



ESCUELA DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS, ANIMALES Y AMBIENTALES
INGENIERÍA AGRONÓMICA

**DETECCIÓN DE VIRUS Y BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN HUERTOS DE
OLIVO (*Olea europaea* L.) EN LAS PROVINCIAS DE CARDENAL CARO Y
COLCHAGUA, REGIÓN DE O'HIGGINS, CHILE**

Nombre de la Estudiante: Francisca Cantillana Díaz

Profesor guía: Nicolás Quiroga Barrera

Profesor colaborador: Set Pérez Fuentealba

Tesina presentada para optar al título profesional de Ingeniera Agrónoma

Octubre, 2025

San Fernando, Chile

Dedicatoria

En memoria a mi padre, Casimiro Cantillana Valenzuela, al cual también le pertenece este logro. Gracias papá, por tu sabiduría, contención, cariño e incondicionalidad, tus enseñanzas me siguen guiando hasta hoy. Aunque físicamente no estas, te llevo conmigo siempre. Te amo infinito papá.

También dedico esta tesina a mi madre, Sonia Díaz Urra, quién me ha brindado su apoyo en esta etapa y ha sido mi inspiración, por su amor y entrega a su profesión. Gracias mamá, por tu compañía, contención y apoyo. Te amo infinito mamá.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de O'Higgins, especialmente a la Escuela de Ciencias Agroalimentarias, Animales y Ambientales y a todos sus académicos docentes, por brindarme las enseñanzas, metodologías, criterios y un sinfín de información que contribuyó a mi formación profesional.

Gracias al proyecto FIC “Estrategia fitosanitaria para la producción sostenible de olivares en la región de O'Higgins” por permitir la presente investigación, y a las personas que componen el equipo, Esteban, Raúl y Juan.

Expreso mi agradecimiento hacia Nicolás Quiroga, mi profesor guía, gracias por compartir sus conocimientos, por su entrega, amabilidad, disponibilidad y contención. Extiendo mi gratitud a mi profesor colaborador Set Pérez, quién me ha enseñado lo dificultoso y hermoso que puede ser el área de la investigación. Gracias a ambos por ser mis referentes en el área de la fitopatología.

Con todo mi corazón, manifiesto en especial, la gratitud hacia mi familia, gracias mamá y papá por el apoyo, por los valores que me entregaron, por el cariño, por los cuidados, todo lo que soy hoy es gracias a ustedes. Gracias a mi pareja, Felipe, por su amor, compañía y apoyo. Gracias a mi Marujita, por sus regalones, su cariño y su incondicionalidad. Gracias a Fer y Trini, por ser unas niñas tan amorosas y por servir de motivación. Gracias Nana y Pablo por su incondicionalidad, por estar en los buenos momentos y en los no tanto. Extiendo mi gratitud a mis compañeros de clase Joaquín, Valentina y Alexandra, por las risas, la contención y la compañía.

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
Hipótesis.....	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
2. MARCO METODOLÓGICO	16
2.1. Ubicación.....	16
2.2. Prospección de olivares en la Región Libertador General Bernardo O'Higgins	16
2.3. Identificación de virus fitopatógenos provenientes de huertos de olivo de la Región de O'Higgins.....	17
2.3.1. Secuenciación masiva de alto rendimiento	17
2.4. Caracterización de bacterias fitopatógenas provenientes de huertos de olivo de la Región de O'Higgins.....	18
2.4.1. Aislamiento de las bacterias.....	18
2.4.2. Pruebas biológicas.....	18
2.4.2.1. Caracterización morfológica y Prueba de Levano.....	18
2.4.2.2. Prueba de fluorescencia	19
2.4.2.3. Prueba de hipersensibilidad en tabaco.....	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Prospección de olivares en la Región Libertador General Bernardo O'Higgins	21
3.2. Identificación de virus fitopatógenos provenientes de huertos de olivo de la Región de O'Higgins.....	24
3.3. Caracterización de bacterias fitopatógenas provenientes de huertos de olivo de la Región de O'Higgins.....	26
3.3.1. Aislamiento y caracterización en medios de cultivos	26
3.3.2. Pruebas biológicas.....	27
4. DISCUSIÓN.....	30
5. CONCLUSIÓN	35
6. APÉNDICES	37
7. REFERENCIAS	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sintomatología típica y distribución en huertos olivícolas de la Región de O'Higgins.....	21
Tabla 2. Pruebas biológicas desarrolladas para la caracterización de bacterias fitopatógenas.	27
Tabla 3. Detalle de muestras provenientes de huertos olivícolas de la Región de O'Higgins.....	37
Tabla 4. Caracterización morfológica de bacterias aisladas desde olivo en medio de cultivo NSA, tras 96 horas de crecimiento.....	38
Tabla 5. Caracterización morfológica de bacterias aisladas desde olivo en medio de cultivo King B, tras 96 horas de crecimiento.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sintomatología observada en huertos de olivo de la región de O'Higgins.....	23
Figura 2. Resultados bioinformáticos de detección de virus en la muestra OLIFC-04 obtenidos de la plataforma Viroscope™.....	24
Figura 3. Resultados bioinformáticos de detección de virus en la muestra OLIFC-06 obtenidos de la plataforma Viroscope™.....	25
Figura 4. Resultados bioinformáticos de detección de viroide en la muestra OLIFC-06 obtenidos de la plataforma Viroscope™.....	25
Figura 5. Imagen georreferenciada de las muestras positivas a virus.	26
Figura 6. Prueba de fluorescencia en aislados bacterianos representativos.	29
Figura 7. Prueba de hipersensibilidad en tabaco de aislados bacterianos representativos.	29

RESUMEN

El olivo (*Olea europaea* L.) es uno de los cultivos más antiguos e importantes de la civilización humana. Su producto más destacado, el aceite de oliva, es considerado un superalimento por sus efectos protectores frente a diversos tipos de cáncer y enfermedades coronarias. Aunque el cultivo del olivo se caracteriza por su rusticidad, es susceptible al ataque de diversos fitopatógenos, entre ellos, virus y bacterias. En particular, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, agente causal de la tuberculosis del olivo, al igual que los virus, no presenta tratamientos curativos, por lo que la detección temprana y prevención de su diseminación es crucial. En este contexto, esta investigación tuvo como objetivo determinar virus y bacterias fitopatógenas en olivares de la Región de O'Higgins. Para ello, se realizaron prospecciones periódicas en 10 huertos de olivo var. Arbequina, Sevillana y Manzanilla establecidos en las Provincias Cardenal Caro y Colchagua. Dos muestras de la comuna de Marchigüe se utilizaron para efectuar un diagnóstico molecular de virus mediante secuenciación masiva de alto rendimiento y posterior análisis. Además, se realizó aislamiento y caracterización bacteriana de 16 muestras provenientes de las Provincias Cardenal Caro y Colchagua. Los resultados del diagnóstico molecular de virus establecen que, en las dos muestras analizadas se identificó Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV) y en una de ellas se determinó material genómico cercano a Citrus exocortis viroid (CEVd). En cuanto a la caracterización bacteriana, no se determinaron aislados atribuibles a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, u otra bacteria fitopatógena del olivo. Además, en la prospección de huertos, se evidenció una alta influencia de fitopatógenos fúngicos, asociados a la madera y al follaje, frente a esto, se enfatiza en la importancia de continuar con prospecciones y estudios que permitan identificar y comprender las interacciones del microbioma del olivo.

Palabras clave: *Olea europaea* L., Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV), Citrus exocortis viroid (CEVd), *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

ABSTRACT

The olive (*Olea europaea* L.) represents one of the oldest and important crops of human civilization. Its most prominent product, olive oil, is recognized as a superfood for the protective effects against various types of cancer and coronary diseases. Olive trees have high rusticity to adapt in diverse pedoclimatic conditions, however, their susceptibility to the attack of various phytopathogens have been frequently reported, including viruses and bacteria. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causative agent of olive tuberculosis, like viruses, does not present curative treatments, so early detection and prevention of its spread are crucial. In this context, this research aimed to determine phytopathogenic viruses and bacteria in olive groves of the O'Higgins Region. For this, periodic prospecting was carried out in 10 olive orchards of cultivars Arbequina, Sevillana and Manzanilla, in the Provinces of Cardenal Caro and Colchagua. Two samples from the commune of Marchigüe were used to perform a molecular diagnosis of the virus through high-throughput sequencing (HTS) and subsequent analysis. In addition, isolation and bacterial characterization of 16 samples from the Cardenal Caro and Colchagua Provinces were carried out. The results of the molecular diagnosis of viruses establish that, in the two samples analyzed, Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV) was identified and in one of them genomic material close to Citrus exocortis viroid (CEVd) was determined. As for bacterial characterization, no isolates attributable to *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, or another phytopathogenic bacteria of the olive tree, were not determined. In addition, in the prospecting of orchards, a high influence of fungal phytopathogens was evidenced, associated with wood and foliage, in the face of this, the importance of continuing with prospecting and studies that allow identifying and understanding the interactions of the olive tree microbiome is emphasized.

Keywords: *Olea europaea* L., Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV), Citrus exocortis viroid (CEVd), *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

1. INTRODUCCIÓN

El olivo (*Olea europaea* L.) es una planta perenne y subtropical, perteneciente a la familia de las Oleáceas, se encuentra mayormente en zonas de clima mediterráneo. Es uno de los cultivos más antiguos e importantes del Mediterráneo. En la actualidad existen olivos plantados en cinco continentes del mundo, probablemente por el interés que radica en sus productos, como el aceite de oliva y la aceituna, ambos obtenidos del fruto (Zohary & Spiegel-Roy, 1975; Barranco *et al.*, 2017; Merlo, 2021).

Existe un gran interés en el cultivo del olivo, desde la antigüedad, los pueblos mediterráneos lo consideraban sagrado, utilizaban el aceite con fines religiosos, alimenticios, medicinales, como combustible y como cosmético. El origen de este cultivo radica en los años 4000 a 3000 a. C. en la región de Palestina (Rapoport, 2008). La domesticación de esta especie ocurrió en el Medio Oriente hace 6000 años (Costero *et al.*, 2021). En el siglo XVI se introdujo al continente americano, alrededor del año 1550 ingresaron cultivares procedentes de España a Perú y de allí a Chile (Tolocka, 2022). En la actualidad, el interés radica en los beneficios que proporciona el consumo de aceite de oliva para la salud humana, por sus ácidos grasos monoinsaturados y biofenoles que otorgan propiedades antioxidantes. El aceite de oliva es considerado un superalimento por sus beneficios de protección contra diferentes tipos de cáncer y enfermedades coronarias (Visioli & Galli, 1998; Owen *et al.*, 2000; Alarcón De La Lastra *et al.*, 2001; Luchetti, 2002; González-Moreno, 2014; Basim *et al.*, 2019; Lanza & Ninfali, 2020; Villa, 2020; Reyes *et al.*, 2023; Alves *et al.*, 2025).

En la última información dispuesta por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONU, 2022), el país con mayor producción de aceitunas y aceite de oliva es España, con 6.098.310 y 1.492.069 ton respectivamente, provenientes de una superficie de 2.827.147 ha (MAPA, 2022). En lo que respecta a Chile, en el año 2022 se registraron 21.141 ha a nivel nacional, con una producción de olivas de 128.963,31 ton y de ellas 16.500 ton fueron utilizadas en la agroindustria para la

producción de aceite. Las regiones con mayor superficie plantada en el país corresponden a Maule, Metropolitana y O'Higgins (FAOSTAT, 2024; ODEPA, 2024a). *Olea europaea* constituye un cultivo relevante para la industria frutícola de Chile, tanto para el mercado nacional como internacional (SAG, 2020a). En lo que respecta a la región de O'Higgins, al año 2024, la mayor cantidad de árboles plantados corresponde a aquellos con una producción creciente, por lo que el futuro del olivo en la región es esperanzador, puesto que en años próximos se prevé un aumento en la producción de olivas a nivel regional (ODEPA, 2024b).

El olivo se destaca por su rusticidad, puede soportar temperaturas por debajo de los 10°C, así también calor extremo y sequía durante el verano (Barranco *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de su rusticidad frente a condiciones ambientales extremas, el olivo es susceptible al ataque de numerosos fitófagos y patógenos, pudiendo sufrir pérdidas considerables de cosecha que pueden llegar a afectar la capacidad productiva, o incluso, la vida del árbol (Trapero & Blanco, 2008; Trapero *et al.*, 2010). De los patógenos relevantes en el cultivo del olivo se incluyen virus, bacterias, hongos foliares y de la madera (Grieco *et al.*, 2000).

