



ESCUELA DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS, ANIMALES Y AMBIENTALES
INGENIERÍA AGRONÓMICA

**DETECCIÓN DE *Allorhizobium vitis* DESDE EL LAVADO XILEMÁTICO DE PLANTAS
ASINTOMÁTICAS DE CUATRO CULTIVARES DE VITIS VINIFERA PROVENIENTES DE DOS
VIVEROS, UBICADOS EN LAS REGIONES METROPOLITANA Y DEL LIBERTADOR BERNARDO
O'HIGGINS.**

Agustín Ignacio Ortiz González
Profesor guía: Set Madian Pérez Fuentealba

Tesina para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo

San Fernando, Chile
Abril, 2023

Dedicatoria

Para todos mis seres queridos.

Agradecimientos

Agradezco a mí padre José Luis que estuvo día a día dando aliento, cariño y sustento.

A mis abuelas por recibirme en su hogar y brindarme el amor y las calorías necesarias para la subsistencia.

A mis tías por estar siempre preocupados de mí, y mis tíos por estarlo en justa medida.

Agradezco a Pía Escobar, Raúl Flores y Nicole Cortez, por brindar ayuda, consejo y compañía durante la investigación. A Don Sebastián por su ayuda en logística y buena disposición.

Agradezco a mi profesor de fitopatología Set Pérez por guiarme en este proceso formativo, por despertar mi interés en la sanidad vegetal y la microbiología, y también por entregarme los conocimientos y las herramientas necesarias para llevar a cabo esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
<i>ABSTRACT</i>	8
1. INTRODUCCIÓN	9
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2. MARCO METODOLÓGICO	13
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	13
2.2 AISLAMIENTOS A PARTIR DE LAVADO XILEMÁTICO.	14
2.3 IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR.	15
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
3.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3.2 ANÁLISIS MOLECULAR.....	19
3.2.1 PCR DESDE COLONIAS DESARROLLADAS EN MEDIO RS.	19
3.2.2 APLICACIÓN DE PCR DIRECTA AL LAVADO XILEMÁTICO.	24
5. REFERENCIAS	30
6. ANEXO.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: DATOS DE PLANTAS ANALIZADAS.....	14
TABLA 2: PARTIDORES PCR Y SU RESPECTIVO PROPÓSITO.	16
TABLA 3: DETECCIÓN DE <i>AGROBACTERIUM SPP.</i> PROVENIENTES DE COLONIAS AXÉNICAS.	23
TABLA 4: DETECCIÓN POR PCR APLICADA DIRECTAMENTE AL LAVADO XILEMÁTICO DE PLANTAS DE <i>VITIS</i> <i>VINÍFERA</i> PROVENIENTES DE VIVEROS.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. POBLACIÓN DE PLANTAS ANALIZADAS.....	13
FIGURA 2. INSTRUMENTOS Y ENSAMBLADO PARA LA OBTENCIÓN DE LAVADO XILEMÁTICO.....	15
FIGURA 3. PLANTAS DE VID CON SÍNTOMAS ASOCIADOS A <i>A. VITIS</i>	17
FIGURA 4. COLONIAS CON MORFOLOGÍA SIMILAR A <i>ALLORHIZOBIUM VITIS</i> EN MEDIO RS, 7 DÍAS DE CRECIMIENTO. .	18
FIGURA 5. COLONIA CONFIRMADA COMO <i>ALLORHIZOBIUM VITIS</i> PROVENIENTE DE PLANTAS DE VIVERO 2 VARIEDAD VIOGNIER.	18
FIGURA 6. LAVADO XILEMÁTICO DIRECTO SEMBRADO EN MEDIO DE CULTIVO LB, 4 DÍAS DE CRECIMIENTO.	18
FIGURA 7. COLONIAS PURIFICADAS DE <i>ALLORHIZOBIUM VITIS</i> CRECIDAS EN MEDIO NSA, 3 DÍAS DE INCUBACIÓN.	18
FIGURA 8. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PCR CONVENCIONAL PARTIDORES PGF/PGR PARA GENES PEHA (DETECCIÓN DE <i>A. VITIS</i>).....	20
FIGURA 9. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PCR CONVENCIONAL PARTIDORES PGF/PGR PARA GEN PEHA (DETECCIÓN DE <i>A. VITIS</i>).	21
FIGURA 10. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA DE ELECTROFORESIS A RESULTADOS PCR CONVENCIONAL PARTIDORES VCF3/VCR3 PARA GENES VIRC (DETECCIÓN DE <i>AGROBACTERIUM SP.</i> CON PLÁSMIDO PATOGENICO).	22
FIGURA 11. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA DE ELECTROFORESIS A RESULTADOS DE PCR CONVENCIONAL PARTIDORES OCTF/OCTR PARA GENES OCS (DETECCIÓN DE <i>AGROBACTERIUM SP.</i> CON PLÁSMIDOS TIPO OCTOPINA).	22
FIGURA 12. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA DE ELECTROFORESIS A RESULTADOS PCR CONVENCIONAL PARTIDORES NOPF/NOPR PARA GENES NOS (DETECCIÓN DE <i>AGROBACTERIUM SP.</i> CON PLÁSMIDOS TIPO NOPALINA).....	23
FIGURA 13. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA DE ELECTROFORESIS A RESULTADOS DE PCR DUPLEX PARA GENES PEHA (DETECCIÓN DE <i>A. VITIS</i>) Y VIRC (DETECCIÓN DE CEPAS VIRULENTAS DE <i>AGROBACTERIUM</i>).	24
FIGURA 14. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA DE ELECTROFORESIS DE RESULTADOS PCR CONVENCIONAL PARTIDORES PGF/PGR PARA GENES PEHA (DETECCIÓN DE <i>A. VITIS</i>).....	25
FIGURA 15. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA DE ELECTROFORESIS A RESULTADOS PCR CONVENCIONAL PARTIDORES PGF/PGR PARA GENES PEHA (DETECCIÓN DE <i>A. VITIS</i>), ADICIÓN DE BLOTTO Y DMSO A LA REACCIÓN.	25
FIGURA 16. AMPLIFICACIÓN OBTENIDA DE ELECTROFORESIS A RESULTADOS PCR CONVENCIONAL PARTIDORES VCF3/VCR3 PARA GENES VIRC (DETECCIÓN DE <i>AGROBACTERIUM SP.</i> CON PLÁSMIDO PATOGENICO).....	26

RESUMEN

Agrobacterium es un género de bacterias Gram negativa que incluye especies benéficas y patógenas, *A. tumefaciens* afecta a un amplio rango de hospederos, mientras que *A. vitis* es específica de la vid. Las células bacterianas se pueden encontrar de forma latente en el xilema de las plantas, y su plásmido es fundamental en el proceso de patogénesis pues entre otras cualidades pueden sintetizar diversos tipos de opinas. Los tumores de la vid suelen afectar la calidad de la planta y consecuentemente provocar pérdidas económicas en regiones vitivinícolas del mundo. En Chile, actualmente se lleva a cabo un recambio varietal que requiere de implementar metodologías propicias y atendibles para la detección temprana de *Agrobacterium* spp. en plantas asintomáticas de viveros. En este estudio se determinó por ensayos microbiológicos y moleculares cepas tumorogénicas de *Allorhizobium vitis* mediante la recolección del lavado xilemático de plantas asintomáticas. Los ensayos fueron realizados considerando plantas de *Vitis vinifera* cvs. Pinot Noir, Cabernet Sauvignon y Viognier provenientes de dos viveros ubicados en las regiones Metropolitana y O'Higgins. Para obtener el lavado xilemático de las plantas mediante el uso de una bomba de vacío se cultivaron las bacterias en medios semi-selectivos y nutritivos para su análisis microbiológico. Para la detección mediante herramientas moleculares se utilizaron los partidores PGF/PGR, VCF3/VCR3, OCTF/OCTR y NOPF/NOPR. Como resultado se obtuvo que cuatro de las 24 plantas analizadas presentaron células de *Allorhizobium vitis* (3 patogénicas, 1 no patogénica), y una planta con presencia de *Agrobacterium* sp., se consigna además que tres de estos aislados bacterianos poseen plásmido de tipo nopalina. Solo se obtuvo resultados positivos para *Allorhizobium vitis* al aplicar PCR al ADN extraído desde colonias bacterianas, pues al realizar PCR directa al lavado xilemático no se detectaron células de *A. vitis*. Este trabajo contribuye al conocimiento aplicado sobre la diversidad endófitica de cepas con potencial patógeno de *Allorhizobium vitis* y *Agrobacterium* spp. presentes en plantas de vid y contribuye a mejorar la gestión de la salud de las plantas y la eficiencia en la producción vitivinícola.

