

INFORME TÉCNICO FINAL

Consultorías para la Innovación

Nombre de la iniciativa	ASESORÍA EXPERTA PARA CONOCER LAS ESPECIES PRODUCTORAS DE AGALLAS EN BERRIES Y LAS TECNICAS DE DETECCION MOLECULAR DE AGROBACTERIUM DESDE TEJIDO VEGETAL
Código de la iniciativa	COC-2021-0003
Nº de informe	Informe Técnico Final
Período informado (considerar todo el periodo de ejecución)	desde el 12 de abril hasta el 30 de julio
Fecha de entrega	30 de julio
Nombre Coordinador(a)	Paz Antonia Millas Ortiz
Firma Coordinador(a)	

INSTRUCCIONES PARA CONTESTAR Y PRESENTAR EL INFORME

- Todas las secciones del informe deben ser contestadas, utilizando caracteres tipo Arial, tamaño 11.
- Sobre la información presentada en el informe:
 - Debe dar cuenta de todas las actividades realizadas en el marco de la iniciativa considerando todo el período de ejecución, incluyendo los resultados finales logrados y las modificaciones que se le introdujeron; y el uso y situación presente de los recursos utilizados, especialmente de aquellos provistos por FIA.
 - Debe estar basada en la última versión de la Propuesta Definitiva aprobada por FIA.
 - Debe ser resumida y precisa. Si bien no se establecen números de caracteres por sección, no debe incluirse información en exceso, sino solo aquella información que realmente aporte a lo que se solicita informar.
 - Debe ser totalmente consistente en las distintas secciones y se deben evitar repeticiones entre ellas.
 - Debe estar directamente vinculada a la información presentada en el informe financiero final y ser totalmente consistente con ella.
- Sobre los anexos del informe:
 - Debe incluir toda la información solicitada en los anexos.
 - Deben incluir toda la información que complemente y/o respalde la información presentada en el informe.
 - En caso de que corresponda, se deben incluir el material de difusión, como diapositivas, publicaciones, manuales, folletos, fichas técnicas, entre otros.
 - También se deben incluir cuadros, gráficos y fotografías, pero presentando una descripción y/o conclusiones de los elementos señalados, lo cual facilite la interpretación de la información.
- Sobre la presentación a FIA del informe:
 - Se deben entregar dos copias iguales, una en papel y una digital en formato Word (CD o pendrive).
 - Debe entregarse en las oficinas de FIA, personalmente o por correo. En este último caso, la fecha válida es la de ingreso a FIA, no la fecha de envío de la correspondencia.
 - La fecha de presentación debe ser la establecida en la cláusula sexta del contrato de ejecución. El retraso en la fecha de presentación del informe generará una multa por cada día hábil de atraso equivalente al 0,2% del último aporte cancelado.
 - FIA se reserva el derecho de publicar una versión del Informe Final editada especialmente para estos efectos.

CONTENIDOS

1	ANTECEDENTES GENERALES	4
2	RESUMEN EJECUTIVO	5
3	OBJETIVO GENERAL	6
4	PROGRAMA DE ACTIVIDADES.....	7
5	ANTECEDENTES DEL EQUIPO TÉCNICO.....	9
6	RESULTADOS OBTENIDOS	12
7	POTENCIAL DE IMPLEMENTACIÓN	13
8	CONCLUSIONES	15
9	RECOMENDACIONES	15
10	ANEXOS	17

1 ANTECEDENTES GENERALES DE LA PROPUESTA

Indique los antecedentes generales de la iniciativa al momento de terminar la ejecución de la consultoría de innovación.		
Lugar donde se realizó la consultoría¹	Región:	Región del Maule
	Comuna (s):	Villa Alegre
Fecha de inicio y término (Incluye la preparación y realización de la consultoría)²	Fecha inicio³:	06-05-2021
	Fecha término⁴:	24-07-2021
Fecha de inicio y término de la consultoría⁵	Fecha inicio:	11-06-2021
	Fecha término:	09-07-2021

¹ Considerando que esta versión es online, debe indicar el lugar principal donde se **ubicaron** los participantes de la consultoría de innovación, es decir quiénes recibieron la consultoría.

² Este rango de fechas deberá incluir el **tiempo total y real de la propuesta**, incluyendo el tiempo utilizado para preparar la consultoría, realizar la consultoría y las actividades administrativas asociadas a esta.

³ Corresponde a la fecha de emisión de la carta de aprobación de las modificaciones por parte de FIA.

⁴ Corresponde a la fecha después de 15 días de la última actividad de la consultoría.

⁵ Este rango de fechas deberá incluir la duración en la cual **efectivamente se realizó la consultoría** según la programación de las actividades.

2 RESUMEN EJECUTIVO

Entregar de manera resumida⁶ las principales actividades realizadas y los resultados obtenidos durante todo el periodo de ejecución de la consultoría para la innovación.

(Máximo 2.000 caracteres sin espacio)

Reunión de coordinación (16 junio): Reunión online través de Zoom con el equipo técnico, empresa encargada de la producción, traductora y expositores. En la reunión se coordinó el trabajo para generar el link del webinar para el Seminario internacional con traducción simultánea y la gestión las invitaciones para los panelistas. También en esta ocasión se realizaron pruebas para compartir las presentaciones en la plataforma con el consultor y expositoras chilenas participantes del seminario.

Seminario Internacional (25 de junio) “Agalla de la corona en berries: antecedentes de una enfermedad compleja”, la cual se realizó en la modalidad Online a través de la plataforma Zoom https://us02web.zoom.us/webinar/register/WN_yPFouiwrT-iBHPngNJSf5w.

Este seminario abordó distintos aspectos de la enfermedad conocida como Agalla de la corona en berries, entregando una actualización sobre las especies que la producen en el país y a nivel mundial, revisando aspectos técnicos de diagnóstico y manejo. Además, se presentó la situación actual y las regulaciones que realiza el SAG en la producción en plantas, materiales de propagación y en huertos comerciales en relación a esta enfermedad.

El desarrollo de este Seminario Internacional contribuyo a la difusión de conocimientos sobre esta importante enfermedad en berries, las herramientas para diagnosticarla tempranamente de modo de implementar manejos preventivos para reducir el número de plantas afectadas y disminuir sus pérdidas económicas tanto a productores como a viveristas. Se contó con la participación de más de 250 asistentes de 12 países. La grabación del seminario se subió al canal de youtube de INIA y las presentaciones se encuentran disponibles en la página web www.berriesmaule.cl y la grabación del seminario se encuentra en el canal de youtube de INIA.

Taller Diagnóstico molecular (09 de julio): Actualizaciones en detección molecular de Agrobacterium/Rhizobium, que se realizó en modalidad online a través de la plataforma Zoom <https://zoom.us/j/94855730398?pwd=TytJNG5OdzdTeVRBN1FDUG9FY3NKdz09>

En este taller el asesor extranjero realizó una exposición de una hora y luego se realizaron tres presentaciones de 15 min de cada uno de los laboratorios de diagnósticos participantes. Finalmente se generó una discusión y se elaboró un documento del taller.

⁶ Esta síntesis se debe citar las ideas más importantes, es decir, excluye datos irrelevantes y no brinda espacio a interpretaciones subjetivas.

3 OBJETIVO GENERAL

Indicar el objetivo de la consultoría para la innovación según la propuesta definitiva aprobada por FIA.

(Máximo 250 caracteres sin espacio)

Dar a conocer a productores y viveristas, sobre la diversidad de especies causantes de agallas en berries y capacitar a laboratorios de diagnóstico en las técnicas de detección molecular actualizadas para la agalla de la corona en base a la asesoría experta del Dr. Nemanja Kuzmanovic.

4 PROGRAMA DE ACTIVIDADES

4.1 Indique las actividades que efectivamente se realizaron durante la ejecución de la consultoría.

N°	Fecha	Lugar de realización	Objetivo de las actividades realizadas	Describir las actividades realizadas	Modalidad (Virtual-online/presencial)	N° participantes	Tipo participantes
1	16-06	Plataforma zoom	Programación webinar para el Seminario internacional y la gestión las invitaciones para los panelistas	Reunión general de coordinación del Seminario y programación de la estrategia de difusión	online	6	Equipo técnico, empresa productora
2	25-06	Plataforma zoom	Dar a conocer a productores y viveristas sobre diversidad de bacterias formadoras de agallas en berries y técnicas de detección molecular.	Seminario Internacional “Agalla de la corona en berries: antecedentes de una enfermedad compleja”	online	256	Viveristas y productores de berries
3	09-07	Plataforma zoom	Capacitar al personal del laboratorio de INIA-Quilamapu y de la Universidad de Chile y el SAG Ñuble, sobre las últimas actualizaciones en detección molecular de Agrobacterium/Rhizobium.	Taller “Actualizaciones en detección molecular de Agrobacterium/Rhizobium”	online	11	Encargados de 3 laboratorios de diagnósticos y equipos técnicos
4							

4.2 En caso de que corresponda, indique y justifique los cambios en las actividades programadas respecto a las actividades efectivamente realizadas.

(Máximo 2.000 caracteres sin espacio)

El Seminario Internacional “Agalla de la corona en berries: antecedentes de una enfermedad compleja” estaba programado para el lunes 21 de junio, pero se modificó para el viernes 25 de junio, ya que se declaró repentinamente el 21 de junio de 2021 como feriado nacional. Se cambió para el 25 de junio, ya que como estaba programado el taller había reserva de la plataforma zoom y tiempo del asesor internacional para dar la charla)

El taller “Actualizaciones en detección molecular de Agrobacterium/Rhizobium” que estaba programado para el viernes 25 de junio, se modificó para el viernes 09 de julio, debido a que se tuvo que usar la fecha reservada con anterioridad para el taller, para realizar el seminario, que tenía más de 300 personas inscritas. El taller se modificó para el 09 de julio, porque fue la primera fecha que había disponibilidad de todos los encargados de laboratorio de diagnóstico y del asesor experto extranjero.

La fecha de entrega del informe estaba planificada para el 19 de julio y se modificó para el 30 de julio por todo el retraso en las actividades que generó la implementación de un feriado nacional con una semana de anticipación.

