



ESCUELA DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS, ANIMALES Y AMBIENTALES
INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Detección de *Allorhizobium vitis* desde lloro primaveral en cuatro cultivares de *Vitis vinifera*
en la Región del Libertador Bernardo O'Higgins.**

Raúl Flores Chacón

Profesor guía: Set Pérez Fuentealba

Profesora colaboradora: Nicole Cortez Jorquera

Tesina para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo

San Fernando, Chile
Diciembre 2023

Dedicatoria

Dedico esta tesis a todas las personas que confiaron en mí y que me acompañaron en este lindo proceso universitario; a mi familia que siempre me apoyaron y creyeron que podría terminar mis estudios de buena manera; también va dedicada a mis amigos Mario, Darío, Francisco, Agustín, Lucas, Juan, Ricardo, Pablo, Constanza, Jenny, Diana e Ignacia, por ayudarme en los momentos que más los necesitaba y por ser los mejores compañeros de carrera que alguien podría haber tenido.

Agradecimientos

Agradezco especialmente a todos(as) los trabajadores(as) y profesores(as) que me acompañaron durante el desarrollo de mi proyecto y mi carrera universitaria en especial a los profesores Set Pérez Fuentealba y Nicole Cortez Jorquera por confiar en mí y ser un gran apoyo en la escritura de mi trabajo. Agradezco también a mi familia y amigos, por acompañarme durante esta etapa de mi vida y por siempre estar a mi lado cuando los necesité.

Índice general

Tabla de contenido

RESUMEN	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1 LUGAR DE MUESTREO Y PROSPECCIÓN.....	14
2.2 OBTENCIÓN DE LORO PRIMAVERAL Y PROCESAMIENTO EN LABORATORIO	15
2.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LORO PRIMAVERAL EN MEDIOS DE CULTIVO.....	16
2.4 EXTRACCIÓN DE ADN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR.....	16
2.4.1 EXTRACCIÓN POR SHOCK TÉRMICO.....	16
2.4.2 EXTRACCIÓN DE ADN CON KIT DE BACTERIAS	16
2.4.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>ALLORHIZOBIUM VITIS</i>	16
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1 INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE AGALLAS DE LA CORONA	19
3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y MOLECULAR DE <i>ALLORHIZOBIUM VITIS</i> DESDE LORO PRIMAVERAL SEMBRADO EN PLACAS	19
3.3 ANÁLISIS MOLECULAR DE <i>ALLORHIZOBIUM VITIS</i> DESDE LORO DIRECTO.....	24
3. CONCLUSIONES.....	27
4. REFERENCIAS	28
5. ANEXOS	31

Índice de tablas

Tabla 1: Secuencias de partidores utilizados para ensayos PCR	18
Tabla 2: Incidencia de agallas de la corona en los distintos huertos prospectados	19
Tabla 3: Tabla de resultados microbiológicos y moleculares	20
Tabla 4: Origen y variedad de plantas positivas a <i>Allorhizobium vitis</i>	25

Índice de figuras

Figura 1: Fundo Santa Elisa, Chimbarongo (Izquierda); Fundo Las Lomas, Peralillo (Derecha)	14
Figura 2: Recolección y procesamiento de llovo primaveral desde <i>Vitis vinífera</i>	15
Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con PCR para gen <i>peh A</i> en cepas purificadas de <i>Allorhizobium vitis</i> desde llovo primaveral en medio RS con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%)	21
Figura 4: Placa Petri con distintos medios de cultivo a los 5 días post inoculación de llovo primaveral	22
Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con producto PCR para el gen <i>peh A</i> en cepas purificadas de <i>Allorhizobium vitis</i> desde llovo primaveral en medio APD con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%)	23
Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con producto PCR para gen <i>peh A</i> de cepas puras de <i>Allorhizobium vitis</i> extraídas por shock térmico y kit con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%)	23
Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con producto PCR para gen <i>peh A</i> en cepas purificadas de <i>Allorhizobium vitis</i> desde llovo primaveral en medio King B con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%)	24
Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con PCR para gen <i>virC</i> en cepas purificadas de <i>Allorhizobium vitis</i> desde llovo primaveral en medio King B con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%).	24
Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con PCR para gen <i>peh A</i> en muestras de llovo directo positivas a <i>Allorhizobium vitis</i> desde placas con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%).....	25

Resumen

Agrobacterium es un género de bacterias Gram negativas que incluye especies patógenas como lo son *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. tumefaciens* que pueden afectar a un gran número de especies frutales, y *Agrobacterium vitis*, actualmente denominada como *Allorhizobium vitis*, la cual es exclusiva de vides. *All. vitis* puede o no presentar un plásmido inductor de tumores, y permanecer latente en el xilema, una vez se produzca una herida en la planta, esta bacteria activa sus mecanismos de virulencia para provocar agallas de la corona; esta enfermedad puede provocar pérdidas económicas asociadas con la reducción del rendimiento y longevidad de las plantas. En Chile actualmente está ocurriendo un recambio varietal, por lo que la detección temprana de *Allorhizobium vitis* en plantas asintomáticas es fundamental para poder implementar medidas de control preventivas. Mediante la combinación de pruebas microbiológicas y moleculares es posible la detección temprana de la bacteria usando como base la recolección y procesamiento de lloro primaveral de plantas asintomáticas. La colecta de lloro primaveral en vides asintomáticas fue realizada en los cultivares Cabernet Sauvignon, Viognier, Carmenere y Pinot Noir provenientes de dos huertos comerciales de la región de O'Higgins. La obtención de aislados de *All. vitis* se realizó sembrando 50 µL de lloro primaveral en medios de cultivo semi-selectivo RS y nutritivos con antifúngico, respectivamente. La detección por pruebas moleculares se realizó utilizando partidores específicos para el gen *pehA* (PGF/PGR) y *virC* (VCF3/VCR3). Mediante la combinación de estas técnicas se detectó *All. vitis* en 8.3% de las plantas analizadas (3 Cabernet Sauvignon y 1 Viognier), estos aislados no presentaron el plásmido Ti. Sólo se obtuvieron resultados positivos a *Allorhizobium vitis* mediante pruebas moleculares realizadas en ADN extraído de colonias bacterianas, por otro lado, no se logró detectar *Allorhizobium vitis* en pruebas moleculares realizadas directamente al lloro primaveral. Esta investigación contribuye a la detección de cepas chilenas de *All. vitis* en el valle de Colchagua, como así también al estudio de la bacteria a nivel nacional para mejorar la gestión de la sanidad de las vides.

Palabras clave:

Allorhizobium vitis, lloro primaveral, *Vitis vinifera*, detección temprana.

Abstract

Agrobacterium is a genus of Gram-negative bacteria that includes pathogenic species such as *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. tumefaciens* that can affect a large number of fruit species, and *Agrobacterium. vitis*, currently called *Allorhizobium vitis*, which is exclusive to vines. Bacterial strains can coexist latently within the vascular bundles of the xylem of plants, transporting themselves from the basal part to the aerial part, causing crown gall disease when these strains present a tumor-inducing plasmid. This disease can cause economic losses associated with reduced plant performance and longevity. In Chile, varietal turnover is currently occurring, so early detection of *Allorhizobium vitis* in asymptomatic plants is essential to implement preventive control measures. By combining microbiological and molecular tests, early detection of the bacteria is possible using the collection and processing of bleeding sap from asymptomatic vines. The tests were carried out on asymptomatic *Vitis vinifera* of the Cabernet Sauvignon, Viognier, Carmenere and Pinot Noir cultivars in two commercial orchards from O'Higgins region. Strains were obtained by plating 50 µL of bleeding sap on semi-selective and nutritive culture media amended with antifungal. Specific detection was realized by using primers PGF/PGR and VCF3/VCR3 that amplify *pehA* and *virC* genes, respectively. The results of the analysis combined showed that in 4 of 48 vines (8.3%) had *Allorhizobium vitis* (3 Cabernet Sauvignon and 1 Viognier), although without detection of Ti plasmid. On the other hand, *Allorhizobium vitis* was only detected using DNA extracted from bacterial colonies, and not applying PCR directly on bleeding sap samples. This research is a contribution to the study of *All. vitis* in Chile, helping to improve plant health management in vines.

Keywords:

Allorhizobium vitis, bleeding sap, *Vitis vinifera*, early detection.

1. Introducción

Vitis vinifera L., es una especie frutal que pertenece a la familia Vitáceas, es de gran importancia internacional y nacional, en Chile la superficie plantada total corresponde a 130.086,17 ha según el catastro vitícola del año 2021 (ODEPA, 2021). Los cultivares con mayor superficie plantada son Cabernet Sauvignon (30,28%), Sauvignon Blanc (11,16%), Merlot (8,61%), Chardonnay (8,31%) y Carmenere (7,54%) (SAG, 2020). Una de las zonas que más destaca es la del secano interior en el centro-sur de Chile, por cuanto aquí se desarrolla gran parte de la viticultura nacional (Díaz, 2020; Sotomayor, 2004).

Las exportaciones de vino han tenido una gran disminución entre los años 2022 y 2023, tanto en litros exportados como en la rentabilidad del negocio de estos vinos. En el caso de las exportaciones, hubo una disminución del 29,3% de los volúmenes exportados en agosto de 2022 y agosto de 2023. El valor de las exportaciones de vino el último año fue de USD 143 millones, lo que significó una disminución del 26,1% comparado agosto 2022 y agosto 2023; pese al descenso ocurrido en los últimos años, Chile sigue teniendo un gran reconocimiento a nivel mundial, llegando a ser el sexto mayor productor de vino a nivel mundial y cuarto mayor exportador de vino a nivel mundial en el año 2022 (OIV, 2023), además, el mercado vitícola sigue siendo de gran importancia a nivel nacional, aportando \$7.507 millones al PIB, valor más alto considerando los últimos 10 años (ODEPA, 2021). Por otro lado, la mantención de un viñedo involucra un alto costo que se aproxima a los \$1.091.239 (ODEPA, 2020).