Palabras clave: *Allorhizobium vitis*, lavado xilemático, *Vitis vinifera*, infección latente, detección temprana.

ABSTRACT

Agrobacterium is a genus of gram-negative bacteria that includes both beneficial and pathogenic species. *A. tumefaciens* affects many hosts, while *A. vitis* (currently *Allorhizobium vitis*) is specific to grapevines. Bacterial cells can be found latently in the xylem of plants, and their plasmid is essential in the pathogenesis process because, among other qualities, they can synthesize various types of opine. Grapevine tumours typically cause economic losses in all wine regions of the world. In Chile, a varietal replacement is currently underway, so implementing a technique for early detection of *Agrobacterium* spp. in asymptomatic plants in nurseries is of vital importance. Through microbiological and molecular assays, this study will determine tumorigenic strains of *A.vitis* by collecting xylem washes from asymptomatic plants. The assays were performed using *Vitis vinifera* cvs. Pinot Noir, Cabernet Sauvignon, and Viognier plants from two nurseries in the Metropolitan and O'Higgins regions. Xylem washes were obtained from plants using a vacuum pump, and bacteria were grown on semi-selective and nutrient media for microbiological analysis. Molecular tools were used for detection, including the PGF/PGR, VCF3/VCR3, OCTF/OCTR, and NOPF/NOPR primers. As a result, four out of 24 analyzed plants had cells of *Allorhizobium vitis* (three pathogenic and one non-pathogenic), and one plant had the presence of *Agrobacterium* sp. Three of the bacterial isolates had nopaline-type plasmids. Detection of *A. vitis* was obtained only when applying PCR to DNA extracted from bacterial colonies, while direct PCR to xylem washes did not detect any positive samples. This study enhances our understanding of potentially pathogenic strains of *Allorhizobium vitis* and *Agrobacterium* spp in grapevine asymptomatic plants; It also aims to improve plant health and the efficiency of wine production.

Keywords: *Allorhizobium vitis*, xylem wash, *Vitis vinífera*, latent infection, early detection.

1. INTRODUCCIÓN

Agrobacterium es un género de bacterias Gram negativas que no forman esporas, perteneciente a la familia Rhizobiaceae. El género incluye bacterias simbiotes como *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Lacroix y Citovsky, 2013), y también, especies patógenas. *Agrobacterium tumefaciens* tiene un amplio rango de especies hospedadoras, mientras que *A. vitis* en la naturaleza se ha detectado casi exclusivamente asociada a *vitis vinifera*, lo cual sugiere un alto grado de especialización (Kusmakovic *et al.*, 2018).

La taxonomía de *Agrobacterium spp.* es dinámica y en muchos casos hay controversias respecto de su nomenclatura. La literatura menciona cuatro especies de importancia agronómica: *Agrobacterium tumefaciens* la cual provoca la enfermedad denominada agalla de la corona en un amplio rango de especies hospedadoras, *A. rhizogenes* que genera la enfermedad de la raíz pilosa, *A. rubi* que causa tumores en hospedantes limitados y *Allorhizobium vitis* que produce agallas en vides (Gelbin, 2003; Mousavi *et al.* 2014). Según Zaenen *et al.* (1973), la bacteria posee un tipo de ADN móvil extracromosomal (plásmido) que induce la generación de tumores; en el caso de bacterias no patogénicas, los autores indicaron que estos carecen de plásmidos (Ti: tumor inducing). Posteriormente, Merlo y Nester (1976) reportaron la presencia de plásmidos en cepas de *Agrobacterium radiobacter* las cuales no son patógenas y se explica debido a la ausencia de la región *vir* en el plásmido.

Según Kusmakovic *et al.* (2018) el plásmido Ti de *A. vitis* contiene los genes primarios requeridos para la patogenicidad y puede determinar el rango de hospederos. El tamaño del plásmido Ti es de aproximadamente 200 Kpb y contiene los siguientes elementos funcionales: ADN-T, región *vir*, genes de catabolismo de opinas, región de replicación y genes de transferencia (conjugación).

Gelvin (2000) sintetiza que el proceso de transferencia de ADN-T se inicia cuando *Agrobacterium* percibe compuestos fenólicos y azúcares provenientes de células vegetales con heridas. Los compuestos actúan como inductores de los genes *vir* bacterianos. Productos químicos como la acetosiringona son percibidos por la proteína sensorial *virA* y después de una serie de procesos se genera la transcripción del gen *vir*. La mayoría de las proteínas *vir* están involucradas en el proceso de generación de ADN-T y la transferencia de ADN-T desde la bacteria hacia la planta.

Cuando las células vegetales son infectadas por *Agrobacterium spp.* producen azúcares y aminoácidos conjugados denominados opinas, estos compuestos son utilizados por las bacterias como fuente de carbono y nitrógeno, o también, como inductor de la transferencia de plásmidos Ti y Ri (tumor inducing y root inducing respectivamente) entre bacterias (transferencia horizontal, descrita en *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*). Debido a esta transferencia horizontal de genes (conjugación) es que células de *Agrobacterium spp.* que no poseen el plásmido pueden adquirirlo eventualmente. Los genes del ADN-T también codifican la biosíntesis de las hormonas vegetales auxinas y citoquininas, esto provoca un desbalance hormonal en las células transformadas, lo cual genera una división y crecimiento celular excesivo y no regulado, lo que finalmente resulta en un “tumor” o “agalla” (Binns y Thomashow, 1988). Hay genes presentes en el ADN-T que codifican enzimas involucradas en la síntesis de opinas, las que son secretadas en las regiones intercelulares del tumor y son metabolizadas por las bacterias (Ellis et al., 1979).

Las opinas juegan un rol importante en la epidemiología de la enfermedad de la agalla de la corona y en la ecología de la bacteria tumorogénica. Hasta ahora más de 20 tipos de opinas han sido descritas y caracterizadas. La presencia de opinas no se limita a la zona del tumor, pueden ser translocadas a otras partes de la planta y también secretarse en las raíces mediante el exudado radicular (Kusmakovic *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Sawada (1995) se evaluó la eficacia de cebadores para la detección de plásmidos Ti y Ri, se demostró que los cebadores (VCF/VCR) amplifican un fragmento esperado de 730 pb (pares de bases) en especies patógenas de *Agrobacterium* tales como *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *Allorhizobium vitis*, entre otras. Susaki *et al.* (2004) realizaron una detección de cepas de *Agrobacterium* utilizando distintos partidores, concluyendo que los cebadores VCF3/VCR3 y VCF5/VCR5 amplifican un número mayor de cepas tumorigénicas respecto de los partidores VCF/VCR; se explicita en este trabajo que los cebadores VCF3/VCR3 son los más adecuado para la detección de células patógenas en muestras de manzanos jóvenes.