5 ANTECEDENTES DEL EQUIPO TÉCNICO

5.1 Indicar los antecedentes del coordinador principal, consultores y participantes individuales que efectivamente participaron en la consultoría.

N°	Tipo de integrante	Nombre completo	Nacionalidad	Nombre de la empresa / organización donde trabaja	Cargo que desempeña en la empresa / organización donde trabaja
1	Coordinador Principal	Paz Antonia Millas Ortiz	Chilena	INIA	Investigadora y Encargada de Laboratorio de Identificación Moleculal del Banco de Recursos Genéticos Microbianos
2	Consultor	Nemanja Kuzmanovic	Serbio	Instituto Julius Kühn	Investigador asociado
3	Participante Individual - Consultoría	Ricardo Javier Chilian	Argentino	INIA	Investigador en Biotecnología
4	Participante Individual - Consultoría	Carmen Gloria Morales Alcayaga	Chilena	INIA	Transferencista-Investigadora
5	Participante Individual - Consultoría	Jorge Andrés Carrasco Fernández	Chileno	INIA	Investigador en Biología Molecular
6	Participante Individual - Consultoría	Hugo Andrés Rodríguez Alister	Chileno	INIA	Encargado de comunicaciones de los centros regionales Quilamapu y Raihuen

7	Participante Individual - Consultoría	Nicola Fiore	Italiano	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Dpto. de Sanidad Vegetal	Decano / Profesor asociado
8	Participante Individual - Consultoría	Gloria Cuevas Cerda	Chilena	Servicio Agrícola y Ganadero	Encargada Laboratorio Fitopatología Ñuble
9	Participante Individual - Consultoría	Giuliano Tassara Levy	Chileno	Comfrut Nursery S.A.	Gerente General
10	Participante Individual - Consultoría	Manuel Villalobos	Chileno	Prodesal Retiro	Asesor Técnico
11	Participante Individual - Consultoría	Borys Chong Pérez	Cubano	Gerente comercial	BioTECNOS Ltda
12	Participante Individual - Consultoría	Richard Astudillo Hormazabal	Chileno	Productor de moras	No aplica
N°	Elija un elemento.				

5.2 Indique y justifique los cambios realizados en el equipo técnico (coordinador, consultores, participantes individuales) inicialmente definidos, respecto a los que efectivamente participaron durante la ejecución de la consultoría.

(Máximo 1.000 caracteres sin espacio)

Hubo 3 participantes individuales que no participaron del Seminario, estos fueron:

Leonardo Bustamante Anjari, Gerente de CEGE Consultores

Juan Miguel Jaque Castillo, Gerente Técnico de Viveros Global Seedlings.

Gabriel Tiznado Zurita, jefe técnico del Prodesal de Linares.

Sin embargo, hubo varios representantes de viveros y de Prodesal que sí participaron en el seminario (Se adjunta listado de asistencia Anexo 4):

Claudia Soto, Gerente Frutales Mayores en Viveros Hijuelas S.A.

Margarita Torres, Encargada Comex, Normativas y Procesos Propiedad Intelectual, Viveros de Chile AGV

Marcelo Cabrera Valdés, jefe Sanidad Vegetal Univiveros

Sebastián Weason, Supervisor de vivero Bestplant

Marisol Hernández, jefe Técnico Prodesal Parral, Región del Maule

Oscar Marchant, Prodesal Teno, Región del Maule

Sergio Ponce, Prodesal Litueche, Región de OHiggins

6 RESULTADOS OBTENIDOS

6.1 Describa cuáles fueron los resultados obtenidos en la realización de la consultoría, según el objetivo general de la propuesta y el trabajo realizado por los consultores.

(Máximo 2.000 caracteres sin espacio)

Entrega de conocimiento actualizado a más de 250 participantes, entre los que contaron productores, viveristas, profesionales y técnicos del agro (Listado de asistencia en anexo 4) sobre la diversidad de especies causantes de agallas en berries a través de un Seminario Internacional que contó de 3 charlas en el tema, una de las cuales dadas por el consultor extranjero Nemanja Kuzmanovic, quien es un experto a nivel mundial en el tema y que ha descrito en los últimos años al menos dos especies nuevas que afectan a los berries

Capacitación a encargados y personal de los tres principales laboratorios de diagnóstico en las técnicas de detección molecular actualizadas para la agalla de la corona en base a un taller dado por el consultor Dr. Nemanja Kuzmanovic. Además se realizaron presentaciones para revisar las metodologías de cada laboratorio y se discutió para consensuar la información.

Discusión y acuerdos del taller generaron un documento de consulta publicado en la página web www.berriesmaule.cl y que se encuentra en el anexo 3 de material audiovisual

6.2 Describa si los resultados obtenidos permitieron alcanzar el objetivo general de la consultoría para la innovación.

(Máximo 2.000 caracteres sin espacio)

El objetivo fue plenamente obtenido ya que se obtuvo un alto número de participantes en el Seminario Internacional y fue altamente valorada la información entregada. El 94% de los encuestados estuvo de acuerdo o muy de acuerdo con que el objetivo de la consultoría fue obtenido.

En la capacitación de los laboratorios de diagnóstico molecular, participaron encargados y personal de 3 de los principales laboratorios que realizan diagnóstico de Agrobacterium en Chile. Se obtuvieron las actualizaciones en las técnicas de detección en una charla magistral dada por el consultor Nemanja Kuzmanovic, se presentaron las técnicas utilizadas por cada laboratorio y se generó un documento con la información acordada.

6.3 En caso pertinente, justifique la discrepancia entre los resultados esperados y los resultados obtenidos.

--

No existió discrepancia

7 POTENCIAL DE IMPLEMENTACIÓN

7.1 Describa detalladamente cómo la realización de la consultoría para la innovación contribuyó a identificar brechas tecnológicas y/o productivas, y facilitar la implementación de soluciones innovadoras. Considerar en el análisis los resultados de la encuesta de satisfacción realizada a los participantes de la consultoría (Anexo 2).

(Máximo 2.000 caracteres sin espacio)

La consultoría mostró que aunque en Chile hay sólo una especie de *Agrobacterium* oficialmente descritas, se vio que hay muchas especies que producen esta enfermedad en el mundo y que pueden ingresar al país o ya ingresaron y aún no han sido detectadas, algunas de estas especies tienen comportamientos distintos y además no son detectadas con las técnicas de diagnóstico que se utilizan actualmente lo que puede llevar a que los viveros ni las inspecciones del SAG las detecten. Por otro lado se destacó que el diagnóstico debe ser realizado post compra de plantas y antes de que se planten en el campo para saber si las plantas están sanas, esta es una técnica fundamental que debe ser adoptada y que no siempre se realiza, ya que requiere de envío de plantas a laboratorios de diagnóstico molecular. Sin embargo se mencionó la disponibilidad de este servicio en al menos 3 laboratorios del país, por lo que es una técnica factible de realizarse

Existen varios productos para la desinfección de material de propagación en vivero, estos debe constantemente estar chequeando frente a la aparición de resistencia a los productos o a la aparición de nuevas especies. INIA realiza este tipo de evaluaciones de productos y cepas de *Agrobacterium* por lo que los viveros pueden realizarla.

El uso del biocontrolador en base a *Agrobacterium radiobacter* cepa K-84, que ha sido ampliamente utilizado en el pasado, ya no es recomendable, porque se ha comprobado científicamente que es capaz de adquirir el plásmido inductor de tumores y transformarse en productor de agallas al igual que las especies de *Agrobacterium*. Aunque existe un biocontrolador que fue mejorado con ingeniería genética para que no adquiriera el plásmido, este biocontrolador no puede ser usado en Chile por ser transgénico.

El 96% de los encuestados estuvo de acuerdo o muy de acuerdo con que la consultoría contribuyó a detectar brechas y a facilitar la implementación de soluciones innovadoras, el otro 4% de los encuestados fue neutral.

7.2 Describa clara y detalladamente cuales son las posibilidades reales de que el grupo participante pueda implementar y/o aplicar la(s) recomendaciones que se entregaron en la consultoría para la innovación. Considerar en el análisis los resultados de la encuesta de satisfacción realizada a los participantes de la consultoría (Anexo 2).

(Máximo 2.000 caracteres sin espacio)

Un 89% de los encuestados estuvo de acuerdo o muy de acuerdo con que las recomendaciones de los consultores tienen potencial real de ser implementado y/o aplicado en su empresa, asociación o institución. El otro 11% se mostró neutral. Existen varias recomendaciones entregadas en la consultoría que pueden ser implementadas por los productores y viveristas, entre estas se encuentran:

Que los productores puedan diagnóstico molecular a las plantas antes de la plantación.

Que los viveristas sometan a chequeo los productos que utilizan para desinfectar el material vegetal de propagación.

Que no utilicen productos de control biológico en base a *Agrobacterium radiobacter* cepa k-84.

Que tanto productores como viveristas eliminen todo el material con agallas.

7.3 Indique posibles ideas de iniciativas de innovación que surgieron producto de la realización de la consultoría para la innovación.

(Máximo 2.000 caracteres sin espacio).

Utilización de diagnóstico molecular por parte de los productores antes de la plantación.

Que los viveros puedan someter su material vegetal proveniente del extranjero a la detección de nuevas especies de bacterias causantes de la agalla de la corona.

Que se puedan hacer estudios para detectar la eficacia en la desinfección de productos en el tiempo para detectar la presencia de resistencia de ciertas cepas.

La evaluación de microorganismos antagonistas para el control de la enfermedad de géneros distintos a *Agrobacterium* y *Rhizobium*

8 CONCLUSIONES

8.1 Realizar un análisis global de las principales conclusiones obtenidas luego de la ejecución de la consultoría para la innovación.

(Máximo 2.000 caracteres sin espacio)

La agalla de la corona se encuentra dentro de las plagas reglamentadas en viveros, debido a la gran importancia económica que tiene en huertos de frutales, por lo que el SAG realiza fiscalizaciones obligatorias durante el desarrollo de las plantas en viveros y toma muestras para verificar la ausencia de las bacterias que causan la enfermedad.