En la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, se estima una superficie cultivada de 41.539,36 ha, superada solamente por la región del Maule con un total de 52.822,56 ha. En cuanto a las variedades de uva para vino, en la Región de O'Higgins predominan las cepas tintas con un total de 35.720,51 ha, mientras que las variedades blancas corresponden a 5.818,85 ha (SAG, 2020). Entre las variedades tintas, Cabernet Sauvignon corresponde a más del 50% del total de superficie (15.930 ha), mientras que en las variedades blancas destacan Chardonnay (2.722,25 ha) y Sauvignon Blanc (2.262,42 ha) (ODEPA, 2021).

Una de las enfermedades de cuidado en el cultivo de la vid vinífera corresponde a las agallas de la corona, causada por *Allorhizobium vitis*. Según estudios realizados por el Departamento de Alimentos y Agricultura de California (CDFA, 2021), esta enfermedad puede provocar un gran daño económico en la producción de vino, debido a su dificultad en erradicarla del suelo, lo que aumenta los costos asociados a un control efectivo. Por otra parte, los estudios realizados por Stewart y colaboradores (2013) indican que las agallas provocadas por esta bacteria afectan negativamente el desarrollo vegetativo y reducen el transporte de asimilados hacia los frutos, lo que directamente altera el equilibrio entre la acidez y los sólidos solubles en las plantas afectadas. A propósito, en Pensilvania, Estados Unidos, se han registrado pérdidas monetarias considerables en viñedos afectados por este fitopatógeno, alcanzando los \$46,000 USD durante un período de 6 años (CDFA, 2021). Hay que destacar, que a nivel nacional no hay registros de pérdidas económicas relacionadas con esta enfermedad.

En cuanto a su epidemiología, *Allorhizobium vitis* se puede transmitir por material vegetal de una planta infectada, suelo, agua o herramientas agrícolas, y el ingreso a la planta es por heridas recientes provocadas por injertos, insectos, nemátodos, heladas o heridas naturales. En las vides, la forma de transmisión más importante es el material vegetal infectado que permanece en el suelo y que hace ingreso a la planta mediante heridas, para el caso de las plantas asintomáticas la detección de la bacteria ha sido compleja (Cruz, 2000). Estudios desarrollados Orel y colaboradores (2017) y Johnson y colaboradores (2015), indican que la bacteria también puede sobrevivir de manera epífita en las vides, logrando sobrevivir en gotas de agua, puntas de sarmientos y en la superficie de los brotes de vid. Las bacterias del género *Agrobacterium* pueden tener distintas especies frutales como huésped, como lo pueden ser: manzano, peral, frambueso, arándano y varios frutales de carozo; por otro lado, *Allorhizobium vitis* (ex *Agrobacterium vitis*) afecta exclusivamente a vides (Llop, 2003).

Esta enfermedad provoca agallas en el cuello de la planta o en la unión patrón-portainjerto, debido a que se produce un aumento de la cantidad de auxinas y citoquininas en la planta, provocando hiperplasia e hipertrofia celular que darán origen a los conocidos tumores o agallas que pueden afectar el transporte de agua y nutrientes en el xilema (Burr *et al.*, 1998) (Fritz *et al.*, 2014). Estos tumores pueden desarrollarse en raíces y tronco como protuberancias esféricas y blandas cerca de la línea de suelo. A medida que éstas aumentan en tamaño, su forma es irregular y presentan una coloración café oscuro, estas generan un menor desarrollo vegetativo de la planta, provocando la aparición de hojas pequeñas y cloróticas, esta bacteria también aumenta la susceptibilidad de la planta al ataque de otros fitopatógenos y a las condiciones ambientales adversas, especialmente a la temperatura de invierno. (Burr *et al.*, 1998).

Respecto de la taxonomía de esta bacteria, consignar que ha sido compleja puesto que tradicionalmente las especies del género *Agrobacterium* se han clasificado en 4 especies principales las cuales son: *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi* y *A. vitis* (actualmente *Allorhizobium vitis*), las cuales con excepción de *A. rubi*, se subdividen en biovares basado en las características fisiológicas y bioquímicas (Young *et al.*, 2003). Las bacterias pertenecientes a este género son Gram negativa, poseen forma bacilar y con flagelos peritricos, y en algunos casos hay cepas que integran un plásmido inductor de tumores (plásmido *Ti*) o inductor de raíces (*Ri*) (Holmes, 1981); en el caso del plásmido *Ti*, éste induce la formación de tumores mediante la transferencia de distintos fragmentos de DNA oncogénico a las células de la planta infectada, por otro lado, el plásmido *Ri* induce la formación de raíces adventicias en el sitio de la infección mediante la transferencia de fragmentos de ADN a la célula de la planta (Tempe *et al.*, 2012) (Vilas *et al.*, 1987).

Estudios desarrollados por Kuzmanovic y colaboradores (2022; 2020) explicitan que *Allorhizobium vitis* posee dos cromosomas circulares, mientras que otras especies pertenecientes al género *Agrobacterium* poseen un cromosoma circular y un cromosoma lineal secundario; en este sentido, correspondería utilizar la nomenclatura relativa a *Allorhizobium vitis*, por lo que, para efectos de esta tesina, será la denominación a utilizar.

Respecto de la detección e identificación de *Allorhizobium vitis*, actualmente se conoce una plétora de herramientas microbiológicas, bioquímicas y moleculares que permiten cumplir con estos

objetivos. En el caso de las pruebas moleculares, la más utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Tolba y Zakí, 2011). En el caso de las herramientas microbiológicas, uno de los medios de cultivo más utilizado para aislar cepas de *Allorhizobium* es Agar Nutritivo (Boatwright y Hirsop, 1976), junto con otros sustratos semi-selectivos como RS (Roy y Sasser, 1983) que buscan reducir la contaminación por otros microorganismos cultivables en medios sintéticos, otorgando condiciones más propicias para el crecimiento selectivo. Las cepas de *Allorhizobium vitis* desarrollan un fenotipo característico en medio de cultivo RS: color blanco, centro de color rojo y aspecto mucoso.

Los partidores utilizados para la detección de *Allorhizobium vitis* mediante pruebas PCR han sido variados, en el caso de este trabajo, aquellos partidores PCR descritos por Suzaki y colaboradores (2004) conocidos como VCF3/VCR3 (414 pb), comprenden la detección del plásmido (*virC*), ya sea *Ti* o un plásmido *Ri*. Otros partidores utilizados frecuentemente son PGF/PGR (466 pb) descritos por Szegedi y Bottka (2002), los cuales son específicos para *Allorhizobium vitis*, puesto que amplifican el gen *peh A* encargado de la producción de poligalacturonasa, y está ubicado en el cromosoma de bacterias patógenas y no patógenas.

Según estudios realizados por Burr y colaboradores en 1988, la bacteria puede permanecer en el suelo y en restos de raíces por 10 años, lo que puede afectar a futuras plantaciones de vides que se establezcan en el lugar. La importancia de esta bacteria se asocia a su capacidad de reducir el vigor y rendimiento del cultivo, pudiendo reducir el rendimiento en 20 - 40% (Schroth *et al.*, 1988). *Allorhizobium vitis* puede sobrevivir en los haces vasculares de las vides, y se puede trasladar a través de la savia desde las raíces hasta la parte aérea; por lo que las plantas pueden permanecer años sin mostrar síntomas de la enfermedad (Burr *et al.*, 1988). Debido al constante traslado de esta bacteria por los haces vasculares, es complicada su detección, no obstante, la recolección de lloro primaveral ha permitido conseguir exitosamente aislamientos de *A. vitis*. Esta técnica consiste en desinfectar y cortar parcialmente sarmientos del árbol a inicio de primavera, para coleccionar el exudado proveniente de los cortes, para posteriormente ser utilizado para sembrar en medios de cultivos para bacterias y/o realizar pruebas moleculares (Szegedi y Bottka, 2002).

El lloro primaveral es un fenómeno que implica la exudación de los vasos del xilema de los sarmientos de la vid. Su función principal es garantizar la supervivencia de la planta durante su período de latencia, proporcionándole nutrientes esenciales (como se menciona en Orel *et al.*, 2016). Este proceso es crucial para el desarrollo saludable de la vid, ya que le permite obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo cuando aún no es época de fertilización. El lloro primaveral se compone de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides y polifenoles; además, su pH es ligeramente ácido (5.2-5.5) debido a la acumulación de ácido oxálico, tartárico, málico, láctico y cítrico. Estudios realizados por Deyett y colaboradores (2019) determinaron que existe una plétora de microorganismos que pueden co-habitar en el lloro primaveral, incluyendo: *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacteroides*, *Massilia*, *Acinetobacter* y *Bacillus*; por otro lado, existen taxones fúngicos que pueden convivir junto con las bacterias patógenas dentro del lloro primaveral, entre los que incluimos algunos como *Cladosporium*, *Mycosphaerella*, *Alternaria*, *Acremonium* y *Filobasidium*.

La riqueza de microorganismos que pueden estar presentes en el lloro primaveral, se debe a que es un ambiente ideal para la proliferación de una amplia gama de bacterias y hongos, debido a un pH y disponibilidad de sustrato ideal para su desarrollo. Es interesante destacar que en el caso de *Allorhizobium vitis*, esta bacteria puede poseer un plásmido inductor de tumores (*Ti*) y un plásmido adicional que desempeña un papel crucial en su adaptación al entorno de la vid, utilizando el tartrato como una estrategia de adaptación al ecosistema de la vid (como se describe en Anderson *et al*, 1979), sin embargo, estos pueden no estar presentes y ser adquiridos posteriormente desde una bacteria que si presenta el plásmido. Este plásmido adicional permite a la bacteria aprovechar el tartrato, lo que puede influir en su interacción con la planta y su capacidad para causar agallas en el cuello de las vides, como se mencionó anteriormente. La relación entre estos plásmidos y la adaptación de la bacteria al ambiente de la vid es un punto clave en la comprensión de la patogenicidad de *Allorhizobium vitis* en esta planta.