Los virus pueden ocasionar diversos síntomas en los olivares, como deformación de hojas y frutos, amarillez del follaje, hojas filiformes, anillos cloróticos, mosaico en hojas, reducción en el rendimiento y en la calidad del aceite, entre otros. Estos se pueden propagar por material vegetal infectado, mediante insectos vectores, herramientas de corte, polen y semillas (Barba, 1993; Xylogianni *et al.*, 2021; SAG, 2023). A la fecha, se han detectado 18 virus alrededor del mundo en *Olea europaea*, específicamente: Cucumber mosaic virus (CMV), Cherry leaf roll virus (CLRV), Strawberry latent ringspot virus (SLRSV), Arabis mosaic virus (ArMV), Olive latent-1 virus (OLV-1), Olive latent-2 virus (OLV-2), Olive vein yellowing associated virus (OVYaV), Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV), Tobacco mosaic virus (TMV), Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV), Olive semi-latent virus (OSLV), Olive latent ringspot virus (OLRSV), Tobacco necrosis virus (TNV), Olive mild mosaic virus

(OMMV), Olive latent-3 virus (OLV-3), Olive virus T (OIVT), Olive leaf mottling virus (OLMV) y *Olea europaea* geminivirus (OEGV). (Bertolini *et al.*, 2001; Faggioli *et al.*, 2005; Chiumenti *et al.*, 2021; Xylogianni *et al.*, 2021; Ruiz-García *et al.*, 2024).

En Chile, durante el año 1999, el Servicio Agrícola y Ganadero presenta el primer informe donde se señala la detección de virus en olivares del país, reportando Cucumber mosaic virus (CMV), Cherry leaf roll virus (CLRV) y Strawberry latent ringspot virus (SLRSV) (Fiore, 2001; SAG, 2005). Luego, en el año 2011, tras una investigación realizada en el Repositorio Nacional de Germoplasma Clonal (NCGR) en la Universidad de California-Davis, se detecta Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV) y CMV en olivo var. Azapa, desde una muestra originaria de Chile (Rwahnih *et al.*, 2011). Posteriormente, se confirma la presencia de CMV y OLYaV en el país (Corrado *et al.*, 2016). No obstante, se haya reportado la presencia de estos virus, aun la información disponible carece de un detalle sobre las regiones geográficas del país donde han sido detectados estos virus; solamente CLRV ha sido detectado bajo reporte oficial del SAG en el año 2020 y 2023, ambas detecciones en la comuna de Río Claro, Región del Maule (SAG, 2020b; SAG, 2023).

La falta de estudios que involucre la etiología y epidemiología sobre virus en olivo en Chile es notoria, esto queda en evidencia al realizar un análisis cuantitativo con las búsquedas: “olive virus Chile” y “virus *Olea europaea* Chile” en las bases de datos “Web of Science”, agriRxiv, Scopus y en el buscador de Google Académico. En este sentido, es que se hace relevante detectar y caracterizar virus presentes en huertos de la región de O’Higgins, ya que permitirá crear o actualizar las intervenciones fitosanitarias, y prevenir la diseminación de virus en los olivares del país.

Las bacterias fitopatógenas pueden generar grandes pérdidas económicas y reducciones en el rendimiento (Bouachi *et al.*, 2015; Koščák *et al.*, 2023a). En particular, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ocasiona la enfermedad denominada tuberculosis

del olivo, conocida por provocar pérdidas económicas significativas y también porque es una enfermedad de difícil control (Quesada *et al.*, 2010; Koščak *et al.*, 2023b). Está presente en la mayoría de los países donde se cultivan olivos, a saber: Argentina, Italia, Croacia, Portugal, Australia, Turquía, Eslovenia, California, Japón, entre otros (Hall *et al.*, 2004; Oriolani *et al.*, 2005; Penyalver *et al.*, 2006; Quesada *et al.*, 2007; Quesada *et al.*, 2012; Moretti *et al.*, 2014; Tsuji *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2018; Basim *et al.*, 2019; Koščak *et al.*, 2023b). La tuberculosis del olivo corresponde a una de las primeras enfermedades de plantas descrita en la antigüedad, alrededor de los años 370 a 286 a. C. Theophrastus indica que "la oliva sufre de la uña, que algunos otros la llaman hongo o pequeño cuenco" (Scortichini *et al.*, 2004). Posteriormente, 2200 años más tarde, la bacteria fue aislada y descrita por Luigi Savastano en los años 1887-1889 y la denominó como *Bacillus oleae tuberculosis*. Más tarde, se llamó *Bacterium savastanoi* (Smith, 1908). El nombre actual del patógeno es *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Psv) (Gardan *et al.*, 1992; Lavado-Benito *et al.*, 2024).

Psv es una bacteria Gram negativa, aeróbica, con movilidad por sus flagelos polares, mide 0,4-0,8 x 1,0-3,0 μm , es oxidasa negativa y arginina dihidrolasa negativa; provoca la respuesta hipersensible en tabaco, la mayoría de los aislados son fluorescentes y levano negativos (Moretti *et al.*, 2008; Peñalver *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2012; Conde *et al.*, 2013; Moretti *et al.*, 2017; Caballo-Ponce *et al.*, 2018; Doksöz & Bozkurt, 2020; Bitgen & Mirik, 2021; Merlo, 2021; Mohammed *et al.*, 2024). No obstante, algunos aislados han resultado no fluorescentes y levano positivos (Iacobellis *et al.*, 1993; Marchi *et al.*, 2005; Turco *et al.*, 2022).

El principal síntoma de la enfermedad tuberculosis del olivo es la formación de agallas, esto debido a la ocurrencia de hiperplasia e hipertrofia en las células afectadas. La hiperplasia e hipertrofia se genera por la producción excesiva de las fitohormonas ácido indolacético (IAA) y citoquininas (CK) en esa área y también por la expresión de genes *hrp/hrc*, estos últimos tienen implicancia en la patogenicidad de la bacteria (Smidt &

Kosuge, 1978; Comai & Kosuge, 1980; Surico *et al.*, 1985; Iacobellis *et al.*, 1994; Sisto *et al.*, 2004). Las agallas, con mayor frecuencia, se evidencian en tallos y ramas, ocasionalmente en hojas y frutos (Wilson, 1965; Gardan *et al.*, 1992; Campos *et al.*, 2009; Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 2010). Cuando los tallos se encuentran gravemente afectados, las plantas evidencian menor crecimiento, ocurre defoliación e incluso pueden morir (Barranco *et al.*, 2017). La formación de agallas se observa a finales de invierno, comienza con pequeñas zonas hinchadas, que crecen de forma acelerada hasta la formación de nódulos de 2 a 5 mm de diámetro (Múñoz, 2005). Las agallas jóvenes evidencian color verde o café claro y aspecto liso, en el interior presentan una apariencia esponjosa de consistencia acuosa. Por otro lado, las agallas más antiguas son más oscuras y rugosas, y el tejido interno suele estar hueco (Trapero & Blanco, 2008).

Para que ocurra la infección de la planta, la bacteria requiere heridas o aberturas naturales, ocasionadas por cortes de poda, caída de hojas, etc. (Múñoz, 2005; Merlo, 2021). La infección puede suceder en un amplio rango de temperaturas, desde 4 a 38°C, aunque el óptimo para la infección es entre 23 a 24°C. Las zonas geográficas más afectadas son aquellas con abundantes lluvias durante primavera y con riesgo de heladas tardías o granizo (Trapero & Blanco, 2008).

Existe evidencia de que la bacteria, además de generar agallas, disminuye la cantidad de aceite y proteínas en los frutos, influyendo negativamente en el sabor y aroma de la oliva, tornándose amarga, rancia o salada (Tjamos *et al.*, 1993; Múñoz, 2005).

El patógeno se puede propagar gracias a la producción de exudados, los cuales son dispersados a través de la lluvia, riego, y herramientas de poda. Además, la diseminación se puede generar por transporte de suelo infectado, maquinaria agrícola con restos vegetales o por material vegetal de propagación contaminado desde viveros, esta última es la principal responsable de la propagación de la bacteria entre países (Gardan *et al.*, 1992; Young, 2004; Trapero & Blanco, 2008; SAG, 2020a). Con respecto al ciclo de vida

de la bacteria, sobrevive dentro y fuera de la planta, se encuentra en los tumores y también de manera epífita en hojas y brotes. De una estación a otra, la bacteria sobrevive de forma endófito en los tumores (Trapero & Blanco, 2008).

La resolución 6511 exenta del SAG señala el estado de este patógeno en el país, se indica que “la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (ex Smith 1908) (Gardan *et al.* 1992) (Pseudomonadales: Pseudomonadaceae), se encuentra bajo el estatus fitosanitario de Plaga Cuarentenaria Ausente, según resolución N° 3.080/2003 y sus modificaciones”. Sin embargo, es importante destacar que mediante una denuncia fitosanitaria se ha detectado en el año 2020 la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en un huerto de olivo (*Olea europaea* L.), en la comuna de Penciahue, Región del Maule (SAG, 2020a). Recientemente, gracias a una prospección realizada por el SAG, se ha detectado nuevamente la bacteria en un huerto contiguo al anterior (Murillo & Torres, 2024).

A la fecha, en la base de datos “Web of Science” existen 102 artículos publicados con la frase de búsqueda “*Pseudomonas savastanoi* olive”. Consignar que con la búsqueda “*Pseudomonas savastanoi* olive Chile” no se encontraron resultados en esta base de datos. La falta de estudios acerca de fitopatógenos que afectan al cultivo del olivo en la región es evidente, por lo tanto, es esencial realizar una investigación en esta área. El conocimiento de la situación fitosanitaria en los olivares de la región permitirá generar un apoyo técnico para la industria olivícola, de esta manera se reducirá el riesgo que podría presentar la diseminación de estos fitopatógenos.

Esta investigación se enmarca en el proyecto “Estrategia fitosanitaria para la producción sostenible de olivares en la región de O’Higgins”, llevado a cabo por la Universidad de O’Higgins junto con el Gobierno Regional. El objetivo fue determinar virus y bacterias fitopatógenas provenientes de huertos de olivo de la Región de O’Higgins, con la finalidad de prevenir el impacto en la producción del cultivo.

Hipótesis

H1: Se identifican virus fitopatógenos mediante secuenciación masiva de alto rendimiento desde muestras sintomáticas provenientes de huertos comerciales de olivo de la Provincia Cardenal Caro.

H2: Las bacterias aisladas desde huertos de olivo de las Provincias Cardenal Caro y Colchagua presentan características biológicas atribuibles a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Objetivo general

Determinar virus y bacterias fitopatógenas provenientes de huertos de olivo de las Provincias Cardenal Caro y Colchagua para la generación de apoyo técnico a la industria olivícola de la Región de O'Higgins.

Objetivos específicos

OE1: Identificar virus fitopatógenos provenientes de huertos comerciales de olivo de la Región de O'Higgins.

OE2: Caracterizar bacterias fitopatógenas provenientes de huertos comerciales de olivo de la Región de O'Higgins.

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1.Ubicación

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Ciencias Agroalimentarias, Animales y Ambientales, Universidad de O'Higgins, San Fernando, Chile. Las muestras fueron colectadas desde huertos comerciales de olivo (*Olea europaea* L.) particularmente de las provincias de Colchagua y Cardenal Caro, de la Región Libertador General Bernardo O'Higgins.

2.2.Prospección de olivares en la Región Libertador General Bernardo O'Higgins

Se seleccionaron un total de 10 productores, de cinco comunas de la región, específicamente de Marchigüe, Peralillo, La Estrella, Lolol y Placilla. Para la selección de los productores se dispuso de la base de datos suministrada por el proyecto del Fondo de Innovación para la Competitividad (FIC) y apoyo del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). La colección de muestras se llevó a cabo en la temporada 2023-2024.