No existe un control curativo para la agalla de la corona, por lo que es importante realizar un diagnóstico oportuno y confiable que permita adoptar medidas preventivas y evitar que la enfermedad se propague en el vivero o en el huerto, dentro de las cuales la más confiable es la detección con marcadores moleculares, este servicio lo entregan al menos 3 laboratorios en Chile

Aunque en Chile se ha detectado sólo una especie causante de agallas de la corona en berries, existe la posibilidad que ingresen en el futuro nuevas especies o que ya hayan ingresado al país y que no se hayan detectado aún debido a la falta de muestreos y estudios que incluyan la identificación molecular para detectar nuevas especies.

9 RECOMENDACIONES

9.1 Realizar un análisis global de las principales recomendaciones⁷ obtenidas luego de la ejecución de la consultoría para la innovación.

⁷Se debe identificar las posibilidades de mejoras futuras en función a lo realizado en la consultoría, considerando aspectos técnicos, de gestión, logísticos, entre otros.

(Máximo 2.000 caracteres sin espacio)

- Una de los cuidados más importantes en la conformación de un huerto de berries es disponer de plantas sanas y que, de preferencia, cuenten con un diagnóstico molecular antes de ser plantadas y así poder eliminar partidas enfermas.
- Usar agua de pozo para el riego para evitar contaminar los suelos, en muchas ocasiones las aguas de canal vienen con cargas de bacterias agalladoras.
- Evitar plantar en suelos donde hayan crecido plantas con problemas en los últimos 4 a 5 años; desechar las plantas de viveros que presenten síntomas, para no contaminar las plantas sanas y el suelo; desinfectar completamente los instrumentos de poda y de toma de esquejes.
- Es importante evitar todo tipo de heridas tanto en viveros como en huertos, dado que estas bacterias son capaces de infectar los suelos por varias temporadas y que entran a las plantas por las heridas causadas por: manejos agrícolas (como las podas), por los daños de insectos en troncos y ramas, o por los agrietamientos en la madera producto de crecimientos acelerados de las plantas.
- Se recomienda hacer evaluaciones de los productos químicos que se utilizan para desinfección de material en vivero, de forma de ir detectando cuando estos productos pierdan efectividad, debido al desarrollo de resistencia por parte de las bacterias.
- Es importante que los laboratorios de diagnóstico se vayan actualizando en las técnicas de diagnóstico ya que queda mucho por descubrir en torno a esta enfermedad, cada vez se ha descrito más especies causantes y se desconoce las características en cuanto a formas de infección, movimiento dentro de la planta, etc de las nuevas especies.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO 1: FORMATO ENCUESTA DE SATISFACCIÓN

El ejecutor debe realizar una encuesta de satisfacción a todos los participantes individuales de la consultoría de innovación según las siguientes características y preguntas:

CARACTERÍSTICAS ENCUESTA SATISFACCIÓN		
Público objetivo	Se debe aplicar la encuesta de satisfacción a todos los participantes individuales que participaron en la consultoría.	
Momento aplicación	Se debe realizar al finalizar la consultoría para la innovación.	
Formato encuesta	La encuesta se debe desarrollar en uno de los siguientes formatos: -Formato digital: google forms, surveymonkey, mentimeter, google meet, entre otros. -Formato presencial: papel, tecleras, entre otros.	
Rubrica a utilizar	En la encuesta se debe utilizar la siguiente rubrica para responder a las preguntas de la encuesta de satisfacción: <i>A partir de la realización de la consultoría para la innovación, seleccione qué tan de acuerdo o en desacuerdo está con las siguientes afirmaciones:</i> 1- <i>Muy en desacuerdo</i> 2- <i>En desacuerdo</i> 3- <i>Neutral</i> 4- <i>De acuerdo</i> 5- <i>Muy de acuerdo</i>	
Preguntas encuesta	Objetivo de la consultoría	Se ha conseguido alcanzar el objetivo de la consultoría <i>“ingrese el objetivo general de la consultoría”</i> .
	Resultados de la consultoría	El contenido y las recomendaciones entregadas por los consultores contribuyo a identificar brechas tecnológicas y productivas, y facilitar la implementación de soluciones innovadoras.
		El contenido y las recomendaciones de los consultores tiene potencial real de ser implementado y/o aplicado en su empresa, asociación o institución.
	Consultores	Los consultores poseen las capacidades y experiencia para abordar las temáticas en las actividades realizadas en la consultoría.
		Los consultores fueron claros y precisos en la entrega de contenido y las recomendaciones en las actividades realizadas en la consultoría.
	Programa de actividades	El programa de actividades de la consultoría se realizó según lo planificado (tiempo, objetivos, contenido, número de actividades).

	Pregunta abierta	Le agradecemos que nos deje sus comentarios, críticas o sugerencias respecto a la consultoría para la innovación.
--	------------------	---

10.2 ANEXO 2: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LA ENCUESTA DE SATISFACCIÓN

Adjuntar la sistematización de los resultados y el análisis de los resultados de la encuesta de satisfacción.

10.3 ANEXO 3: INFORME TÉCNICO DEL CONSULTOR

Adjuntar el informe técnico entregado por el consultor.

10.4 ANEXO 4: MATERIAL AUDIOVISUAL RECOPIADO EN LA CONSULTORÍA PARA LA INNOVACIÓN

Adjuntar el material audiovisual recopilado en la consultoría para la innovación.

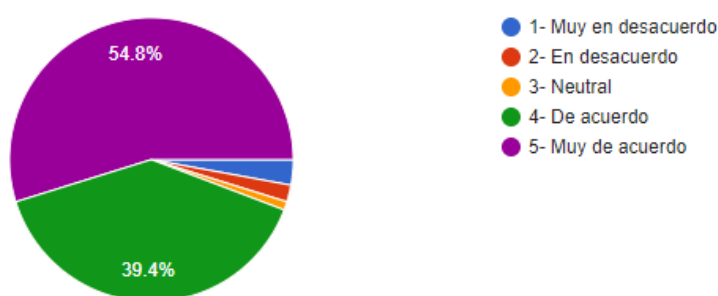
Sistematización de encuesta de satisfacción por pregunta

Seminario Internacional: Agallas de la corona en berries: antecedentes de una enfermedad compleja.

De un total de 104 respuestas se presentan los siguientes porcentajes por pregunta. La planilla de resultados se encuentra al final de resumen por pregunta

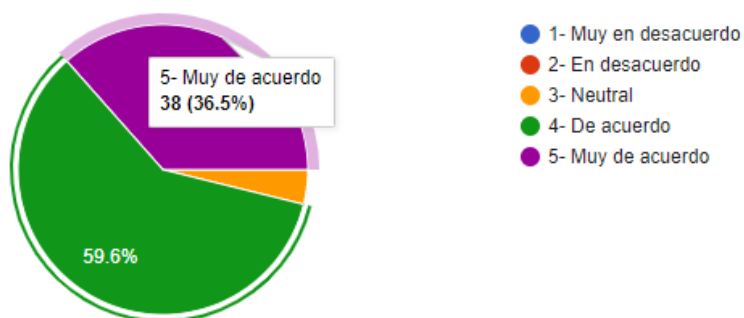
Se ha conseguido alcanzar el objetivo de la consultoría “Difundir conocimientos a productores y viveristas, sobre la diversidad de especies descritas causando tumores en berries, en base a la asesoría experta del doctor Nemanja Kuzmanovic.”.

104 respuestas



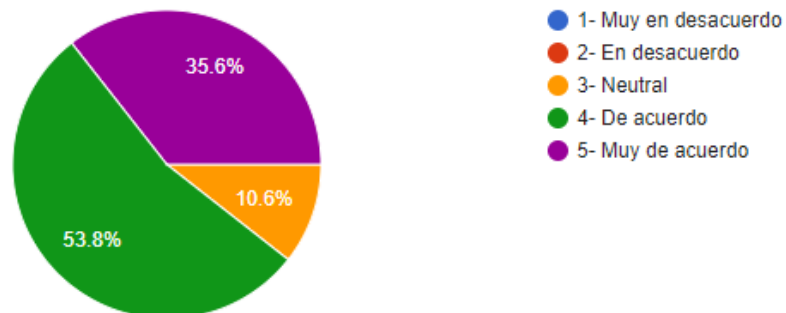
El contenido y las recomendaciones entregadas por los consultores contribuyeron a identificar brechas tecnológicas y productivas, y facilitar la implementación de soluciones innovadoras.

104 respuestas



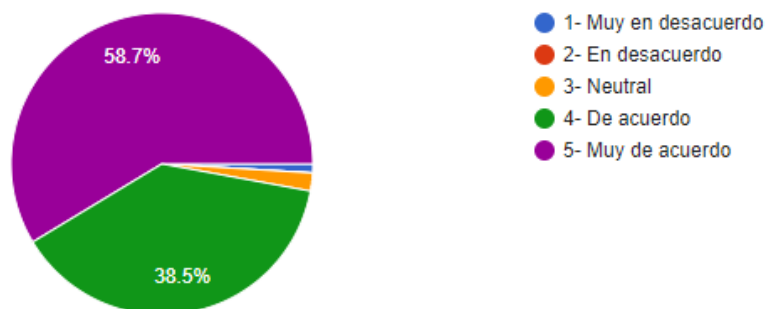
El contenido y las recomendaciones de los consultores tiene potencial real de ser implementado y/o aplicado en su empresa, asociación o institución.

104 respuestas



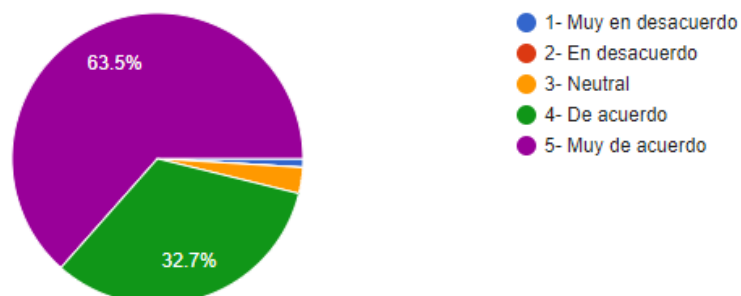
Los consultores poseen las capacidades y experiencia para abordar las temáticas en las actividades realizadas en la consultoría.

