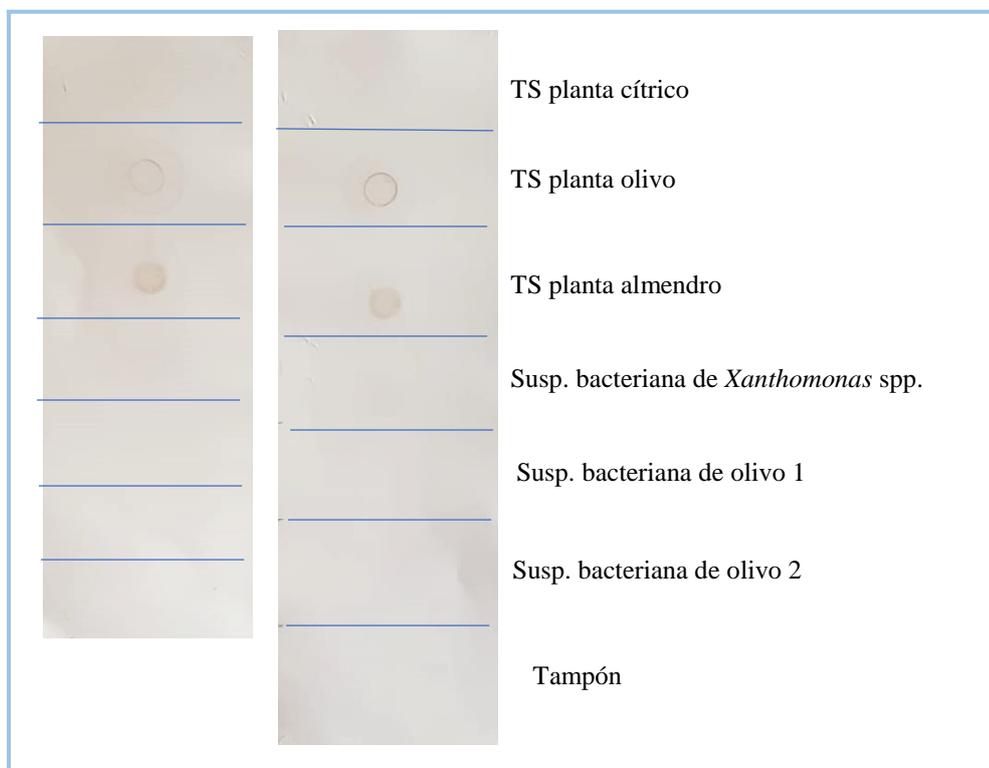


Figura 5.3. Prueba de suero preinmune por la técnica Dot Blot realizado en dos membranas, empleando suspensión bacteriana de *X. fastidiosa* de la cepa OLI17A, de *Xanthomonas* spp. y extracto de planta sana de olivo, cítrico, almendro y tampón de extracción

Titulación y comparación de sueros obtenidos

El tratamiento con cloroformo, permitió eliminar la reacción inespecífica presente en las muestras sanas, reacción observada en el preinmune principalmente de olivo y almendro, en los sueros analizados. Según se muestra en la Figura 5.4, empleando el suero AsXf.1 en dilución 1/1000 no hubo reacción con planta sana y se observó una reacción nítida del testigo enfermo. Esta mejora que se realizó sobre la técnica Dot Blot se implementó para el resto de las pruebas realizadas posteriormente con los demás sueros empleados.

De las titulaciones realizadas por Dot Blot con los diferentes sueros obtenidos (AsXf.1-7), se pudo observar que existe una respuesta importante de dichos sueros frente a extractos de planta enferma de olivo y suspensiones de *X. fastidiosa* de almendro y olivo y ausencia de reacción frente a planta sana, al eliminar la coloración inespecífica una vez tratadas con cloroformo. A continuación, se mencionan las diluciones probadas para cada suero en dicha técnica, utilizando a partir de las mismas y en adelante, el tratamiento con cloroformo.

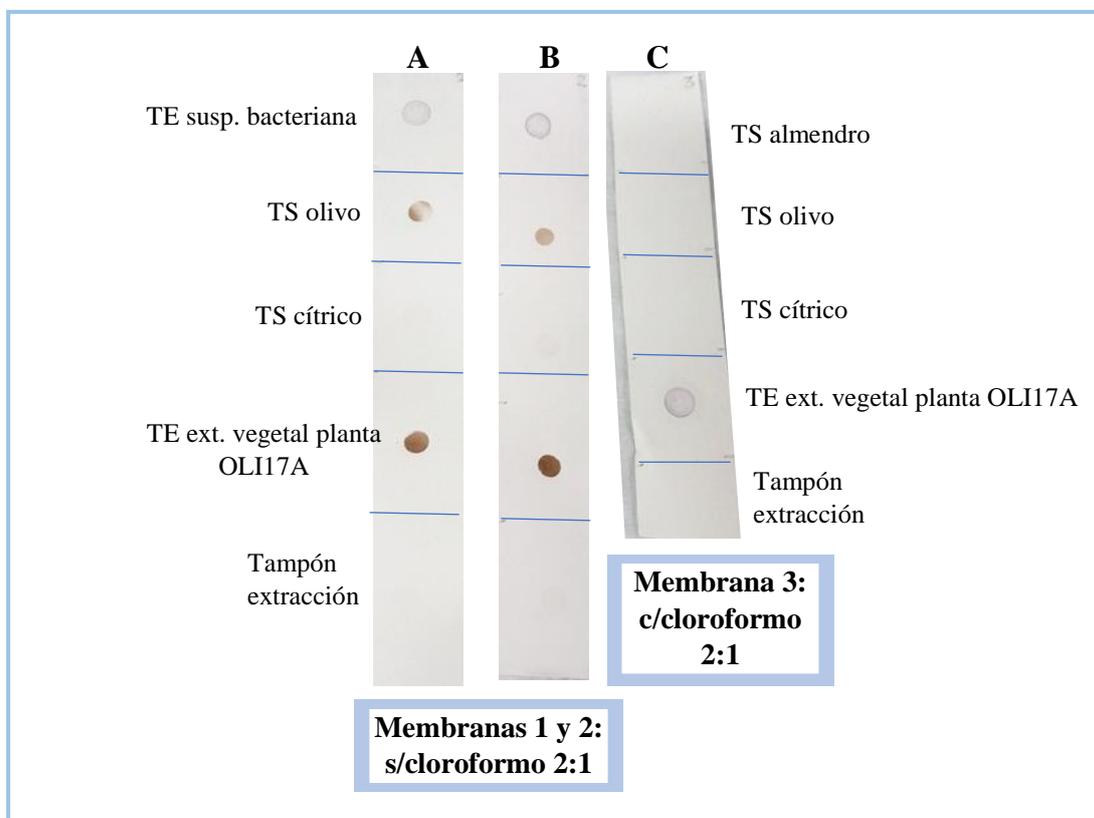


Figura 5.4. Técnica Dot Blot. A y B. Membranas de nitrocelulosa sin tratamiento con cloroformo. C. Membrana con tratamiento de cloroformo empleando la dilución 1/1.000 del suero AsXf.1

El suero AsXf.1 en las diluciones 1/5000, 1/10000, 1/15000 y 1/20000, detectó *X. fastidiosa* en el extracto de planta enferma de olivo y en la suspensión bacteriana de las cepas OLI17A y ALM4. No se detectó reacción inespecífica en los testigos sanos.

Los sueros AsXf.2 y 3, fueron probados individualmente con diluciones seriadas desde 1/20000 hasta 1/320000, reaccionando el extracto de planta enferma de olivo hasta 1/160000 (reacción muy suave que no se logra apreciar en la figura) y la suspensión bacteriana hasta la máxima dilución probada (Figura 5.5).

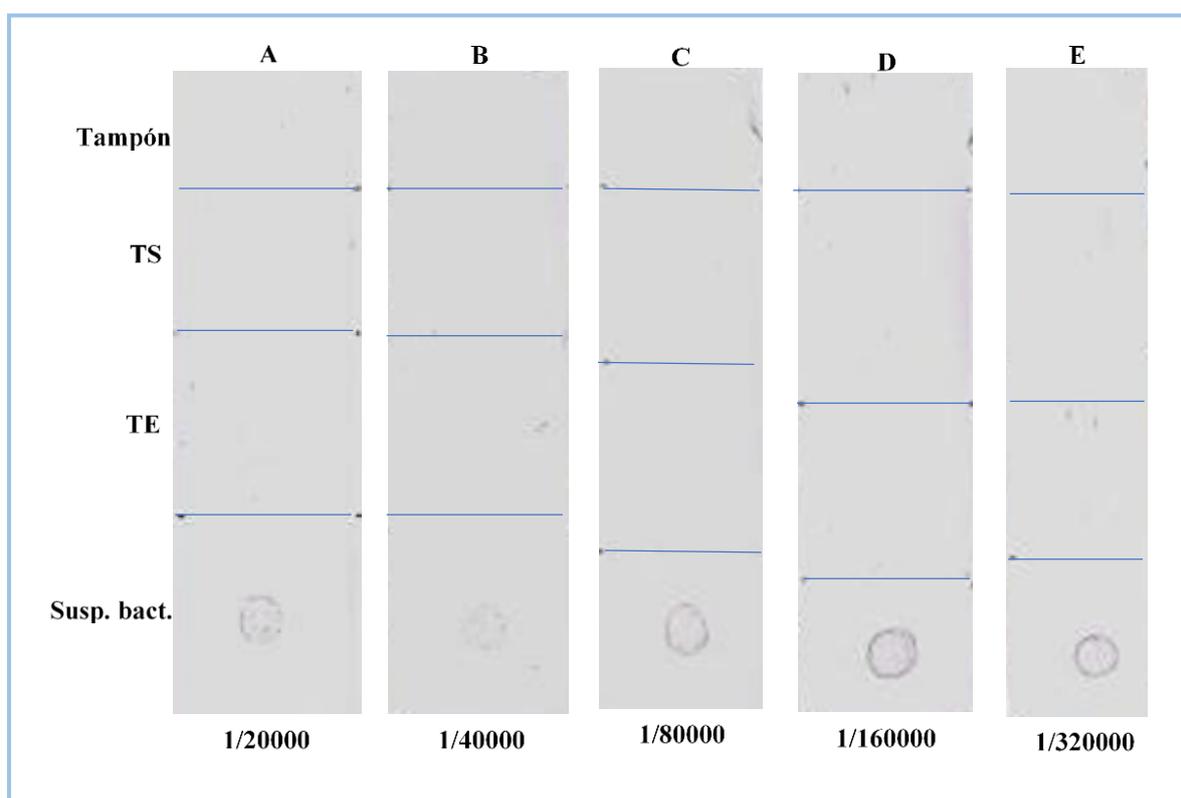


Figura 5.5. Técnica Dot Blot en membranas de nitrocelulosa. Detección de *X. fastidiosa*, utilizando diluciones de 1/20000, 1/40000, 1/80000, 1/160000 y 1/320000, de los sueros AsXf.2. TS: testigo sano, TE: testigo enfermo, Susp. bact.: suspensión bacteriana

Los sueros AsXf.4, 5 y 6, fueron titulados en las diluciones seriadas desde 1/80000 hasta 1/1280000, detectando la bacteria en la suspensión hasta 1/160000 y en el extracto

de planta de olivo enfermo hasta la máxima dilución probada, sin manifestar color (reacción inespecífica) el testigo sano.