Dada la significativa participación de la uva destinada a la producción de vino a nivel nacional, que abarca un extenso territorio de hectáreas cultivadas y representa una cantidad considerable de vino exportado al mercado internacional, junto con los considerables costos relacionados con la implementación y el mantenimiento de viñedos, la detección rápida y efectiva de *Allorhizobium vitis* se convierte en una prioridad fundamental. Esto se debe a que una detección oportuna permitiría establecer un control más eficaz y ágil contra esta enfermedad, evitando la muerte de las plantas y, en última instancia, reduciendo las pérdidas económicas asociadas a esta patología. La importancia de esta detección radica en la preservación de la salud de las vides y la sostenibilidad de la industria vitivinícola a nivel nacional.

Hipótesis

La detección de *Allorhizobium vitis* en plantas asintomáticas de *Vitis vinifera* es posible mediante el análisis microbiológico y molecular de lloro primaveral.

Objetivo general

Detectar *Allorhizobium vitis* en lloro primaveral de plantas asintomáticas procedentes de cuatro cultivares de *Vitis vinifera* establecidos en dos localidades de la Región del Libertador Bernardo O'Higgins.

Objetivos específicos

- Determinar la prevalencia de agallas de la corona en vides viníferas de los cultivares Cabernet. Sauvignon, Carmenere, Pinot Noir y Viognier, en dos localidades de la Región de O'Higgins.
- Validar metodología para la detección de *Allorhizobium vitis* en lloro primaveral.
- Detectar *Allorhizobium vitis* desde lloro primaveral en cuatro cultivares de *Vitis vinifera*, a través de pruebas microbiológicas y moleculares.

2. Materiales y métodos

2.1 Lugar de muestreo y prospección

El estudio se realizó en dos huertos comerciales de vides ubicados en la Región del Libertador Bernardo O'Higgins en el mes de septiembre del año 2022. Los viñedos seleccionados consideraron una evaluación previa en concordancia con ubicación en el valle de Colchagua, condiciones climáticas imperantes en la localidad, y presencia de variedades tintas (Cabernet Sauvignon, Carmenere, Pinot Noir) y blancas (Viognier) en un mismo sitio.

El primer campo visitado fue el Fundo Santa Elisa el día 14/09/2022, ubicado en la comuna de Chimbarongo (S 34°43.197, W 71°02.557). Se monitorearon vides en su primera hoja vegetativa, en tres cultivares: Cabernet Sauvignon, Pinot Noir y Viognier. A saber, las variedades Viognier y Carmenere fueron cultivadas en base a un manejo tradicional, mientras que la variedad Cabernet Sauvignon tuvo un manejo orgánico. En cuanto a las condiciones edafoclimáticas características del sitio, corresponden a clima templado cálido con lluvias estacionales con temperaturas anuales promedio de 18,3°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), con una estación seca que se prolonga aproximadamente entre 7 - 8 meses y precipitaciones promedio entre 806 y 1052 mm anuales, concentrados en los meses de invierno.

El segundo campo visitado fue el Fundo Las Lomas el día 15/09/2022, ubicado en la comuna de Peralillo, en las coordenadas S 34°27.243, W 71° 30.573, donde se evaluaron 3 variedades: Cabernet Sauvignon, Carmenere y Viognier, las cuales tenían 10 años de plantación. En este caso, las tres variedades evaluadas eran cultivadas mediante un manejo tradicional. En cuanto a las condiciones edafoclimáticas del lugar de muestreo, se asocia a una condición de clima mediterráneo con temperaturas medias entre 14° y 15°C, con precipitaciones invernales mayoritariamente entre los meses de junio y agosto, con un promedio de 700 a 800 mm anuales (Ciren, 2016).

Para determinar la prevalencia en terreno de la enfermedad de agallas de la corona, se realizó una prospección por cinco personas en cada uno de los campos mencionados. Se monitorearon de forma aleatoria síntomas de agallas en cuello y unión patrón-injerto en un total de 250 vides, según cultivar (5 hileras alternadas y 50 plantas por cada hilera).



Figura 1: Fundo Santa Elisa, Chimbarongo (Izquierda); Fundo Las Lomas, Peralillo (Derecha) (Imágenes obtenidas noviembre 2023)

2.2 Obtención de lloso primaveral y procesamiento en laboratorio

Para la recolección de lloso primaveral se utilizó como base el procedimiento descrito por Bini y colaboradores (2008), y Biondi y colaboradores (2012) para recolección de lloso primaveral en vides y kiwi, respectivamente. Se seleccionaron 8 plantas asintomáticas de forma aleatoria para cada variedad, en cada caso se desinfectaron con etanol 70%, 10 cm de la zona distal de dos sarmientos de cada planta. Posteriormente, se cortaron 5 cm del sarmiento, donde se ubicó un tubo Falcon de 15 ml en cada corte. Transcurridos aproximadamente 45 min, se colectaron todos los tubos Falcon y se conservaron en un contenedor refrigerado portátil ($8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) para transportarlos al laboratorio y mantener en frío (4°C) hasta el momento de su procesamiento.

Las dos submuestras de lloso primaveral de cada vid fueron traspasadas a un tubo Falcon y homogenizadas a baja revolución en un vórtex. Posteriormente, se compararon los distintos volúmenes de lloso y se realizó una estandarización del volumen para todas las muestras. Los tubos con lloso primaveral fueron centrifugados a 10.000 g durante 10 min a 4°C . El sobrenadante fue eliminado y el pellet re-suspendido en 1 ml de agua destilada estéril. Se dividió en dos alícuotas cada muestra: 300 μl para análisis molecular que se almacenó a -20°C y, 700 μl para análisis microbiológico a la que se adicionó 20% de glicerol para preservación a -80°C .

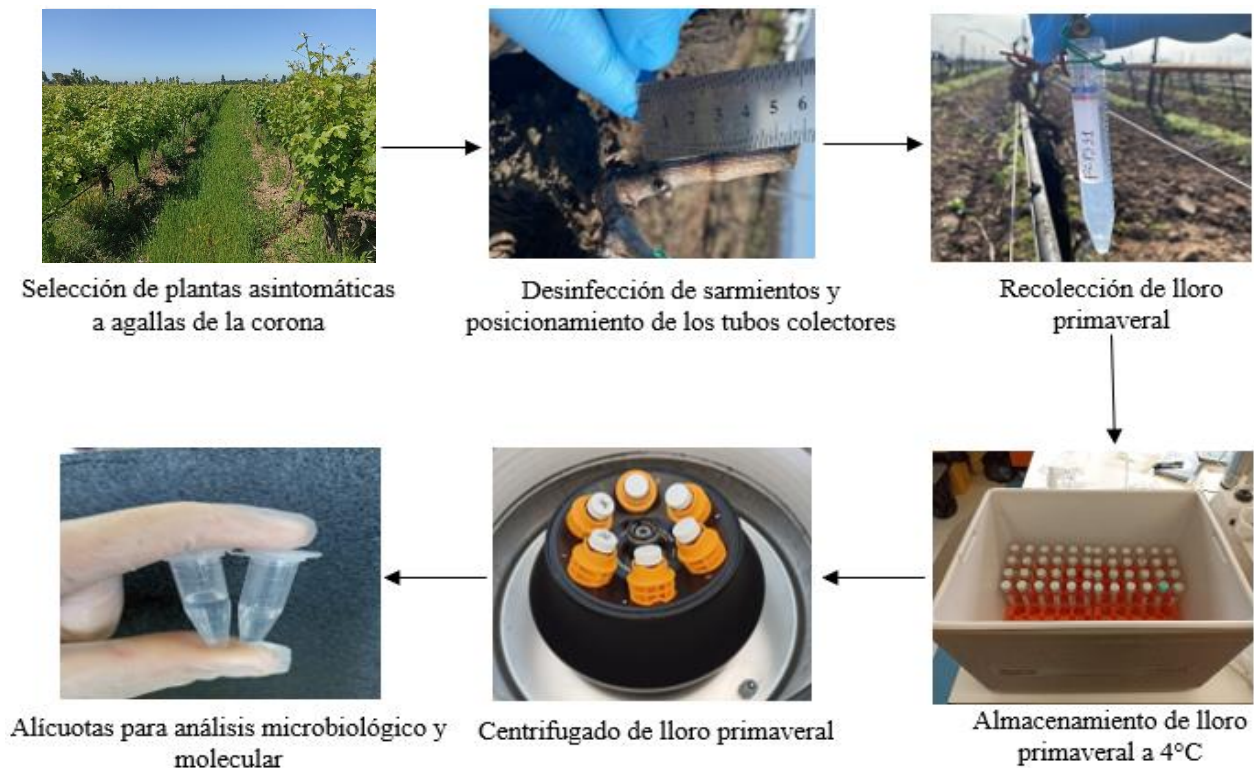


Figura 2: Recolección y procesamiento de lloso primaveral desde *Vitis vinífera*.

2.3 Análisis microbiológico de lloso primaveral en medios de cultivo

Las pruebas microbiológicas fueron realizadas utilizando distintos medios de cultivo, como lo son: RS, NSA y APD con pH ajustado a 7,2 (con y sin antifúngico) y King B (Tolba y Zaki, 2011; Biggs *et al*, 1994) (Anexo 1). Las placas sembradas fueron incubadas rutinariamente a 27°C hasta obtener colonias singulares (24 h hasta 7 días). Un total de 48 muestras de lloso primaveral provenientes de ambos viñedos (Campo 1: N=24; Campo 2: N = 24) fueron procesadas en laboratorio. Fueron sembrados 50 µl de cada muestra en medio de cultivo semi-selectivo RS e incubadas a 27°C hasta obtener colonias singulares; luego se seleccionaron colonias con el fenotipo de *Allorhizobium vitis* para su purificación en medio de cultivo APD modificado (pH ajustado a 7,2 y suplementado con Cicloheximida en una proporción de 7 mg en 250 ml de medio de cultivo) (Sampayo *et al*, 2001). Complementariamente, se realizó una purificación en medio de cultivo King B de las colonias purificadas en medio de cultivo APD con pH 7,2. Las bacterias purificadas fueron incubadas durante 16 horas a 27°C para la posterior extracción de ADN.