Se realizó un monitoreo de síntomas atribuibles a fitopatógenos en cada huerto visitado, luego, se colectaron de una a tres muestras por predio, dependiendo de la sintomatología observada, cada muestra correspondió a ramillas con hojas de olivo de 10 a 20 cm. Las muestras se georreferenciaron, se colectaron en bolsas herméticas transparentes, y fueron transportadas en contenedores termorregulados. Posteriormente se almacenaron a 8°C antes de llevar a cabo la parte experimental en el laboratorio (Goussous & Al-Gharaibeh, 2008; Koščák *et al.*, 2023b). Se realizó rutinariamente la desinfección de herramientas y calzado, utilizando etanol (EtOH) al 70%, además del uso de guantes desechables (SAG, 2020a).

2.3. Identificación de virus fitopatógenos provenientes de huertos de olivo de la Región de O'Higgins.

2.3.1. Secuenciación masiva de alto rendimiento

Para realizar la identificación de virus se optó por el método de secuenciación masiva de alto rendimiento (HTS), la cual, además de revelar la identidad del patógeno, permite conocer su potencial de virulencia y características funcionales. Asimismo, determina el ensamblaje genómico a partir de muestras complejas con la secuenciación de genomas completos (Tedersoo *et al.*, 2021; Imanian *et al.*, 2022), pudiendo en algunos casos, detectar fitopatógenos nuevos y emergentes (Nizamani *et al.*, 2023).

Las muestras OLIFC-04 Y OLIFC-06, correspondientes a ramillas de ≈ 10 cm fueron envueltas en toalla de papel humedecida con agua destilada estéril (dH₂O) y dispuestas en bolsas herméticas con su respectivo código, luego se empacaron en cajas rotuladas y refrigeradas. Las muestras se enviaron a Multiplex SpA para el diagnóstico molecular de virus mediante secuenciación masiva (HTS) y análisis en la plataforma bioinformática Viroscope™.

Según los protocolos establecidos por Multiplex SpA, el procedimiento comienza con la extracción de ARN a partir de tejido vegetal, luego se realiza la depleción del ARN no deseado (Ribo-Zero Plant kit, Illumina USA) y preparación de la librería (NEBNext Ultra RNA Library Prep kit, New England Biolabs, USA). La secuenciación por Illumina utilizó el equipo NovaSeq6000 con una profundidad mínima de 10M de lecturas pareadas. Posteriormente para el análisis de datos se utilizó el algoritmo Viroscope™, para ello se aplicó un criterio de corte de 10% de cobertura de ensamblaje genómico como umbral mínimo de detección viral, y de la presencia de actividad biológica mediante identificación de replicasa (PCT/IB2023/059104). Un resultado positivo indica la presencia de ARN viral representando al menos un 10% del virus o la presencia de la enzima de replicación del virus. Por el contrario, un resultado negativo indica que la presencia del ARN viral está bajo el criterio de corte mínimo (inferior a 10%) o que no

fue detectado el ARN del virus y/o enzima de replicación en la muestra. El resultado de funcionalidad viral corresponde a la detección de la enzima replicasa en el ensamblaje genómico, lo que indica la infección viral y alta certeza en el diagnóstico (Valenzuela *et al.*, 2022).

2.4. Caracterización de bacterias fitopatógenas provenientes de huertos de olivo de la Región de O'Higgins.

2.4.1. Aislamiento de las bacterias

Las bacterias fueron aisladas desde material vegetal, anteriormente recolectado y desinfectado con una toalla de papel asperjada con EtOH al 70%. Mediante un bisturí estéril se extirpó el tejido interno de ramillas, luego fue procesado utilizando un mortero y 1 mL de dH₂O (Moretti *et al.*, 2008). Desde el macerado se agregaron 15 µL en una placa con medio de cultivo nutritivo de sacarosa y agar (NSA) (Nutrient Broth, 8,0 g; Bacto agar, 15 g; sacarosa, 50 g; 1 L dH₂O). La siembra por agotamiento se llevó a cabo mediante un asa de vidrio Drigalsky, luego, fueron incubadas a 26±1 °C durante 48 hr. Para obtener colonias purificadas se realizó una siembra por estrías utilizando un asa de níquel de 1mm de diámetro, estas se incubaron por 24 hr. La preservación a -80 °C se realizó en tubos con 400 µL de medio LB y glicerol (20%) (Moretti *et al.*, 2008; Basim *et al.*, 2019; Mohammed *et al.*, 2024).

Para verificar la viabilidad de las bacterias, las soluciones fueron descongeladas, luego se sembraron en placas con medio de cultivo de agar de sacarosa nutritiva (NSA), utilizando 10 µL de solución bacteriana para cada muestra e incubación durante 48 hr a 26±1 °C.

2.4.2. Pruebas biológicas

2.4.2.1. Caracterización morfológica y Prueba de Levano

Se examinaron colonias bacterianas puras, de 96 horas de crecimiento en una incubadora a 26±1°C, en medio de cultivo NSA y en medio de cultivo King B (King *et al.*, 1954). Se

analizaron aspectos macroscópicos como la forma de la colonia, tamaño, pigmentación, opacidad, elevación, superficie y consistencia.

Como referencia, se consideró la morfología de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, la cual, tras 6 días de crecimiento en cultivo nutritivo de sacarosa y agar (NSA) presenta colonias con pigmentación blanco a amarillo pálido, circulares (0,5 - 2,9 mm de diámetro), con un centro mate ligeramente elevado (Moretti *et al.*, 2008). En medio de cultivo King's B, tras 72 horas de crecimiento, las colonias presentan una pigmentación blanco pálido a amarillo, con forma redonda a ligeramente ovalada, de entre 0,5 a 3 mm de diámetro (Koščak *et al.*, 2023b).

Se evaluaron colonias puras en placas con medio de cultivo NSA, de 96 horas de crecimiento en una incubadora a 26 ± 1 °C. Se consideran Levano positivas aquellas colonias mucoides de color blanco, con forma cupoliforme. Para el control positivo se utilizó la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) cepa 1111-6B1 (Schaad *et al.*, 2001).

2.4.2.2. Prueba de fluorescencia

Se evaluaron colonias puras en placas con medio de cultivo King B con 24 hr y 48 hr de incubación a 26 ± 1 °C (KB; peptona de proteasa N°3, 20 g; Bacto agar, 15 g; glicerol 87%, 8,2 mL; K₂HPO₄, 1,5 g; MgSO₄ x 7H₂O, 1,5 g; 1000 mL dH₂O). Estas fueron dispuestas en un transiluminador UV a 365 nm. Para el control positivo se utilizó la bacteria Pss cepa 1111-6B1 (Schaad *et al.*, 2001).

2.4.2.3. Prueba de hipersensibilidad en tabaco

Se utilizaron colonias puras provenientes de cultivos crecidos por 24 hr a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ en medio de cultivo NSA. Las suspensiones fueron calibradas utilizando un Espectrofotómetro de Dilución “Implen OD600®”, $\text{OD}_{600} = 0,18 - 0,20$, equivalentes a 10^8 UFC/mL. La vitalidad de las suspensiones fue determinada mediante el método de dilución seriada, en proporción 1:10, por la fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \text{Número de colonias} / (0,01 \text{ mL} \times \text{Factor de dilución})$$

Se inocularon plantas de tabaco utilizando diluciones en serie de 10^6 a 10^8 UFC/mL, empleando una jeringa hipodérmica por muestra, se realizaron cuatro repeticiones para cada una. Las plantas se mantuvieron a una temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Las evaluaciones de hipersensibilidad se realizaron transcurridas 24, 48 y 72 hr. Como control positivo se utilizó la bacteria Pss cepa 1111-6B1, en cuanto al control negativo, se utilizó dH_2O (Schaad *et al.*, 2001).

3. RESULTADOS

3.1. Prospección de olivares en la Región Libertador General Bernardo O'Higgins

En la prospección de huertos de las comunas Marchigüe, Peralillo, La Estrella, Lolol y Placilla, se observó sintomatología atribuible a virus, hongos de la madera y hongos foliares. Entre los síntomas observados en campo se encuentran: hojas filiformes, hojas en hoz, amarillez en hojas, manchas concéntricas de color verde oscuro a marrón en la cara adaxial de las hojas, defoliación, muerte regresiva de ramas y ramillas, y decoloración de haces vasculares (Véase Figura 1 y Tabla 1). En total se colectaron 24 muestras de las variedades Arbequina, Manzanilla y Sevillana, 11 de ellas presentaron sintomatología atribuible a virus (46%), 9 sintomatología atribuible a hongos foliares (37%) y 4 sintomatología atribuible a hongos foliares (17%) (Véase en Apéndice Tabla 3).

Tabla 1. Sintomatología típica y distribución en huertos olivícolas de la Región de O'Higgins.

Fecha colecta	Código muestras	Huerto	Coordenadas	Comuna	Sintomatología atribuible
06/09/24	OLIFC-01	Huerto 1	34,363679°S; 71,738435°O	Marchigüe	VIRUS
06/09/24	OLIFC-02	Huerto 1	34,363679°S; 71,738435°O	Marchigüe	VIRUS
06/09/24	OLIFC-03	Huerto 1	34,363679°S; 71,738435°O	Marchigüe	HONGO MADERA
06/09/24	OLIFC-04	Huerto 2	34,37320°S; 71,57243°O	Marchigüe	VIRUS
03/10/24	OLIFC-05	Huerto 3	34°25'00.9''S; 71°3558.5'W	Marchigüe	HONGO MADERA
03/10/24	OLIFC-06	Huerto 3	34°25'00.9''S; 71°3558.5'W	Marchigüe	VIRUS

03/10/24	OLIFC-07	Huerto 4	34°28'29.1S; 71°42'35.1''W	Marchigüe	HONGO MADERA
03/10/24	OLIFC-08	Huerto 4	34°28'29.1S; 71°42'35.1''W	Marchigüe	VIRUS
03/10/24	OLIFC-09	Huerto 2	34,37320°S; 71,57243°O	Marchigüe	VIRUS
25/10/24	OLIFC-10.1	Huerto 5	34,48294°S; 71,50599°O	Peralillo	HONGO MADERA
25/10/24	OLIFC-10.2	Huerto 5	34,48294°S; 71,50599°O	Peralillo	HONGO FOLIAR
25/10/24	OLIFC-11	Huerto 5	34,48294°S; 71,50599°O	Peralillo	VIRUS
25/10/24	OLIFC-12.1	Huerto 6	34,46979°S; 71,42701°O	Peralillo	HONGO MADERA
25/10/24	OLIFC-12.2	Huerto 6	34,46979°S; 71,42701°O	Peralillo	HONGO FOLIAR
25/10/24	OLIFC-13	Huerto 6	34,46979°S; 71,42701°O	Peralillo	VIRUS
15/11/24	OLIFC-14	Huerto 7	34,6133300°S; 71,3513098°O	Placilla	HONGO MADERA
15/11/24	OLIFC-15	Huerto 8	34,64095°S; 71,37453°O	Lolol	VIRUS
15/11/24	OLIFC-16.1	Huerto 8	34,64095°S; 71,37453°O	Lolol	HONGO FOLIAR
15/11/24	OLIFC-16.2	Huerto 8	34,64095°S; 71,37453°O	Lolol	HONGO MADERA
06/12/24	OLIFC-17	Huerto 9	34,26863°S; 71,50208°O	La Estrella	VIRUS

06/12/24	OLIFC-18	Huerto 9	34,26863°S; 71,50208°O	La Estrella	HONGO MADERA
06/12/24	OLIFC-19.1	Huerto 10	34,29144°S; 71,66158°O	La Estrella	HONGO MADERA
06/12/24	OLIFC-19.2	Huerto 10	34,29144°S; 71,66158°O	La Estrella	HONGO FOLIAR
06/12/24	OLIFC-20	Huerto 10	34,29144°S; 71,66158°O	La Estrella	VIRUS