El suero AsXf.7 detectó la bacteria en extracto de planta enferma en diluciones de 1/50000, 1/100000, 1/150000, 1/200000 y 1/250000.

El análisis comparativo de los 7 sueros obtenidos (AsXf.1-7) a través de PTA ELISA, permitió observar la mayor diferencia entre TS y TE de las distintas sangrías, en la dilución 1/2000, seleccionando el suero 4 (AsXf.4) por obtener el valor más alto de absorbancia, para la puesta a punto de la técnica DAS ELISA. Para los distintos sueros se empezaron con las diluciones que normalmente se emplean 1/1000 hasta 1/8000, pero como en las máximas diluciones el suero seguía reaccionando, en las siguientes pruebas se aumentaron las diluciones, a pesar de eso las diluciones de los sueros superaron los valores probados. Estos resultados eran los esperables. Existen antecedentes previos en la obtención de sueros y resultados comparables como las que se hicieron aquí. En el año 2013, en el laboratorio del IPAVE-INTA se elaboró otro suero para la detección de la bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* agente causal del raquitismo de las socas o RSD (*Ratoon Stunting Disease*). Este suero arrojó resultados comparables y muy satisfactorios (Tolocka *et al.*, 2014; Tolocka *et al.*, 2016).

Implementación de la técnica serológica DAS ELISA para el diagnóstico de *X. fastidiosa*

Primera prueba: Los testigos enfermos reaccionaron en la dilución empleada y la concentración 1/1000 de la IgG dio valores de absorbancia más altos con las diluciones del conjugado 1/500 y 1/1000 que con 1/2000.

Segunda prueba: En esta prueba los resultados del reactivo AsXf.4 fueron adecuados con las diluciones de la IgG y conjugado 1/1000, donde se observó diferencias en cuanto a valores de absorbancia entre el testigo enfermo OLI17A y los testigos sanos. Los valores de absorbancia correspondiente a la dilución 1/100 (p/v) del extracto vegetal

fueron más altos que 1/10, lo que se atribuyó a inhibición por el material vegetal molido. Las diluciones de *X. fastidiosa* de 10^4 , 10^5 y 10^6 UFC/ml tuvieron mejor respuesta en cuanto a reacción, prolongando la incubación a 4 horas en lugar de 2 horas.

Tercera prueba: El reactivo AsXf.4 detectó *X. fastidiosa* en forma específica, sin observarse reacciones cruzadas con las bacterias patógenas evaluadas: *X. citri* subsp. *citri*, *P. fluorescens*, *A. avenae*, *P. savastanoi*. El kit comercial reaccionó satisfactoriamente dando valores más altos de absorbancia.

Cuarta prueba: El kit comercial AGDIA reaccionó con valores de absorbancia más altos que el reactivo AsXf.4 y se observó inhibición en la dilución del extracto 1/10 en ambos sistemas. De las dos diluciones de IgG a partir del AsXf.4 empleadas, se obtuvieron resultados satisfactorios en la dilución de IgG 1/1000, dando valores muy bajos de absorbancia en los controles sanos y observándose inhibición en la dilución 1/10 de planta enferma, presentándose los mayores valores de absorbancia, en las diluciones de 1/50 y 1/100 (resultados no mostrados).

Quinta prueba: Se comprobó que hay inhibición en extracto de planta enferma 1/10 (p/v) y también en la suspensión de *X. fastidiosa* en extracto de planta sana 1/10, debido a que se obtuvieron valores de absorbancia más bajos que 1/50 y 1/100 para ambos sistemas. Estas dos últimas diluciones dieron valores de absorbancia muy semejantes. (Tabla 5.5 y 5.6)

Tabla 5.5. Esquema de siembra de las muestras analizadas en placas de poliestireno mediante la técnica DAS ELISA con reactivo AsXf.4 y kit AGDIA

	1	2	3	4	5	6
A	blanco	A1	A2	A3	A4	T
B	T	B5	B6	B7	B8	T
C	T	C9	C10	C11	C12	T
D	T	D13	D14	D15	D16	T
E	T	E17	E18	E19	E20	T
F	T	F21	F22	F23	F24	T
G	T	G25	G26	G27	G28	T
H	T	H29	H30	H31	H32	T

Referencias:

T: tampón extracción

A1-A2: suspensión bacteriana AM2-Angelina 1/100

A3-A4: suspensión bacteriana OLI17A 1/100

B5-B6-F23: suspensión bacteriana AM2-Angelina 1/100 en testigo sano A 1/10

B7-B8-F24: suspensión bacteriana OLI17A 1/100 en testigo sano A 1/10

C9-C10: suspensión bacteriana AM2-Angelina 1/100 en testigo sano A 1/50

C11-C12: suspensión bacteriana OLI17A 1/100 en testigo sano A 1/50

D13-D14: suspensión bacteriana AM2-Angelina 1/100 en testigo sano A 1/100

D15-D16: suspensión bacteriana OLI17A 1/100 en testigo sano A 1/100

E17-E18: suspensión bacteriana AM2-Angelina 1/100 en testigo sano B 1/10

E19-E20: suspensión bacteriana OLI17A 1/100 en testigo sano B 1/10

F21-F22: suspensión bacteriana AM2-Angelina 1/100 en testigo sano B 1/50

G25-G26: suspensión bacteriana OLI17A 1/100 en testigo sano B 1/50

G27-G28: suspensión bacteriana AM2-Angelina 1/100 en testigo sano B 1/100

H29-H30: suspensión bacteriana OLI17A 1/100 en testigo sano B 1/100

H31: testigo sano 1/10

H32: testigo enfermo (kit)

Tabla 5.6: Valores de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm (A405) obtenidos con el reactivo AsXf.4 y el kit AGDIA a la hora y 45 min

AsXf.4 (1 hs y 45 min)	1	2	3	4	5
A	0	1,734	1,516	0,019	0,017
B		0,52	0,556	0,004	0,007
C		1,375	1,344	0,014	0,016
D		1,444	1,413	0,013	0,013
E		0,352	0,322	0,005	0,006
F		0,921	0,864	0,521	0,007
G		0,015	0,017	1,24	1,076
H		0,019	0,015	0,011	3,106
Kit AGDIA (1 hs y 45 min)					
A	0	1,255	1,205	0,065	0,064
B		0,341	0,326	0,044	0,046
C		1,049	1,003	0,055	0,054
D		1,185	1,185	0,048	0,058
E		0,336	0,333	0,04	0,042
F		0,882	0,874	0,324	0,047
G		0,058	0,056	1,165	1,024
H		0,06	0,061	0,045	3,540

Sexta prueba: Las comparaciones del reactivo AsXf.4 en dilución 1/200 igual al del kit AGDIA (dilución de uso) fueron satisfactorias. Hubo inhibición con extracto de planta enferma molida 1/10 (p/v) y suspensiones de *X. fastidiosa* diluidas en extracto de planta sana 1/10, en ambos sistemas. A su vez, a la hora de reacción, todas las muestras fueron reconocidas con ambos reactivos en la concentración 10^6 UFC/ml. La dilución 10^5 UFC/ml fue reconocida sólo en la dilución 1/30 con ambos sistemas (AsXf.4 y AGDIA). A las dos horas de reacción, el AsXf.4 en la dilución de extracto 1/30, fue estadísticamente igual al kit comercial en sus lecturas a la hora de reacción en las concentraciones 10^5 y 10^6 UFC/ml. En cambio, 10^4 UFC/ml no fue reconocida para ninguno de los reactivos (Tabla 5.7).

El olivo es una planta que contiene sustancias, principalmente compuestos fenólicos que pueden causar inhibición en las pruebas de diagnóstico. Los resultados

obtenidos en este estudio coinciden con lo expuesto por Gorris (com. pers., 2020) quien menciona la dificultad que presenta el material de olivo para su análisis en el DAS ELISA, siendo importante una mayor dilución del extracto. Los protocolos comerciales (AGDIA) indican trabajar con la muestra en diluciones de 1/10 (p/v); sin embargo, en este trabajo se comprobó que con una dilución 1/30 se obtienen valores de absorbancia mayores, evitando de esta manera falsos negativos.

Tabla 5.7. Respuesta de los reactivos AsXf.4 y AGDIA frente a diferentes concentraciones de suspensiones de *X. fastidiosa* y tiempos de lectura

Tiempos de lectura (min)	Dilución del extracto	Reactivos	Concentración bacteriana (UFC/ml)												
			10 ⁴			10 ⁵			10 ⁶						
			Abs.	E.E.		Abs.	E.E.		Abs.	E.E.					
120	1/10	AGDIA	0,05	0,001	c	0,10	0,01	c	*	0,35	0,05	c	*	**	
		AsXf.4	0,02	0,001	b	0,03	0,01	e		0,16	0,02	d	*	**	
	1/30	AGDIA	0,06	0,010	c	0,19	0,04	ab	*	**	0,61	0,09	b	*	**
		AsXf.4	0,02	0,002	b	0,07	0,01	d	*	**	0,36	0,06	c	*	**
60	1/10	AGDIA	0,09	0,001	a	0,20	0,01	a	*	**	0,65	0,10	b	*	**
		AsXf.4	0,02	0,002	b	0,05	0,01	de	*		0,29	0,03	c	*	**
	1/30	AGDIA	0,10	0,010	a	0,36	0,07	a	*	**	1,11	0,14	a	*	**
		AsXf.4	0,02	0,002	b	0,12	0,01	bc	*	**	0,65	0,08	b	*	**

* Media estadísticamente diferente a la media de los testigos (0,09 para AGDIA a los 120 minutos y 0,05 para AGDIA a los 60 minutos. 0,02 para AsXf.4 en ambos tiempos). Abs.: absorbancia; EE.: error estándar.
 ** Media estadísticamente diferente a dos veces la media de los testigos (0,18 para AGDIA a los 120 minutos y 0,10 para AGDIA a los 60 minutos. 0,04 para AsXf.4 en ambos tiempos). Abs.: absorbancia; EE.: error estándar.