2.4 Extracción de ADN e identificación molecular

2.4.1 Extracción por shock térmico

Un total de 10/11 suspensiones bacterianas obtenidas fueron sometidas a shock térmico. Para este procedimiento, se suspendieron las colonias bacterianas puras en 750 µl de agua destilada estéril; cada suspensión fue de aproximadamente 10^8 UFC/ml. Estas suspensiones fueron sometidas en agitación en un Termoblock a 100°C por 15 min para obtener la liberación de ADN genómico, seguido de esto, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso en procedimientos moleculares.

2.4.2 Extracción de ADN con kit comercial

Se realizó una extracción de ADN genómico de bacterias con el kit Norgen Biotek (Marca Norgen Biotek) para el total de 11 aislamientos obtenidos con la purificación en medio de cultivo King B. Seguido de esto, se dispusieron en un tubo Eppendorf de 2 ml, colonias bacterianas con fenotipo similar a *Allorhizobium vitis* en 1 ml de agua destilada estéril. Estas suspensiones fueron agitadas en un vórtex y posteriormente se realizó la extracción de ADN total por kit según indicaciones del fabricante (Ver anexo 2). El ADN total fue almacenado a -20°C.

2.4.3 Identificación molecular de *Allorhizobium vitis*

Desde lloso directo:

Para la identificación molecular mediante pruebas PCR de lloso directo como templado, se realizó una extracción rápida de ADN por shock térmico de 4 muestras de lloso primaveral almacenado a -20°C que fueron consideradas como positivas. Se tomaron 50 µl de cada muestra y se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml para calentarlas en un Termoblock a 100°C por 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron almacenadas a -20°C.

Para evaluar la sensibilidad de las pruebas moleculares, se llevaron a cabo diluciones seriadas de una suspensión bacteriana de *Allorhizobium vitis*. Estas diluciones se realizaron contaminando muestras de llovo primaveral que originalmente no contenían *Allorhizobium vitis*. La suspensión madre se preparó colocando colonias puras de bacterias en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 1 ml de agua destilada estéril, logrando una concentración de 10^8 UFC/ml. Luego, se agitó la muestra a baja intensidad en un vórtex para homogeneizarla.

A continuación, se realizaron las diluciones tomando 100 μ l de cada suspensión madre y mezclándolos con 900 μ l de agua destilada estéril, lo que generó 8 concentraciones diferentes, desde 10^8 hasta 10^1 UFC/ml. Cada una de estas diluciones se usó para inocular 8 muestras de llovo primaveral destinadas al análisis molecular. La inoculación se realizó en una proporción de 1:10, utilizando 90 μ l de llovo y 10 μ l de la suspensión bacteriana diluida, lo que dio como resultado 8 muestras de llovo con diferentes concentraciones de bacterias.

Estas muestras de llovo inoculado se agitaron a baja intensidad en un vórtex y luego se sometieron a una extracción mediante shock térmico para obtener un lisado bacteriano. Este lisado se utilizó posteriormente en pruebas moleculares dirigidas al gen *peh A*, utilizando los partidores PGF/PGR. Este proceso permitió evaluar la sensibilidad de las pruebas moleculares en la detección de *Allorhizobium vitis* en muestras con concentraciones variables de bacterias. Para identificar las bacterias obtenidas desde cepas puras y llovo primaveral directo, se realizó una PCR convencional con los partidores PGF/PGR (466 pb) descritos por Szegedi y Bottka (2002), los cuales están diseñados para detectar el gen cromosomal *peh A* que produce la enzima poligalacturonasa, cuya función es catalizar la escisión hidrolítica de polímeros pépticos de la pared celular. Estos partidores amplifican tanto especies patógenas (con presencia de plásmido), como no patógenas de *Allorhizobium vitis* (sin presencia de plásmido) (Tabla 1).

Las reacciones se llevaron a cabo en un Termociclador T960 (Heal Force) (País de origen: China) en volúmenes finales de 25 μ l compuestos por: 5X Green GoTaq Flexi Buffer 5 μ l (5 u/ μ l); $MgCl_2$ 1,5 μ l (25 mM); dNTP's 0,5 μ l (10 mM); PGF 1 μ l (10 mM); PGR 1 μ l (10 mM); DMSO (5% v/v) 1,25 μ l (2% Mm); Blotto (2% v/v) 0,5 μ l (10 mM); GoTaq G2 DNA Polymerase 0,125 μ l (5 u/ μ l); agua destilada estéril 13,125 μ l y ADN molde 1 μ l. El perfil térmico utilizado fue el descrito por Bini y colaboradores (2008); la amplificación inicial fue una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Complementariamente, se realizó una PCR de punto final con los partidores VCF3/VCR3 (414 pb) descritos por Suzaki y colaboradores (2004), los cuales permiten diferenciar especies de *Agrobacterium* en base a la presencia de los genes de virulencia en el plásmido (*Ti* o *Ri*) de la bacteria (Tabla 1).

Esta reacción se llevó a cabo en volúmenes finales de 25 μ l compuestos por: 5 μ l de 5X Green GoTaq Flexi Buffer (5 u/ μ l); 1,5 μ l de $MgCl_2$ (25 mM); 0,5 μ l de dNTP's (10 mM); 1 μ l de cada partidor (10 mM); 1,25 μ l de DMSO (5% v/v) (2% Mm); 0,5 μ l de Blotto (2% v/v) (10 mM); 0,125 μ l de GoTaq G2 DNA Polymerase (5 u/ μ l); 13,125 μ l de agua destilada estéril y 1 μ l de ADN molde. El perfil térmico utilizado fue el descrito por Suzaki y colaboradores (2004) donde la amplificación inicial fue una desnaturalización a 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos a

94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, finalmente se realizó una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Los productos PCRs fueron cargados en volúmenes de 5 µl en un gel de agarosa al 1,5% p/v teñido con Syber safe para luego separar las moléculas de ADN en una electroforesis a 100 volts durante 60 minutos. Los productos obtenidos fueron visualizados en un transiluminador con luz UV.

Tabla 1: Secuencias de partidores utilizados para ensayos PCR

Partidores Referencia	Secuencia (5'-3')	Largo del fragmento	
<i>peh A</i> - poligalacturonasa			
PGF/PGR	5'-GGGGCAGGATGCGTTTTTGAG-3' 5'-GACGGCACTGGGGCTAAGGAT-3'	466 pb	Szguedi y Bottka. (2002)
<i>virC</i> - gen de patogenicidad			
VCF3/VCR3	5'GGCGGGCGYGCGYGAAAGRAARACYT3' 5'AAGAACGYGGNATGTTGCATCTYAC3'	414 pb	Suzaki <i>et al.</i> (2004)

3. Resultados y Discusión

3.1 Incidencia y severidad de agallas de la corona

Mediante observaciones en campo de las distintas variedades muestreadas en ambos huertos, se consignó como resultado que tanto el Fundo Santa Elisa de la comuna de Chimbarongo, como el Fundo Las Lomas en la comuna de Peralillo, no evidenciaron síntomas de agallas en vides (N= 500 plantas monitoreadas) en los cuatro cultivares evaluados (Tabla 2).

Tabla 2: Incidencia de agallas de la corona en los distintos huertos prospectados

Predio	Cultivares			
	Cabernet Sauvignon	Viognier	Pinot Noir	Carmenere
Fundo Santa Elisa	0	0	0	No aplica
Fundo Las Lomas	0	0	No aplica	0

3.2 Análisis microbiológico y molecular de *Allorhizobium vitis* desde lloro primaveral sembrado en placas

Con la siembra de lloro primaveral en medio de cultivo RS, 21/24 (87,5%) muestras provenientes del Fundo Santa Elisa, tuvieron prominente crecimiento bacteriano, al igual que las muestras colectadas desde el Fundo Las Lomas evidenciado en 20/24 (83.3%). En cuanto a la morfología típica de la *All. vitis*, de las 48 muestras analizadas ninguna poseía el fenotipo esperado para *Allorhizobium vitis* en medio de cultivo RS, a saber: colonias blancas, redonda con márgenes enteros y con un centro de coloración roja (Ignatov *et al.* 2016). Las muestras de lloro primaveral sembradas en medio de cultivo RS presentaron una amplia riqueza bacteriana y fúngica, condición similar a la observada por Deyett y colaboradores (2019), quienes describen la amplia diversidad de hongos y bacterias que pueden convivir en el lloro primaveral.

Al desglosar los resultados por variedad, se observa que de las 21 muestras obtenidas del Fundo Santa Elisa que mostraron crecimiento bacteriano, 8 pertenecían a la variedad Cabernet Sauvignon (38%), 8 eran Pinot Noir (38%) y 5 eran de la variedad Viognier (23.8%). Por otro lado, de las 20 muestras recolectadas en el Fundo Las Lomas que mostraron crecimiento bacteriano, 8 eran de la variedad Cabernet Sauvignon (40%), 7 eran Carmenere (35%) y 5 eran de la variedad Viognier (25%).

El medio de cultivo semiselectivo (RS) redujo el número de colonias con morfologías diversas en la muestra de lloro primaveral, sin embargo, no logro limitar el crecimiento de hongos presentes en el lloro (Figura 4 A), por lo tanto, es recomendable suplementar el medio de cultivo con antifúngicos para evitar el crecimiento de hongos que pueden limitar y contaminar el crecimiento bacteriano, tal como lo describen Tolba y Zaki (2011), y Roy y Sasser (1983). También, debido a la riqueza bacteriana que puede convivir en el lloro primaveral es complejo aislar *Allorhizobium vitis* desde plantas asintomáticas, esto asociado con la similitud fenotípica que puede haber entre las bacterias que habitan el mismo medio, esto se encuentra en concordancia con lo descrito por Szguedi y colaboradores en el 2005, quienes indican que no existen diferencias morfológicas significativas entre las distintas especies de *Agrobacterium* y *Allorhizobium vitis*.