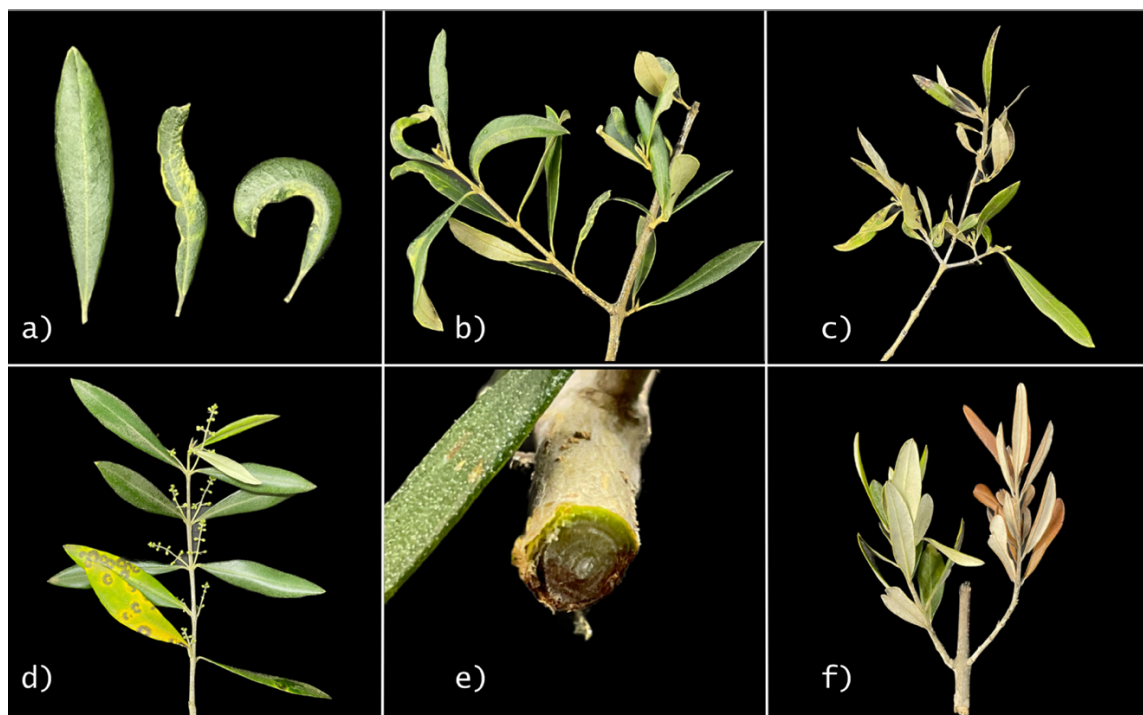


Figura 1. Sintomatología observada en huertos de olivo de la región de O'Higgins. Sintomatología atribuible a virus en: a), b) y c), particularmente se evidencian hojas filiformes, hojas falciformes y amarillez de las hojas. Sintomatología atribuible a hongos en: d), e) y f). En d) se evidencian anillos concéntricos de color marrón rodeados de un halo amarillo, atribuibles a hongos foliares. En e) y f) se evidencia sintomatología atribuible a hongos de la madera, se observa decoloración de haces vasculares y muerte regresiva de ramas, respectivamente.

3.2. Identificación de virus fitopatógenos provenientes de huertos de olivo de la Región de O'Higgins.

Las muestras OLIFC-04 Y OLIFC-06 resultaron positivas a virus mediante plataformas de secuenciación masiva de alto rendimiento (Véase Figura 2, 3 y 4). Concretamente, en la muestra OLIFC-04 fue detectado Olive leaf yellowing–associated virus (OLYaV), con 71% de integridad del genoma y con evidencia funcional, es decir, se detectó la enzima replicasa en el ensamblaje genómico, lo que indica la infección viral y alta certeza en el diagnóstico. En la muestra OLIFC-06 también fue detectado Olive leaf yellowing–associated virus (OLYaV), con 38% de integridad del genoma y con evidencia funcional. Además se encontró material genómico correspondiente a Citrus exocortis viroid, con 37% de integridad del genoma. Las muestras positivas fueron georreferenciadas con el sistema de información geográfica QGIS (Véase Figura 5).

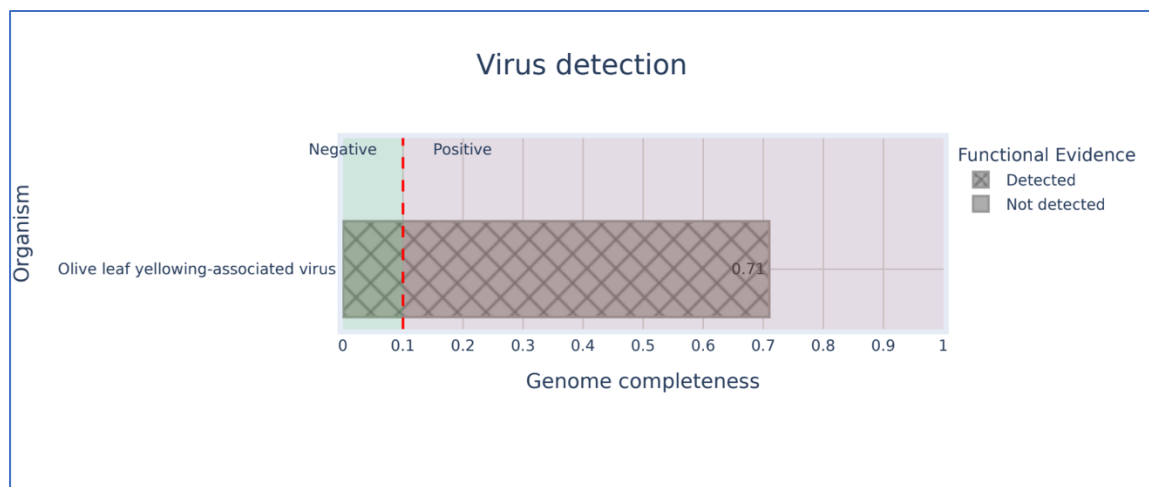


Figura 2. Resultados bioinformáticos de detección de virus en la muestra OLIFC-04 obtenidos de la plataforma Viroscope™.

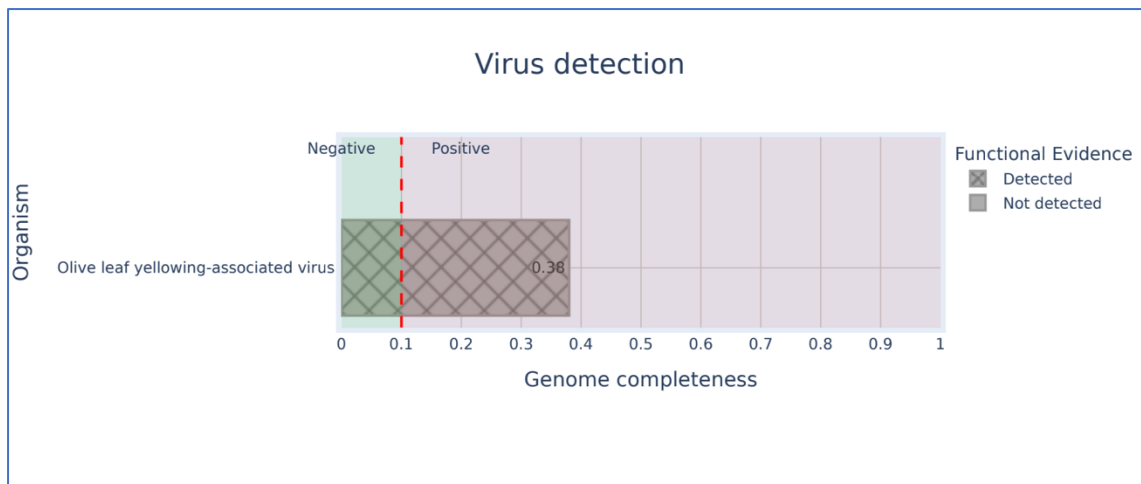


Figura 3. Resultados bioinformáticos de detección de virus en la muestra OLIFC-06 obtenidos de la plataforma Viroscope™.

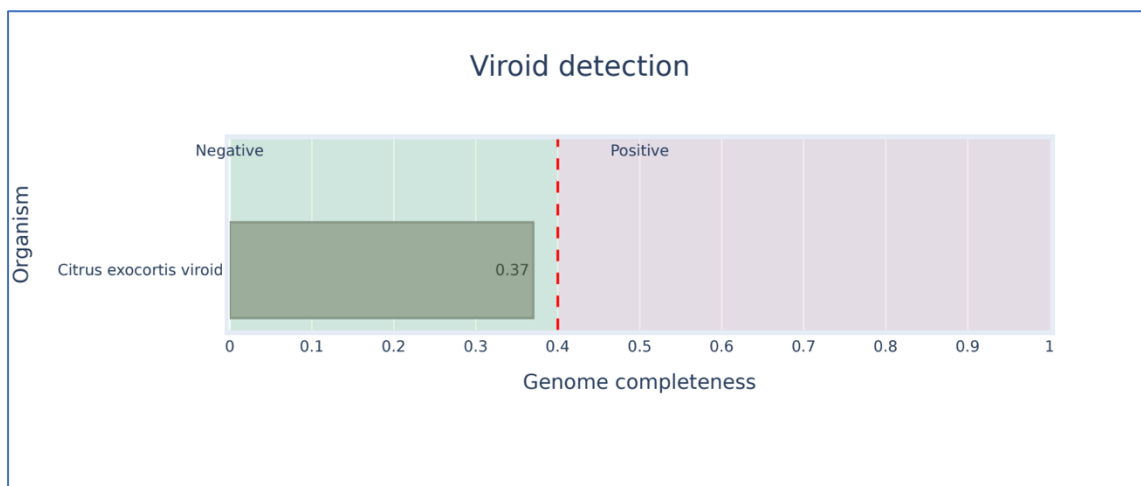


Figura 4. Resultados bioinformáticos de detección de viroide en la muestra OLIFC-06 obtenidos de la plataforma Viroscope™.



Figura 5. Imagen georreferenciada de las muestras positivas a virus.

3.3.Caracterización de bacterias fitopatógenas provenientes de huertos de olivo de la Región de O'Higgins.

3.3.1. Aislamiento y caracterización en medios de cultivos

No se observaron síntomas atribuibles a bacteriosis, no obstante, se realizaron aislamientos desde material vegetal asintomático; específicamente se evaluaron 12 muestras: OLIFC-01, OLIFC-02, OLIFC-06, OLIFC-08, OLIFC-09, OLIFC-11, OLIFC-13, OLIFC-14, OLIFC-15, OLIFC-17, OLIFC-18 y OLIFC-20. La mayoría de las muestras presentaron crecimiento bacteriano en medio de cultivo NSA, a excepción de OLIFC-02, OLIFC-11 y OLIFC-20.

Consignar que se evidenciaron muestras asintomáticas con alta carga bacteriana. Se obtuvieron colonias puras de las muestras: OLIFC-01A, OLIFC-01B, OLIFC-01C,

OLIFC-01D, OLIFC-01E, OLIFC-06, OLIFC-08A, OLIFC-08B, OLIFC-09A, OLIFC-09B, OLIFC-13, OLIFC-14, OLIFC-15, OLIFC-17A, OLIFC-17B y OLIFC-18.

La mayoría de los aislados bacterianos desarrollados en medio NSA, tras 96 horas de crecimiento a 26 ± 1 °C produjeron colonias con bordes enteros y forma circular. En cuanto al tamaño de las colonias, la mayoría presentó un tamaño < 1 mm hasta 2 mm de diámetro, mientras que tres aislados mostraron un tamaño entre 3 a 4 mm. Con respecto a la pigmentación, la mayoría de los aislados tuvieron color blanco-crema, además se observaron colonias con pigmentación rosado, naranja y blanco-amarillo. La opacidad fue iridiscente en la mayoría de las muestras. Los aislados presentaron elevación, con aspecto brillante y mucoides (Véase en Apéndice Tabla 4). Los aislados bacterianos desarrollados en King B tuvieron forma redonda, tamaño entre < 1 mm hasta 2 mm, pigmentación color crema, opacidad transparente, con elevación, de una superficie brillante y de consistencia mucoide (Véase en Apéndice Tabla 5).

3.3.2. Pruebas biológicas

Todas las muestras analizadas resultaron negativas a la prueba de Levano (Véase Tabla 2). Si bien, algunas muestras exhibieron forma cupuliforme, no presentaban pigmentación blanca ni consistencia mucoide.

Tabla 2. Pruebas biológicas desarrolladas para la caracterización de bacterias fitopatógenas.