A. vitis puede infectar sistémicamente la vid y propagarse a través de la savia del xilema, *A. vitis* también se ha aislado desde vides asintomáticas con infecciones latentes. La población bacteriana aumenta en primavera, luego disminuye en verano y vuelve a aumentar en otoño. Su temperatura óptima es entre 25 a 28°C (Kusmakovic *et al.*, 2018).

Los tumores de la vid son frecuentes en todas las regiones vitícolas del mundo y causan constantemente significativas pérdidas económicas y productivas. La enfermedad se puede diseminar mediante el material vegetal que tenga la infección latente o que simplemente posea células patógenas. En Chile actualmente se está llevando a cabo un proceso de recambio varietal en las zonas productoras de uva de mesa y vino, esto también ocurre en la región de O'Higgins,

la cual a nivel nacional es la región que posee mayor superficie plantada con uva de mesa destinando 12.736 hectáreas. A demás posee 41.539 ha destinadas a la producción de uva para vino siendo la segunda región más importante del territorio nacional. Para este proceso los viveros son los principales encargados de proveer plantas saludables. Debido a esto, detectar plantas con infección latente por *Allorhizobium vitis* y *Agrobacterium spp.* en plantas de vid bajo condiciones de viveros es de vital importancia, pues en esto radica el control oportuno y precoz, incluso se puede considerar como la primera aproximación de prevención de la enfermedad en los predios comerciales. Por esta razón, es necesario detectar de manera temprana plantas con infección latente por *Agrobacterium vitis* y *Agrobacterium spp.* con el objetivo de reducir el potencial riesgo en la calidad de las plantas y mortalidad de estas en el campo.

Hipótesis

H: Es posible detectar por ensayos microbiológicos y moleculares cepas tumorogénicas de *Allorhizobium vitis* mediante la recolección del lavado xilemático de plantas asintomáticas de tres cultivares de *Vitis vinifera* provenientes de vivero.

Objetivo general

Determinar las especies de *A. Vitis* asociadas con plantas asintomáticas de tres cultivares de *Vitis vinifera* provenientes de dos viveros ubicados en la región de O'Higgins y Metropolitana.

Objetivos específicos

OE1: Detectar infección latente de *A. vitis* en lavado xilemático de tres cultivares de vides jóvenes provenientes de dos viveros ubicados en la región de O'Higgins y Metropolitana.

OE2: Identificar *A. vitis* mediante el uso de técnicas microbiológicas y moleculares.

2. MARCO METODOLÓGICO

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.

2.1 Material biológico

Plantas de *Vitis vinífera* fueron cedidas para análisis de laboratorio para detección de A.n vitis. El viñedo situado en la comuna de Chimbarongo cedió 26 plantas de la variedad Pinot Noir adquiridas desde un vivero instalado en la región Metropolitana (vivero 1) y 30 plantas de las variedades Cabernet Sauvignon, 30 de Viognier y 30 Pinot Noir provenientes de un vivero de la región de O'Higgins (vivero 2). Las plantas estudiadas tenían un año, se encontraban en estado de dormancia y presentaban una raíz desnuda (plantas barbadas).

Las plantas se mantuvieron a 4°C durante 1 mes antes de extraer el lavado xilemático, desde donde fue posible coleccionar bacterias viables.



Figura 1. Población de plantas analizadas.

Tabla 1. Datos de plantas analizadas.

Procedencia	Variedad	Total plantas	N° muestras analizadas	Edad plantas	Plantas sintomáticas	Plantas asintomáticas
Vivero 1	Pinot Noir	26	6	1 año	11	15
Vivero 2	Pinot Noir	30	6	1 año	0	30
Vivero 2	Viognier	30	6	1 año	0	30
Vivero 2	Cabernet Sauvignon	30	6	1 año	0	30

2.2 Aislamiento bacteriano en medio de cultivo desde el lavado xilemático.

Para obtener colonias bacterianas se extrajeron muestras de lavado xilemático de plantas asintomáticas, adaptando la metodología empleada por Bazzi *et al.* (1987). Se seleccionaron plantas de vid dormantes provenientes de viveros las cuales se encontraban almacenadas a 4°C. Los tallos tenían entre 13,5 a 20 cm de longitud, 0,7 a 1 cm de diámetro y 1 a 2 nudos. En el extremo proximal de cada ramilla se colocó un trozo de tubo Tygon el cual fue unido a un tubo Falcon de 50 ml con una perforación en el centro de su tapa. El tubo Falcon se unió a un matraz kitasato y un tubo Falcon de 15 ml fue dispuesto en el interior del matraz. En el extremo distal del corte se ubicó un tubo de Tygon el cual fue aforado con 2,5 ml de agua destilada. Se forzó el lavado del xilema del tallo mediante la utilización de una bomba de vacío de membrana (BOECO modelo R-300) a una potencia de entre 75 a 80 Kpa. La bomba se mantuvo en funcionamiento entre 2 a 5 minutos, hasta que se recuperó una solución de 2,5 ml la cual fue centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. Luego se eliminó el sobrenadante y se conservó el pellet, posteriormente se resuspendió el pellet en 1 ml de agua destilada estéril y se homogenizó con un vortex. De la solución resultante una porción de 0,3 ml se almacenó a -20 °C para la realización de PCR directa (posterior a la extracción de ADN), otra porción de 0,7 ml se mezcló con un 2% (0,14 ml) de glicerol para preservar a -80°C, de esta porción se realizó la posterior siembra de colonias bacterianas utilizando un volumen de 0,1 µl.

Las colonias bacterianas fueron incubadas a 27°C en medios de cultivo RS (Roy and Sasser, 1983) y LB (Lysogeny broth) por un periodo mínimo de 7 días. Las colonias que presentaron una morfología similar a la de *A. vitis* o *A. tumefaciens* en los medios mencionados fueron sometidas

a ensayos PCR para identificación, igualmente se sometieron colonias que presentaban una morfología diferente.



Figura 2. Instrumentos y ensamblado para la obtención de lavado xilemático.

2.3 Identificación microbiológica y molecular.

Para la identificación morfológica de los aislamientos se utilizó el medio semi-selectivo RS (Roy y Sasser, 1983). Las colonias fueron comparadas por sus características de crecimiento y desarrollo con cepas de referencia, las cuales brevemente se detallan a continuación: en medio RS a los 5 días a 28°C las colonias tienen un centro rojo opaco, márgenes translucidos y una apariencia mucoide. A los 2-3 días a 28°C en medio LB las colonias de *A. tumefaciens* presentan un color amarillo blanquecino y una apariencia mucoide, no levaniforme. Para la identificación molecular se extrajo ADN total desde las colonias bacterianas crecidas en medios de cultivo y directamente desde el fluido xilemático.

Desde cultivos bacterianos desarrollados en los medios descritos previamente, se seleccionaron tres colonias y se les extrajo ADN mediante shock térmico. Para la extracción rápida mediante shock térmico se suspendieron colonias bacterianas en 750 µL de agua destilada estéril, se incubaron en un termoblock a 100°C durante 10 min, para luego refrigerar a -20°C. En las PCR

realizadas se utilizó como control positivo de *A. tumefaciens* la cepa GV3101 y como control positivo de *A. vitis* se utilizó una cepa obtenida en el mismo estudio de código UVPN1, en todas las PCR se dispuso un control negativo agua.