No se observó reacción con proteínas de plantas sanas (testigos sanos), confirmando así que el reactivo AsXf.4 pudo reconocer específicamente antígenos de *X. fastidiosa*. Con la dilución 1/200 de IgG y conjugado, se obtuvieron muy buenos resultados.

Además, se determinó que a mayores tiempos de lectura (2 hs de reacción) el reactivo AsXf.4, tendría un mejor comportamiento que a la hora de incubación, equiparándose de esta manera, con el kit comercial. Respecto a este último, se observó en la placa de polietileno coloración en los testigos sanos, aumentando sus valores de

absorbancia a las dos horas, no sucediendo lo mismo en la placa donde se encontraba el reactivo AsXf.4, donde los testigos sanos se mantuvieron incoloros.

Con respecto a la especificidad, no se obtuvieron reacciones cruzadas con las bacterias patógenas evaluadas.

El reactivo AsXf.4 además de ser probado en el laboratorio del IPAVE-INTA se verificó su eficacia de detección por la Dra. Marco Noales responsable del laboratorio de Bacteriología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de Valencia, España. Utilizó la técnica serológica DAS ELISA en una dilución de 1/800 de IgG y conjugado con diluciones de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 y 10^4 UFC/ml de *X. fastidiosa* proveniente de cítrico, almendro y olivo. También se probó con este reactivo dos cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, una de *Erwinia amylovora*, una de *X. fastidiosa* subespecie *pauca*, de cafeto (CFBP 8072, Ecuador) y tres de la subespecie *fastidiosa* proveniente de almendro (LMG 15099, Florida USA), vid (LMG 17159, California USA) y cerezo (IVIA 5235, Islas Baleares España) (E. Marco Noales y T. Gorris, com. pers., 2020).

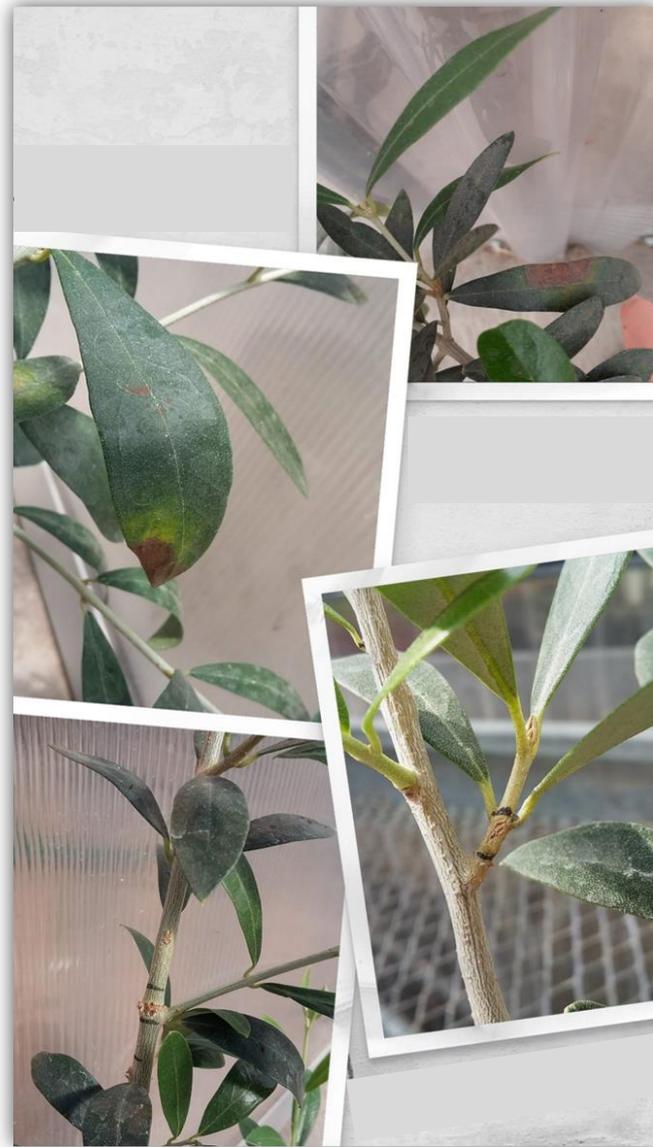
El ensayo permitió visualizar reacción de nuestro reactivo hasta la dilución de 1.10^6 UFC/ml de *X. fastidiosa* procedente de olivo y hasta 1.10^5 UFC/ml de la bacteria provenientes de cítricos y almendro. Además, reconoció todas las cepas de *X. fastidiosa*, de las dos subespecies probadas: *pauca* y *fastidiosa*. Respecto a la especificidad de los patógenos evaluados, hubo una leve reacción cruzada con *E. amylovora*. Cabe consignar que, el reactivo comercial AGDIA presenta reacción cruzada con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y *X. arboricola* pv. *pruni* (EPPO, 2018). Se resalta la importancia de esta evaluación donde fue corroborado lo consistente y robusto del sistema que se elaboró. En comparación con los antisueros monoclonales específicos, que mencionan que la sensibilidad y especificidad es mayor en un orden de magnitud menor (10^4 UFC/ml) en comparación con el sistema AGDIA (Gorris *et al.*, 2021).

Respuesta de dos cultivares de olivo frente a la infección con *X. fastidiosa*

Se observó que la metodología empleada fue apropiada para esta especie leñosa y que el inóculo inyectado de *X. fastidiosa* cepa OLI17A fue viable, dado que a partir de los 3 meses de efectuadas las inoculaciones, se obtuvieron resultados positivos por qPCR en el cv. Arauco, considerado susceptible a la bacteria, y no así en el cv. Frantoio. Hubo traslocación de la bacteria por los vasos xilemáticos, ya que fue detectada en los nudos subsiguientes al último PI; ésto se considera de importancia para saber si la bacteria se multiplicó en la planta o sólo quedó ocluida en los PI. En el caso de la planta N°7, *X. fastidiosa* no progresó ya que no fue detectada por qPCR en los siguientes análisis por encima del último PI. También es importante mencionar que la planta N°12 fue positiva para *X. fastidiosa* en los sectores analizados y en todos los períodos de tiempo evaluados, obteniendo el valor más bajo de Ct 20,09 a los 3 meses de inoculación, presentando alta concentración bacteriana. Le sigue en orden de importancia, la planta N°2 con un Ct 24,43 a los 24 meses de realizados las inyecciones (Tabla 5.8).

En relación a la sintomatología observada, los primeros síntomas de clorosis y necrosis apical denominada “punta de flecha”-PF, que sería atribuible a la bacteria, empezaron a manifestarse en plantas del cv. Arauco a partir del año y cuatro meses, como una pequeña necrosis apical en algunas hojas (Figura 5.6) y a los 2 años de inoculación, se vieron síntomas más marcados donde se detectó el secado de las hojas superiores de la rama principal de las plantas (Figura 5.7), como se observa a campo en plantaciones infectadas con la bacteria. En el caso del cv. Frantoio solo se observó amarillamiento en las hojas. El tiempo de aparición de los síntomas coincide aproximadamente con lo indicado en el trabajo de Saponari *et al.* (2017). Se comprobó que la sintomatología observada en las plantas infectadas bajo condiciones controladas en invernadero coincidía con la de plantas enfermas con *X. fastidiosa* presente en plantaciones comerciales a campo, teniendo un rol importante como agente causal de la enfermedad. Esta problemática se acentúa en algunos casos con la presencia de *V. dahliae* y con condiciones ambientales favorables para la bacteria (como la prevalencia de inviernos suaves), que permiten su supervivencia. A su vez, la presencia de un insecto-vector eficiente para la

transmisión y el abandono de las fincas invadidas por malezas, ponen en riesgo la supervivencia del cv. Arauco originario de Argentina, y muy apreciado no sólo por sus atributos organolépticos del aceite sino también como aceituna de mesa.



Figuras 5.6. Presencia de síntomas incipientes de necrosis en el borde y zona apical en hojas por encima de los puntos de inoculación en plantas cv. Arauco a los 16 meses del momento de inoculación con la suspensión de *X. fastidiosa*



Figura 5.7. Síntomas de rama seca en el extremo y necrosis apical-PF en la planta N°19 cv. Arauco (A, B, C, D). Presencia de síntomas de clorosis con puntos necróticos y necrosis apical en hojas de la planta N°12 cv. Arauco (E). En ambas plantas se observaron estos síntomas a los 24 meses del momento de inoculación con la bacteria

De acuerdo a los resultados obtenidos por qPCR, se detectó a los 3 meses de realizadas las inoculaciones, analizando el PI y nudo superior, 2 plantas enfermas (7 y 12) correspondiendo un 18% del total, a los 7 meses, analizando el segundo nudo desde el PI, 5 plantas resultaron positivas (2, 6, 8, 12 y 13), lo que representa un 45%. Los analisis realizados al año, contemplando el tercer nudo desde el PI, 2 plantas fueron

positivas para la bacteria (10 y 12), dando un 18%. El análisis del año y 4 meses, tomando hojas del cuarto nudo desde el PI, dió 6 plantas positivas (54%), en ese momento se observó la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad. El último qPCR realizado a los dos años, detectó la bacteria en el quinto nudo desde el PI, en 9 de las 11 plantas del cv. Arauco analizadas (82%), esto significa que en 9 plantas infectadas hubo traslocación de la bacteria través de los vasos xilemáticos en 5 nudos consecutivos de la rama, y la manifestación de síntomas en este período fue mucho más marcada con ramas secas en los extremos de las plantas infectadas. La planta 7 sólo dió positiva a *X. fastidiosa* en el análisis efectuado a los 3 meses, luego fue negativa en las sucesivas evaluaciones posteriores, lo que significa que el patógeno estaba en el PI, pero luego no se trasloco por la planta. Y la planta 5 no dio positiva por qPCR a los dos años de realizadas las inoculaciones, que se explica que, por algún motivo desconocido, la bacteria no continuó multiplicándose en el hospedante. Respecto al cv. Frantoio, solo una planta fue positiva a los 2 años sin manifestación de síntomas (Tabla 5.8). Es importante mencionar, que la planta N°12 fue detectada como positiva en todos los tiempos evaluados. Otras plantas no tuvieron los mismos resultados esperados en determinados períodos evaluados, dando registros valores negativos por qPCR, como las plantas N° 6, 8 y 13 que dieron registros negativos al año de inoculadas, después de haber dado positivo a los 7 meses. Sin embargo, en los siguientes análisis (16 y 24 meses) se detectó la bacteria en los nudos consecutivos. Ésto es debido a que la velocidad de multiplicación de la bacteria dentro de la planta no es homogénea y varía con el tiempo. Los controles sanos de ambos cultivares utilizados en el ensayo, se mantuvieron negativos en todos los momentos analizados.