Código suspensión bacteriana	Levano (NSA)	Fluorescencia (King B)	HR tabaco
Control (+)	+	+	+
OLIFC-01A	-	-	-
OLIFC-01B	-	-	-
OLIFC-01C	-	-	-
OLIFC-01D	-	-	-
OLIFC-01E	-	-	-

OLIFC-06	-	-	-
OLIFC-08A	-	-	-
OLIFC-08B	-	-	-
OLIFC-09A	-	-	-
OLIFC-09B	-	-	-
OLIFC-13	-	-	-
OLIFC-14	-	-	-
OLIFC-15	-	-	-
OLIFC-17A	-	-	-
OLIFC-17B	-	-	-
OLIFC-18	-	-	-

Tras 24, 48 y 72 horas de crecimiento a 26 ± 1 °C en King B, todos los aislados bacterianos resultaron negativos a la prueba de fluorescencia (Véase Tabla 2 y Figura 6). Luego de 24, 48 y 72 horas posterior a la inoculación, todos los aislados tuvieron una respuesta de hipersensibilidad en tabaco negativa (Véase Tabla 2 y Figura 7).

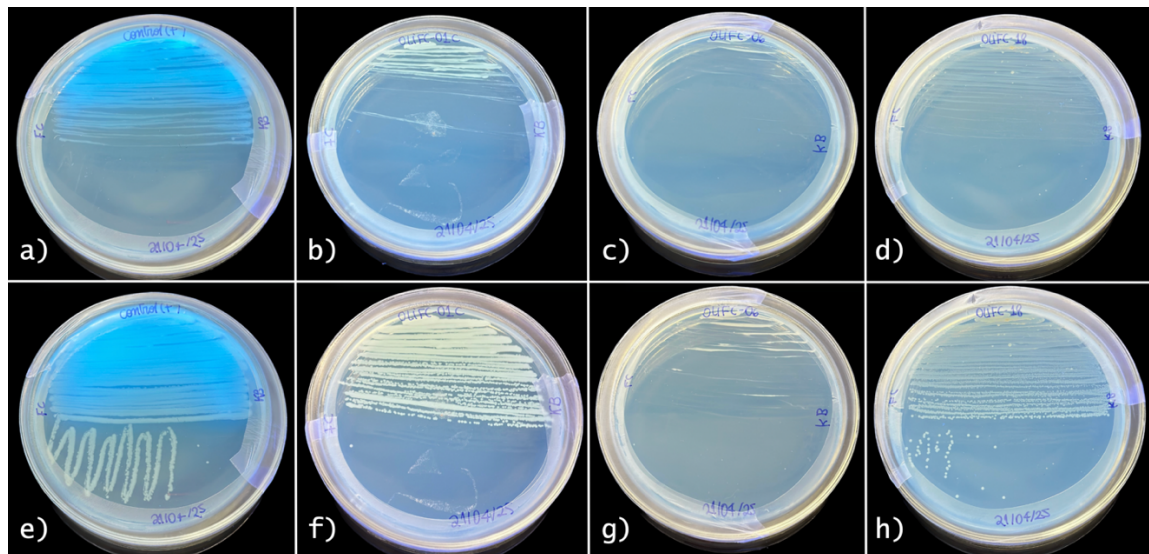


Figura 6. Prueba de fluorescencia en aislados bacterianos representativos. a) y e) se observa el control positivo (Pss cepa 1111-6B1), tras 24 y 48 horas de crecimiento a 26 ± 1 °C, respectivamente. En b), c) y d) se observan aislados representativos que resultaron negativos a la prueba de fluorescencia tras 24 horas de crecimiento a 26 ± 1 °C. En f), g) y h) se observan aislados representativos que resultaron negativos a la prueba de fluorescencia tras 48 horas de crecimiento a 26 ± 1 °C.

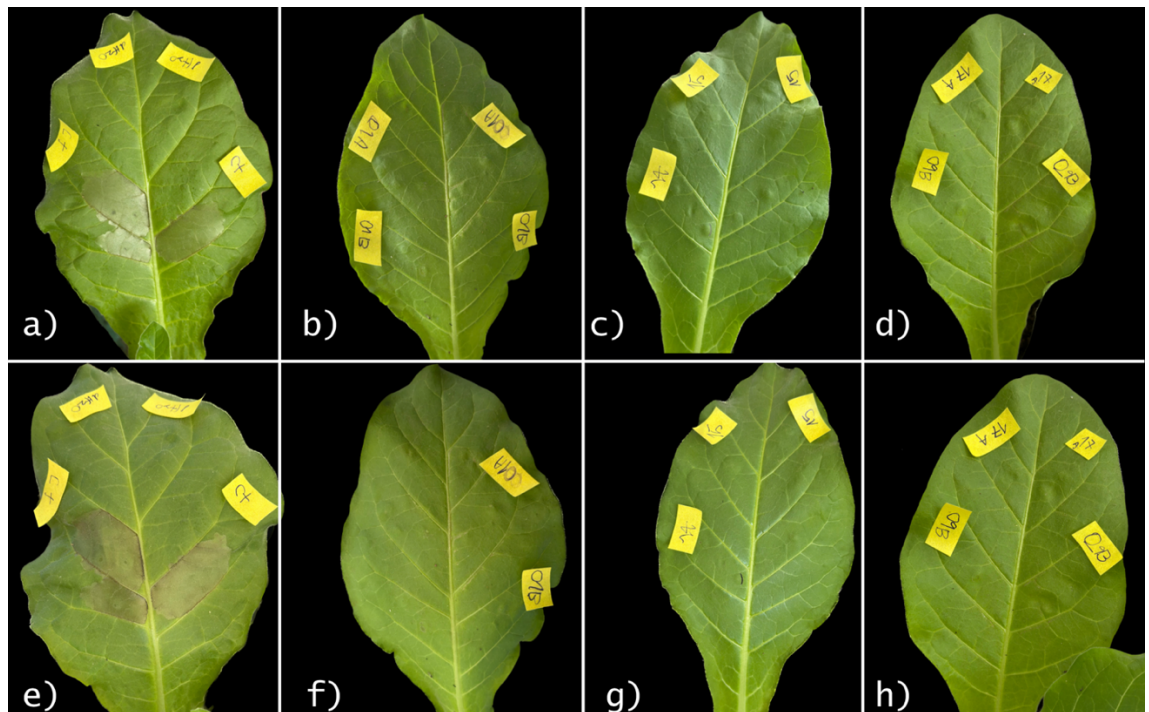


Figura 7. Prueba de hipersensibilidad en tabaco de aislados bacterianos representativos. a), b), c) y d) se evidencia la reacción tras 24 horas. e), f), g) y h) se evidencia la reacción tras 48 horas. En a) y e) se observa el control negativo (dH₂O) y el control positivo (Pss cepa 1111-6B1). En b), c), d), f), g) y h) se observan algunos ejemplos de las muestras que resultaron negativas a la prueba de hipersensibilidad en tabaco.

4. DISCUSIÓN

En la prospección de huertos de olivo de las Provincias de Colchagua y Cardenal Caro en la Región de O'Higgins, se evidenció sintomatología atribuible a virus en 9 de los 10 huertos prospectados, particularmente se observaron hojas filiformes, hojas en hoz y amarillez en el follaje. Luego, tras la secuenciación masiva de alto rendimiento de las muestras sintomáticas provenientes de la Provincia Cardenal Caro: OLIFC-04 Y OLIFC-06, ambas resultaron positivas al virus, en ellas se determinó la presencia de Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV); este hallazgo se condice con lo descrito por Rwnh y colaboradores en el año 2011, donde detectan OLYaV en muestras originarias de Chile, correspondientes a olivo var. Azapa, mas en este estudio no detallan la región geográfica del país donde fue obtenido el material vegetal. De la misma forma, la detección de OLYaV es coherente con la investigación realizada por Corrado y colaboradores (2016), dónde señala la distribución de OLYaV alrededor del mundo, incluyendo a Chile; no obstante, el lugar de Chile donde se reporta no se incluye, por lo tanto, esta investigación permite determinar un punto geográfico de detección de OLYaV en el país. Frente a esta situación, se ha generado una georreferenciación genómica de los fitopatógenos presentes en los olivares de la región, lo que en un futuro permitirá generar mapas epidemiológicos que asocien la detección de la enfermedad, ubicar brotes, comprender la distribución de los fitopatógenos, entre otros posibles estudios.

Con respecto a la epidemiología de OLYaV, se disemina a través de material de propagación infectado (Corrado *et al.*, 2016). Análogamente, se ha demostrado la presencia del virus en *Euphyllura olivina* y en algunos Pseudocócidos, ambos potenciales insectos vectores (Sabanadzovic *et al.*, 1999; Faggioli *et al.*, 2005; Afechtal & Mounir, 2020; Ruíz-García *et al.*, 2020; Caruso *et al.*, 2023). Por lo tanto, su transmisión se podría atribuir al uso de material vegetal infectado, más aún por el origen de las muestras, debido a que ambas muestras analizadas provienen de huertos dónde las plantas fueron obtenidas desde viveros que no se encuentran en la “Nómina de Viveros Inscritos” en el SAG (Véase en Apéndice Tabla 3).

Es esencial prevenir el impacto que podrían ocasionar los virus en los olivares del país. Un estudio revela que OLYaV afecta la calidad del aceite de oliva ya que aumenta de forma significativa el índice K_{232} , reflejando una oxidación del aceite (Fontana *et al.*, 2019). De igual forma, existen otros virus que afectan al olivar, estos han demostrado ser riesgosos debido al impacto económico que ocasionan, por ejemplo, se ha demostrado que CLRV genera un menor rendimiento del aceite en olivares var. Frantoio (Godena *et al.*, 2012). En otro estudio, realizado por Erilmez y Erkan (2014) revela que SLRV ocasiona una disminución en el rendimiento, peso y volumen de la oliva. Considerando las limitaciones que presenta esta investigación en la cantidad de muestras analizadas, es crucial prospectar una mayor cantidad de huertos en diferentes comunas de la región, a fin de que se pueda evidenciar el alcance epidemiológico de este y otros virus del olivo, para así establecer medidas efectivas en la mitigación del impacto que causan estos fitopatógenos en la olivicultura. Así mismo, se sugiere realizar estudios para esclarecer el efecto de este grupo de patógenos sobre el rendimiento de los olivares y la calidad del aceite de oliva en la región.

Es importante señalar, que prospecciones realizadas en otras zonas olivícolas alrededor del mundo, indican que OLYaV se detecta más a menudo en plantas asintomáticas. Si bien, las detecciones en esta investigación fueron a través de material vegetal sintomático, es relevante considerar esta información para estudios futuros sobre la distribución de OLYaV en Chile (Corrado *et al.*, 2016).

Además de la detección de OLYaV, se encontró material genómico de Citrus exocortis viroid (CEVd) en una de las muestras evaluadas, específicamente en la muestra OLIFC-06, este resultado concuerda con investigaciones anteriormente realizadas en Chile. Herrera y Madariaga (1999) determinaron la presencia de un organismo tipo viroide en huertos de olivo de la zona Norte del país, los cuales presentaban hojas en hoz. Años más tarde, la información se condice con el estudio realizado por Chavéz (2001), donde se señala la investigación del Dr. Luis Salazar, donde se reporta un agente patógeno similar

a un viroide en plantas sintomáticas y asintomáticas. No obstante, a la fecha, la detección de un viroide en olivo no ha sido reportada (Kaponi *et al.*, 2024).

Esta investigación determinó la existencia de material genómico cercano a CEVd en la muestra OLIFC-06, mas no se consideró como una detección positiva debido a que presentó 37% de integridad del genoma y el criterio de corte que se considera como umbral mínimo de detección corresponde a un 40%. Esto se puede atribuir a la alta variabilidad genética de CEVd (Gandía *et al.*, 2000; Gandía *et al.*, 2005), así como también a los cambios en las secuencias que pueden ser ocasionados por el tipo de hospedero (Bernad *et al.*, 2005). La determinación de material genómico cercano a CEVd indica una alta probabilidad de detectar en el futuro CEVd en olivo, añadiendo así, un nuevo hospedante para este viroide, por lo que es necesario continuar con prospecciones y detección de viroides en olivares del país.

Si bien, la detección de CEVd fue parcial, hay que consignar que su transmisión hacia otras especies vegetales presenta un gran riesgo. Su diseminación se produce a través de material vegetal de propagación y herramientas de poda contaminadas (Barbosa *et al.*, 2005a; Barbosa *et al.*, 2005b). El impacto que ocasiona se refleja principalmente en cítricos, siendo este grupo de árboles frutales el más propenso a la ocurrencia de descamación de la corteza, lesiones en el sistema radicular, disminución de la fructificación y rendimiento. No obstante, también se ha detectado en plantas ornamentales, hortalizas y oleaginosas (Belabess *et al.*, 2021; Hadidi *et al.*, 2024).