Para realizar las pruebas PCR se utilizó la metodología y los cebadores descritos por Zsegedi y Bottka (2002), Suzaki (2004) y Bini *et al* (2008). Los cebadores específicos utilizados fueron los indicados en la Tabla 2.

Se realizó una reacción de PCR dúplex con partidores PGF/PGR y VCF3/VCR3 para verificar su viabilidad. Las demás reacciones PCR fueron simples.

Los productos PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% durante 60 minutos a 80 volts. Los geles fueron teñidos en con SYBR safe (5 µg / 100mL) y luego visualizados en un transiluminador UV a una longitud de onda de 365 nm.

Tabla 2. Partidores PCR y su respectivo propósito.

Cebadores	Objetivo	Gen	Pares de base	Referencia
PGF / PGR	Detección de cepas de <i>A. vitis</i> patógenas y no patógenas.	PehA	466	Zsegedi y Bottka (2002)
VCF3 / VCR3	Detección de cepas de <i>Agrobacterium</i> .	VirC	414	Suzaki (2004)
OCTF / OCRT	Detección de cepas tipo octopina	Ocs	475	Bini <i>et al.</i> (2008)
NOPF / NOPR	Detección de cepas tipo nopalina	Nos	394	Bini <i>et al.</i> (2008)

Como antecedente adicional de este estudio, se debe indicar que se mantuvieron plantas a 4°C durante 1 mes antes de extraer el lavado xilemático, desde donde fue posible coleccionar bacterias viables.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 116 plantas recibidas para la realización de este estudio, en 11 plantas de la variedad Pinot Noir provenientes del vivero 1 ubicado en la región metropolitana fue posible determinar síntomas atribuibles a *Allorhizobium vitis*. El síntoma consistió en una pequeña protuberancia, similar a una agalla, en la unión injerto-portainjerto (Figura 3).



Figura 3. Plantas de vid con síntomas asociados a *A. vitis*.

3.1 Análisis microbiológico

Las colonias que exhibieron morfología similar a la de *Allorhizobium vitis* en medio RS presentaron en su mayoría bordes translucidos y regulares, un centro de color amarillo blanquecino y una apariencia mucoide a los 7 días de crecimiento, en ningún caso se mostró una coloración roja opaca como declaran Roy y Sasser (1983), Ignatov *et al.* (2016) y otros autores. En medio nutritivo LB se observó el crecimiento de diversas especies bacterianas, por lo que no se realizó selección de colonias desde este medio de cultivo. El medio RS ajustado a pH 7,2 presentó restricción para el crecimiento de otros microorganismos bacterianos, sin embargo, no inhibió por completo el crecimiento de hongos.

Adicionalmente se sembraron colonias con morfología similar a *Allorhizobium vitis* en medio de cultivo NSA con el objetivo de conocer y asociar su fenotipo y obtener ADN puro. Se puede apreciar que las colonias individuales presentan bordes regulares, de forma circular y una coloración blanquecina.



Figura 4. Colonias con morfología similar a *Allorhizobium vitis* en medio RS, 7 días de crecimiento.



Figura 5. colonia confirmada como *Allorhizobium vitis* proveniente de plantas de Vivero 2 variedad Viognier.



Figura 6. Lavado xilemático directo sembrado en medio de cultivo LB, 4 días de crecimiento.

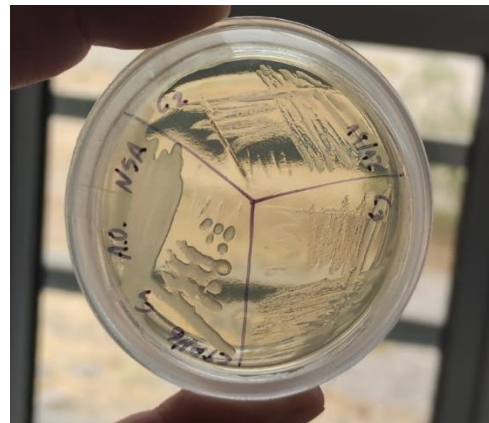


Figura 7. Colonias purificadas de *Allorhizobium vitis* crecidas en medio NSA, 3 días de incubación.

El método empleado para la recolección de colonias bacterianas desde plantas de vivero resultó ser efectivo en su propósito. En un estudio previo realizado por Bazzi (1987) se utilizaron ramillas de 20 cm con un diámetro de entre 6 a 12 mm. Por otra parte en el presente estudio se recolectaron colonias de *Allorhizobium vitis* desde ramillas con diferentes largo y diámetro, la más pequeña contaba con 13 cm de largo y 70 mm de diámetro (tallo principal de la planta), por lo tanto, mediante este estudio se sugiere que es posible utilizar trozos leñosos de menor longitud y de un mayor diámetro. La factibilidad de funcionamiento óptimo de la bomba reportada por Bazzi fue de 8 Kpa. En este trabajo se realizó la extracción de fluido a una potencia entre 75 a 80 Kpa lo cual varía dependiendo de la planta procesada y la afinidad del diámetro de la planta con los instrumentos utilizados (principalmente con el tubo Tygon). El diámetro del tronco es importante para la colecta de bacterias endófitas del xilema, ya que a mayor diámetro el fluido se obtiene de forma más rápida, por el contrario, a menor diámetro la colecta de fluido se suele prolongar este procedimiento. De hecho, en plantas con un diámetro menor a 70 mm se hizo imposible la toma de muestras, puesto que esto restringe la circulación de agua por los haces vasculares.

3.2 Análisis molecular

3.2.1 PCR desde colonias desarrolladas en medio RS.

De las 24 plantas asintomáticas analizadas cinco de ellas desarrollaron colonias similares a la de *Allorhizobium vitis* (ver figura 4 y 5); estas cepas tuvieron amplificación del gen *PehA* el cual posee un fragmento esperado de 466 pb. Consignar que una de las plantas provenientes del Vivero 1 y de la variedad Pinot Noir fue positiva a este ensayo PCR. Por otra parte, cuatro plantas provenientes del Vivero 2 amplificaron el fragmento esperado para *A. vitis*, específicamente dos plantas de la variedad Viognier, una planta del cv. Cabernet Sauvignon y una planta cv. Pinot Noir.

El ADN proveniente de colonias bacterianas con morfología similar fue sometido a ensayos PCR con partidores VCF3/VCR3 para detectar cepas tumorogénicas de *A. vitis*, se evidenció en cuatro de las 24 muestras amplificación del fragmento esperado a 414 pb. En detalle, la presencia del plásmido tumorogénico se estableció en tres plantas del cv. Pinot Noir, dos de las cuales

proceden del vivero 1 y la restante del vivero 2. Se detectó además un aislado de *Agrobacterium* sp. con plásmido tumorogénico en una planta del cv. Cabernet Sauvignon del Vivero 2.

Con estos resultados se confirma que plantas provenientes de los dos viveros asociados a este estudio, poseen cepas de *A. vitis* con plásmido tumorogénico. El otro punto a destacar se refiere a que una de las muestras amplificó el gen *VirC* pero no el gen *PehA*, lo que es indicativo de la presencia de una especie de *Agrobacterium* patógena pero que no corresponde a *A. vitis*, pudiendo probablemente tratarse de *A. tumefaciens*.

Al obtener seis muestras positivas como *A. vitis* o *Agrobacterium tumefaciens* las 6 fueron analizadas para determinación del tipo de opina, tres de estas amplificaron el fragmento esperado (394 pb) para el gen *nos*, el cual se relaciona con la producción de nopalina. En cuanto al tipo de opina que sintetiza el gen *ocs* para octopina, ningún aislado de *A. vitis* tumorogénico amplificó el fragmento esperado, esto quiere decir que 3 de las muestras analizadas poseen un tipo de opina diferente a octopina y nopalina.