Tabla 5.8. qPCR positivos (+) para *X. fastidiosa* en plantas de olivo cv. Arauco y Frantoio en diferentes momentos de análisis en relación a los días desde la inoculación

Cultivar	Períodos de tiempos evaluados				
	3 meses (CT) (PI + nudo superior)	7 meses (CT) (segundo nudo desde el PI)	12 meses (CT) (meses (tercer nudo desde el PI)	16 meses (CT) (cuarto nudo desde el PI)	24 meses (CT) (quinto nudo desde el PI)
Planta N°1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+) 30,99 c/síntomas
Planta N°2	(-)	(+) 28,86 (b)	(-)	(-)	(+) 24,43 c/síntomas
Planta N°5	(-)	(-)	(-)	(+) 32,56 c/síntomas	(-)
Planta N°6	(-)	(+) 32,46 (b)	(-)	(+) 29,58 c/síntomas	(+) 26,22 c/síntomas
Planta N°7	(+) 28,50 (a) 29,19 (b) (s/síntomas)	(-)	(-)	(-)	(-)
Planta N°8	(-)	(+) 31,00	(-)	(+) 31,38 c/síntomas	(+) 30,99 c/síntomas
Planta N°10	(-)	(-)	(+) 31,26	(-)	(+) 26,44 c/síntomas
Planta N°12	(+) 20,09 (a)	(+) 27,48 (b)	(+) 31,26 (b)	(+) 31,89 (b) (c/sínt. incipientes)	(+) 29,01 (b) (c/sínt. más marcados)
Planta N°13	(-)	(+) 30,61	(-)	(+) 31,68 c/síntomas	(+) 30,87 c/síntomas
Planta N°14	(-)	(-)	(-)	(-)	(+) 28,97 c/síntoma
Planta N°19	(-)	(-)	(-)	(+) 30,63 c/síntomas	(+) 26,34 c/síntomas
Frantoio Planta N°11	(-)	(-)	(-)	(-)	(+) 32,11 s/síntoma

Nota: a: Se extrajeron para el análisis pecíolo y nervadura principal de las hojas en los 3 PI (aprox. eran entre 2 a 6 hojas). b: Se extrajeron pecíolo y nervadura principal de las hojas subsiguientes por encima del último PI (aprox. eran entre 1 o 2 hojas) y de los siguientes nudos

Los resultados de patogenicidad obtenidos en este estudio son semejantes a los logrados en los ensayos realizados por Saponari *et al.* (2017), que señala que los síntomas iniciales en invernadero (marchitez, desecación y muerte progresiva) comenzaron a aparecer al año de realizada las inoculaciones en el cv. Cellina Di Nardò considerado altamente susceptible a *X. fastidiosa*, como sucede en Argentina con el cv. Arauco. A los 13-14 meses, los síntomas progresaron rápidamente y a los 24 meses el cv. Cellina Di Nardò mostró los brotes superiores completamente secos, tal como sucedió con tres plantas del cv. Arauco utilizada en nuestros análisis (6, 10 y 19). El cv. Cellina Di Nardò fue altamente susceptible a la bacteria con la aparición de una marcada sintomatología que sería atribuida a una mayor concentración bacteriana. Respecto a los otros cultivares evaluados en ese ensayo, la aparición de síntomas en los cvs. Leccino y Frantoio, fue recién a los 2 años. Se menciona según estos investigadores, que el período de latencia de la bacteria en plantas jóvenes de olivo (12 ó 18 meses) puede exceder el año debido a que es más lenta la colonización de la bacteria en olivo que en cítricos y vid (Saponari *et al.*, 2017). El comportamiento a invernadero que tuvo el cv. Arauco en cuanto a la sintomatología observada en nuestro ensayo fue semejante a los obtenidos con el cv. Celia Di Nardo en Italia al cabo de los 2 años.

Se observó en fincas de Aimogasta donde se realizó un seguimiento continuo en plantas enfermas del cv. Arauco de más de 50 años, un aumento progresivo de la sintomatología en poco tiempo debido a una mayor colonización de la bacteria, ocasionando la muerte de ejemplares con marcado deterioro. Hubo una alta correlación entre la presencia de la bacteria en las plantas analizadas y la sintomatología observada a campo (M. Paccioretti, com. pers., 2018). Por lo anterior, se considera que el cv. Arauco sería altamente susceptible a la infección ocasionada por la bacteria (Paccioretti *et al.*, 2015). Relacionando a otros hospedantes, los síntomas en naranjo suelen aparecer 4-10 meses después de la inoculación, mientras que en vid aparecen a los 2 ó 4 meses, pero en café pueden tardar en visualizarse hasta 1 ó 2 años. En el caso de olivo se ha observado que los síntomas en invernadero tardan hasta 12 meses (Saponari *et al.*, 2017).

A campo, los ataques por la cepa De Donno (DD) causante del OQDS provoca la muerte de los árboles a los pocos años de la aparición de los síntomas. Los cultivares

locales altamente susceptibles 'Cellina di Nardò' y 'Ogliarola salentina' son los más afectados. Estos árboles sintomáticos se someten a una poda intensa para estimular un nuevo crecimiento, pero la nueva vegetación pronto se marchita y se seca (Martelli, 2016).

Análisis estadístico

Del análisis estadístico de regresión logística, se obtuvo un gráfico que corresponde a los datos de predichos por el modelo de regresión (Figura 5.8). En relación a la pendiente se observó que la tendencia de la curva es progresiva ascendente, demostrando que, por cada día de progreso de la enfermedad, aumenta la probabilidad de detectar esta patología en los períodos evaluados (3, 7, 12, 17 y 24 meses).

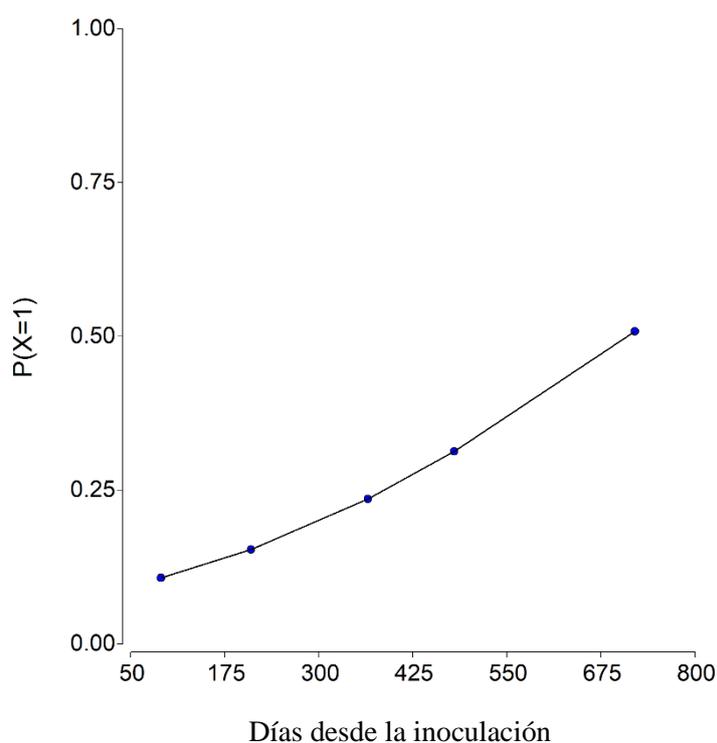


Figura 5.8. Análisis de regresión. Probabilidad de que la reacción de qPCR resulte positiva en función de los días desde la inoculación en que se realizaron los análisis mediante esta técnica. Los datos en eje X corresponden a los días desde la inoculación y los datos en el eje Y es la probabilidad $P(x=1)$ de obtener un qPCR positivo

La curva de progreso de la enfermedad estimada en el tiempo, fue explicada mediante el siguiente modelo logístico: Se calcularon los intervalos de confianza para un nivel de confianza del 95% de la proporción de qPCR, evaluando si ésta es diferente de cero. A continuación, se indican con un asterisco, los días desde la inoculación donde la proporción de plantas del cv. Arauco con qPCR positivas fue diferente a lo obtenido en el cv. Frantoio. Se obtuvieron diferencias significativas entre el cv. Arauco y el cv. Frantoio (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Parámetros evaluados en función de los cv. Arauco y Frantoio analizados en función de los días desde la inoculación

Parámetros	Estimación	E.E.	Wald Chi ²	p- valor
Constante	-2.42	0.53	21.23	<0.0001
Fecha	3.40E-03	1.10E-03	10.12	0.0015

Días desde la inoculación	LI (95%)	LS (95%)
90	-0.04	0.22
210	0.07	0.47*
365	-0.04	0.22
480	0.11	0.53*
720	0.32	0.77*

Postulados de Koch

Se logró re aislar la bacteria desde la planta N°19 en medio BCYE. Fue seleccionada esa planta porque manifestó la mayor cantidad de síntomas (rama seca en el extremo apical de la parte aérea) y tuvo uno de los Ct más bajo a los 24 meses de realizada la inoculación (Ct 26,34), por lo tanto, una de las mayores concentraciones bacteriana. Se obtuvieron muy pocas colonias incipientes, muy pequeñas en algunas impresiones sobre el medio mencionado a los 9 días de realizado el aislamiento. Las características morfológicas de las mismas fueron similares a las citadas en la sección de resultados del Capítulo 3: aspecto translúcido, convexo y opalescente, de borde circular, algunas con márgenes enteros y otros levemente ondulados, de aspecto superficial suave, de textura viscosa, de tamaño aproximado de 25 micras y carencia de pigmentos. Su identidad fue confirmada a través de los cebadores generales RST31/33 para *X. fastidiosa*, completando de esta manera los postulados de Koch, igualmente que en Italia según Saponari *et al.* (2017), demostrando, de esta manera, que la bacteria sería la causante del decaimiento rápido de los olivos en las principales zonas afectadas, como en la localidad Aimogasta del Dpto. Arauco. En la Figura 5.9, se muestra la amplificación de tamaño esperado a la misma altura del TE, confirmando la presencia de la bacteria que fue re-aislada de la planta tratada. Por lo tanto, se puede confirmar que el patógeno *X. fastidiosa* subsp. *pauca* es el responsable de ocasionar los síntomas observados tanto a campo como en condiciones de invernáculo y que por consiguiente es el agente causal de la enfermedad conocida internacionalmente como declinamiento súbito del olivo (*Olive Quick Decline Syndrome-OQDS*) (Figura 5.10).