104 respuestas



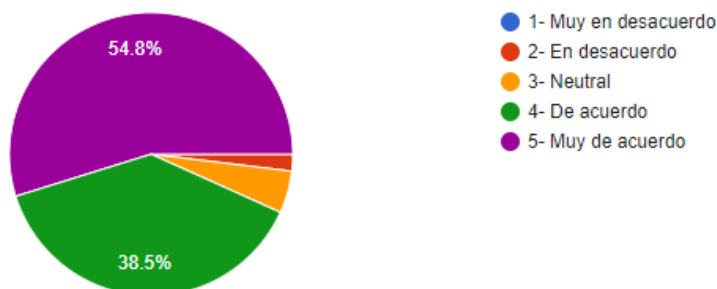
Los consultores fueron claros y precisos en la entrega de contenido y las recomendaciones en las actividades realizadas en la consultoría.

104 respuestas



El programa de actividades de la consultoría se realizó según lo planificado (tiempo, objetivos, contenido, número de actividades).

104 respuestas



Le agradecemos que nos deje sus comentarios, críticas o sugerencias respecto a la consultoría para la innovación.

61 respuestas

1. Excelente las exposiciones....muchas gracias.
2. Muy claras y fundamentadas todas las exposiciones
3. Fue una plática muy productiva, llena de mucha experiencia, gracias.
4. Fue un tema muy importante para mi, cumplió mis expectativa, me gustaría que me invitara a otra sección de la agalla.
5. El problema que nunca pude pasar al idioma español por ende no podría opinar mucho ya que mi inglés no es fluido
6. Un seminario desde mi punto de vista completo ya que reafirma conceptos ya conocidos y entre otros nuevos lo que ayuda a mantener una actualización en el tema felicitaciones a todos
7. Interactuar con experiencias de los participantes que tengan esas vivencias en sus campos propios o del trabajo
8. Excelente presentación muy satifecha
9. Fue una muy buena presebtacion, sobre todo en el ambito de actualizarnos con estos fenomenos que estamos viviendo en la industria
10. Buen seminario, saludos.
11. Muy buena información
12. muy buenas las presentaciones, espero sigan entregando este tipo de estudios para nejrorar la sanidad de nuestros cultivos
13. Interesante el tema, se vio en profundidad, gracias.
14. felicitaciones por la organización de este evento a sido muy util para mi labor de inspección de plantas frutales, gracias
15. Gracias por compartir sus conocimientos, que servirán de mucho para integrar en nuevos proyectos.
16. gracias

17. Creo que la jornada fue muy productiva, pero al contrario de otras veces, empezó mucho mas tarde de lo previsto y eso impidió que pudiera ver la última exposición completa. Fuera de eso, excelentes exposiciones, y ojalá puedan seguir seminarios de temáticas similares.
18. Muy buena la iniciativa!
19. Me parece muy interesante este tipo de actividades y que se repliquen en otros tipo de cultivo como avellanos, espárragos y cerezos
20. muchas gracias por la invitación
21. Muy buena
22. Muy aplicado integrando lo básico con respuestas prácticas
23. Me gusto estuvo interesante
24. Lamentablemente hubo algunas partes que por motivos anexos no pude ver, sin embargo lo que si pude escuchar fue bastante interesante y muy útil.
25. Muy importante la informacion gracias
26. En lo persona creo que la propagación de esta enfermedad parte en los vivero, los cuales no se ve una gran preocupación de parte de estos por evitar esta situación .tampoco se ve que el ente regulador (sag)este muy preocupado de esto
27. La consultoria brindada por los consultores en la charla, fue muy interesante y satisfactoria, junto a las soluciones innovadoras en base a sus experiencias para esta problemática en huerto.
28. Ojalá quedara disponible para poder revisar nuevamente los contenidos
29. Muy buen seminario
30. Se agradece mucho los conocimientos entregados y se solicita seguir realizando estas capacitaciones
31. Mantener estas actividades
32. Que compartan la presentaciones
33. Muy bien planteado el tema, difícil solución a corto plazo
34. Sólo agradecer por la buena idea
35. Excelentes expositores
36. Demasiado largo en tiempo
37. Sigam realizando este tipo de actividad. Muchas gracias.
38. Muchas gracias, importante sería tener disponibles los videos de las capacitaciones.
39. Gracias por lo presentado, me gustaría seguir estando presente en las presentaciones que entregan
40. En lo general felicitaciones; espero que hagan otros eventos tan interesantes como este.
41. Deberian hacerse en diferentes spp y asi poder implementarlo
42. Ha sido un placer atender a este seminario, pensaba que iba a ser menos instructivo y menos científico, por lo que ha sido una sorpresa. Enhorabuena!!
43. sin comentario
44. Felicitaciones por presentar estos temas tan específicos, con experiencias nacionales e internacionales que permiten actualizar conocimientos, para la implementación de nuevas herramientas preventivas y de control
45. De parte del especialista esperaba un poco más de manejo práctico, por momentos la exposición se me hizo demasiado teórica
46. muy interesante temática y buena forma de abordarla. muy satisfecho y agradecido.
47. Por lo que pude ver y escuchar fue una muy buena presentación, lamentablemente no puedo dar una opinión general ya que perdí la conexión varias veces.

48. LOS CONOCIMIENTOS BRINDADOS SON MUY IMPORTANTE
49. Solo agradecer, por compartir sus conocimientos, de forma clara y profunda ,gracias por considerar.
50. Felicitaciones por, la buena idea
51. Darle mayor difusión al evento, muy interesante y útil
52. El seminario ha sido muy interesante y creo que el tema se ha abordado de forma muy clara, aunque me gustaría que pudieramos ampliar conocimientos en las medidas de desinfección del material y del personal... nos mostrasteis materiales de desinfección como lejía, peróxido pero que tiempo deben estar expuestos a estos materiales para su completa desinfección... se me plantean dudas como esta en el proceso de control.
53. es muy interesante los temas de manejo fitosanitario desde la mirada de expertos y terceros fuera de la empresa sobre todo INIA, SAG entro otros.
54. Fue un excelente evento y las conferencias de excelente calidad de información
55. A los que nos cuesta en la parte tecnologica veiamos a un relator que hablaba en ingles y no cachamos nada al final nos dimos cuenta que se podia traducir y como se hacia ,eso ,por ultimo si el relator habla en ingles se podria haber traducido en español ,como en el cine lo digo por los que no pudieron usar el traductor ,me gustaria que se hiciera pero con relator en castellano, eso pero de todas maneras doy las gracia por la invitacion ,saludos paz usted y carmen gloria son unas estupendas relatoras por hay creo deberia ir la cosa,para los que noscuesta ir al alcanse de la negnologia ,hun gran habrazo
56. Me gustó mucho y conocí un tema que me ayudará estar alerta.
57. Los felicito por hacer estas charlas, sigan asi..!!!
58. Muy bien presentado
59. Seguir complementando con mas conocimientos respecto al tema.
60. Estas iniciativas tecnológicas son importantes que se difundan
61. Excelente curso



INFORME CONSULTOR

Nombre de la iniciativa	Asesoría experta para conocer las especies productoras de agallas en berries y las técnicas de detección molecular de <i>Agrobacterium</i> desde tejido vegetal
Código de la iniciativa	COC-2021-0003
Fecha realización consultoría	12 de abril al 30 de julio
Institución ejecutora	Instituto de Investigaciones Agropecuarias
Nombre Coordinador(a)	Paz Antonia Millas Ortiz
Nombre Consultor(a)	Nemanja Kuzmanovic

Antecedents

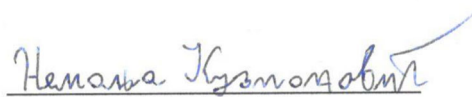
Crown gall in berries, caused by bacteria of the *Agrobacterium* and *Rhizobium* genera, strongly affects berry nurseries, but it is also a serious problem for growers, who often buy infected plants with no visible symptoms. Studies worldwide showed that there are several species of bacteria causing this disease, that were collectively called *Agrobacterium tumefaciens* in the past. In Chile, the bacterial species causing crown gall disease in berries is unknown, due to the lack of studies and adequate techniques for identifying these bacteria. The ability of tumorigenic bacteria to cause tumors is conferred by tumor-inducing (Ti) plasmid, that is transmissible between *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. The pathogenicity of bacteria causing crown gall and detection of Ti plasmid mainly relies on molecular methods. In Chile, there are very few laboratories that perform molecular detection of Ti plasmid. In addition, some of them use obsolete techniques, which do not efficiently detect all species and give inconclusive results in some cases. Dissemination of knowledge about the diversity of tumorigenic bacteria, together with transferring knowledge in molecular detection techniques will enable at least two specialized laboratories to identify all the species present in Chile. Accordingly, this will allow nurseries to diagnose the disease in time and to carry out preventive management measures involving phytosanitary control of plant propagation material. It is crucial to avoid introduction and spread of the pathogen to the new areas by detecting the pathogen in asymptomatic plant material. In this respect, the producers can be provided with a certified plant material.



Recommendations:

In order to establish disease management strategies, it is necessary to identify tumorigenic species occurring on agricultural crops in Chile. Therefore, I recommend performing a study that would involve analysis of various plant hosts showing symptoms of crown gall. Isolation of tumorigenic bacteria should be attempted on several general, as well as semi-selective and/or differential media. Isolated bacteria should be characterized using polyphasic approach, by traditional bacteriological (physiological and biochemical tests, pathogenicity assay), as well as molecular and genomics-based methods (PCR, marker gene sequencing, whole genome sequencing and bioinformatics analyses). The results obtained will give an insight into the diversity of tumorigenic bacteria occurring in Chile and will enable selection and establishment of suitable diagnostic protocols for routine analysis of plant samples (see below).