Figura 8. Amplificación obtenida de Electroforesis en gel de agarosa PCR convencional partidores PGF/PGR para genes *PehA* (detección de *A. vitis*). C+: control positivo *A. vitis*. M: marcador de peso molecular. Casillas 1 a la 12: ADN extraído desde colonias bacterianas provenientes de lavado xilemático. C-: control negativo.

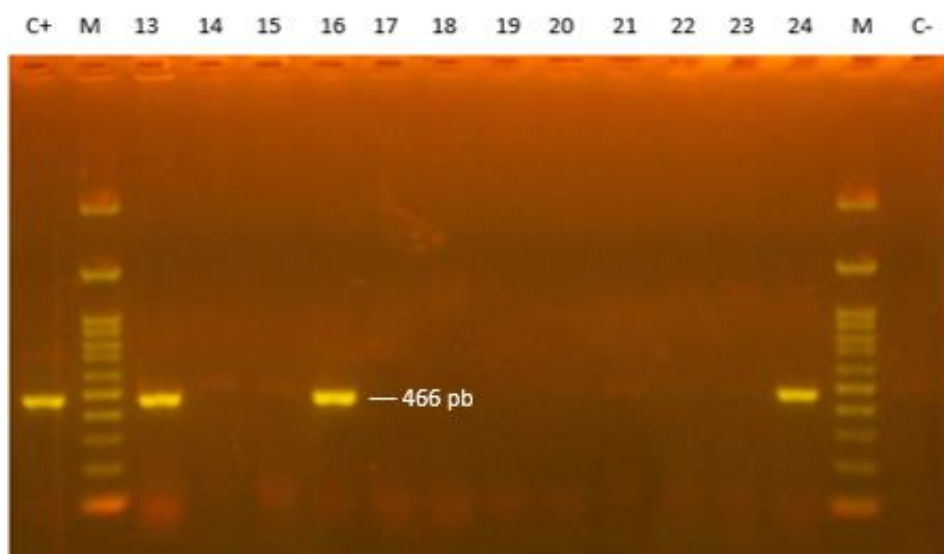


Figura 9. Amplificación obtenida de Electroforesis en gel de agarosa PCR convencional partidores PGF/PGR para gen *PehA* (detección de *A. vitis*). C+: control positivo *A. vitis*. M: marcador de peso molecular. Casillas 13 a la 24: ADN extraído desde colonias bacterianas provenientes de lavado xilemático. C-: control negativo.

La combinación de partidores PGF/PGR permite la detección de cepas de *Allorhizobium vitis* tanto patogénicas como no patogénicas, esto se explica puesto que el gen *PehA* (producción de poligalacturonasa) es cromosomal y no plasmidial. (Szegedy y Bottka, 2002). Al utilizar la combinación VCF3/VCR3 se pueden diferenciar las cepas de *Allorhizobium vitis* patógenas de las no patógenas, pero no permiten identificar la especie de forma precisa, por ende se deben utilizar combinados ambos pares de partidores para la detección. Según Bazzi (1987) el no detectar la bacteria, no se relaciona con que no esté presente en los tejidos de la planta, puesto que no se recupera la totalidad del fluido a través del lavado xilemático. En su estudio menciona que recupero un 1,8% a 4,6% de las bacterias inoculadas al utilizar 2,4 y 8 Kpa, respectivamente. Esto puede explicar en cierta medida la escasa concentración bacteriana en el fluido xilemático y por ende una menor posibilidad de detección con los partidores específicos.

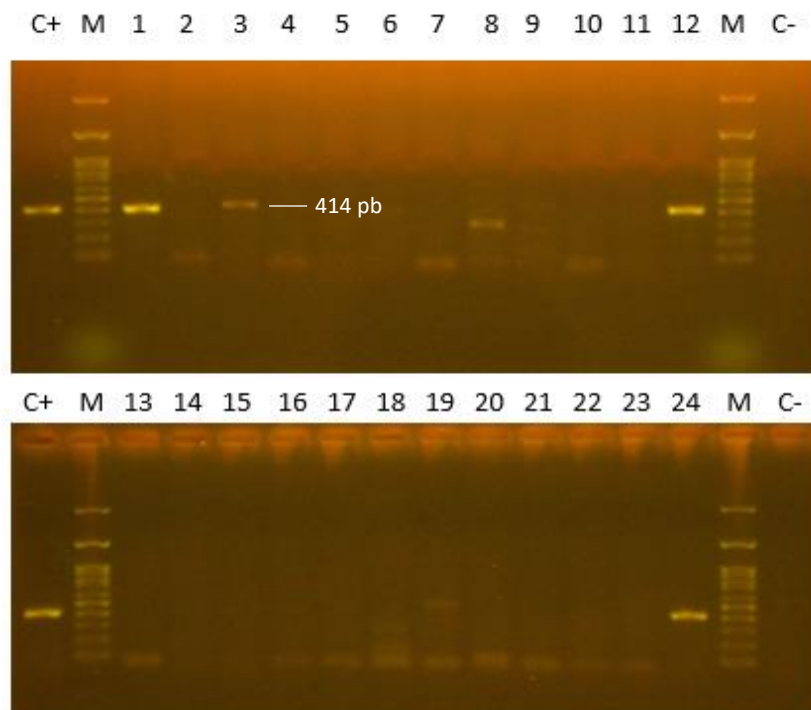


Figura 10. Amplificación obtenida de Electroforesis a resultados PCR convencional partidores VCF3/VCR3 para genes VirC (detección de *Agrobacterium* sp. Con plásmido patogénico). C+: control positivo *A. vitis* . M: marcador de peso molecular. Casillas 1 a la 24: muestras de ADN extraído desde colonias. C-: control negativo.

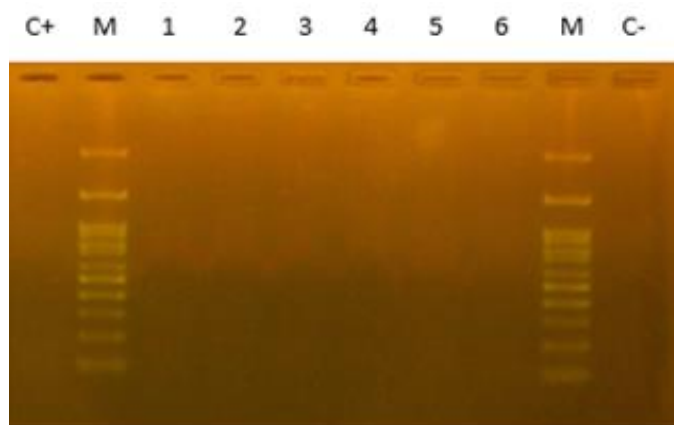


Figura 11. Amplificación obtenida de Electroforesis a resultados de PCR convencional partidores OCTF/OCTR para genes ocs (detección de *Agrobacterium* sp. Con plásmidos tipo octopina). C+: No hay stock de control positivo. M: marcador de peso molecular. Casillas 1 a la 6: cepas positivas de *Allorhizobium vitis* (ADN desde colonias). C-: control negativo.