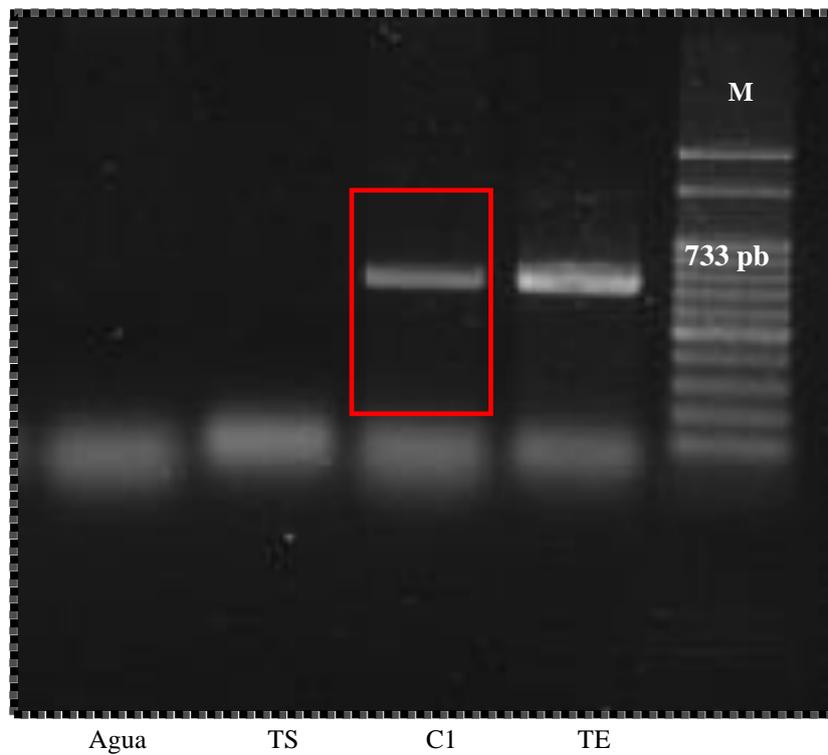


Figura 5.9. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. C1: Suspensión de una colonia de *X. fastidiosa* proveniente de la planta N°19 de olivo cv. Arauco que fue inoculada con la cepa OLI17A, Agua: Control negativo, TS: testigo sano planta de olivo, TE: suspensión bacteriana de la cepa OLI17A. Marcador PM (Ladder100 pb). Foto: Tolocka, P.

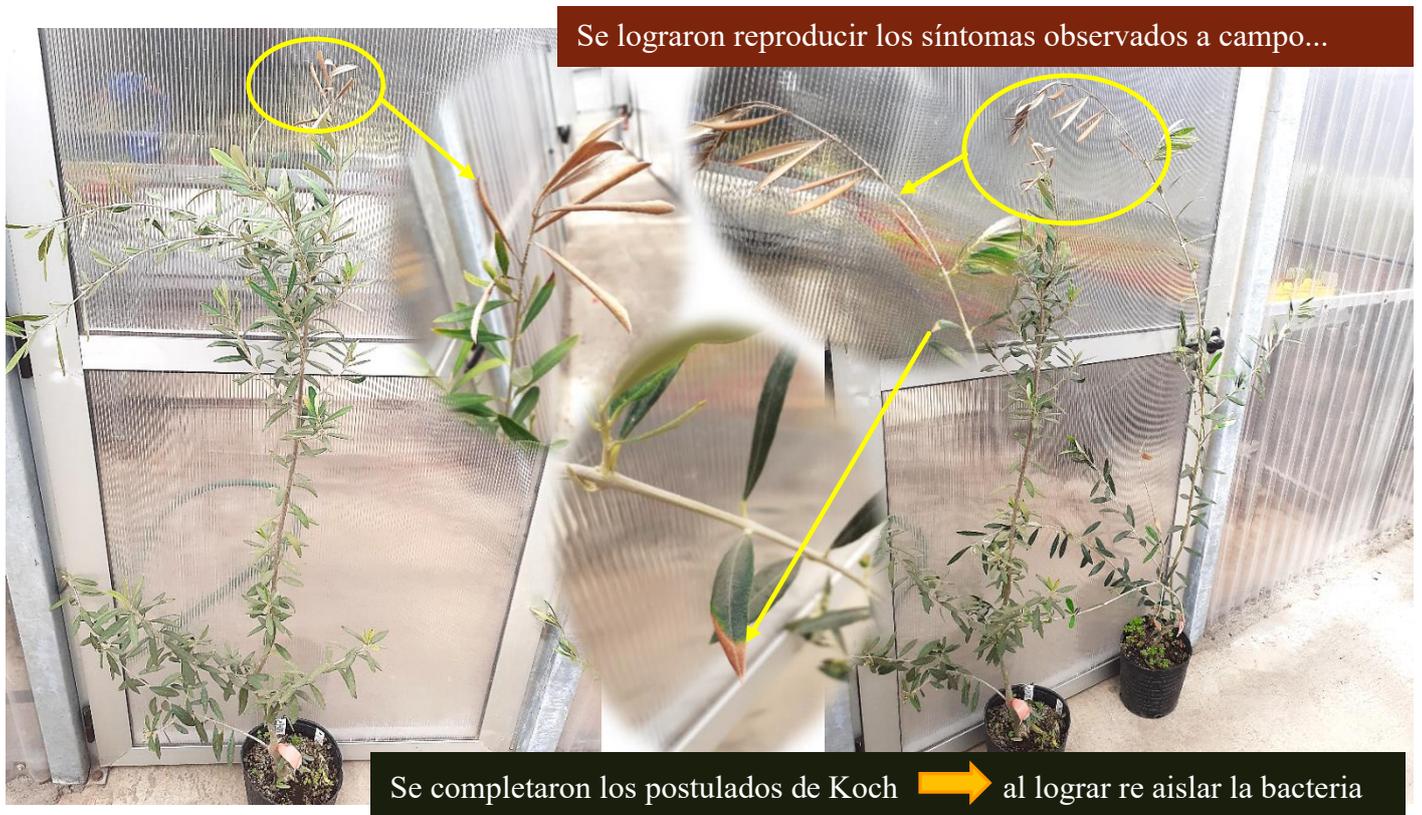


Figura 5.10. Planta N°19 cv. Arauco infectada con *X. fastidiosa* subsp. *pauca* a partir de la cual se re-aisló el patógeno. Fotos: Tolocka, P.

CONCLUSIONES

. - El suero 4 (AsXf.4) detectó la presencia de la bacteria en todas las diluciones probadas (hasta 1/1280000), resultando además específico porque no reaccionó en presencia de otras suspensiones bacterianas. La respuesta inmunológica fue en aumento desde la 1^{ra} hasta la 7^{ta} sangría. Además, con el agregado de cloroformo, fue posible eliminar la reacción inespecífica observada en las membranas con extracto de planta en el suero preinmune y en las sangrías.

. - Los extractos vegetales de olivo preparados en una dilución 1/30 (p/v) permiten obtener mayores valores de absorbancia en casos positivos reduciendo la posibilidad de falsos negativos.

. - El análisis de DAS ELISA, utilizando el reactivo AsXf.4 y el kit AGDIA en 1/200, detectó a *X. fastidiosa* hasta la dilución 1/1000 en extractos de plantas de olivo enfermas, reconociendo la bacteria con bajos valores de absorbancia en una dilución de 1/10000.

. - En DAS ELISA, el reactivo AsXf.4 reconoció a *X. fastidiosa* con sensibilidad y alta especificidad y no reaccionó frente a otras bacterias patógenas de plantas, en particular bacterias que afectan olivo, excepto una leve reacción cruzada con *E. amylovora*. Se estandarizó una dilución de uso de 1/200 para IgG y conjugado, y se considera que a las dos horas de colocado el sustrato, sería el momento más apropiado para evaluar los valores de lectura de absorbancia, pudiéndose continuar con las mismas, mientras los testigos sanos permanezcan estables.

. - Este antisuero policlonal elaborado a partir de una cepa local, permitió detectar diferentes subespecies de *X. fastidiosa* en distintos hospedantes. Mediante la técnica DAS

ELISA reconoció cuatro cepas de *X. fastidiosa*, una de la subespecie *pauca* y tres de la subespecie *fastidiosa* (pruebas realizadas en el laboratorio de Bacteriología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de Valencia, España).

. - Respecto a la patogenicidad, se confirma que el cv. Arauco es notablemente susceptible a *X. fastidiosa*, no así el cv. Frantoio, que se presentó como tolerante al patógeno. Los primeros síntomas de clorosis y necrosis apical de las hojas, empezaron a manifestarse a los 16 meses y se fueron acentuando a los 24 meses con el secado de ramas apicales. La severidad y el momento de aparición de los síntomas difieren con el cultivar, lo que confirma su reacción diferencial. La sintomatología y la aparición de la misma en Arauco fue similar al ensayo realizado con cv. Cellina Di Nardò en Italia.