En cuanto a las bacterias aisladas, estas no presentaron características biológicas atribuibles a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, del mismo modo, no se determinaron otras bacterias fitopatógenas en los huertos de las Provincias Cardenal Caro y Colchagua. Este resultado se puede asociar a la distribución de la bacteria en el país, pues se ha determinado en un área geográfica delimitada, en la comuna de Péncahue, Región del Maule. Así también, este resultado refleja que el estatus fitosanitario de Plaga

Cuarentenaria Ausente y las medidas sanitarias establecidas por el SAG han evitado la diseminación de este patógeno en los huertos prospectados (SAG, 2020a; Murillo & Torres, 2024; Carrasco *et al.*, 2024; SAG, 2025). Importante considerar, el riesgo de diseminación de Psv en la Región de O'Higgins, la cuál se puede propagar mediante la producción de exudados, a través de riego, lluvia, viento, herramientas de poda, suelo infectado, maquinaria agrícola con restos vegetales o por material de propagación contaminado. Este último corresponde a la vía principal de la bacteria para la diseminación a largas distancias (Gardan *et al.*, 1992; Young, 2004; Trapero & Blanco, 2008; SAG, 2020a; Tatulli *et al.*, 2025).

La diseminación y transmisión de la bacteria puede suceder en un amplio rango de temperaturas, las cuales pueden ir desde 4 - 38 °C (Trapero & Blanco, 2008). No obstante, un estudio reciente señala el mes de septiembre como el mes óptimo para su propagación en la región, por lo tanto, realizar prospecciones en ese momento se torna crucial para evitar el impacto que esta bacteria podría causar (Vásquez *et al.*, 2024).

Adicionalmente a las prospecciones, se estima conveniente estudiar las interacciones de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* con bacterias no patógenicas del olivo, tales como *Erwinia oleae*, *Erwinia toletana* y *Pantoea agglomerans*, esto por la evidencia sobre la severidad de la sintomatología frente a las coinfecciones, en particular por la generación de tumores más grandes y mejor colonización bacteriana (Hosni *et al.*, 2011; Buonauro *et al.*, 2015; Scortichini *et al.*, 2023).

Para finalizar, se sugieren estudios, donde se revele la diversidad de hongos de la madera y hongos foliares en olivares, debido a que en la prospección, en 9 de 10 huertos se observó sintomatología atribuible a hongos de la madera y en 4 de 10 huertos se evidenció sintomatología atribuible a hongos foliares. A su vez, se propone evaluar la interacción de hongos de la madera y hongos foliares con otros fitopatógenos, debido a que en diversos estudios se han evidenciado interacciones sinérgicas que se desencadenan durante las

coinfecciones, lo que podría tener implicancias sobre el manejo de las enfermedades (Lamichhane & Venturi, 2015; Abdullah *et al.*, 2017; Scortichini *et al.*, 2023).

5. CONCLUSIÓN

La investigación “Detección de virus y bacterias en huertos de olivo (*Olea europaea* L.) en las Provincias de Cardenal Caro y Colchagua, Región de O’Higgins, Chile” permitió aceptar la hipótesis 1: “Se identifican virus fitopatógenos mediante secuenciación masiva de alto rendimiento desde muestras sintomáticas provenientes de huertos comerciales de olivo de la Provincia Cardenal Caro”, se identificó OLYaV desde dos muestras sintomáticas, en la comuna de Marchigüe, Provincia de Cardenal Caro. Además de la detección de OLYaV, se detectó material genómico cercano a CEVd, lo que refleja la efectividad de la utilización de secuenciación masiva y Viroscope™ como herramientas para la detección de virus y viroides en olivo.

Se determinó que las bacterias aisladas no presentaron características biológicas atribuibles a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*; asimismo, no se determinaron otras bacterias fitopatógenas. Por lo tanto la hipótesis 2: “Las bacterias aisladas desde huertos de olivo de las Provincias Cardenal Caro y Colchagua presentan características biológicas atribuibles a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*” se rechaza.

En la prospección de huertos se evidenció una alta influencia de hongos fitopatógenos, particularmente se observó sintomatología atribuible a hongos de la madera y hongos foliares en los olivares de la región, frente a esto se enfatiza sobre la importancia de continuar con prospecciones y estudios que permitan identificar el microbioma del olivo.

Esta investigación permitió un diagnóstico molecular de virus en solo dos muestras de la comuna de Marchigüe. En cuanto a bacterias, se caracterizaron solo 16 aislados de cinco comunas de la región, por lo tanto, continuar con prospecciones y muestreos es crucial para identificar y comprender las interacciones de los fitopatógenos que afectan al cultivo del olivo. El proyecto FIC “Estrategia fitosanitaria para la producción sostenible de

olivares en la región de O'Higgins" continuará con esta labor, lo que permitirá la generación de estrategias de control integrado más efectivas.

6. APÉNDICES

Tabla 3. Detalle de muestras provenientes de huertos olivícolas de la Región de O'Higgins.

Código muestras	Huerto	Variedades	Densidad de plantación	Vivero certificado	Sintomatología atribuible
OLIFC-01	Huerto 1	Sevillana	5 x 4 m	NO	VIRUS
OLIFC-02	Huerto 1	Sevillana	5 x 4 m	NO	VIRUS
OLIFC-03	Huerto 1	Sevillana	5 x 4 m	NO	HONGO MADERA
OLIFC-04	Huerto 2	Sevillana	6 x 4 m	NO	VIRUS
OLIFC-05	Huerto 3	Sevillana	3 x 3 m	SÍ	HONGO MADERA
OLIFC-06	Huerto 3	Sevillana	3 x 3 m	SÍ	VIRUS
OLIFC-07	Huerto 4	Manzanilla	4 x 6 m	NO	HONGO MADERA
OLIFC-08	Huerto 4	Manzanilla	4 x 6 m	NO	VIRUS
OLIFC-09	Huerto 2	Sevillana	6 x 4 m	NO	VIRUS
OLIFC-10.1	Huerto 5	Desconocida	4 x 5 m	NO	HONGO MADERA
OLIFC-10.2	Huerto 5	Desconocida	4 x 5 m	NO	HONGO FOLIAR
OLIFC-11	Huerto 5	Desconocida	4 x 5 m	NO	VIRUS
OLIFC-12.1	Huerto 6	Sevillana	3,5 x 5 m	NO	HONGO MADERA
OLIFC-12.2	Huerto 6	Sevillana	3,5 x 5 m	NO	HONGO FOLIAR
OLIFC-13	Huerto 6	Sevillana	3,5 x 5 m	NO	VIRUS
OLIFC-14	Huerto 7	Arbequina	1 m	SÍ	HONGO MADERA
OLIFC-15	Huerto 8	Desconocida	Desconocida	SÍ	VIRUS
OLIFC-16.1	Huerto 8	Desconocida	Desconocida	SÍ	HONGO FOLIAR
OLIFC-16.2	Huerto 8	Desconocida	Desconocida	SÍ	HONGO MADERA
OLIFC-17	Huerto 9	Arbequina	1,5 x 3,5 m	SÍ	VIRUS
OLIFC-18	Huerto 9	Arbequina	1,5 x 3,5 m	SÍ	HONGO MADERA
OLIFC-19.1	Huerto 10	Sevillana	4 x 3 m	SÍ	HONGO MADERA
OLIFC-19.2	Huerto 10	Sevillana	4 x 3 m	SÍ	HONGO FOLIAR
OLIFC-20	Huerto 10	Sevillana	4 x 3 m	SÍ	VIRUS

Tabla 4. Caracterización morfológica de bacterias aisladas desde olivo en medio de cultivo NSA, tras 96 horas de crecimiento.

Bacterias	Forma	Tamaño	Pigmentación	Opacidad	Elevación	Superficie	Consistencia
OLIFC-01A	C+I	1 a 2 mm	CR	TL	NO	Brillante	M
OLIFC-01B	-	-	CR	TL	NO	Brillante	M
OLIFC-01C	C	≈ 4 mm	B	I	SÍ	Brillante	V
OLIFC-01D	C+I	1 a 2 mm	CR	TL	NO	Brillante	M
OLIFC-01E	C+I	1 a 2 mm	CR	TL	NO	Brillante	M
OLIFC-06	-	-	CR	I	SÍ	Brillante	V
OLIFC-08A	C	< 1 mm	CR	I	SÍ	Brillante	V
OLIFC-08B	C	< 1 mm	CR	I	SÍ	Brillante	V
OLIFC-09A	C	≈ 3 mm	CR	TP	NO	Suave	M
OLIFC-09B	C+I	≈ 3 mm	CR	I	SÍ	Brillante	V
OLIFC-13	R	1 a 2 mm	B	O	NO	Suave	S
OLIFC-14	-	-	CR	TP	NO	Suave	M
OLIFC-15	C	≤ 1 mm	CR	I	SÍ	Brillante	V
OLIFC-17A	C	< 1 mm	RP	TL	NO	Brillante	M
OLIFC-17B	C+I	1 a 2 mm	N	O	SÍ	Suave	V
OLIFC-18	-	-	B-A	I	SÍ	Suave	M

Abreviaciones: “C” = colonias con forma redonda/circular; “C+I” = colonias circulares e irregulares; “-” = no hay colonias aisladas; “R” = colonias con forma rizoide; “CR” = color crema; “B” = color blanco; “RP” = color rosa pálido; “N” = color naranja; “B-A” = color blanco-amarillo; “TP” = transparente; “TL” = translúcida; “I” = iridiscente; “O” = opaca; “M” = mucoide; “V” = viscoso; “S” = seco.

Tabla 5. Caracterización morfológica de bacterias aisladas desde olivo en medio de cultivo King B, tras 96 horas de crecimiento.

Bacterias	Forma	Tamaño	Pigmentación	Opacidad	Elevación	Superficie	Consistencia
OLIFC-01A	C	≈ 4 mm	CR	TP	NO	Brillante	M
OLIFC-01B	C	≈ 3 mm	CR	I	NO	Brillante	V
OLIFC-01C	C	≈ 2 mm	B	I	SÍ	Brillante	V
OLIFC-01D	C	≈ 1 mm	CR	TP	NO	Brillante	M
OLIFC-01E	C	≈ 1,5 mm	CR	TP	SÍ	Brillante	M
OLIFC-06	C	< 1 mm	RP	I	SÍ	Brillante	V
OLIFC-08A	C	< 1 mm	CR	I	SÍ	Brillante	V
OLIFC-08B	C	< 1 mm	CR	O	NO	Suave	M
OLIFC-09A	C	≈ 1 mm	CR	TP	NO	Seca	M
OLIFC-09B	C	< 1 mm	Be	I	SÍ	Suave	V
OLIFC-13	R	≈ 3 mm	RN	O	SÍ	Suave	S
OLIFC-14	C	≈ 3 mm	CR	TP	SÍ	Brillante	M
OLIFC-15	C	< 1 mm	Be	O	NO	Suave	S
OLIFC-17A	C	< 1 mm	Ro	TL	SÍ	Brillante	M
OLIFC-17B	C	< 1 mm	N	TP	SÍ	Suave	V
OLIFC-18	C	1 a 3 mm	CR	TP	NO	Seca	M

Abreviaciones: “C” = colonias con forma redonda/circular; “R” = colonias con forma rizoides; “CR” = color crema; “B” = color blanco; “RP” = color rosa pálido; “N” = color naranja; “Be” = color beige; “RN” = rosa – anaranjado; “Ro” = color rosado; “TP” = transparente; “TL” = translúcida; “I” = iridiscente; “O” = opaca; “M” = mucoso; “V” = viscoso; “S” = seco.