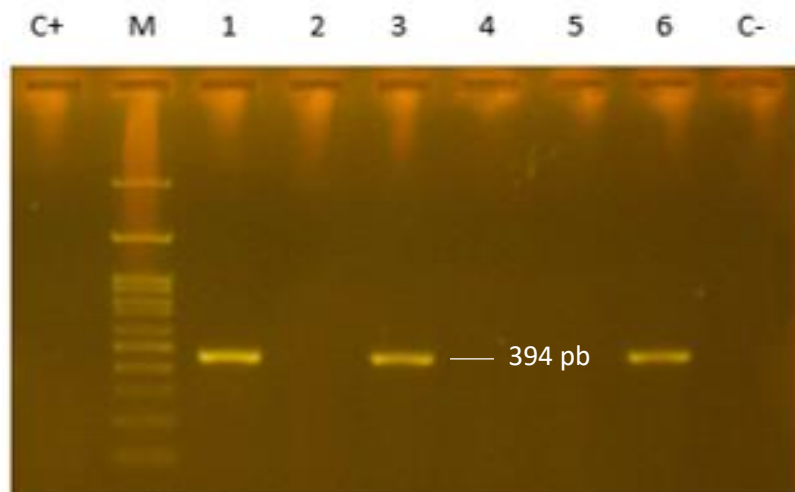


Figura 12. Amplificación obtenida de Electroforesis a resultados PCR convencional partidores NOPF/NOPR para genes nos (detección de *Agrobacterium* sp. con plásmidos tipo nopalina). C+: No hay stock de control positivo. M: marcador de peso molecular. Casillas 1 a 6: cepas positivas de *Allorhizobium vitis* (ADN desde colonias). C-: control negativo.

Tabla 3. Detección de *Agrobacterium* spp. provenientes de colonias axénicas.

Procedencia	Variedad	N° plantas analizadas	PGF/PGR	VCF3/VCR3	Tipo de plásmido
Vivero 1	Pinot noir	6	1	2	Nopalina (solo una muestra)
Vivero 2	Pinot noir	6	1	1	Nopalina
Vivero 2	Viognier	6	2	0	Desconocido
Vivero 2	Cabernet Sauvignon	6	1	1	Nopalina

3.2.2 Aplicación de PCR directa al lavado xilemático.

Se realizó una PCR a 16 muestras de fluido xilemático directo, como resultado se obtuvo que una muestra amplificó el fragmento esperado, la casilla número uno se trata de una planta proveniente del Vivero 1 de variedad Pinot Noir; se consigna que este resultado debe ser ratificado. El resto de las muestras analizadas desde lavado xilemático directo mediante PCR, no mostró amplificación de fragmentos de ADN esperado (Figura 14). En este sentido, los protocolos se modificaron para lograr mayor especificidad de la PCR, adicionando Blotto y DMSO a la reacción.



Figura 13. Amplificación obtenida de Electroforesis a resultados de PCR duplex para genes PehA (detección de *A. vitis*) y VirC (detección de cepas virulentas de *Agrobacterium*). C+: control positivo. Casilla 1: ADN obtenido a partir de lavado xilemático directo. M: marcador de peso molecular. Casillas 2 a la 16: ADN obtenido a partir de lavado xilemático directo. C-: control negativo.

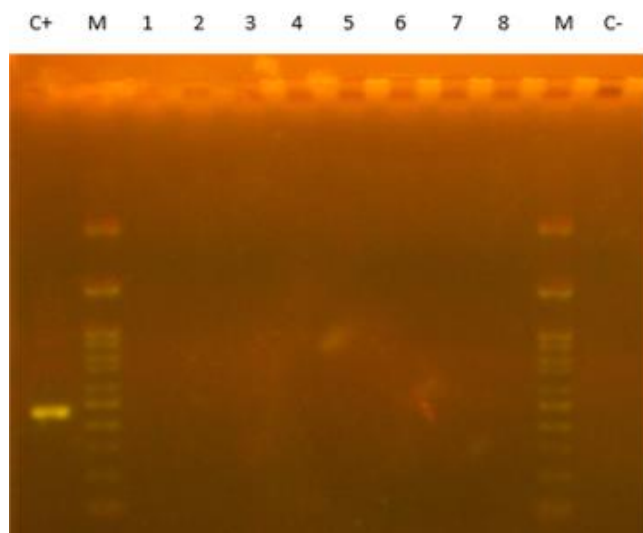


Figura 14. Amplificación obtenida de Electroforesis de resultados PCR convencional partidores PGF/PGR para genes PehA (detección de *A. vitis*). C+: control positivo. M: marcador de peso molecular. Casillas 1 a la 8: muestras de lavado xilemático directo de plantas de vivero asintomáticas. C-: control negativo.

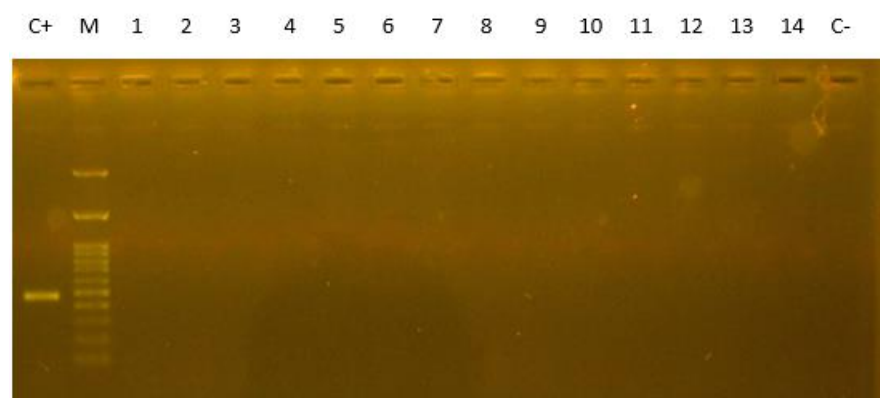


Figura 15. Amplificación obtenida de Electroforesis a resultados PCR convencional partidores PGF/PGR para genes PehA (detección de *A. vitis*), Adición de Blotto y DMSO a la reacción. C+: control positivo. M: marcador de peso molecular. Casillas 1 a la 6: muestras de lavado xilemático directo de plantas de vivero asintomáticas. Casillas 7 a la 14: muestras de lloro primaveral de plantas establecidas. C-: control negativo.

El Blotto permite reducir la presencia de compuestos de la planta que inhiben la reacción PCR. Por su parte el DMSO aumenta el rendimiento de la reacción y también su especificidad. En el análisis realizado la utilización de estos dos reactivos no permitió la detección de colonias de *Agrobacterium spp* ni de *Allorhizobium vitis* (Figura 15). Esto se puede explicar por la baja concentración bacteriana que posee el lavado xilemático utilizado para la extracción de ADN.

Con el objetivo de confirmar la ausencia de amplificaciones desde lavado xilemático directo, se realizó una PCR al lavado xilemático solo de muestras positivas (confirmadas mediante PCR a colonias bacterianas) y algunas muestras que entregaron resultados técnicos poco fiables. Como resultado (Figura 16) se obtuvo que empleando la metodología descrita no se logró detectar *A. vitis* ni *Agrobacterium spp*, desde el lavado xilemático directo, esto se puede asociar a la baja concentración bacteriana presente en el lavado xilemático y también a la cantidad de inhibidores presentes en las muestras como extractos crudos. Sin embargo no se debe descartar que quizá el método de análisis no es el adecuado al implementarlo en lavado xilemático directo.