BIBLIOGRAFIA

- Almeida, R.P.P. y Nunney, L. 2015. ¿Cómo surgen las enfermedades de las plantas causadas por *Xylella fastidiosa*?, *Plant Diseases*, 99 1457-1467. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-15-0159-FE>.
- Almeida, R. P. P., Pereira, E. F., Purcell, A. H. y Lopes, J. R. S. 2001. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange, *Plant Disease* (85) 382-386.
- Carbajal, D., Morano, K. A. y Morano, L. D. 2004. Indirect immunofluorescence microscopy for direct detection of *Xylella fastidiosa* in xylem sap; *Current Microbiology* (49); pp. 372-375.
- Chatterjee, S., Newman, L., Lindow, S. E. 2008a. Cell-to-Cell Signaling in *Xylella fastidiosa* Suppresses Movement and Xylem Vessel Colonization in Grape *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(10) 1309-1315. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-10-1309>.
- Clark, M. F., Adams, A. N. 1977. Characteristic of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *Journal of General Virology* 34, 475- 483.
- Djelouah, K., Frasheri, D., Valentini, F., D'onghia, A. M. y Digiario, M. 2014. Direct tissue blot immunoassay for detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees, *Phytopathologia Mediterranea* (53) 559-564.
- EPPO Bulletin. 2019. PM 7/24. *Xylella fastidiosa*. 49(2), 175-227. <https://doi.org/10.1111/epp.12575>.
- FAO-IPPC. 2018. SPM27.ANNEX 25: *Xylella fastidiosa*. Roma, Italia, 36 pp.
- Fuente Delgado, S. 1990. Procedures. Curso avanzado de virología. Centro internacional de la papa (CIP), Lima, Perú. En: D. M. Docampo y S. L. Lenardón, (Eds.). Métodos para detectar patógenos sistémicos. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal IFFIVE-INTA-JICA, Córdoba, Argentina. p.116.
- Gorris, M. T., Sanz, A., Peñalver, J., López, M. M., Colomer, M., Marco-Noales, E. 2021. Detección y Diagnóstico de *Xylella fastidiosa* por Anticuerpos Monoclonales Específicos, *Agronomía*, 11(1) 48. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010048>.
- Hammond, J. Jordan, R. 1990. Dot Blots (Viruses) and Colony Screening. En: R. Hampton, *et al.*, (Eds.). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, *A Laboratory Manual*. APS Press, St. Paul, 237-248 pp.
- Harper, S. J., Ward, L. I., Clover, G. R. G. 2010, erratum 2013. Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for

- quarantine and field applications, *Phytopathology* 100(12) 1282-1288. <https://doi.org/10.1094/phyto-06-10-0168>.
- Hartung, J. S. Beretta, J. Berlansky, R. H. Spisso, J. y Lee, R. F. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*, *Phytopathology* (84) 591-597.
- Hill, B. L. y Purcell, A. H. 1995. Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*, *Phytopathology* (85) 209-212.
- Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants, *Annual Reviews Phytopathology* 27: 271-290.
- Landa, B. B., Navas Cortés, J. A., Montes Borrego, Miguel. 2017. Capítulo 2: Características generales de *X. fastidiosa*. En: Blanca B. Landa, Ester Marco-Noales y María Milagros López, (Coord.). Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Cajamar Caja Rural (ed.), España, p.47-48.
- Leon, L., Serrano, A., De la Rosa, R., Belaj, A., Montilon, V., Altamura, G., Saldarelli, P., Boscia, D., Saponari, M. 2019. Poster. Expooliva.
- Li, W., Hartung, J. S., Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing, *Journal of Microbiological Methods* 66(1) 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>.
- Loconsole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T. 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods, *Journal of Plant Pathology* (96) 7-14.
- Lommel, S. A. McCain, A. H. Morris, T. J. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *Phytopathology* 72, 1018-1022.
- Lopes, S. A., Teixeira, D. C, Fernandes, N. G.; Ayres, A. J. 2005. An experimental inoculation system to study *Citrus-Xylella fastidiosa* interactions, *Plant Disease* 89(3) Follow journal. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0250>.
- López, M. M., Landa, B. B., Marco-Noales, E. 2017. Capítulo 5: Métodos de inspección, diagnóstico y detección. Métodos de análisis. Pruebas de patogenicidad. En: Enfermedades causadas por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Monografía (32). Landa, B. B., Marco-Noales, E. y López, M. M. (Eds). Cajamar Caja Rural, 108-109 pp.
- Martelli, G. P. 2016. The current status of the quick decline syndrome of olive in southern Italy. *Phytoparasitica* 44, 1-10.
- Muhittin, K., Hakan C. 2018. A Systematic Review: Polyphenol Contents in Stressed-Olive Trees and Its Fruit Oil. *IntechOpen Journals*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76703>.

- McElrone, A. J., Sherald, J. L. and Forseth, I. N. 2001. Effects of Water Stress on Symptomatology and Growth of *Parthenocissus quinquefolia* Infected by *Xylella fastidiosa*, *Plant Disease* 85(11) 1160-1164.
- Paccioretti, M., Roca, M., Tolocka, P. A., Otero, M. L., Gonzalez V. Taborda, R. Guzmán, F. A., Stivala, M. P., Bataglia, M. J., Beorchia Nigris, V., Haelterman, R. M. 2015. Relevamiento preliminar de *Xylella fastidiosa* Wells et al. en olivares de la República Argentina. XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Santa Fe. p. 117. ISSN: 2451-8069.
- Saponari, M., Boscia, D. Altamura, G., Loconsole, G., Zicca, S., D'Attoma, G., Morelli, M., Palmisano, F., Saponari, A., Tavano, D., Savino, V. N., Dongiovanni, C. & Martelli, G. P. 2017. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* associated to the olive quick decline syndrome in southern Italy, *Scientific Reports*, 7:17723. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17957-z>.
- Sherald, J. L. y Lei, J. D. 1991. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscaping trees, *Plant Disease* (75) 200-203.
- Tolocka, P.A., Giolitti, F., Haelterman, R.M. 2016. Argentina cuenta con reactivos serológicos para detectar la bacteria causal del raquitismo de las socas (RSD). SATCA (XX Reunión Técnica Nacional de la caña de azúcar). San Miguel de Tucumán. Trabajo completo.
- Tolocka, P. A., Giolitti, F., Rago, A., Fontana, P. y Haelterman R. M. 2014. Producción de reactivos serológicos a partir de cepas argentinas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* de caña de azúcar. Actas del III Congreso Argentino de Fitopatología. Pp. 496.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

. - En este trabajo se logró comprobar tres hipótesis completas y una parcial ya que no se detectó la bacteria en hospedantes alternativos. Se demostró la presencia *X. fastidiosa* en plantaciones de olivo de las provincias de La Rioja, Córdoba, Catamarca y Buenos Aires, faltaría la comprobación molecular en esta provincia. En San Juan y Mendoza, que son provincias de importancia olivícola, no fue hallado el patógeno, debido a que las condiciones climáticas no serían las adecuadas para la supervivencia del patógeno. El mayor decaimiento rápido de los olivares fue visto en la localidad de Aimogasta (La Rioja), donde está el foco de la enfermedad por la gran mortandad de plantas encontradas; le sigue Córdoba y luego Catamarca.

. - De un total de 568 muestras analizadas, provenientes de las principales provincias productoras, se obtuvo un 39,6% de infección de *X. fastidiosa* en plantaciones de Córdoba (cultivares Arauco, Arbequina, Frantoio, Nevadillo), le sigue Catamarca con 33,3% (cv. Arauco) y La Rioja con un 32,7% (cultivares Arauco, Manzanilla, Coratina, Picual, Arbequina); en San Juan, Mendoza y Rio Negro no ha sido detectada la bacteria.

. - De la sintomatología observada (PF, coloración verde opaco, entre otras) se comprobó que es inespecífica, debido a que se analizaron muestras de hojas con síntomas sospechosos y dieron negativas, de ahí la importancia de realizar su diagnóstico a través de diferentes técnicas.

. - No fue encontrada en hospedantes alternativos como plantas ornamentales, malezas u otros frutales muestreados en fincas de olivo infectadas con este patógeno.

. - Se logró el aislamiento de tres cepas de *X. fastidiosa*: una proveniente de almendro (Catamarca) en medio de cultivo PW, BCYE y PD3, apareciendo las primeras

colonias aproximadamente a los 15-22 días, y dos procedentes de olivo (La Rioja) que crecieron únicamente en medio BCYE, surgiendo colonias incipientes a los 34 días posteriores a la siembra.

. - Respecto a la caracterización morfológica, bioquímica, serológica y molecular de las cepas locales de *X. fastidiosa*, las características morfológicas y dimensiones observadas responden a lo citado en bibliografía. Respecto a las pruebas bioquímicas realizadas, resultó ser Gram (-) en las tres cepas locales evaluadas y los únicos test que resultaron positivo para esta bacteria fueron la solubilidad en hidróxido de potasio (KOH) y la reacción de catalasa. Las colonias analizadas por DAS ELISA y PCR convencional, tanto de almendro como las provenientes de olivo, resultaron positivas para ambas técnicas. Es importante mencionar que el DAS ELISA es una técnica serológica robusta; sin embargo, es necesario incluir pruebas moleculares para la detección de material vegetal asintomático en áreas libres de la enfermedad o plantas madres de las cuales se va a obtener el material de propagación agámica.

. - Se logró caracterizar la subespecie de *X. fastidiosa* presente en olivo, cítrico y almendro, empleando el sistema de tipificación MLST donde podemos concluir que, hasta el momento, en el país, se encuentra solamente la subespecie *pauca*. En fincas de almendro (Catamarca) y olivo (Córdoba) se determinó el ST78; en cítrico (Corrientes) y olivos (Catamarca, Córdoba y La Rioja) el ST69. Ambos tipos de secuencias sólo están presentes en nuestro país.

. - De acuerdo al análisis filogenético, ST69 y ST78 se encuentran más estrechamente emparentados al ST65 de cítricos de Brasil, y alejados del ST53, causante de la enfermedad declinamiento súbito del olivo (*Olive Quick Decline Syndrome-OQDS*), ocasionado por *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, considerada mucho más agresiva en fincas olivícolas del sur de Italia.

. - Con la técnica MLVA, se obtuvieron mayores números de repeticiones con los microsatélites tradicionales reportados por Li *et al.* (2005) y Coletta Fihlo *et al.* (2001) que con los de CoDiRO (MP1/MP2/MP3) diseñados para la cepa ST53 de Italia.

. - Las cepas AM2-Angelina, OLI17A y ALM4 manifestaron diferencias de acuerdo al polimorfismo observado en los perfiles de bandeo y al número de repeticiones obtenido con el uso de los microsatélites tradicionales. Se logró visualizar una marcada variabilidad genética en muestras que pertenecen al mismo grupo genético, incluso en materiales provenientes de la misma región geográfica de nuestro país.

. - Con el análisis del árbol filogenético empleando los cebadores tradicionales se determinó que las dos cepas de olivo (AM2-Angelina y OLI17) de la Rioja se parecen entre ellas difiriendo de la de ALM4 procedente de Catamarca. Estos resultados fueron semejantes a los obtenidos en las corridas electroforéticas de los cebadores mencionados.

. - Cuando se realizaron pruebas de combinaciones de cebadores para la detección de microsatélites se observó mayor variabilidad con los RP3 que con los RP4, incluso en muestras procedentes de un mismo hospedante como es el caso del olivo.

. - Las técnicas MLST y MLVA resultaron útiles para diferenciar distintas variantes genéticas de esta bacteria y para confirmar la subespecie presente en Argentina, descartando hasta el momento otras subespecies como la *fastidiosa* causante de la enfermedad de Pierce (PDB) en vid.

. - Es importante destacar que a partir de un aislamiento local de *X. fastidiosa*, fue posible elaborar un antisuero policlonal (AsXf.4) que permite la implementación de reactivos de diagnóstico serológicos para la detección de *X. fastidiosa* en olivo y en otras especies vegetales, como almendro y cítricos.