Autores como Anderson *et al* (1979), afirman que el uso de muestras asintomáticas reduce la posibilidad de detección de *Allorhizobium vitis*, ya que estas muestras poseen una carga bacteriana menor comparando con muestras sintomáticas. Kuzmanovic y colaboradores (2018) confirman que la bacteria tiene una distribución desigual al interior de la planta, obteniendo cultivos puros de *Allorhizobium vitis* desde sarmientos de una planta sintomática, sin embargo, al utilizar otro sarmiento de la misma planta no les fue posible obtener aislados de *All. vitis*, lo que confirma la dificultad por obtener cepas de esta bacteria desde lloro primaveral directo, tanto de vides sintomáticas como asintomáticas. Complementando esta afirmación, estudios realizados por Johnson y colaboradores (2016) indican que *All. vitis* se puede detectar con mayor frecuencia en segmentos más cercanos al tronco.

Tabla 3:Tabla de resultados para detección de *Allorhizobium vitis* usando análisis microbiológicos y moleculares.

Muestra	Localidad	Variedad	Morfología de colonias en RS	PCR <i>pehA</i> desde colonias en medio RS	PCR <i>pehA</i> desde medio King B y ADN desde kit comercial.	PCR <i>pehA</i> desde medio King B y ADN desde shock térmico	PCR <i>virC</i> desde medio King B y ADN obtenido por shock térmico y kit
1	CH	Viognier	Negativo	----	----	----	----
2	CH	Viognier	Negativo	----	----	----	----
3	CH	Viognier	Positivo	Negativo	----	----	----
4	CH	Viognier	Positivo	Negativo	----	----	----
5	CH	Viognier	Positivo	Negativo	----	----	----
6	CH	Viognier	Negativo	----	----	----	----
7	CH	Viognier	Positivo	Negativo	----	----	----
8	CH	Viognier	Positivo	Negativo	----	----	----
9	CH	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
10	CH	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
11	CH	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
12	CH	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
13	CH	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
14	CH	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
15	CH	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
16	CH	Cabernet S.	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
17	CH	Pinot Noir	Positivo	Negativo	----	----	----
18	CH	Pinot Noir	Positivo	Negativo	----	----	----
19	CH	Pinot Noir	Positivo	Negativo	----	----	----
20	CH	Pinot Noir	Positivo	Negativo	----	----	----
21	CH	Pinot Noir	Positivo	Negativo	----	----	----
22	CH	Pinot Noir	Positivo	Negativo	----	----	----
23	CH	Pinot Noir	Positivo	Negativo	----	----	----
24	CH	Pinot Noir	Positivo	Negativo	----	----	----
25	PE	Viognier	Negativo	----	----	----	----
26	PE	Viognier	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
27	PE	Viognier	Positivo	Negativo	----	----	----
28	PE	Viognier	Negativo	----	----	----	----
29	PE	Viognier	Negativo	----	----	----	----
30	PE	Viognier	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
31	PE	Viognier	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
32	PE	Viognier	Positivo	Negativo	----	----	----
33	PE	Cabernet S.	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
34	PE	Cabernet S.	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
35	PE	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
36	PE	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----

37	PE	Cabernet S.	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
38	PE	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
39	PE	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
40	PE	Cabernet S.	Positivo	Negativo	----	----	----
41	PE	Carmenere	Negativo	----	----	----	----
42	PE	Carmenere	Positivo	Negativo	----	----	----
43	PE	Carmenere	Positivo	Negativo	----	----	----
44	PE	Carmenere	Positivo	Negativo	----	----	----
45	PE	Carmenere	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
46	PE	Carmenere	Positivo	Negativo	----	----	----
47	PE	Carmenere	Positivo	Negativo	----	----	----
48	PE	Carmenere	Positivo	Negativo	----	----	----

*.- Chimbarongo: CH

**.- Peralillo: PE

En cuanto a los resultados moleculares, de las 43 muestras sembradas en medio RS y purificadas en medio NSA, se obtuvieron resultados positivos para el gen *pehA* en 8 aislados, de estos sólo uno amplificó a la altura de bases esperada (muestra 22) (466 pb) comparando con el control positivo (UVPN1); mientras que las otras 7 muestras (13, 24, 25, 27, 28, 31, 38) presentaron amplificaciones no concluyentes. Estas últimas fueron sometidas a nuevo análisis PCR adicionando Blotto (2%) y DMSO (5%) (Biondi *et al.*, 2012) para mejorar la reacción PCR; desde este procedimiento, se obtuvieron cuatro amplificaciones a 466 pb (muestras 16, 26 y 30), mientras que la muestra 31 tuvo una amplificación a una altura menor (Figura 3).

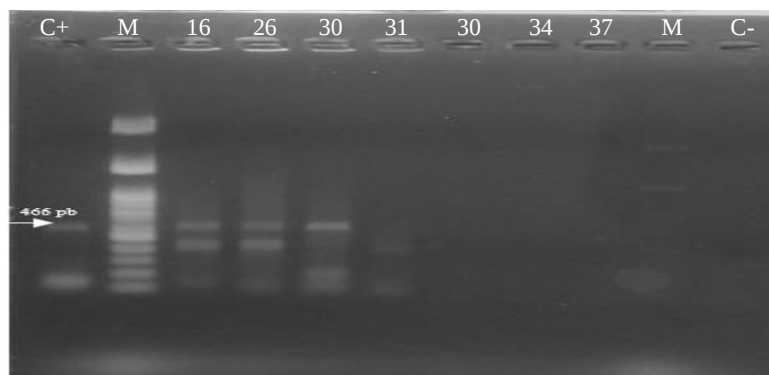


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con producto PCR para gen *pehA* en cepas purificadas de *Allorhizobium vitis* desde lloro primaveral en medio RS con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%). C+: control positivo ADN *Allorhizobium vitis* extraído mediante shock térmico con partidores PGF/PGR. M: marcador de peso molecular. Muestras de la 16 a la 37: ADN extraído mediante shock térmico y combinación de partidores PGF/PGR. C-: Control negativo.

Estos resultados pueden estar asociados con los distintos componentes que integran el lloro primaveral y que pueden inhibir la PCR, como lo son: fenoles, ácidos, azúcares, aminoácidos y nutrientes; esto además es coincidente con lo indicado por Zheng y colaboradores (2020). Szeguedi y colaboradores (2005) indican que la enfermedad de agallas de la corona es provocada en un 90% por *All. vitis*, mientras que el 10% restante se atribuye a *Agrobacterium tumefaciens*, lo cual puede incidir en la detección molecular según el tipo de partidores utilizados. Al adicionar Blotto y DMSO se logra reducir la cantidad de agentes inhibidores de la PCR que están presentes en el lloro primaveral y se favorece la desnaturalización del ADN, facilitando la unión de los cebadores con la cadena de ADN respectivamente (De Boer *et al.*, 2005). Sin embargo, inferimos que en debido a la baja carga bacteriana en el lloro de vides asintomáticas, la amplificación del gen *pehA* fue deficiente. Otros autores como Habbadi y colaboradores (2017) indican que la concentración mínima para la detección de *Allorhizobium vitis* por pruebas PCR convencional es de 10^4 UFC/ml,

mientras que otros autores como Herlache *et al*, (1999) indican que debe existir concentraciones mayores a 10^6 UFC/ml dentro de la planta para que la bacteria sea capaz de provocar la sintomatología de agallas de la corona, por lo que al utilizar muestras de lloro de plantas asintomáticas, se entiende que estas tengan una carga menor a 10^6 UFC/ml, lo que dificultaría aún más la detección.

En el caso de la siembra de lloro primaveral procesado en medio de cultivo APD con pH 7,2 y suplementado con fúngicida, se obtuvo que las 8 muestras desarrollaron una alta diversidad fenotípica de colonias bacterianas, que dificultó el aislamiento y purificación, pero no hubo crecimiento de hongos en el medio. Se obtuvieron en total 11 muestras con un fenotipo característico de *Allorhizobium vitis* (Figura 4 C). Estas muestras fueron sometidas a shock térmico para obtener un lisado que fue sometido a pruebas moleculares para el gen *pehA*, manteniendo el perfil químico y térmico utilizado anteriormente, y agregando nuevamente Blotto y DMSO a la muestra. De las 8 muestras sometidas a pruebas moleculares se logró obtener una amplificación (muestra 16), la cual estaba a la altura de bases esperada (466 pb) comparando con el control positivo (UVPN1), sin embargo, esta muestra presenta una doble banda (Figura 5), por lo tanto, esta no fue considerada como positiva y se debió realizar nuevamente una purificación de las muestras para confirmar los resultados.