In order to prevent further spreading of tumorigenic bacteria and their introduction to new areas, I recommend monitoring of the pathogen presence in planting material. In this respect, it is necessary to establish more stringent phytosanitary control of nursery production that would involve observation of disease incidence and laboratory analysis of plants used for propagation and further distribution. Additionally, visual inspection and pathogen detection in imported plant material is required. For this purpose, it is necessary to develop highly sensitive method suitable for pathogen detection in asymptomatic plant material or to evaluate efficiency of already available methods. In my opinion, method of choice for routine analysis of a large number of samples would involve use of highly efficient DNA extraction method followed by real-time PCR. Taken together, selected detection methods should be tested with various reference strains, as well as with tumorigenic bacteria identified in Chile.


NEMANJA KUZMANOVIC
012559533

Traducción del informe técnico del consultor

Antecedentes:

La agalla de la corona en los berries, causada por bacterias de los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*, afecta fuertemente a los viveros de berries, pero también es un problema grave para los productores, que a menudo compran plantas infectadas sin síntomas visibles. Los estudios en todo el mundo mostraron que hay varias especies de bacterias que causan esta enfermedad, que en el pasado se llamaban colectivamente *Agrobacterium tumefaciens*. En Chile, se desconoce la especie bacteriana causante de la agalla de la corona en los berries, debido a la falta de estudios y técnicas adecuadas para identificar estas bacterias. La capacidad de las bacterias tumorigénicas para causar tumores es conferida por el plásmido inductor de tumores (Ti), que es transmisible entre las especies de *Agrobacterium* y *Rhizobium*. La patogenicidad de las bacterias que causan la agalla de la corona y la detección del plásmido Ti se basa principalmente en métodos moleculares. En Chile, hay muy pocos laboratorios que realicen detección molecular del plásmido Ti. Además, algunos de ellos utilizan técnicas obsoletas, que no detectan de manera eficiente todas las especies y dan resultados no concluyentes en algunos casos. La difusión del conocimiento sobre la diversidad de bacterias tumorigénicas, junto con la transferencia de conocimientos en técnicas de detección molecular, permitirá que al menos dos laboratorios especializados identifiquen todas las especies presentes en Chile. En consecuencia, esto permitirá a los viveros diagnosticar la enfermedad a tiempo y realizar medidas de manejo preventivo que involucren el control fitosanitario del material de propagación vegetal. Es fundamental evitar la introducción y propagación del patógeno a las nuevas áreas mediante la detección del patógeno en material vegetal asintomático. A este respecto, se puede proporcionar a los productores un material vegetal certificado.

Recomendaciones:

Para establecer estrategias de manejo de enfermedades, es necesario identificar especies tumorigénicas presentes en cultivos agrícolas en Chile. Por lo tanto, recomiendo realizar un estudio que involucre el análisis de varias plantas hospedantes que muestren síntomas de agallas en la corona. El aislamiento de bacterias tumorigénicas debe intentarse en varios medios generales, así como semiselectivos y / o diferenciales. Las bacterias aisladas deben caracterizarse mediante un enfoque polifásico, mediante métodos bacteriológicos tradicionales (pruebas fisiológicas y bioquímicas, ensayo de patogenicidad), así como métodos moleculares y genómicos (PCR, secuenciación de genes marcadores, secuenciación del genoma completo y análisis bioinformáticos). Los resultados obtenidos darán una idea de la diversidad de bacterias tumorigénicas que ocurren en Chile y permitirán la selección y el establecimiento de protocolos de diagnóstico adecuados para el análisis de rutina de muestras de plantas (ver más abajo).

Para evitar una mayor propagación de bacterias tumorigénicas y su introducción a nuevas áreas, recomiendo monitorear la presencia de patógenos en el material de siembra. A este respecto, es necesario establecer un control fitosanitario más estricto de la producción de viveros que implicaría la observación de la incidencia de enfermedades y el análisis de laboratorio de las plantas utilizadas para la propagación y posterior distribución. Además, se requiere inspección visual y detección de patógenos en material vegetal importado. Para este propósito, es necesario desarrollar un método altamente sensible adecuado para la

detección de patógenos en material vegetal asintomático o para evaluar la eficiencia de los métodos ya disponibles. En mi opinión, el método de elección para el análisis de rutina de una gran cantidad de muestras implicaría el uso de un método de extracción de ADN altamente eficiente seguido de PCR en tiempo real. En conjunto, los métodos de detección seleccionados deben probarse con varias cepas de referencia, así como con bacterias tumorigénicas identificadas en Chile.

SEMINARIO INTERNACIONAL

"Agalla de la corona en berries: antecedentes de una enfermedad compleja"

~~Lunes 21 junio~~ / Desde las 09:15 horas / Plataforma 



INSCRIPCIÓN GRATUITA
www.inia.cl/berriesmaule



"Crown gall of berries: an old, emerging disease"
Agalla de la corona en berries: una antigua enfermedad emergente
Nemanja Kusmanovic. Doctor of Biotechnical Sciences, Consultor Independiente, Serbia



"Detección de especies de Agrobacterium/Rhizobium obtenidas desde agallas de berries en Chile"
Paz Millas Ortiz. Dra. Cs., Fitopatóloga e Investigadora de INIA Quilamapu



"Situación actual y regulaciones del género Agrobacterium en la producción en plantas, materiales de propagación y en huertos comerciales"
Gloria Cuevas. Ingeniera Agrónoma, Mg. Cs. Encargada Laboratorio Fitopatología del SAG, Ñuble

Crown gall of berries: an old, emerging disease

Nemanja Kuzmanović

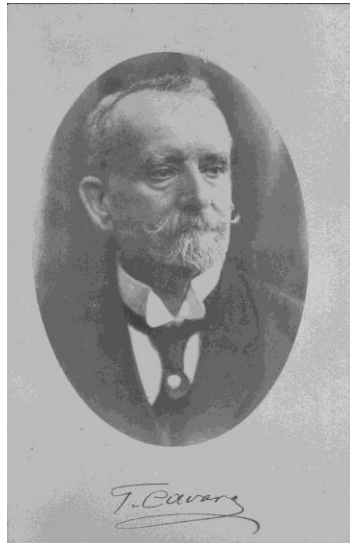
Crown gall disease

- **1853. First written report of crown gall disease**

Fabre, E. and Dunal, F. (1853): Observations sur les maladies régnantes de la vigne. Bull. Soc. Cent. Agric. Dep. Herault. 40, 46.

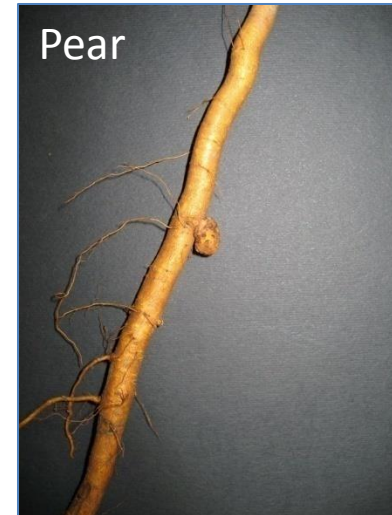
- **1897. F. Cavara identified bacteria, termed *Bacillus ampelopsorae*, as the causal agent of crown gall of grapevine**

Cavara, F. (1897) Tubercolosi della vite. Intorno alla eziologia de alcune malattie di piante coltivate. Stazioni Sperimentali Agrarie Italiane 30, 483–487.



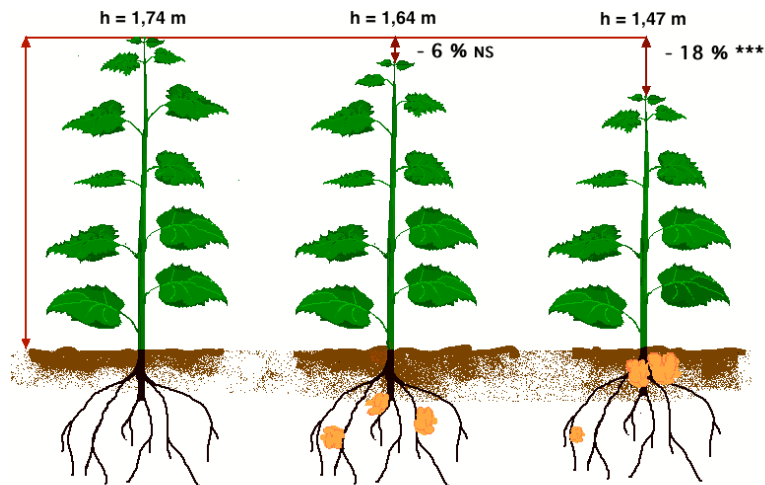
Fridiano Cavara

Symptoms



Economic significance

- Reduces growth, vigor and yield of infected plants
- Severe disease may cause partial or complete death of infected plants
- In some cases, no significant differences between diseased and healthy plants were found



- In USA, annual losses from *Agrobacterium* spp. estimated to several tens of millions of dollars
- High losses occur especially in nurseries

**Tumorigenic *Rhizobiaceae*
species**



**Tumorigenic
agrobacteria**

***Rhizobiaceae* members**

- **Plant pathogens**
 - Crown and cane gall disease
 - Hairy root
- Symbiotic bacteria
- Biological control agents of plant diseases
- Plant-growth promoting bacteria
- Bioremediating bacteria
- Producers of industrially important biomaterials
- Opportunistic human pathogens
- Vectors for plant genetic engineering