. - Mediante DAS ELISA, el reactivo AsXf.4 reconoció a *X. fastidiosa* con adecuada sensibilidad y alta especificidad y no reaccionó frente a otras bacterias patógenas de plantas, en particular bacterias que afectan olivo, excepto una leve reacción cruzada con *Erwinia amylovora*. Además, se determinó que a mayores tiempos de lectura (2 h de reacción) este antisuero, tendría un mejor comportamiento que a la hora de incubación, equiparándose con el kit comercial. Se estandarizó una dilución de uso del AsXf.4 de 1/200 para IgG y conjugado enzimático. Dado que, en las pruebas de diagnóstico realizadas en olivo, se observó que existe inhibición, se aconseja macerar el tejido vegetal

en diluciones de al menos 1/30 (p/v), para evitar falsos negativos. Este antisuero permitió además, detectar diferentes subespecies de *X. fastidiosa* en distintos hospedantes.

. - El reactivo AsXf.4 obtenido permitió un diagnóstico sensible y específico de la muestra a evaluar para detectar la bacteria, permitiendo testear gran cantidad de muestras para la toma inmediata de medidas de erradicación, realizando monitoreos periódicos por SENASA en aquellas fincas donde todavía no se encuentra establecida la bacteria. Este suero además de ser un método de diagnóstico más económico comparado a las técnicas de diagnóstico molecular, permite el suministro continuo a otros laboratorios que realizan análisis de diagnóstico de la bacteria a nivel nacional.

. - Respecto a la respuesta de los dos cultivares de olivos infectados con la bacteria se confirmó mediante qPCR la presencia de la bacteria a partir de los 3 meses de la inoculación en algunas plantas del cv. Arauco, no así del cv. Frantoio que fue detectado en una sola planta al final del ensayo. De un total de 11 plantas del cv. Arauco infectadas con la bacteria, 9 resultaron positivas a *X. fastidiosa* (82% del total), mientras que sólo 1 planta del cv. Frantoio resultó positiva (9%), sin observarse la sintomatología esperable a los 2 años de realizada la inoculación. Se obtuvo diferencias significativas entre ambos cultivares. Se demuestra así, tanto con el número de plantas infectadas como la sintomatología presente, que el cv. Arauco es mucho más susceptible a este patógeno que el cv. Frantoio, comportándose este último como tolerante a la bacteria. Esta respuesta de tolerancia/susceptibilidad bajo invernadero fue muy semejante al ensayo realizado en Italia donde los cvs. Frantoio, Leccino y Coratina tuvieron un comportamiento mucho más tolerante que el cv. Cellina Di Nardò manifestándose susceptible a la cepa De Donno.

. - Se lograron completar los postulados de Koch, al poder re aislar la bacteria a partir de una de las plantas inoculadas, logrando reproducir los síntomas observados a campo a partir de los 16 meses de ser inoculadas, donde los síntomas observados fueron incipientes y a los 24 meses donde la sintomatología fue mucho más marcada.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Este es el primer trabajo realizado en Argentina sobre *X. fastidiosa* en olivo, aportándose información importante y sienta las bases para futuros trabajos que permitan plantear adecuadas estrategias de manejo y de este patógeno:

- Puesta a punto de técnicas de teledetección para la detección de la bacteria en nuevas áreas de estudio.
- Continuar con la búsqueda de hospedantes alternativos.
- Caracterización mediante los sistemas de tipificación empleados en este trabajo de materiales provenientes de nuevas zonas productivas y otros hospedantes.
- Ensayos de tolerancia/susceptibilidad a campo de los cultivares más importantes a nivel comercial y presentes en el país.
- Búsqueda de genes de tolerancia en cultivares de olivo.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS

- Tolocka P. A., Guzmán, F. A., Paccioretti, M. D., Roca, M. E., Otero, M. L., Haelterman, R. M. 2022. Identification of sequence type ST78 *Xylella fastidiosa* from olive trees in Argentina. *Plant Disease de la AAF 2021 APS Caribbean Division Meeting, Abstracts*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-112-3-S1.1>. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdfplus/10.1094/PHYTO-112-3-S1.1>
- Tolocka, P. A., Giolitti, F., Guzmán, F.A., Mattio, M. F., Nome, C. F., Ortega, L. I., Paccioretti, M. A., Roca, M. E., Otero, M. L., Haelterman, R. M. 2021. Caracterización de *Xylella fastidiosa* a partir de materiales vegetales y cepas aisladas de olivo (*Olea europaea* L.) e implementación de un sistema de diagnóstico serológico en Argentina. *RIA* 47 (3): 38-389. <http://ria.inta.gob.ar/trabajosenprensa>.
- Tolocka, P. A., Guzmán, F.A, Paccioretti, M.D, Roca, M.E., Otero, M.L Haelterman, R.M. 2021. Identificación de la secuencia tipo ST78 de *Xylella fastidiosa* en olivo de Argentina. 5º congreso Argentino de Fitopatología y 59º Reunión de la APS División Caribe. Pp. 139.
- Tolocka, P. A., Guzmán, F. A., Giannini Kurina, F. y Haelterman, R. M. 2021. Respuesta de dos cultivares de olivo (*Olea europaea* L.) frente a la infección de una cepa argentina de *Xylella fastidiosa*. 5º congreso Argentino de Fitopatología y 59º Reunión de la APS División Caribe. Pp.138.
- Tolocka, P. A., Olivares García, C., Guzmán F. A., Landa Del Castillo, B. M., Haelterman, R. M. 2020. Variabilidad en cepas de *Xylella fastidiosa* procedentes de olivo (*Olea europaea* L.) de Argentina. IV Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Mendoza. Modalidad virtual, pág. 59. <https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/handle/20.500.12123/8405>.
- Tolocka, P.A., Paccioretti, M.A. y Haelterman, R.M. *Xylella fastidiosa*. 2019. En: Manual de protocolos de manejo de plagas y patologías del olivo, 143- 154. ISBU: 978-987-510-275-0.
- Tolocka, P. A., Giolitti, F., Guzmán, F. A., Roca, M. E., Paccioretti, M. A., Otero, M. L., Haelterman, R. M. Aislamiento de *Xylella fastidiosa* y producción de reactivos de diagnóstico serológicos para su detección. 2018. XVI Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Tucumán, Pp.80.
- Tolocka P. A., Mattio M. F., Otero M. L., Paccioretti M. A., Roca M., Guzmán F. A. y Haelterman R. M. Variante genética de *Xylella fastidiosa* en olivo (*Olea europea* L.) de Córdoba y Catamarca. 2018. XL Congreso Argentino de Horticultura-ASAHO. Publicado en la revista Horticultura Argentina, 37(94). Pp. 357.
- Tolocka, P. A., Mattio, M. F., Paccioretti, M. A., Otero, M. L., Roca, M. E., Guzmán, F. A. and Haelterman, R. M. 2017. *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST69 in olive in Argentina, *Journal of Plant Pathology*, 99 (3), 803. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3965>.

- Haelterman, R. M., Tolocka, P. A., Roca, M. E., Guzmán, F. A., Fernández, F. D., Otero, M. L. 2015. First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing Olive scorch in Argentina, *Journal of Plant Pathology*. 97(2), 393. <http://dx.doi.org/104454/JPP.V97I2.023>.
- Tolocka, P. A., Mattio, M.F., Otero, M. L., Paccioretti, M. D., Roca, M. E., Guzmán F.A., Haelterman R. M. 2017. Presencia de diferentes cepas de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* en hospedantes de Argentina. IV Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza., Pp. 178.
- Tolocka, P. A., Mattio, M.F., Otero, M. L., Paccioretti, M. D., Roca, M. E., Guzmán F.A., Haelterman R. M. 2017. Nueva secuencia tipo de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST78, obtenida de un aislamiento de almendro de Argentina. IV Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza., Pp. 177.
- Tolocka, P. A., Mattio, M. F., Otero, M. L., Paccioretti, M. D., Roca, M., Guzmán F.A., Haelterman R. M. 2017. *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST69, detectada en cítricos argentinos. IV Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza., Pp. 180.
- Tolocka, P. A.; Otero, M. L., Paccioretti, M. D., Roca M. E., Von Baczko, O. H., Kroneberger E. F., Guzmán, F. A., Haelterman R. M. 2017. Presencia de *Xylella fastidiosa* en plantaciones jóvenes de olivo var. arbequina del sur de la provincia de Buenos Aires. IV Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza., Pp. 181.
- Tolocka, P.A., Mattio, M. F., Luciani, C. E.; Guzmán, F. A., Haelterman, R. M. 2016. *Xylella fastidiosa* en olivo: Caracterización de un aislamiento argentino. Modalidad: exposición oral publicada. XXXIII Jornadas Científica de la Asociación de Biología de Tucumán. Conferencia oral. Hotel Waynay Killa, Tafí del Valle, San Miguel de Tucumán.
- Tolocka, P. A., Otero, M. L., Torres, L., Taborda, R. J., Haelterman, R. M. 2014. Detección de *Xylella fastidiosa* en huertos de olivo de la región noroeste de la provincia de Córdoba. Actas del XXXVII Congreso Argentino de Horticultura.

ANEXO

PROTOCOLO I: DAS ELISA (Doble sándwich de anticuerpos, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay Double Sandwich Antibody*)

1.- Cobertura de la placa con anticuerpos (Sensibilización de la placa)

Diluir la IgG en la dilución óptima 1:800 con el tampón cobertura ($\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaHCO}_3 + \text{NaN}_3$, pH 9,6). Colocar 100 μl de esa dilución en cada celdilla. Incubar en cámara húmeda durante 4 horas a 28 °C para evitar la deshidratación.

2.- Lavado de la placa

Vaciar la placa de golpe, luego llenar las celdillas con tampón lavado (PBS 1x +Tween-20), dejar reposar 3 min y vaciar la placa, repetir este procedimiento 3 veces y golpearla sobre papel absorbente para eliminar burbujas y resto del tampón de lavado.

3.- Preparación de las muestras y agregado del antígeno

Macerar pecíolos y parte de nervadura principal de hojas con síntomas con tampón de extracción (PBS 1x +Tween-20+PVP-40+Sulfito de Na^+ y agregar en el momento de usar 2% de leche descremada) en relación 1/30 p/v (ver cuántos pecíolos corresponden a esa cantidad para agilizar la técnica). Luego de lavar la placa, sembrar con 100 μl de cada muestra. Se emplean 6 testigos sanos y 2 testigos enfermos como controles negativos y positivos, respectivamente. Mantenerla e incubar en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche aprox. 16-18 hs.

4.- Lavado de la placa

Lavar la placa de la manera anteriormente descrita hasta que no se observen restos vegetales (5 o más lavados de 3 min. Hasta que las celdillas estén totalmente limpias sin restos vegetales), evitar que el contenido de una celdilla pase a la otra.