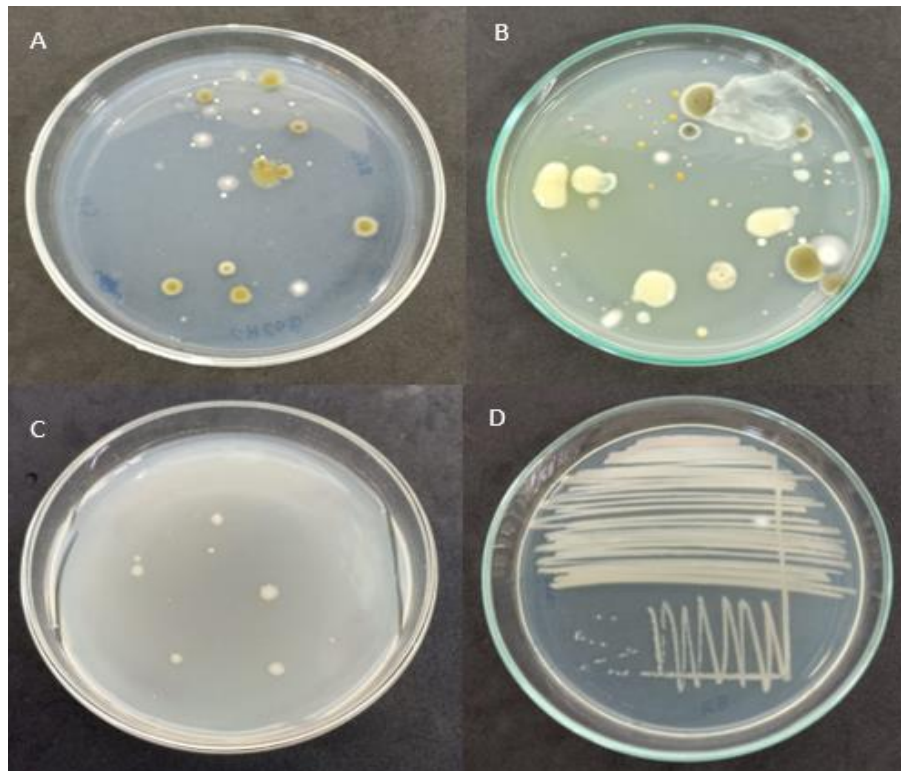


Figura 4: Placa Petri con distintos medios de cultivo a los 5 días post inoculación de lloro primaveral: (A) Medio de cultivo RS sembrado con lloro primaveral y crecimiento de microorganismos; (B) Medio de cultivo APD con pH 7,2 sembrado con lloro primaveral y con crecimiento de microorganismos; (C) Medio de cultivo APD con pH 7.2 y suplementado con cicloheximida con crecimiento de colonias bacterianas; (D) Medio de cultivo King B con crecimiento de cepas puras de *Allorhizobium vitis*.

A través del uso de pruebas microbiológicas empleando el medio de cultivo King B, se lograron obtener 11 colonias que presentaban la morfología característica de *All. vitis*; es decir, color blanco, aspecto mucoso, y márgenes enteros. Estas muestras se sometieron a extracción de ADN

mediante shock térmico para obtener un lisado bacteriano, y kit de extracción de ADN con el fin de realizar PCR para amplificar el gen *pehA*. Se obtuvieron 6 amplificaciones a la altura de bases esperada (466 pb), como se evidencia en la Figura 6. a propósito se observó bandas poco nítidas, por lo que se repitieron las pruebas moleculares para confirmar.

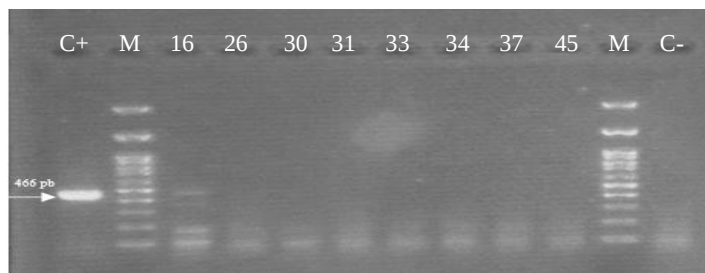


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con producto PCR para el gen *pehA* en cepas purificadas de *Allorhizobium vitis* desde lloso primaveral centrifugado en medio APD con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%). C+: control positivo ADN *Allorhizobium vitis* amplificado con partidores PGF/PGR. M: marcador de peso molecular. Muestras de la 16 a la 45: producto de PCR ADN extraído mediante shock térmico y combinación de partidores PGF/PGR. C-: control negativo.

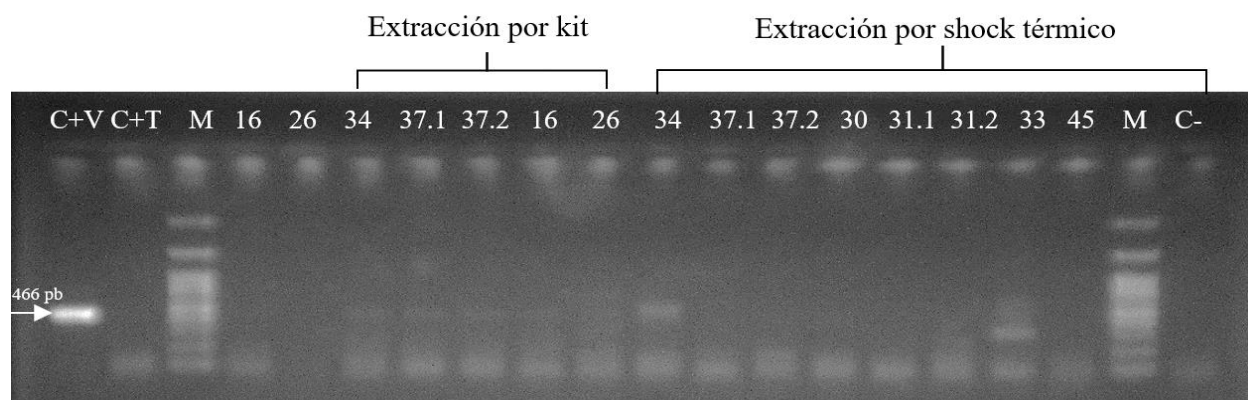


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con producto PCR para gen *pehA* de cepas puras de *Allorhizobium vitis* extraídas por shock térmico y kit con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%). C+V ADN de *Allorhizobium vitis* UVPN1; C+T: ADN de *Agrobacterium tumefaciens*; M: Marcador de peso molecular; Muestras de 16 a la 37,2: ADN puro extraído mediante kit Norgen; Muestras de la 16 a la 45: Lisado bacteriano extraído mediante shock térmico; C-: Control negativo.

Para confirmar la positividad de las muestras se realizó una prueba PCR con los partidores PGF/PGR de las 6 muestras consideradas como positivas. Los resultados muestran una amplificación más definida de las muestras evaluadas, donde tres fueron extraídas mediante kit de ADN, y las otras fueron extraídas mediante shock térmico. Hubo 5 muestras que presentaron una amplificación a la altura de bases esperada (466 pb) comparando con el control positivo para *All. vitis* (UVPN1), por lo que estas muestras se pueden considerar como positivas (Figura 7). En esta investigación la extracción por kit no presentó una diferencia en cuanto a la calidad de amplificación comparado con la extracción por shock térmico, por lo que no se logró establecer cual método es más adecuado para procesar lloso primaveral desde plantas asintomáticas.

Para confirmar la presencia de plásmido (*Ti*) en *All. vitis* se realizó una PCR para el gen *virC* sobre las 6 muestras consideradas como positivas utilizando el ADN obtenido mediante shock térmico, y el ADN puro obtenido mediante kit de extracción, como control positivo se utilizó la cepa UVPN1. Los resultados obtenidos nos muestran que hubo amplificación del ADN del control positivo a la altura esperada (414 pb), sin embargo, no hubo amplificación en ninguna de las 6 muestras positivas para *Allorhizobium vitis*, lo que confirma que estas no presentan el gen *virC*.

(Figura 8). Este resultado indica que las bacterias detectadas no presentan plásmido inductor de tumores (*Ti*). En otro estudio (Ortiz, 2022) se utilizaron muestras de fluido xilemático provenientes de plantas asintomáticas para la amplificación del gen *virC* con estos partidores (VCF3/VCR3), las cuales produjeron amplificación de este gen plasmídico; esto puede estar relacionado con la procedencia de la muestra, puesto que las plantas evaluadas provenían desde viveros con vides con presencia de agallas de la corona.

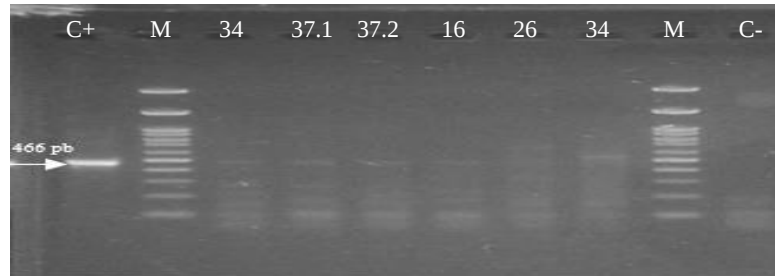


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con producto PCR para gen *peh A* en cepas purificadas de *Allorhizobium vitis* desde lloro primaveral centrifugado en medio King B con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%). C+: control positivo ADN *Allorhizobium vitis* UVPN1 con partidores PGF/PGR. M: marcador de peso molecular. Casillas de la 34 a la 37.2: ADN de lisado bacteriano extraído mediante kit Norgen y combinación de partidores PGF/PGR. Muestras de la 16 a la 34: ADN de lisado bacteriano extraído mediante shock térmico y combinación de partidores PGF/PGR. C-: control negativo.

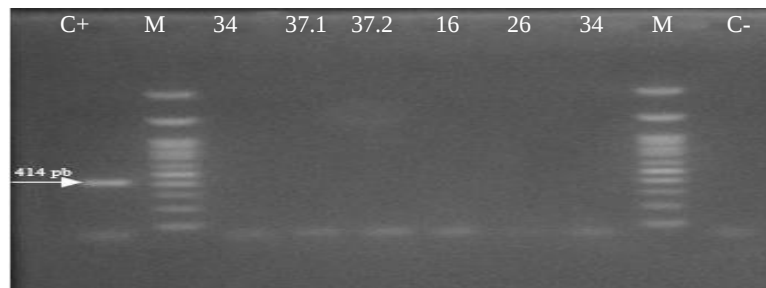


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con producto PCR para gen *virC* en cepas purificadas de *Allorhizobium vitis* desde lloro primaveral centrifugado en medio King B con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%). C+: control positivo ADN *Allorhizobium vitis* UVPN1 con partidores VCF3/VCR3. M: marcador de peso molecular. Muestras de la 34 a la 37.2: ADN extraído mediante kit Norgen y combinación de partidores VCF3/VCR3. Muestras de la 16 a la 34: ADN de lisado bacteriano extraído mediante shock térmico y combinación de partidores VCF3/VCR3. C-: control negativo.