Rhizobiaceae members

Diverse bacteria



Plant tumors and hairy-roots
Xylem sap
Soil surrounding infected plants



Root nodules



Soil and rhizosphere
Decaying organic matter
Saprophytes



Sea water



Ditch water



Human-associated
samples



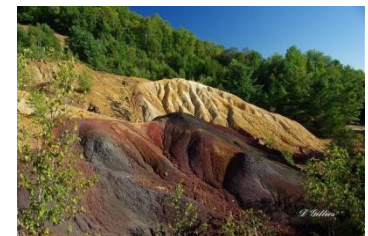
Caves



Endophytes and epiphytes

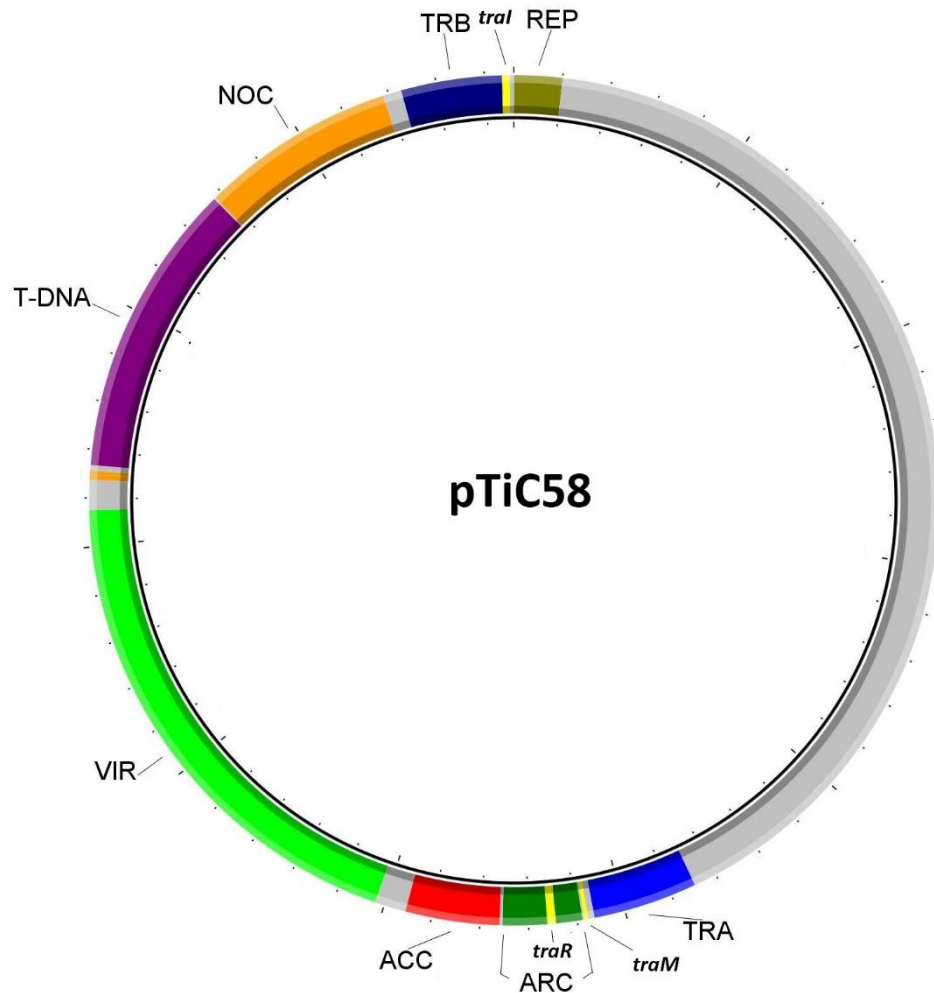


Animal-associated samples



Metal-contaminated
environment

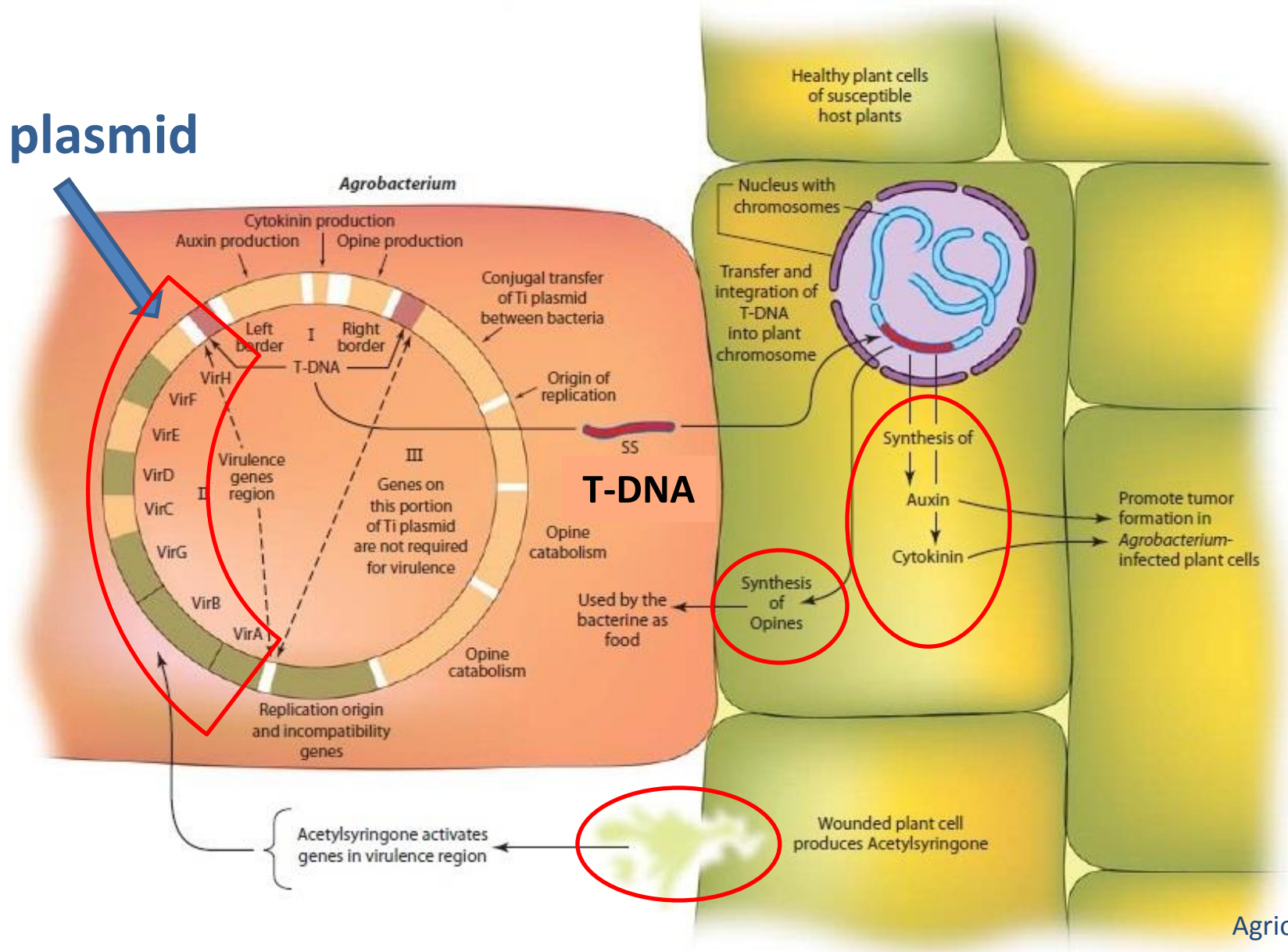
Tumor-inducing (Ti) plasmid



- Transferable/mobile
- Essential for pathogenicity
- Not essential for survival of bacteria

Infection process

Ti plasmid



Epidemiology of crown gall disease

- Tumorigenic agrobacteria can survive in soil, surrounding infected plants or in plant debris remaining in soil
- Tumorigenic agrobacteria do not generally inhabit soils of the natural environment, that is not used for agriculture
- Tumorigenic agrobacteria are almost exclusively associated with infected plants
- Tumorigenic agrobacteria systemically colonize host plant – they inhabit vascular tissue
- Tumorigenic agrobacteria can be latently present in asymptomatic plant material
- **Main means of dissemination: infected plant material**

Taxonomy of agrobacteria

- Extensively debated through the history and is still under discussion
- Dynamic field

Classification based on phytopathogenic features

- *Agrobacterium tumefaciens*
- *Agrobacterium rhizogenes*
- *Agrobacterium radiobacter*
- *Agrobacterium vitis*
- *Agrobacterium rubi*



-
- *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G1 = ***Agrobacterium fabacearum*** (*Agrobacterium tumefaciens*)
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G2 = ***Agrobacterium pusense*** (NT)
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G3
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G4 = ***Agrobacterium radiobacter***
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G5 (NT)
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G6
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G7 = “***Agrobacterium deltaense***”
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G8 = “*Agrobacterium fabrum*”
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G9 = ***Agrobacterium salinitolerans***
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G13 (NT)
 - *Agrobacterium tumefaciens* genomic species G14 = ***Agrobacterium nepotum***
 - ***Agrobacterium arsenijevicii***
 - ***Agrobacterium bohemicum*** (NT)
 - ***Agrobacterium larrymoorei***
 - ***Agrobacterium rubi***
 - ***Agrobacterium rosae***
 - ***Agrobacterium skierniewicense***
 - “***Agrobacterium viscosum***” (NT)
-
- ***Allorhizobium vitis*** (*Agrobacterium vitis*; *Agrobacterium* biovar 3)
 - ***Rhizobium rhizogenes*** (*Agrobacterium rhizogenes*; *Agrobacterium* biovar 2)
 - ***Rhizobium tumorigenes***
-

Why is the taxonomy relevant for nursery growers and farmers?