5.- Agregado del conjugado enzimático

Calcular la cantidad de buffer necesario (PBS 1x +Tween-20), teniendo en cuenta de agregar el MRS en relación 1/5 (1 ml de MRS más 4 ml tampón para un volumen final de 5 ml). Diluir el conjugado (inmunoglobulina-enzima) en la dilución óptima **1:800**. Agregar 100 μl de esta dilución en cada celdilla, menos en el blanco que va solamente el tampón. Incubar en cámara húmeda durante 4 horas a 28°C.

6.- Lavado de la placa

Lavar la placa como se describió en el punto 2 (4 lavados de 3 min. c/u).

7.- Adición del sustrato

En el tampón sustrato disolver entre 0,6 a 1 mg/ml de P-nitrofenilfosfato cuando se emplea el conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. En el caso de que este conjugado con peroxidasa se utilizan μ l 200 de TMB en cada celdilla.

Dejar la placa en oscuridad y observarla periódicamente cada 15 min. Identificar primero los testigos enfermos y sanos.

Las muestras infectadas (reacción positiva) son aquellas que presentan coloración amarilla (fosfatasa alcalina) /azúl (peroxidasa), cuya intensidad varía de acuerdo a la concentración del antígeno en la muestra. Realizar la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm con el uso del conjugado con fosfatasa alcalina y 655 nm con peroxidasa mediante el empleo de un espectrofotómetro vertical.

Tampones utilizados para DAS ELISA

Tampón PBS 10X (tampón fosfato salino) (g/l)

CINa	80
KH ₂ PO ₄	2,0
Na ₂ HPO ₄	11,5
KCl	2,0
NaN ₃	2,0

Tampón PBS 1X: 100 ml de PBS 10X + 900ml de agua destilada, pH 7.4

Tampón cobertura (en g/l)

Na ₂ CO ₃	1,59
NaHCO ₃	2,93
NaN ₃	0,2

Llevar a pH 9,6.

Tampón de lavado

PBS	1 litro
Tween-20	0,5 ml / litro

Tampón extracción:

PBS	1 litro
Tween-20	0,5 ml
PVP 40.000	20 g
Sulfito de sodio	1,4 g

Agregar en el momento de usar 2% de leche.

Tampón de sustrato:

Dietanolamina	97 ml/l
H ₂ O	800 ml/l
NaN ₃	0,2 g/l

Llevar a pH 9,8 y enrasar a 1 litro con agua.

Para kit utilizar solamente TMB

PROTOCOLO II: Extracción de ADN a partir de tejido vegetal

Protocolo de Murray y Thompson (1980) modificado: Partiendo de 100 mg de material sintomático (pecíolos y nervadura principal) espolvoreado con 5 mg de PVP-P (Polivinilpolipirrolidona) para evitar procesos oxidativos e inhibitorios de los tejidos vegetales, y se procedió a la molienda con nitrógeno líquido dentro de morteros estériles y posteriormente homogeneizado. Luego, el material fue colocado dentro de eppendorf de 1,5 ml, suspendido con 500 ul de tampón de C-TAB (C-TAB, NaCl 1.4M, PVP-10, EDTA 0.5M pH8, Tris 1M pH8) más 1 ul de β -Mercaptoethanol e incubado a 65°C durante 30 min. A continuación, se agregó 1 volumen (500 ul) de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada muestra y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. Se tomó el sobrenadante donde se encuentra el ADN y se precipitó con 0.7 volumen de isopropanol a temperatura ambiente, dejándolo reposar 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min, eliminando el sobrenadante y lavando el *pellet* del fondo del tubo con 700ul de alcohol etílico al 70%. Se dejó orear 20min y se resuspendió el *pellet* con 30 ul de agua libre de nucleasas.

PROTOCOLO III: ELISA en membrana de nitrocelulosa, NC ELISA

Impresión de la muestra

Desarrollo serológico de la prueba:

- 8-** Las membranas se bloquean desde 1 hora a toda la noche con tampón bloqueo, en agitación.
 - 9-** Se las enjuaga con tampón lavado en agitación durante 5 minutos.
 - 10-** Diluir el antisuero homólogo a la concentración óptima, con tampón antisuero e incubar las membranas 2 horas en agitación.
 - 11-** Lavar 3 veces con tampón lavado, 5 minutos por cada uno, en agitación.
 - 12-** Incubar 1 h con antisuero de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Goat anti-Rabbit (H+L)-AP conjugate, BIO-RAD) diluido 1/3.000 en tampón antisuero.
 - 13-** Lavar 3 veces con tampón lavado, 5 min. cada lavado, en agitación.
 - 14-** Revelar con sustrato (NBT-BCIP) para fosfatasa alcalina, una tableta de 5mg cada 10 ml de agua destilada.
 - 15-** Se detiene la reacción con agua, se deja secar la membrana y se almacena.
- Todo el proceso se realiza a temperatura ambiente.

Tampón TBS (5X) (g/l)

Tris	12,1
Na Cla	43,38

Tampón bloqueo

TBS 1X	
Leche descremada	5%

Tampón lavado

TBS 1X	
Tween 20	0,05%

Tampón antisuero

TBS 1X

Leche descremada 2%

PROTOCOLO IV: ELISA INDIRECTO-PTA ELISA *Plate Trapped Antigen* - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Es un ELISA en el cual se cubre el soporte sólido directamente con el antígeno y se adiciona la inmunoglobulina específica o el antisuero crudo contra el patógeno. La presencia del complejo antígeno-anticuerpo se detecta mediante una anti-IgG o con proteína A conjugada con la enzima.

El uso de técnicas de ELISA indirectas, tiene la gran ventaja de evitar la preparación de conjugados específicos para cada antígeno (el DAS ELISA requiere la purificación de las inmunoglobulinas específicas y el conjugado de éstas con la enzima, para cada patógeno.

Esta técnica resulta práctica para la titulación de antisueros enfrentando los mismos a concentraciones constantes de antígeno. La ventaja principal de esta prueba es el ahorro de tiempo significativo, que representa la obtención de resultados en pocas horas y la simplicidad, por cuanto no requiere la preparación previa de IgG ni conjugado.

1- Cobertura de la placa con antígenos

Se macera el tejido vegetal en tampón cobertura, en una relación 1/10 (p/v) o se preparan diluciones de la bacteria a analizar. El tipo de tejido a utilizar dependerá de la ubicación de la bacteria. Incluir controles positivos y negativos.

- Colocar 200 µl de la muestra molida o la dilución de la bacteria en cada celdilla. Agregar los testigos sanos y enfermos.
- Colocar la placa en una caja húmeda e incubar a 4°C durante toda la noche.

2- Lavado de la placa

Vaciar la placa, luego llenar las celdillas con tampón de lavado, dejar reposar 3 minutos y vaciar la placa. Este procedimiento se repite tres o más veces hasta que no se observen restos vegetales.

3- Bloqueo

Agregar 200 µl de tampón de extracción con el agregado leche descremada al 5%. Incubar a 37°C durante una hora.

4- Lavado de la placa

Lavar la placa de la manera ya descripta.

5-Agregado del antisuero

Diluir el antisuero a una concentración de 1/8000 en tampón extracción. Agregar 180 µl por celdilla e incubar a 37°C por una hora.

6- Lavado de la placa

Lavar la placa de la manera ya descripta.

7- Agregado del anti-Ig conjugado con la enzima

Diluir la anti-Ig conjugada con la enzima fosfatasa alcalina a una concentración de 1/3000 en tampón extracción. Colocar 180 µl por celdilla e incubar a 37° C durante una hora.

8- Lavado de la placa

Lavar la placa como se describió, se puede realizar el último lavado con tampón de sustrato.

9- Adición del sustrato

Disolver una pastilla de p-nitrofenilfosfato (5 mg) cada 6,5 ml de tampón sustrato (esperar hasta que la pastilla esté bien disuelta).

Agregar rápidamente 200 µl en cada celdilla de la placa.

Dejar la placa en oscuridad y observar a los 30 y 60 min. Leer en el lector de ELISA.

Tampones

Tampones

Tampón cobertura (en g/l)

Na₂CO₃ 1,59

NaHCO₃ 2,93

NaN₃ 0,2

Llevar a pH 9,6.

Tampón de lavado (PBS + Tween-20)

PBS 1 litro

Tween-20 0,5 ml / litro

Tampón extracción

PBS 1 litro

Tween-20 0,5 ml/l

PVP 20 g/l

Agregar en el momento de usar 2% de leche.

Tampón de sustrato

Dietanolamina 97 ml/l

H₂O 800 ml/l

NaN₃ 0,2 g/l

Llevar a pH 9,8 y enrasar a 1 litro con agua

PROTOCOLO V: PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINA (IgG)

- 1- Diluir 1 ml de antisuero con 9 ml de agua destilada.
- 2- Mezclar con 10 ml de solución saturada de sulfato de amonio (gota a gota y en forma lenta), manteniendo en agitación constante.
- 3- Dejar en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4- Centrifugar a 10.000 g por 15 minutos.
- 5- Resuspender el sedimento con 2 ml de PBS 1/2.
- 6- Dializar en 500 ml de PBS 1/2 con tres cambios de tampón.
- 7- Pasar por columna de DEAE Celulosa o Sephacel y recoger las alícuotas con lectura de absorbancia superiores a 0,9 a una longitud de onda de 280 nm (se considera que una lectura de 1,4 corresponde a una concentración de 1 mg/ml).
- 8- Adicionar 0,01% de azida sódica y almacenar a -20°C.

Tampón PBS 10X (tampón fosfato salino) (g/l)

ClNa	80
KH ₂ PO ₄	2,0
Na ₂ HPO ₄	11,5
KCl	2,0
NaN ₃	2,0
Llevar a pH 7,4.	

**PROCOLO VI: PREPARACIÓN DEL CONJUGADO ENZIMÁTICO PARA
DAS ELISA**

- 1- Mezclar la enzima fosfatasa alcalina (Sigma VIITen ClNa, con la Ig purificada en relación 2500U/mg de Ig.
- 2- Adicionar 0,06% de glutaraldehido.
- 3- Dejar en reposo a temperatura ambiente por 4 horas.
- 4- Dializar en dos cambios de 1 litro de PBS + 0,1% de glicina (1g/l) y un último cambio con PBS + Cl₂ Mg (0,203 g/l) + Cl₂ Zn (0,0136 g/l), por toda la noche a 4°C.
- 5- Añadir 5 mg/ml de albúmina de suero bovino y 0,01% de azida sódica.
- 6- Almacenar a 4°C.