7. REFERENCIAS

- Abdullah, A. S., Moffat, C. S., Lopez-Ruiz, F. J., Gibberd, M. R., Hamblin, J., & Zerihun, A. (2017). Host–multi-pathogen warfare: pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01806>
- Afechtal, M., & Mounir, M. (2020). Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Morocco. *Moroccan Journal of Agricultural Sciences*, 1(1).
- Alarcón de la Lastra, C., Barranco, M. D., Motilva, V., & Herrerias, J. M. (2001). Mediterranean diet and health: Biological importance of olive oil. *Current Pharmaceutical Design*, 7, 933-950.
- Alves, A. E., Rojas, N. F., Alva, M. R., Gerónimo, J. F., Arista, Z. B., & Vidaurre, J. R. (2025). Educación Nutricional en la era de los Superalimentos: El caso del Sacha Inchi y el Oliva en la prevención de enfermedades cardiovasculares. *Revista Latinoamericana de Calidad Educativa*, 2(1), 90-96. <https://doi.org/10.70625/rlce/82>
- Barba, M. (1993). Viruses and virus-like diseases of olive. *EPPO Bulletin*, 23(3), 493–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1993.tb01358.x>
- Barbosa, C. J., Pina, J. A., Pérez-Panadés, J., Bernad, L., Serra, P., Navarro, L., & Durán-Vila, N. (2005a). Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease*, 89(7), 749-754. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0749>
- Barbosa, C. J., Serra, P., Pina, J. A., Navarro, L., Daros, J. A., Flores, R., & Durán-Vila, N. (2005b). Identification and preliminary characterization of a viroid-like RNA in *Atlantia citroides*. In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 16(16).
- Barranco, D., Fernández, R., & Rallo, L. (2017): *El cultivo del olivo 7ª edición*. Ediciones Mundi-Prensa Libros.
- Basim, H., Basim, E., & Ersoy, A. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causing olive knot disease in Turkey. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(6).

- Bernad, L., Gandía, M., & Durán-Vila, N. (2005). Host effect on the genetic variability of *Citrus exocortis viroid* (CEVd). *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 16(6).
- Bertolini, E., Olmos, A., Martínez, M. C., Gorris, M. T., & Cambra, M. (2001). Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Journal of Virological Methods*, 96(1), 33-4.
- Bitgen, E., & Mirik, M. (2021). Tekirdağ ilinde yetişen zeytin ağaçlarında dal kanseri hastalığı etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tanısı ve antagonist bakteriyel izolatlar ile biyolojik mücadelesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(2), 326-336.
- Bouaichi, A., Benkirane, R., Habbadi, K., Benbouazza, A., & Achbani, E. H. (2015). Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causal agent of olive knot. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 8(12), 41-5.
- Buonaurio, R., Moretti, C., Da Silva, D. P., Cortese, C., Ramos, C., & Venturi, V. (2015). The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in Plant Science*, 6, 434. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00434>
- Caballo-Ponce, E., Meng, X., Uzelac, G., Halliday, N., Cámara, M., Licastro, D., da Silva, D., Ramos, C., & Venturi, V. (2018). Quorum sensing in *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Erwinia toletana*: role in virulence and interspecies interactions in the olive knot. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(18), e00950-18.
- Campos, A., da Costa, G., Coelho, A. V., & Fevereiro, P. (2009). Identification of bacterial protein markers and enolase as a plant response protein in the infection of *Olea europaea* subsp. *europaea* by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *European Journal of Plant Pathology*, 125, 603-616.
- Carrasco, J., Murillo, M., Vega, E., & Ureta, C. (2024). Identificación y diagnóstico de la bacteria cuarentenaria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en predios de olivo de la Región del Maule. En *Libro de Resúmenes SOCHIFIT 2024. XXXI Congreso*

- de la Sociedad Chilena de Fitopatología: Avances en sanidad vegetal para un mañana sostenible.* (p. 122). Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). *Serie Actas - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, (N° 65. 122). <http://hdl.handle.net/20.500.14001/69629>
- Caruso, A. G., Bertacca, S., Ragona, A., Agrò, G., Font-San-Ambrosio, M. I., Alfaro-Fernández, A., Sánchez, R. E., Panno, S., & Davino, S. (2023). Detection by sensitive real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of Olive Leaf Yellowing Associated Virus and its incidence in Italy and Spain. *Horticulturae*, 9(6), 702.
- Chavéz, R. (2001). *V Jornadas Olivícolas Nacionales*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas, (14), 152 p. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/8317>
- Chiumenti, M., Greco, C., de Stradis, A., Loconsole, G., Cavalieri, V., Altamura, G., Zica, S., Saldarelli, P., & Saponari, M. (2021). *Olea europaea* geminivirus: a novel bipartite geminivirid infecting olive trees. *Viruses*, 13(3), 481.
- Comai, L., & Kosuge, T. (1980). Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, 143, 950 -957.
- Conde, P., Montelongo, M. J., & Leoni, C. (2013). Enfermedades del olivo. *En Aceites de oliva: de la planta al consumidor*, 1, 183-213.
- Corrado, G., Garonna, A., Gómez-Lama, C., Gregoriou, M., Martelli, G. P., Mathiopoulos, K. D., Mercado-Blanco, J., Saponari, M., Tsoumani, K. T., & Rao, R. (2016). Host Response to Biotic Stresses. *The Olive Tree Genome*, 75-98. doi:10.1007/978-3-319-48887-5_6.
- Costero, B., Teich, I., Taborda, R. J., Toro, A., Prenol, L., & 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.
- Doksöz, S. F., & Bozkurt, I. A. (2020). A new and simple pathogenicity test using carrot slices for *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causal disease agent of olive

- knot. *Journal of Plant Pathology*, 102(4), 1173–1177.
<https://doi.org/10.1007/s42161-020-00601-7>
- Erilmez, S., & Erkan, S. (2014). The Investigation about The Effects of Strawberry latent ring spot virus on Certain Fruit Quality Characteristics of Olive Tree. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 43(1-2-3), 7-13.
- Faggioli, F., Ferretti, L., Albanese, G., Sciarroni, R., Pasquini, G., Lumia, V., & Barba, M. (2005). Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*, 49-55.
- FAOSTAT statistical database (2024). Producción de aceitunas, año 2022.
<https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Fiore, N. (2001). Virus y virus afines que afectan al cultivo del olivo: Breve resumen de la situación en Chile y en el mundo. En *V Jornadas Olivícolas Nacionales* (pp. 60-61). Instituto de Investigaciones Agropecuarias (Serie Actas, N°14).
- Fontana, A., Piscopo, A., de Bruno, A., Tiberini, A., Muzzalupo, I., & Albanese, G. (2019). Impact of olive leaf yellowing associated virus on olive (*Olea europaea* L.) oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(4), 1800472.
- Gandía, M., Palacio, A., & Duran-Vila, N. (2000). Variability of citrus exocortis viroid (CEVd). In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, Vol. 14, N° 14.
- Gandía, M., Rubio, L., Palacio, A., & Duran-Vila, N. (2005). Genetic variation and population structure of an isolate of Citrus exocortis viroid (CEVd) and of the progenies of two infectious sequence variants. *Archives of Virology*, 150, 1945-1957.
- Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghorrah, M., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (1992). DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(4), 606-612.

- Godena, S., Bendini, A., Giambanelli, E., Cerretani, L., Dermić, D., & Dermić, E. (2012). Cherry leafroll virus: Impact on olive fruit and virgin olive oil quality. *European journal of lipid science and technology*, 114(5), 535-541.
- González-Moreno, I. J. (2014). Aceite de oliva y salud. [Trabajo Fin de Grado, Universidad de Jaén]. <https://crea.ujaen.es/items/7efcfb6a-89c1-4190-b3bc-d744bf6e2cd6>
- Goussous, S., & Al-Gharaibeh, M. (2008). Isolation, characterization and PCR tests of the causal agent of the olive knot disease (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) in North Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(1).
- Grieco, F., Alkowni, R., Saponari, M., Savino, V., & Martelli, G. P. (2000). Molecular detection of olive viruses. *EPPO Bulletin*, 30(3-4), 469-473.
- Hadidi, A., Czosnek, H. H., Kalantidis, K., & Palukaitis, P. (2024). Viroids and Satellites and Their Vector Interactions. *Viruses*, 16(10), 1598.
- Hall, B. H., Cothier, E. J., Whattam, M., Noble, D., Luck, J., & Cartwright, D. (2004). First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33, 433-436.
- Herrera, G., & Madariaga, M. (1999). Detección de un organismo tipo viroide en olivos (*Olea europaea* L.) con síntomas de malformación de hojas. [Detection of viroid like-organism on olive plants (*Olea europaea* L.)]. *Agricultura Tecnica (Chile)*, 59(3), 178-185.
- Hosni, T., Moretti, C., Devescovi, G., Suarez-Moreno, Z. R., Fatmi, M. B., Guarnaccia, C., Pongor, S., Onofri, A., Buonauro, R., & Venturi, V. (2011). Sharing of quorum-sensing signals and role of interspecies communities in a bacterial plant disease. *The ISME Journal*, 5(12), 1857-1870. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.65>
- Iacobellis, N. S., Sisto, A., & Surico, G. (1993). Occurrence of unusual strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive in Central Italy. *EPPO Bulletin*, 23(3), 429-435.

- Iacobellis, N. S., Sisto, A., Surico, G., Evidente, A., & Di Maio, E. (1994). Pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* mutants defective in phytohormone production. *Journal of Phytopathology*, 140(3), 238 -248.
- Imanian, B., Donaghy, J., Jackson, T., Gummalla, S., Ganesan, B., Baker, R. C., Henderson, M., Butler, E. K., Hong, Y., Ring, B., Thorp, C., Khaksar, R., Samadpour, M., Lawless, K. A., MacLaren-Lee, I., Carleton, H. A., Tian, R., Zhang, W., & Wan, J. (2022). The power, potential, benefits, and challenges of implementing high-throughput sequencing in food safety systems. *npj Science of Food*, 6(1), 35.
- Kaponi, M., Kyriakopoulou, P. E., & Hadidi, A. (2024). Viroids of the mediterranean basin. *Viruses*, 16(4), 612.
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954): Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301-307.
- Košćak, L., Lamovšek, J., Đermić, E., & Godena, S. (2023a). The Antibacterial Effect of Selected Essential Oils and Their Bioactive Constituents on *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: Phytotoxic Properties and Potential for Future Olive Disease Control. *Microorganisms*, 11(11), 2735.
- Košćak, L., Lamovšek, J., Đermić, E., Tegli, S., Gruntar, I., & Godena, S. (2023b). Identification and characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* as the causal agent of olive knot disease in Croatian, Slovenian and Portuguese olive (*Olea europaea* L.) orchards. *Plants*, 12(2), 307.
- Lamichhane, J. R., & Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Frontiers in Plant Science*, 6, 385. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00385>
- Lanza, B., & Ninfali, P. (2020). Antioxidants in extra virgin olive oil and table olives: Connections between agriculture and processing for health choices. *Antioxidants*, 9(1), 41.

- Lavado-Benito, C., Murillo, J., Martínez-Gil, M., Ramos, C., & Rodríguez-Moreno, L. (2024). GacA reduces virulence and increases competitiveness *in planta* in the tumorigenic olive pathogen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Frontiers in plant science*, *15*, 1347982.
- Luchetti, F. (2002). Importance and future of olive oil in the world market: an introduction to olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *104*(9-10), 559–563.
- Marchi, G., Viti, C., Giovannetti, L., & Surico, G. (2005). Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive knot, in central Italy. *European journal of plant pathology*, *112*, 101-112.
- Merlo-Sánchez, M. (2021). Enfermedades microbianas en el olivar. [Trabajo Fin de Grado, Universidad de Jaén]. <https://crea.ujaen.es/handle/10953.1/14423>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (España). (2022). ESYRCE: Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/>
- Mohammed, J. M., Hassan, W. A., & Aziz, F. F. A. (2024). Identification and phylogenetic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from two provinces in Iraq. *Tropical Plant Pathology*, *49*(2), 232-240.
- Moretti, C., Cortese, C., Passos da Silva, D., Venturi, V., Ramos, C., Firrao, G., & Buonauro, R. (2014). Draft genome sequence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strain DAPP-PG 722, isolated in Italy from an olive plant affected by knot disease. *Genome announcements*, *2*(5), 10-1128.
- Moretti, C., Ferrante, P., Hosni, T., Valentini, F., D'Onghia, A., Fatmi, M. B., & Buonauro, R. (2008). Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains collected from olive trees in different countries. En M. Fatmi, A. Collmer, N. S. Iacobellis, J. W. Mansfield, J. Murillo, N. W. Schaad, & M. Ullrich (Eds.), *Pseudomonas syringae pathovars and related Pathogens: Identification, Epidemiology and Genomics*, (pp. 321-329). Springer.