- Knowing the enemy!
- Epidemiology of the disease
- Disease management - diagnostics!
 - developing new control strategies



Biocontrol

Crown gall and cane gall of berries

- Berries have been identified as natural hosts of tumorigenic agrobacteria
- Early reports on cane gall disease on berries (USA - Bailey, 1895; Sweden – Wulff, 1907)
- *Agrobacterium rubi* (Hildebrand, 1940)
- Crown gall and crown gall of berries have been frequently reported in the last 20 years
- Economical losses varied

Crown gall and cane gall of blackberry-raspberry hybrid in Italy

- Serious epidemic in Italy in 2000 (Weller et al., 2004)
- Blackberry-raspberry (*Rubus occidentalis*-*Rubus idaeus*) hybrid of cv. Lochness
- Tumors on crown of the plants beneath the superficial layer of soil
- The nursery material, imported from France, was planted in soil where no *Rubus* species had previously been cultivated
- *Agrobacterium rhizogenes*/*Rhizobium rhizogenes*/biovar 2



Crown gall of raspberry in Serbia



- Raspberry production and export is of a strategic importance for agriculture in Serbia
- Serbia is one of the world's leading raspberry producers (96,078 t in 2012 [<http://faostat3.fao.org/>]) and exporters

Top producers of raspberries in tons (2019)	
Russian Federation	174,000
Mexico	128,848
Serbia	120,058
United States of America	102,510
Poland	75,660
Source: UN FAOSTAT (http://faostat3.fao.org/)	

Crown gall of raspberry in Serbia



- Crown gall was reported in Serbia before (Arsenijević, 1989)
- *Agrobacterium tumefaciens* (biovar 1) occurring on raspberry plants cv. Villamette collected from plantation in Western Serbia (Milijašević et al., 2007)



Crown gall on raspberry

- Milijašević et al., 2007)

Crown gall of raspberry in Serbia

2011-2013



Cultivars:

- **Polka**
 - **Tulameen**
- Stunted growth
 - Significantly decreased yield
 - Considerable economic losses



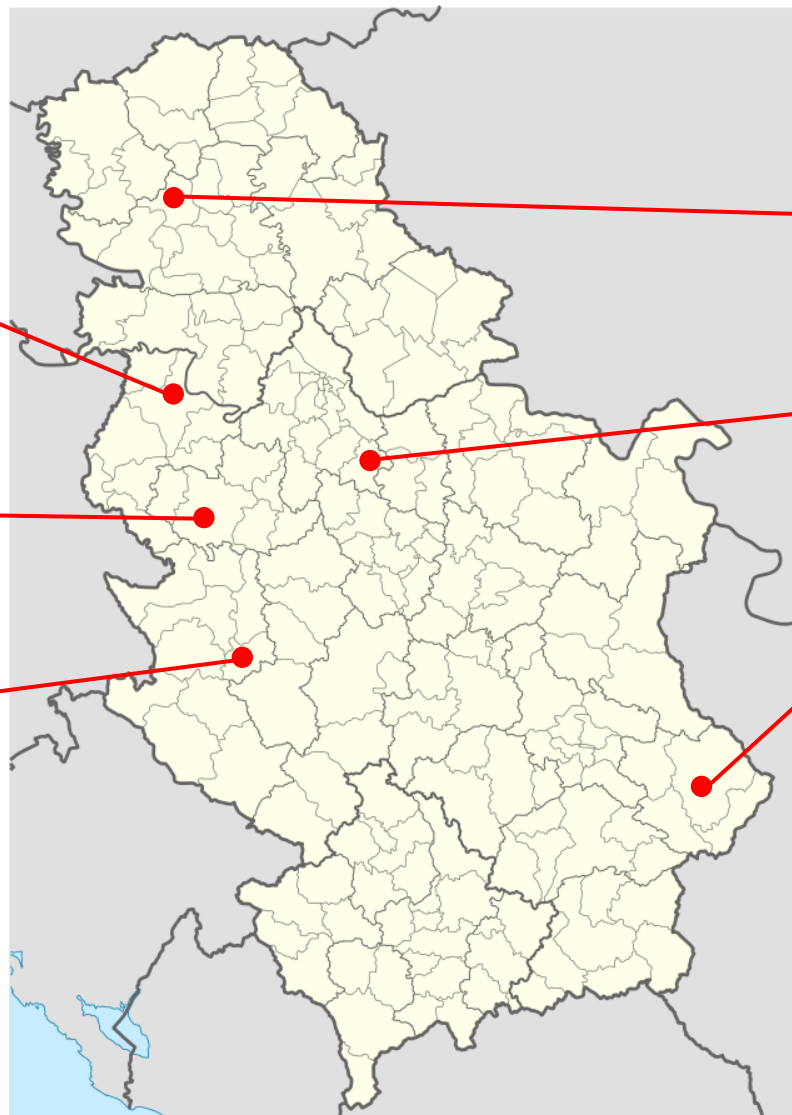
Aim of the study



- to gain an insight into population structure of tumorigenic strains occurring on raspberry in Serbia
- to isolate and identify tumorigenic bacteria from the diseased plants originating from several localities in Serbia, and investigate their pathogenic properties

Insight into population structure of phytopathogenic *Agrobacterium/Rhizobium* spp. may be particularly important for better understanding of epidemiology and ecology of crown gall disease and for developing strategy for rapid, reliable and efficient detection and identification of the pathogen.

Origin of samples (2011-2013.)



Šabac

Vrbas

Valjevo

Mladenovac

Pirot

Arilje



Crown gall of raspberry in Serbia



Plantation



Nursery



Crown gall of raspberry in Serbia

- As a causal agents of crown gall disease in Serbia at least two different *Agrobacterium/Rhizobium* species were found
 - *R. rhizogenes* was prevalent species isolated from raspberry tumors
 - *A. tumefaciens* genomospecies G8
 - New *Agrobacterium* species



Prof. Momčilo
Arsenijević

***Agrobacterium arsenijevicii* sp. nov.**

Summary of results and conclusions



- At least two different *Agrobacterium/Rhizobium* species caused raspberry crown gall disease in Serbia
 - *R. rhizogenes* was prevalent species isolated from raspberry tumors (12 strains)
 - *A. tumefaciens* genomospecies G8 (1 strain)
 - **New bacterial species – *Agrobacterium arsenijevicii***



Complexity of population structure of tumorigenic bacteria associated with crown gall disease of raspberry

- The presented data also highlight the importance of crown gall bacteria on raspberry and contribute to taxonomic studies of agrobacteria.

Cane gall of thornless blackberry in Serbia

- Two localities in western Serbia
- Recurrent outbreaks
- Not lethal
- No significant losses in yield



Cane gall disease of *Rubus* spp.
(Hildebrand, 1940)

Agrobacterium rubi



Cane gall of thornless blackberry in Serbia

- New tumorigenic bacterial species discovered

Rhizobium tumorigenes

- Different than all tumorigenic agrobacteria discovered so far
- Epidemiology of cane gall caused by *R. tumorigenes*?
- Is it systemic in infected plants?
- Does it survive in soil?

Distribution of the novel pathogen („tumorigenes“ group)

- Blackberry in Serbia
- Rhododendron in Germany
- **Blueberry?**



Crown gall is one of the most important bacterial diseases in blueberry production!

***Rhizobium tumorigenes* on blueberry in Germany?**

- Two plantations in Northern Germany
- Cultivars – Duke, Draper
- Causal agent not isolated
- *Rhizobium tumorigenes*-like bacteria detected in tumor tissue by means of molecular methods
- Plant material unavailable!

Crown gall of blueberry in Argentina

- Investigation performed in Argentina, 2006-2008 (Allipi et al., 2012)
- Blueberry plants originating from nurseries and commercial farms
- Tumors at the base of the shoot or on the root
- *Agrobacterium tumefaciens* (biovar 1), *Agrobacterium rhizogenes* (biovar 2) and *Agrobacterium rubi*

Crown gall of blueberry in Poland

Pulawska and Kuzmanovic, 2018

- Three types of symptoms were recorded
- Pathogen could not be identified!



Crown gall of blueberry in Serbia

- Several localities
- Young plantations (1-4 years old)
- Several cultivars (Duke, Hannah's Choice)
- Imported plant material



- In 2017, a severe outbreak of stem gall on stems of mature 'Draper' blueberry plants was observed in several fields in Oregon
- Classical isolation of the pathogen was unsuccessful
- Tissue culture to recover tumorigenic strains
- Pathogen similar to *Rhizobium tumorigenes* was identified



Control of crown gall disease

The use of healthy planting material in areas with no history of the crown gall represents the crucial measure of disease management.

- Production of healthy plant material
- Phytosanitary control of mother plants used for propagation in nurseries
- Control of imported plant material
- Growing resistant cultivars?

Control of crown gall disease

- **No chemical control measures available!**
- **Removing infected plants**
- **Crop rotation**
- **Re-planting?**



Control of crown gall disease

- **Analysis of soil before establishing plantation**



Control of crown gall disease

Biological control

R. rhizogenes, strain K84

R. rhizogenes, strain K1026



Detección de especies de Agrobacterium/Rhizobium desde agallas en berries en Chile



pmillas@inia.cl

25 junio 2021

Detección de especies de *Agrobacterium/Rhizobium* desde agallas en berries en Chile

- **Es importante esta la enfermedad en berries?**
- **Cuáles son las especies causantes de agallas en berries?**
- **Qué podemos hacer para manejar la enfermedad?**
- **Investigación futura**



Importancia de la enfermedad en berries

Viveros: Pérdida de plantas

Productores: Pérdida de rendimientos



Importancia es la enfermedad en berries

En los últimos años ha habido un aumento de solicitud de diagnósticos por síntomas de tumores en berries

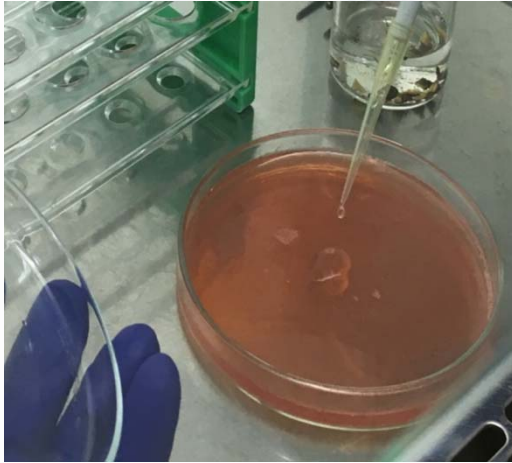


El uso de fitohormonas para estimular el crecimiento generan sobrecrecimientos similares.

Cómo los diferenciamos?