3.3 Análisis molecular de *Allorhizobium vitis* desde lloro directo

Mediante el uso de muestras de lloro primaveral contaminado con cepas de *Allorhizobium vitis* no fue posible detectar la bacteria por pruebas moleculares para el gen *peh A* en ninguna de las concentraciones evaluadas, teniendo en cuenta que autores como Habbadi y colaboradores (2017) indican que la concentración mínima para la detección de *All. vitis* mediante una prueba PCR convencional es 10^4 ; este resultado, permite hipotetizar que la detección de la bacteria desde lloro primaveral no es posible debido a distintos factores como lo puede ser la composición de la muestra y la baja carga bacteriana presente.

Para confirmar los resultados obtenidos anteriormente, se realizó una prueba PCR para el gen *peh A* en las alícuotas de lloro primaveral en las 4 plantas positivas a *Allorhizobium vitis*, esto con la finalidad de detectar la bacteria en lloro primaveral. El ADN del control positivo (UVPN1) amplificó según lo esperado, sin embargo, no hubo amplificación en ninguna de las muestras de

lloro primaveral (Figura 9). Estos resultados tienen concordancia con los obtenidos por Szguedi y Bottka (2002), quienes mencionan que la detección de *Allorhizobium vitis* desde lloro primaveral es complejo, tanto desde plantas sintomáticas como de asintomáticas, debido al bajo número de células bacterianas, o bien, la presencia de inhibidores de PCR. Esta aseveración también ha sido relevada en los estudios realizados por Wages (2005), Pulawska y colaboradores (2006), donde se detalla que los polisacáridos son capaces de inhibir las pruebas PCR.

Estudios realizados por Kuzmanovic y colaboradores (2018) indican que para aumentar la posibilidad de detección de la bacteria desde muestras de lloro primaveral es necesario enriquecer la población bacteriana utilizando en medio de cultivo semiselectivo (RS), o bien, medios que contengan una menor cantidad de azúcares. Estos autores también indican que si bien, el aislamiento de colonias previo al análisis molecular lleva más tiempo, es una herramienta necesaria para aumentar la fiabilidad del método de detección, pues se aumenta el número de células bacterianas de interés, y se eliminan los inhibidores de la polimerasa presentes en las plantas.

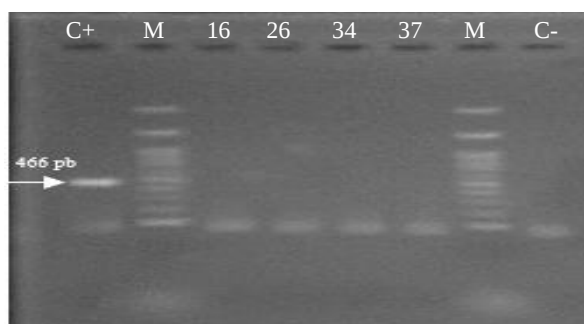


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v con producto PCR para gen *pehA* en muestras de lloro directo positivas a *Allorhizobium vitis* desde placas con adición de Blotto (2%) y DMSO (5%). C+: control positivo ADN *Allorhizobium vitis* UVPN1 con partidores PGF/PGR. M: marcador de peso molecular. Muestras de la 16 a la 37: PCR con lloro primaveral extraído por shock térmico de plantas positivas a *Allorhizobium vitis* desde cepas purificadas en placas. C-: control negativo.

Mediante el uso de pruebas microbiológicas y moleculares fue posible detectar a *Allorhizobium vitis* en 4 muestras provenientes de ambos huertos en dos de las cuatro variedades evaluadas siguiendo el siguiente desglose: 1 muestra (Cabernet Sauvignon) del Fundo Santa Elisa, y 3 muestras (Cabernet Sauvignon (2) y Viognier (1) del Fundo Las Lomas (Tabla 3). Las muestras de lloro del Fundo Santa Elisa provenían de plantas de 1 año de plantación al momento de la toma de muestras, mientras que las plantas del Fundo Las Lomas tenían 10 años de plantación al momento de la toma de muestras, por lo que se puede concluir que existe una mayor probabilidad de detección de *Allorhizobium vitis* en plantas con más años de plantación, ya que estas han podido estar por más tiempo en contacto con la bacteria en el suelo.

En cuanto a la detección de *Allorhizobium vitis* mediante el uso de pruebas moleculares para el gen *pehA* aplicadas de forma directa al lloro primaveral, esta no fue posible en ninguna de las muestras evaluadas de ambos huertos.

Tabla 4: Origen y variedad de plantas positivas a *Allorhizobium vitis*

Predio	Variedad	Código	Pruebas Microbiológicas			Pruebas Moleculares		
			Morfología en medio RS	Morfología en medio APD	Morfología en medio King B	<i>pehA</i> desde colonias purificadas (PGF/PGR)	<i>virC</i> desde colonias purificadas (VCF3/VCR3)	<i>pehA</i> desde lloro directo (PGF/PGR)

Chimbarongo	Cabernet S.	CS8CH (16)	Blanca, márgenes enteros, convexa	Blanca, márgenes enteros, convexa	Blanca, márgenes enteros, convexa	Positiva	Negativa	Negativa
Peralillo	Viognier	VG2PE (26)	Blanca, márgenes enteros, convexa	Blanca, márgenes enteros	Blanca, márgenes enteros	Positiva	Negativa	Negativa
Peralillo	Cabernet S.	CS2PE (34)	Blanca, márgenes enteros, convexa	Blanca, márgenes enteros	Blanca, márgenes enteros	Positiva	Negativa	Negativa
Peralillo	Cabernet S.	CS5PE (37)	Blanca, márgenes enteros, convexa	Blanca, márgenes enteros	Blanca, márgenes enteros	Positiva	Negativa	Negativa

3. Conclusiones

Se detectó *All. vitis* en 4 muestras de lloro primaveral de vides asintomáticas de los dos viñedos evaluados en este estudio, esto con el uso de técnicas microbiológicas y uso de PCR con partidores específicos para el gen *peh A* (PGF/PGR).

Las muestras de lloro primaveral con presencia de *All. vitis*, corresponden a: 1 muestra (Cabernet Sauvignon) del Fundo Santa Elisa, y 3 muestras (Cabernet Sauvignon (2) y Viognier (1)) del Fundo Las Lomas. Estos resultados son indicativos que no hay co-dependencia del lugar con la detección de *All. vitis*.

La aplicación directa de PCR específica con partidores PGF/PGR en lloro primaveral, demuestra que es insuficiente para la detección de *All. vitis*.

Los aislados de *Allorhizobium vitis* detectados en lloro primaveral no presentaron plásmido *Ti*, esto usando partidores para amplificar el gen *virC*.

A través del monitoreo realizado en ambos viñedos estudiados, no se observaron síntomas de agallas de la corona en vides de los cuatro cultivares evaluados, consecuentemente la incidencia de la enfermedad fue 0%. No obstante, es importante considerar nuevos monitoreos en las plantas analizadas, debido al recientemente recambio de plantas.

Las técnicas microbiológicas (medio de cultivo) permitieron aislar *All. vitis* desde lloro primaveral y fueron un aspecto determinante en el éxito para detectar la presencia por PCR de la bacteria.

Se recomienda la colecta y procesamiento de lloro primaveral para fines de detección temprana de *All. vitis* en vides asintomáticas, considerando emplear una combinación de técnicas microbiológicas como lo son el uso de medios de cultivo APD modificado, y PCR específica usando partidores PGF/PGR.

4. Referencias

- Alippi, A., López, 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: 278-286.
- Anderson, A. & Moore, W. (1979). Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathology* 69: 320-323.
<https://www.redalyc.org/pdf/2130/213021188008.pdf>
- Biggs, J. (1994). Ecology and biological control of *Agrobacterium vitis*, the grapevine crown gall pathogen.
- Bini, F., Kuczmog, A., Putnoky, P., Otten, L., Bazzi, C., Burr, T.J. & Szguedi, E. (2008). Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*.
- Biondi, E., Kuzmanovic, N., Galeone, A., Ardizzi, S. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* detection in kiwifruit plant tissue and bleeding sap.
- Boatwright, J. & Hirsop, H. (1976). Sucrose agar- a growth medium for spoilage organism. *Journal of The Institute of Brewing*, 82: 343-346.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.2050-0416.1975.tb06960.x>
- 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.
- Burr, T.J, Bazzi, C., Süle, S. & Otten, L. (1988). Crown gall. Biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies, 82. 12: 1288-1297.
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1998.82.12.1288>
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (2021). Catastro vitícola nacional.
- Cruz A, M. (2000). Las agallas de frutales y vides. *Tierra Adentro*, 35: 26-29.
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/5806/NR26138.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Deyett, E., Pouzoulet, J.-I. Yang, Ashworth, E., Castro, Roper, M. & Rolshausen, E. (2019). Assessment of Pierce's disease susceptibility in *Vitis vinifera* cultivars with different pedigrees. *Plant Pathology* 68, 1079–1087.
- Días, I. (2020). Producción vitivinícola en el secano central de Chile. *Boletín INIA* 418: 35-56.