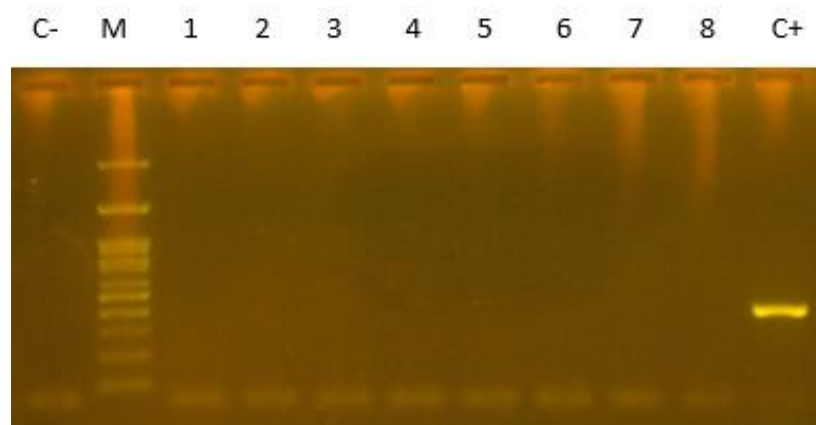


Figura 16. Amplificación obtenida de Electroforesis a resultados PCR convencional partidores VCF3/VCR3 para genes VirC (detección de *Agrobacterium* sp. con plásmido patogénico). C-: control negativo. M: marcador de peso molecular. Casillas 1 a la 8: muestras de lavado xilemático directo de muestras confirmadas como positivas para el gen VirC. C+: control positivo.

Los resultados obtenidos dan cuenta de que el método de PCR a partir de colonias bacterianas posee una mayor sensibilidad de detección respecto de la PCR directa al fluido xilemático. Esto es consistente el hecho que cuando se obtuvieron colonias similares a *A. vitis* en medio RS se obtuvieron 6 muestras positivas, mientras que con el ADN extraído del fluido xilemático directo no hubo amplificaciones por PCR.

En futuros experimentos relativos a la detección de *A. vitis* en fluido derivado del lavado xilemático, es recomendable disminuir el volumen de agua aplicada luego de la centrifugación.

Tabla 4. Detección por PCR aplicada directamente al lavado xilemático de plantas de *Vitis vinífera* provenientes de viveros.

Procedencia	Variedad	N° plantas analizadas	PCR PGF/PGR (muestras positivas)	PCR VCF3/VCR3 (muestras positivas)	Tipo plásmido
Vivero 1	Pinot noir	6	0	0	No aplica
Vivero 2	Pinot noir	6	0	0	No aplica
Vivero 2	Viognier	6	0	0	No aplica
Vivero 2	Cabernet Sauvignon	6	0	0	No aplica

Detectar colonias de *Agrobacterium spp.* y *Allorhizobium vitis* en plantas de vivero es de vital importancia ya que como menciona Bazzi (1987) las plantas jóvenes de entre dos y tres años pueden morir si se encuentran infectadas, lo cual se traduce a pérdidas económicas. Cabe destacar que para que se manifieste la virulencia de la bacteria la planta debe presentar heridas, lo cual es común que se produzcan en las labores de plantación y/o injertación.

Según Bustos y San Martín (2019), *A. tumefaciens* y *Allorhizobium vitis* se consideran plagas reglamentadas (no cuarentenarias) para la producción de plantas de vid en viveros, es decir que el vivero no puede comercializar plantas que presenten estas bacterias. El protocolo que se usa actualmente para verificar la presencia o ausencia de *A. vitis* y *Agrobacterium spp.* en viveros se basa en la toma de muestras de agallas o raíces para *A. tumefaciens* y de zona de agalla o injerto para *Allorhizobium vitis* (Servicio agrícola y ganadero, 2017). El problema es que para recolectar agallas la planta ya debe estar afectada, por lo tanto, se debe adoptar un método

de análisis que permita detectar la presencia de células bacterianas antes de la aparición de síntomas en vivero, ya que como ha sido demostrado por múltiples autores y ahora confirmado en este trabajo *Allorhizobium vitis* puede sobrevivir de forma endófito por largos periodos de tiempo. Como antecedente adicional de este estudio, se debe indicar que se mantuvieron plantas a 4°C durante 1 mes antes de extraer el lavado xilemático, desde donde fue posible coleccionar bacterias viables.

4. CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de *Allorhizobium vitis* y *Agrobacterium* sp., esto por medio de la metodología de lavado xilemático de plantas de vid asintomáticas y posterior aplicación de los análisis microbiológicos y moleculares.
2. Se confirmó la presencia de cepas tumorogénicas y no tumorogénicas de *Allorhizobium vitis* en plantas de los dos viveros analizados, lo cual representa un riesgo para la calidad de la producción de vid en viveros.
3. Se determinó un aislado de *Agrobacterium* sp. con presencia del plásmido Ti, lo que sugiere la existencia de más de una especie potencialmente patógena asociada a las plantas de vides analizadas. Su identidad será determinada en futuros estudios epidemiológicos.
4. Se identificaron por PCR cepas de *A. vitis* que sintetizan nopalina y, en tres aislados, opinas diferentes a octopina y nopalina; la identidad de estas últimas deben ser confirmadas con aislados de referencia.
5. La aplicación de PCR directa al lavado xilemático no fue satisfactorio para la detección de *A. vitis* o *Agrobacterium spp.*, esto a pesar de la modificación de los protocolos y la adición de reactivos que mejoran la sensibilidad y especificidad en la reacción. Se consigna entonces, que la aplicación de PCR específica a colonias bacterianas desarrolladas en medio de cultivo RS posee una mayor probabilidad de detección.
6. Mediante la observación, se detectaron 11 plantas de la variedad Pinot Noir con síntomas atribuibles a bacteriosis (*A. vitis*).
7. En el ámbito del diagnóstico, este trabajo contribuye al conocimiento aplicado sobre la diversidad endófitas de cepas con potencial patógeno de *Allorhizobium vitis* y *Agrobacterium spp.* presentes en plantas de vid.
8. La relevancia de este trabajo de investigación radica en la validación de un método de detección temprana de *Allorhizobium vitis* y *Agrobacterium spp.* en plantas asintomáticas, para mejorar la gestión de la salud de las plantas y la eficiencia en la producción vitivinícola.

5. REFERENCIAS

- Alippi, A. Lopez, A. y Balatti, P. (2011). Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. Revista argentina de microbiología, 43 (4), 278-286.
- Andrade, G., Sartoretto, L., Brasileiro, A. (2003). Biología molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp., Fitopatologia Brasileira, 28(5), 465-476. doi:10.1590/s0100-41582003000500001
- Bini, F., Kuczmog, A., Putnoky, P., Otten, L., Bazzi, C., Burr, J. y Szegedi, E. (2008). Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. Vitis, 47(3), 181-189. doi:10.5073/VITIS.2008.47.181-189
- Binns, A. y Thomashow, M. (1988). Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. Annual review of microbiology, 42(1), 575-606. doi:10.1146/annurev.mi.42.100188.003043
- Biondi, E., Bini, F., Anaclerio, F. y Bazzi, C. (2009). Effect of bioagents and resistance inducers on grapevine crown gall. Phytopathologia Mediterranea, 48(3), 379-384. <http://www.jstor.org/stable/26463361>
- Biondi, E., Galeone, A., Kuzmanović, N., Ardizzi, S., Lucchese, C. y Bertaccini, A. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* detection in kiwifruit plant tissue and bleeding sap. Annals of applied biology. 161 (1), 60-70. <https://doi.org/10.1111/aab.12001>
- Burr, T. J. (2004). Grape crown gall biology and strategies for control, Foundation plant science Grape program newsletter. Octubre 2004. University of California-Davis. P16-18
- Bustos S., San Martin C. 2019. Viveros frutales: plagas reglamentadas y las principales obligaciones. Segunda Edición del Servicio Agrícola y Ganadero. División Protección Agrícola y Forestal. 68 p.