- Moretti, C., Vinatzer, B. A., Onofri, A., Valentini, F., & Buonauro, R. (2017). Genetic and phenotypic diversity of Mediterranean populations of the olive knot pathogen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Plant Pathology*, 66(4), 595-605.
- Múñoz, M. (2005). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (ex Smith 1908). Vigilancia Fitosanitaria, División Protección Agrícola. Informativo fitosanitario (Nº-02-2005). Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). <https://www2.sag.gob.cl/agricola/vigilancia/Pseudomonas.pdf>
- Murillo, M., & Torres, F. (2024). Detección de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en el cultivo de olivo, Pénahue-Región del Maule, Chile. En *Libro de Resúmenes SOCHIFIT 2024. XXXI Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología: Avances en sanidad vegetal para un mañana sostenible*. (p. 45). Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). *Serie Actas - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, (Nº 65). <http://hdl.handle.net/20.500.14001/69629>
- Nguyen, K. A., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2018). Genetic diversity of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in California and characterization of epidemiological factors for olive knot development. *Plant disease*, 102(9), 1718-1724.
- Nizamani, M. M., Zhang, Q., Muhae-Ud-Din, G., & Wang, Y. (2023). High-throughput sequencing in plant disease management: a comprehensive review of benefits, challenges, and future perspectives. *Phytopathology Research*, 5(1), 1-17.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2024a). *Estadísticas silvoagropecuarias*. https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/73247/Estadisticas_Silvoagropecuarias2024.pdf
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2024b). *Distribución de la superficie frutal, número de huertos y árboles por variedad (Región de O'Higgins, especie olivo, tipo de productor: todos)* [Base de datos interactiva]. <https://reportes.odepa.gob.cl/#/catastro-superficie-fruticola-regional>

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2022). *Estadísticas: Datos de cultivos y productos de ganadería*. <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Oriolani, E., Bueno, L., Pérez, B. A., Otero, L., Docampo, D., Brancher, N., Nieto, A., Reta, A., & Matias, C. (2005). *La tuberculosis del olivo en el oeste Argentino*. En *XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología y III Taller de La Asociación Argentina de Fitopatología* (p. 640).
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: The possible role of antioxidants. *The lancet oncology*, 1(2), 107-112.
- Peñalver, R., Llop, P., Marco-Noales, E., & López, M. M. (2009). *Bacterias fitopatógenas: ¿Es posible su prevención?*. https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/3954/2009_Penyalver_Bacterias.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., Quesada, J. M., Salcedo, C. I., Piquer, J., Pérez-Panadés, J., Carbonell, E. A., del Río, C., Caballero, J. M., & López, M. M. (2006). Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology*, 96(3), 313-319.
- Quesada, J. M., García, A., Bertolini, E., López, M. M., & Penyalver, R. (2007). Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. *International Microbiology*, 10(2), 77.
- Quesada, J. M., Penyalver, R., & López, M. M. (2012).: “Epidemiology and control of plant diseases caused by phytopathogenic bacteria: the case of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*”. *Plant Pathology*, 299-326.
- Quesada, J. M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C. I., Carbonell, E. A., & López, M. M. (2010). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology*, 59(2), 262-269.

- Ramos, C., Matas, I. M., Bardaji, L., Aragón, I. M., & Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), 998-1009.
- Rapoport, H. F. (2008). Botánica y morfología. En D. Barranco, R. Fernandez-Escolar, L. Rallo (Eds.), *El cultivo del olivo* (6ª edición, pp. 39-61). Editorial MUNDPRENSA.
- Reyes, B., Chamorro, R., Morales, G., Hernández, M. C., Farías, C., & Valenzuela, R. (2023). Composición química y aplicaciones clínicas del aceite de oliva extra virgen. *Revista chilena de nutrición*, 50(3), 320-331.
- Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I. M., Murillo, J., López- Solanilla, E., Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., Rodríguez-Mosquera, M. E., Penyalver, R., López, M. M., Quesada, J. M., Biehl, B. S., Perna, N. T., Glasner, J. D., Cabot, E. L., Neeno-Eckwall, E., & Ramos, C. (2010): Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour- inducing pathogen of woody hosts. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1604-1620.
- Ruiz-García, A. B., Candresse, T., Canales, C., Morán, F., Machado de Oliveira, C., Bertolini, E., & Olmos, A. (2020). Molecular characterization of the complete coding sequence of olive leaf yellowing-associated virus. *Plants*, 9(10), 1272.
- Ruiz-García, A. B., Candresse, T., Malagón, J., Ruiz-Torres, M., Paz, S., Pérez-Sierra, A., & Olmos, A. (2024). Olive Leaf Mottling Virus: A New Member of the Genus *Olivavirus*. *Plants*, 13(16), 2290. <https://doi.org/10.3390/plants13162290>
- Rwahnih, M. A., Guo, Y., Daubert, S., Golino, D., & Rowhani, A. (2011). Characterization of latent viral infection of olive trees in the National Clonal Germplasm Repository in California. *Journal of Plant Pathology*, 93(1), 227-231.
- Sabanadzovic, S., Abou-Ghanem, N., La Notte, P., Savino, V., Scarito, G., & Martelli, G. P. (1999). Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology*, 37-45.

- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (3rd ed., pp. xii-373). APS Press.
- Scortichini, M., Manetti, G., Brunetti, A., Lumia, V., Sciarroni, L., & Pilotti, M. (2023). *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, *Neofusicoccum* spp. and the decline of olive trees in Salento (Apulia, Italy): Comparison of symptoms, possible interactions, certainties and doubts. *Plants*, 12(20), 3593.
- Scortichini, M., Rossi, M. P., & Salerno, M. (2004). Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity. *Plant pathology*, 53(4), 491-497.
- Servicio Agrícola y Ganadero. (2020b). Resolución exenta 5420. Establece programa de acciones fitosanitarias inmediatas de emergencia para el control de Cherry Leaf Roll Virus (CLRV). <https://bcn.cl/3l0qd>
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), División Protección Agrícola, Vigilancia Agrícola. (2005). *Guía de reconocimiento de plagas en Olivo (Olea europaeae)* (Versión 1). [Archivo PDF]. https://www2.sag.gob.cl/agricola/vigilancia/plagasOlivo_05.pdf
- Servicio Agrícola y Ganadero. (2020a). Resolución exenta 6511. Establece programa de acciones fitosanitarias inmediatas de emergencia para el control de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Ex Smith 1908) Gardan et al. 1992 (*Pseudomonadales: Pseudomonadaceae*) en los lugares que se detecte. <https://bcn.cl/2li9>
- Servicio Agrícola y Ganadero. (2023). Resolución exenta 2134. Establece programa de acciones fitosanitarias inmediatas de emergencia para el control de Cherry Leaf Roll Virus (CLRV). <https://bcn.cl/3csj3>
- Servicio Agrícola y Ganadero. (2025). Resolución exenta 5194. Establece programa de acciones fitosanitarias inmediatas de emergencia para el control de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Ex Smith 1908) Gardan et al. 1992 (*Pseudomonadales: Pseudomonadaceae*) en los lugares que se detecte. <https://bcn.cl/MnHZEM>
- Sisto, A., Cipriani, M. G., & Morea, M. (2004). Knot formation caused by *Pseudomonas savastanoi* subsp. *savastanoi* on olive plants is hrp-dependent. *Phytopathology*, 94, 484-489.

- Smidt M., & Kosuge T. (1978). The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha-methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation in oleander. *Physiological Plant Pathology*, 13(2), 203 -214.
- Smith, E. F. (1908). Recent studies on the olive-tubercle organism. *Bulletin of the Bureau of Plant Industry*, 131, 25–43. United States Department of Agriculture.
- Surico, G., Iacobellis, N. S., & Sisto, A. (1985). Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi*. *Physiological Plant Pathology*, 26(3), 309-320.
- Tatulli, G., Pucci, N., Santilli, E., Scala, V., & Loreti, S. (2025). Droplet Digital PCR for the Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Asymptomatic Olive Plant Material. *Plants*, 14(12), 1831.
- Tedersoo, L., Albertsen, M., Anslan, S., & Callahan, B. (2021). Perspectives and benefits of high-throughput long-read sequencing in microbial ecology. *Applied and environmental microbiology*, 87(17), e00626-21.
- Tjamos, E. C., Graniti, A., Smith, I. M., & Lamberti, F. (1993). Conference on olive diseases. *EPPO Bulletin*, 23, 365-550.
- Tolocka, P. (2022). Caracterización de la bacteria *Xylella fastidiosa* en plantaciones de olivo de Argentina. [Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba]. https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/14288/INTA_CIAP_InstitutoPatologíaVegetal_Tolocka_P_Caracterización_de_la_bacteria.pdf?sequence=2&isAllowed=y.
- Trapero, A. & Blanco, M. A. (2008). Enfermedades. En *El cultivo del olivo* (6ª edición, pp.595- 656). En D. Barranco, R. Fernández-Escobar & L. Rallo (Eds.). Ediciones Mundi-Prensa Libros.
- Trapero, A., Roca, L. F., Moral, J., Trapero, C. & López-Escudero, F. J. (2010). Las enfermedades y su manejo en el olivar ecológico. [Archivo PDF].

- [https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:K2zmvZHJdtoJ:scholar.google.com/&hl=es&as_sdt=0,5&scioq=Trapero,+A.,+Roca,+L.+F.,+Moral,+J.,+Trapero,+C.,+%26+López-Escudero,+F.+J.+\(2010\).+Las+enfermedades+y+su+manejo+en+el+olivar+ecológico.](https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:K2zmvZHJdtoJ:scholar.google.com/&hl=es&as_sdt=0,5&scioq=Trapero,+A.,+Roca,+L.+F.,+Moral,+J.,+Trapero,+C.,+%26+López-Escudero,+F.+J.+(2010).+Las+enfermedades+y+su+manejo+en+el+olivar+ecológico.)
- Tsuji, M., Ohta, K., Tanaka, K., & Takikawa, Y. (2017). Comparison among Japanese isolates of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causal agent of olive knot disease. *Journal of General Plant Pathology*, 83, 152-161.
- Turco, S., Draaisma, M. I., Rossini, L., Chaboteaux, E., Rahi, Y. J., Balestra, G. M., Iacobellis, N. S., & Mazzaglia, A. (2022). Complete genome assembly of the levan-positive strain PVFi1 of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolated from olive knots in Central Italy. *Environmental Microbiology Reports*, 14(2), 274-285.
- Valenzuela, S. L., Norambuena, T., Morgante, V., García, F., Jiménez, J. C., Núñez, C., Fuentes, I., Pollak, B. (2022). Viroscope: Plant viral diagnosis from high-throughput sequencing data using biologically-informed genome assembly coverage. *Frontiers in Microbiology*, 13, 967021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.967021>
- Vásquez, J., Tudela, V., Serrano, R., Quiroga, N., Pérez, S. (2024). Modelamiento agroclimático para el monitoreo de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en olivo en la Región de O'Higgins. En *Libro de Resúmenes SOCHIFIT 2024. XXXI Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología: Avances en sanidad vegetal para un mañana sostenible* (p. 52). Instituto de Investigaciones Agropecuarias. *Serie Actas - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, N° 65. <http://hdl.handle.net/20.500.14001/69629>
- Villa, P. (2020). *El cultivo del olivo*. Editorial De Vecchi. <https://books.google.es/books?id=5VHhDwAAQBAJ>
- Visioli, F., & Galli, C. (1998). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4292–4296.

- Wilson, E. E. (1965). Pathological histogenesis in oleander tumors induced by *Pseudomonas savastanoi*. *Phytopathology*, 55, 1244 -1249.
- Xylogianni, E., Margaria, P., Knierim, D., Sareli, K., & Winter, S. (2021). Virus surveys in olive orchards in Greece identify Olive Virus T, a novel member of the genus *Tepovirus*. *Pathogens*, 10(5), 574.
- Young, J. M. (2004). Olive knot and its pathogens. *Australasian Plant Pathology*, 33, 33-39.
- Zohary, D., & Spiegel-Roy, P. (1975). Beginnings of fruit growing in the old world. *Science*, 187(4174), 319–327.