- Fritz W. & Stephen J. (Julio 2014). EXTENSION. “Agalla de la corona en uvas”. (en línea). Oficina de Extensión en Texas AgriLife y Universidad de Wisconsin-Madison <https://www.extension.org/pages/60159/agalla-de-la-corona-en-las-uvas-crown-gall-in-grapes>
- Habbadi, K., Duplay, Q., Chapulliot, D., Kerzaon, I. (2017). Characterization and phylogenetic diversity of *Allorhizobium vitis* isolated from grapevine in Morocco. *Journal of Applied Microbiology*. 128
- Holmes, B., Roberts, P. (1981). The Classification, Identification and Nomenclature of *Agrobacteria*. *Journal of Applied Bacteriology*, Volume 50, 443–467,
- 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.
- Johnson, K., Cronin, H., Reid, C. & Burr, T. J. (2016). Distribution of *Agrobacterium vitis* in grapevines and its relevance to pathogen elimination. *Plant Dis.* 100:791-796.
- Johnson, K. L., Cronin, H., Reid, C. L., & Burr, T. J. (2015). Distribution of *Agrobacterium vitis* in Grapevines and Its Relevance to Pathogen Elimination. *Plant Disease* 100:791-796.
- Kuzmanovic, N., Biondi, E., Overmann, J., Pulawska, J., Verburg, S., Smalla, K., & Lassalle, F. (2022). Genomic analysis provides novel insights into diversification and taxonomy of *Allorhizobium vitis* (i.e., *Agrobacterium vitis*).
- Kuzmanovic, N., Biondi, E., Pulawska, J. y Smalla, K. (2020). Revisiting the taxonomy of *Allorhizobium vitis* (i.e., *Agrobacterium vitis*) using genomics - emended description of *All. vitis* sensu stricto and description of *Allorhizobium ampelinum* sp. nov.
- Kuzmanovic, N., Pulawska, J., Hao, L., y Burr, T. (2018). The ecology of *Agrobacterium vitis* and management of crown gall disease in vineyards.
- 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
- Llop, P. (2003). Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en *Agrobacterium tumefaciens*. [Tesis Doctoral, Universidad de Valencia].
-
- Orel, D. C., Reid, C. L., Fuchs, M., & Burr, T. J. (2017). Identifying environmental sources of *Agrobacterium vitis* in vineyards and wild grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*.

- Orel, D., Karagoz, A., Durmaz, R., & Ertunc, F. (2016). Phenotypic and molecular characterization of *Rhizobium vitis* strains from vineyards in Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 55: 41–53.
- The International Organisation of Vine and Wine (2017). Focus OIV 2017: Distribution of the world's grapevine varieties. <https://www.oiv.int/public/medias/5888/en-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties.pdf>
- Puerta, C. y Ureña, C. (2005). *Prácticas de Biología Molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javerina.
- Pulawska, J., Willems, A. & Sobiczewski, P. (2006). Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 470-479.
- Roy, M., & Sasser, M. (1983). A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. *Phytopathology* 73:810
- Schroth, M., Huisman, O. (1988). Reduction in yield and vigor of grapevine caused by crown gall disease. *Plant Disease* 72:1000-1002
- Servicio Agrícola y Ganadero (2020). Catastro vitícola nacional 2020: División de Protección Agrícola-Forestal y Semillas; Subdepartamento de Viñas, Vinos y Bebidas alcohólicas.
- Stewart, E., Wenner, N., Long, L. & Overton, B. (2013). Crown gall or grape: Understanding the disease, prevention, and management disease fact sheet. <https://www.odepa.gob.cl/rubro/vinos/catastro-viticola-nacional>
- Szegedi E. & 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.
- Sotomayor, J. (2004). Vid, *vitis vinífera* L. Boletín INIA. 120: 52-79. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/7043/NR32269.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Suzaki, K., Yoshida, K. & Sawada, H. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *J Gen Plant Pathol* 70, 342–347 (2004).

- Tempé, J., Petit, A., Holster, M., Van Montagu, M. & Schell, J. (1977). Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: possible relation to transformation in crown gall. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(7), 2848–2849.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC431316/pdf/pnas00029-0260.pdf>
- Tolba, I. H., & Zaki, M.F. (2011). Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt. *Annals of Agricultural Science*, 56: 113-119.
- Vilas, P., Pythoud, F., Nester, E., Gordon, M. (1987). Increased virulence of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the vir region of pTiBo542: Application to genetic engineering of poplar. *Bio/Technology* 5, 1323-1327.
- Wages, J., (2005). Polymerase chain reaction. *Encyclopedia of analytical science*. 243-250.
- Young, J., Kuykendall, L., Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2003). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*.
- Zheng, T., Salman, M., Zhang, K., Jia, H. & Fang, J. (2020). Biological and functional properties of xylem sap extracted from grapevine (cv. Rosario Bianco)

5. Anexos

Anexo 1: Recetario medios de cultivo

Medio de cultivo RS (1 litro)

- Fosfato monopotásico: 0,7 g
- Fosfato dipotásico: 0,9 g
- Sulfato de magnesio: 0,2 g
- Adonitol: 4,0 g
- Extracto de levadura: 0,14 g
- Cloruro de sodio: 0,20 g
- Ácido bórico: 1,0 g
- Agar: 15 g
- Agua destilada 1000 ml

Medio de cultivo NSA (1 litro)

- Bacto nutrient broth: 8,0 g
- Sacarosa: 50 g
- Bacto agar: 15 g
- Agua destilada 1000 ml

Medio de cultivo APD (1 litro)

- Agar papa dextrosa: 39 g
- Cicloheximida: 28 g
- Agua destilada: 1000 ml

Medio de cultivo King B (1 litro)

- Proteosa peptona 3: 20 g
- Fosfato monopotásico: 1,5 g
- Sulfato de magnesio: 1,5 g
- Glicerol 87%: 8,2 ml
- Bacto agar: 15 g
- Agua destilada: 1000 ml

Anexo 2: Instructivo uso Kit de Extracción ADN

1. Preparación de lisado (Bacterias Gram Negativas)
 - a. Trasfiera 1 ml de cultivo bacteriano a un tubo de microcentrífuga y centrifugue a 20.000 x g (14.000 RPM) durante 30 segundos para sedimentar las células. Retirar el sobrenadante con cuidado para no perturbar o desalojar el sedimento celular.
 - b. Agregar 250 µl de Solución de Resuspensión A al sedimento celular. Resuspender las bacterias con un vórtice suave.

Tratamiento Opcional con ARNasa A: Si se requiere ADN genómico libre de ARN, agregue el equivalente a 10 KUnitz de RNasa A (sin exceder 20 µl) a la suspensión celular. Mezclar bien y continuar al paso 1Ac.

- c. Agregar 250 µl de Tampón de Lisis P y 12 µl de Proteinasa K a la suspensión celular. Mezclar bien mediante agitación suave e incubar a 55°C durante 30 minutos.

Nota: Los tiempos de incubación pueden fluctuar entre 15 y 45 minutos dependiendo de la cantidad y tipo de cepa bacteriana que se lisa. La lisis se considera completa cuando se obtiene un lisado relativamente claro. Puede persistir una ligera turbidez en el lisado durante ciertos periodos, los cuales no afectarán la recuperación de ADN genómico

- d. Proceder al Paso 2: Vinculación a la columna

2. Vinculación a la columna

- a. Agregar 500 µl de Solución BX al lisado y mezclar bien con agitación suave. Asegurarse que se obtiene una mezcla homogénea.
- b. Agregar 500 µl de etanol 96-100% (proporcionado por el usuario) y mezclar bien con un vortex a baja revolución.
- c. Ensamble una columna de centrifugado con uno de los tubos de recolección previstos en el Kit. Aplicar 750 µl de la mezcla al conjunto de la columna de centrifugado. Tapar la columna y centrifugar la unidad por 1 minuto a 10.000 x g (10.000 RPM).

Nota: Asegurarse que todo el volumen de lisado haya pasado por el tubo de recolección inspeccionando la columna. Si no ha pasado todo el volumen del lisado, centrifugar a 20.000 x g (14.000 RPM) durante 1 minuto.

- d. Después de la centrifugación, descartar el flujo y volver a ensamblar la columna de centrifugación con el tubo colector.
- e. Aplicar el resto de la mezcla a la columna, tapar la columna y centrifugar la unidad por 1 minuto a 10.000 x g (10.000 RPM).

Notas: Asegurarse que todo el volumen de lisado haya pasado al tubo de recolección inspeccionando la columna. Si no ha pasado todo el volumen del lisado, centrifugar a 20.000 x g (14.000 RPM) durante 1 minuto.

- f. Después de la centrifugación descartar el sobrenadante y volver a ensamblar la columna de centrifugación con el tubo colector.

3. Lavado de ADN ligado

- a. Agregar 500 µl de Solución de Lavado A a la columna y centrifugar durante 1 minuto a 20.000 x g (14.000 RPM). Desechar el flujo y volver a ensamblar la columna de centrifugado con el tubo colector.

Notas: Asegurarse que todo el volumen de lisado haya pasado al tubo de recolección inspeccionando la columna. Si no ha pasado todo el volumen del lisado, centrifugar a 20.000 x g (14.000 RPM) durante 1 minuto.

- b. Lavar la columna por segunda vez agregando otros 500 µl de Solución de Lavado A y centrifugar por 1 minuto a 20.000 x g (14.000 RPM). Desechar el flujo y volver a ensamblar la columna de centrifugado con el tubo colector.
- c. Girar la columna por 2 minutos para secarla completamente. Descartar el tubo de colección.

4. Elución de ADN limpio

- a. Ensamble la columna de centrifugación (con el ADN unido a la columna) con los tubos tubos de elución de 1,7 ml proporcionados.
- b. Agregar 200 µl de Tampón de Elución B al centro de la columna. Centrifugar a 3.000 x g (6.000 RPM). Una porción del Tampón de Elución B pasará a través de la columna permitiendo que se produzca una hidratación del ADN.
- c. Centrifugar a 20.000 x g (14.000 RPM) durante 2 minutos adicionales para recolectar el total del volumen de elución.

Opcional: El rendimiento se puede mejorar en un 20-30% pipeteando la elución nuevamente sobre la columna y repitiendo el paso 4c.

El ADN genómico purificado se puede almacenar a 2-8°C durante unos días. Para almacenar a largo plazo, se recomienda almacenar a -20°C.