- Ellis, J., Kerr, A., Van Montagu, M. y Schell, J. (1979). *Agrobacterium*: genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. *Physiological plant pathology*, 15(3), 311–319. doi:10.1016/0048-4059(79)90082-1
- Farkas, E. y Haas, J. (1985). Biological control of crown gall in rose nursery stock. *Phytoparasitica*, 13(2), 121–127. doi:10.1007/bf02980889
- Frikha-Gargouri, O., Ben, D., Ghorbel, I., Charfeddine, I., Jlaiel, L., Triki, M., y Tounsi, S. (2016). Lipopeptides from a novel *Bacillus methylotrophicus* 39b strain suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Pest Management Science*, 73(3), 568–574. doi:10.1002/ps.4331
- Gelbin, S. (2000). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 51, 223–56. DOI: 10.1146/annurev.arplant.51.1.223
- Gelbin, S. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67 (1), 16–37. 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003
- Haas, J., Moore, L., Ream, W. y Manulis, S. (1995). Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2879–2884.
- Ignatov, A., Khodykina, M., Vinogradova, S., Polityko, V., Kornev, K. y Mazurin, E. (2016). First Report of *Agrobacterium vitis* Causing Crown Galls of Wine Grape in Russia. *Plant disease*, 100(4), 853. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1101-PDN>
- Kado, C. y Heskett, M. (1970). Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60(6), 969–976. doi:10.1094/phyto-60-969
- Kawaguchi, A., Inoue, K., y Ichinose, Y. (2008). Biological Control of Crown Gall of Grapevine, Rose, and Tomato by NonPathogenic *Agrobacterium vitis* Strain VAR03-1. *Phytopathology*, 98(11), 1218–1225. doi:10.1094/phyto-98-11-1218
- Kerr, A., y Tate, M. E. (1984). Agrocin and the biological control of crown gall. *Microbiological Sciences* 1 (1), 1–4.

- Kumagai, L. y Fabritius, A. (2008). Detection and differentiation of pathogenic *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* in grapevine using multiplex Bio-PCR. Proceedings of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference, 42-47.
- Kuzmanović, N., Puławska, J., Hao, L. y Burr, T.J. (2018). The ecology of *Agrobacterium vitis* and management of crown gall disease in vineyards. In: Gelvin, S. (eds) *Agrobacterium* biology. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 418. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/82_2018_85
- Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Gašić, K., Zlatković, N. y Obradović, A. (2014). Characterization and phylogenetic diversity of *Agrobacterium vitis* from Serbia based on sequence analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) region. European Journal of Plant Pathology, 140(4), 757-768. doi:10.1007/s10658-014-0507-5
- Lacroix, By Citovsky, B. (2013). *Agrobacterium*. Brenner's Encyclopedia of Genetics, 1 (2), 52-54. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00025-5
- Merlo, D. y Nester, E. (1977). Plasmids in avirulent strains of *Agrobacterium*. Journal of Bacteriology, 129 (1), 76-80. doi: 10.1128/jb.129.1.76-80.1977
- Mougel, C., Cournoyer, B. y Nesme, X. (2001). Novel Tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *agrobacterium* biovars 1 and 2. applied and environmental microbiology, 67(1), 65-74. doi:10.1128/AEM.67.1.65-74.2001
- Mousavi, S., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L. y Lindström, K. (2014). Phylogeny of the Rhizobium-Allorhizobium-*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. Systematic and Applied Microbiology, 37(3), 208-215. doi:10.1016/j.syapm.2013.12.007
- Puławska, J. y Sobiczewski, P. (2005). Development of a seminested PCR based method for sensitive detection of tumorigenic *Agrobacterium* in soil. Journal of Applied Microbiology, 98(3), 710-721. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02503.x

- Putawska, J., Willems, A. y Sobiczewski, P. (2006). Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and applied Microbiology*, 29(6), 470-479.
- Sawada, H., Leki, H. y Matsuda, I. (1995). PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (2), 828-831. DOI: 10.1128/aem.61.2.828-831.1995
- Servicio Agrícola y Ganadero (7 de noviembre de 2017). Instructivo técnico para el diagnóstico de bacterias fitopatógenas en material de propagación de exportación. <https://www.sag.cl/sites/default/files/it-semilleros-bacteriologia.pdf>
- Shams, M., Campillo, T., Lavire, C., Muller, D., Nesme, X., y Vial, L. (2012). Rapid and efficient methods to isolate, type strains and determine species of *Agrobacterium* spp. in pure culture and complex environments. *Biochemical Testing*. doi:10.5772/36068
- Stonier, T., Beardsley, R., Parsons, L. y McSharry, J. (1966) *Agrobacterium tumefaciens* Conn. 3. Effect of thermal shock on bacteria in relation to tumor inducing ability. *Journal of Bacteriology*, 91(1), 266-269. DOI: 10.1128/jb.91.1.266-269.1966.
- Stover, E., Swartz, H., y Burr, T. (1997). Crown gall Formation in a Diverse Collection of Vitis Genotypes Inoculated with *Agrobacterium vitis*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 26-32.
- Suzaki, K., Yoshida, K., Sawada, H. (2004). Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *J. Journal of General Plant Pathology*, 70(6), 342-347. DOI:10.1007/s10327-004-0133-8
- Szegedi, E. y Bottka, S. (2002). Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semi selective medium. *Vitis*, 41 (1), 37-42.
- Szegedi, E., Bottka, S., Mikulas, J., Otten, L. y Sule, S. (2005). Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from grapevine. *Vitis*, 44, 49-54.

Zaenen, I., van Larebeke, N., Teuchy, H., van Montagu, M. y Schell, J. (1974). Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology*, 86 (1), 109-127. doi:10.1016/s0022-2836(74)80011-2

6. ANEXO

Recetas de los medios de cultivo:

Tabla 5. Receta para medio de cultivo Roy y Sasser (1983)

Medio de cultivo	Ingredientes	Gramos/litro
RS	MgSO ₄	0,2
	K ₂ HPO ₄	0,9
	KH ₂ PO ₄	0,7
	Adonitol	4,0
	Extracto de levadura	0,14
	NaCl	0,2
	Ácido bórico	1,0
	Agar	15

Tabla 6. Receta para medio de cultivo Nutrient Agar Sacarose

Medio de cultivo	Ingredientes	Gramos/litro
NSA	Caldo nutritivo	0,4
	Sacarosa	50
	Agar	15

Tabla 7. Receta para medio de cultivo LB-Agar

Medio de cultivo	Ingredientes	Gramos/litro
LB-Agar	Extracto de levadura	5
	Triptona	10
	NaCl	10
	Agar	15

Tabla 8. Datos sobre las muestras analizadas

Vivero	Variedad	N° Planta	Longitud (cm)	Diámetro (cm)	Fluido xilemático obtenido (mm)
Vivero 1	Pinot noir	1			2,5
		2			2,5
		3	15,5	0,8	2,5
		4	14,4	0,8	2,5
		5	13,5	0,8	2,5
		6	14,5	0,7	2,5
Vivero 2	Pinot noir	1			2,5
		2			2,5
		3	18	1,2	2,5
		4	12	0,8	2,5
		5	13	0,8	2,5
		6	13	0,7	2,5
	Viognier	1			2,5
		2			2,5
		3	18,5	1	2,5
		4	20	0,8	2,5
		5	20	1	2,5
		6	19,5	0,9	2,5
	Cabernet Sauvignon	1			2,5
		2			2,5
		3	20	0,9	2,5
		4	19,4	0,8	2,5
		5	25	1	2,5
		6	20	1	2,5