Diagnóstico

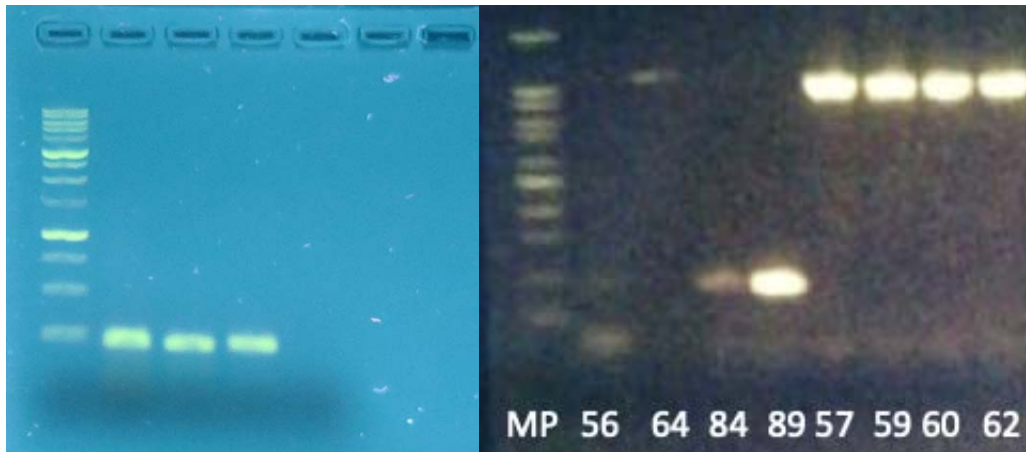
Microbiológico



Medios:

- Selectivos
- Semi-selectivos

Molecular



PCR

- Plásmido
- Biovares

Especies causantes de agallas en berries

Agrobacterium es un género más importante, pero hay especies dentro de los géneros *Allorhizobium* y *Rhizobium* que también son causantes agallas.



Taxonomía



La taxonomía de *Agrobacterium* ha cambiado constantemente durante el último siglo.

Taxonomía inicial en base a la sintomatología

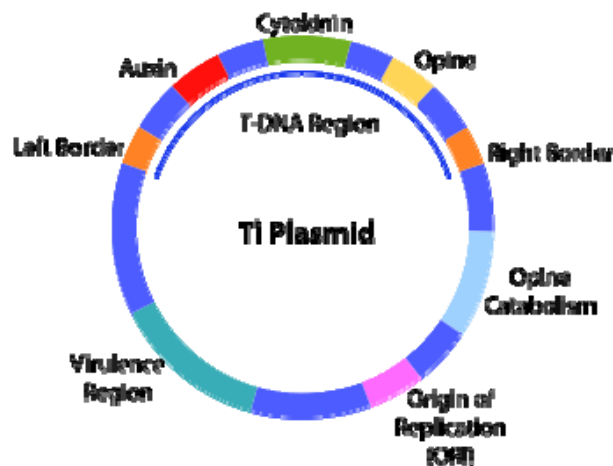
A. tumefaciens → Tumores

A. rhizogenes → Proliferación raíces

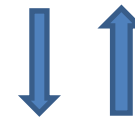
A. radiobacter → No patógenicas

Patogenicidad asociada al plásmido Ti

Conjugación



Especies no patógenicas



Especies patógenicas

Taxonomía



Especies válidamente descritas:

- *Agrobacterium arsenijevicii*
- *Agrobacterium larrymoorei*
- *Agrobacterium nepotum*
- *Agrobacterium pusense*
- *Agrobacterium radiobacter*
- *Agrobacterium rubi*
- *Agrobacterium skierniewicense*

A. vitis → *Allorhizobium vitis*
A. rhizogenes → *Rhizobium rhizogenes*

Además, hay al menos 9 especies genómicas más dentro del *Agrobacterium* biovar 1 de (G1, G3, G5, G6, G7, G9, G13, G8 [*“Agrobacterium fabrum”*] y G15 [*“Agrobacterium viscosum”*]), las que no han sido formalmente nombradas.

Especies causantes de agallas en berries en Chile

Reportes oficiales

Agrobacterium tumefaciens

Agrobacterium rubi

ARÁNDANOS

Vaccinium ashei Reade, *V. corymbosum* L.,
V. macrocarpon Ait., *V. vitis-idaea* L., *Vaccinium* spp.



BACTERIAS

Agrobacterium tumefaciens (Smith y Town.) Conn Guerrero, 1988, 1991; Latorre, 1992; Hepp, 1994b;
Agallas del cuello Montealegre, 1996a; Cisternas y France, 2009.

FRAMBUESO

Rubus idaeus L.



BACTERIAS

Agrobacterium tumefaciens (Smith y Town.) Conn Latorre, 1982d; Guerrero, 1986; Auger, 1988; Latorre,
Agallas del cuello y raíces 1988a, 1992; Hepp, 1994a; Montealegre, 1996a;
Cisternas et al., 2000; Vega, 2001; Vega et al., 2002;
Torres, 2006b; Vega, 2006.

Agrobacterium rubi (Hildebrand) Starr y Weiss Vega et al., 2002.
Agallas de la caña



Especies causantes de agallas en berries en Chile

Reportes oficiales

Agrobacterium rhizogenes (*Rhizobium rhizogenes*)

MANZANO

Malus x domestica Borkh.



BACTERIAS

Agrobacterium rhizogenes (Riker *et al.*) Conn
Raíces en cabellera, proliferación de raíces

Latorre, 1982d, 1985b, 1987, 1988, 1992; Montealegre, 1995, 1996a.

Agrobacterium tumefaciens (Smith y Town.) Conn
Agallas del cuello

Pinto de Torres y English, 1972; Latorre, 1987, 1988a, 1992; Pinto de Torres *et al.* 1994; Montealegre, 1996a; Alvarez *et al.*, 2004.

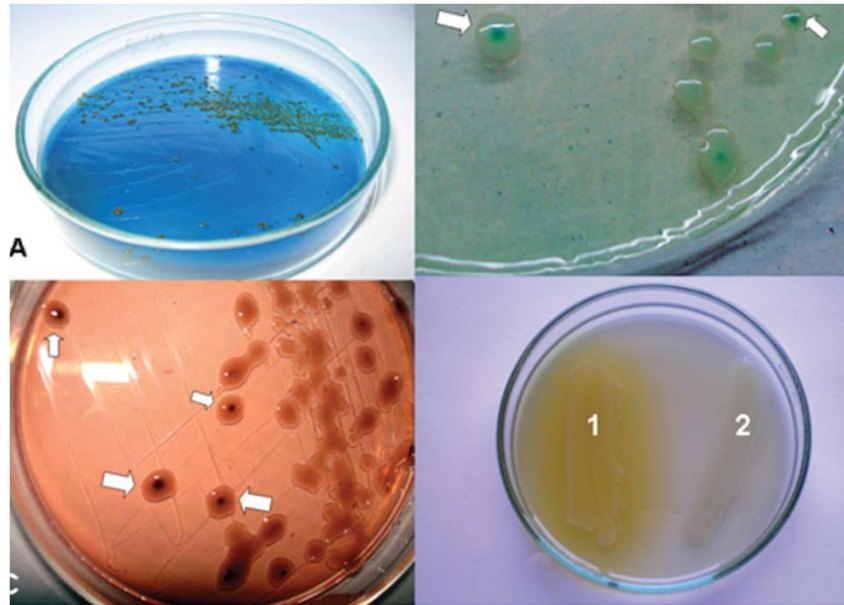


Diversidad de especies



En Argentina, se ha estudiado la diversidad de especies de *Agrobacterium* que afectan a arándano.

- *A. rubi*
- *Agrobacterium* bv 1 (*A. tumefaciens*)
- *Agrobacterium* bv 2 (*Rhizobium rhizogenes*)



Alippi *et al.* 2011

Cuáles son las especies causantes de agallas en berries?

A nivel mundial esta enfermedad no sólo es causada por especies de *Agrobacterium* como se pensaba en el pasado.

A Novel Group of *Rhizobium tumorigenes*-Like Agrobacteria Associated with Crown Gall Disease of Rhododendron and Blueberry

Nemanja Kuzmanović✉, Patric Behrens, Elke Idczak, Stefan Wagner, Monika Götz, Cathrin Spröer
, Boyke Bunk, Jörg Overmann, and Kornelia Smalla✉

- En Chile se desconoce si hay otras especies causantes de esta enfermedad en berries.
- Falta de estudios con técnicas adecuadas de identificación

Estudio determinación de especies

Tesis de grado

Nº ingreso	Código Banco	Hospedero	Variedad	Edad	F. ingreso	Localidad
4732	Fit-85	Cerezo	Regina L/Gisela 6	5 meses	13-08-2018	Pasaje San José Lote 3-Yungay
4758	Fit-56	Arándano	Duke	1 año	31-08-2018	San Carlos
4676a	Fit-84	Arándano	BlueRibbon		03-07-2018	Villarrica
4678		Cerezo	Gisela 6	2 años	20-07-2018	
4780	Fit-86	Cerezo	Santina/Colt	4 años	16-10-2018	Sta Cruz de Cuca
4824	Fit- 57	Avellano Europeo	Injerto			San Gregorio
4917b	Fit-58	Frambuesa	Heritage	2 años	10-01-2019	Sector La Palma, Km 20, Coihueco
4982	Fit-87	Arándano	Blueribbon		14-01-2019	Molina
4983	Fit-59	Arándano	Duke		14-01-2019	Molina
5050 corona	Fit-88	Frambuesa			20-03-2019	San Carlos
5050 raíz	Fit-60	Frambuesa			20-03-2019	San Carlos
5052 campo	Fit-61	Arándano	TopShell		29-03-2019	San Adolfo de Romeral
5053 vivero	Fit-96	Arándano	TopShell		29-03-2019	San Adolfo de Romeral
5058	Fit-62	Arándano	TopShell	14 meses	31-03-2019	Osorno
5076	Fit_97	Arándano	BlueRibbon	5 meses	14-04-2019	Osorno
5096	Fit-64	Arándano				Valparaíso
Vitis 1	Fit-65	Vid	Zinfandel		12-02-2019	Cauquenes
4934	Fit-91	Frambuesa		3 años	18-01-2019	
5084	Fit-63	Arándano	Duke		25-04-2019	San Carlos
5132	Fit_107	Arándano	TopShell	2 años	13-06-2019	Estación Yumbel
5134	Fit-90	Arándano	BlueRibbon		14-06-2019	Coihueco
5156	Fit-92	Arándano	Duke		01-08-2019	El Carmen- Retiro
5174	Fit-99	Vid			29-08-2019	
98	Fit-98	Encino				
5069	Fit-89	Arándano	BlueRibbon	1 año	11-04-2019	Coihueco

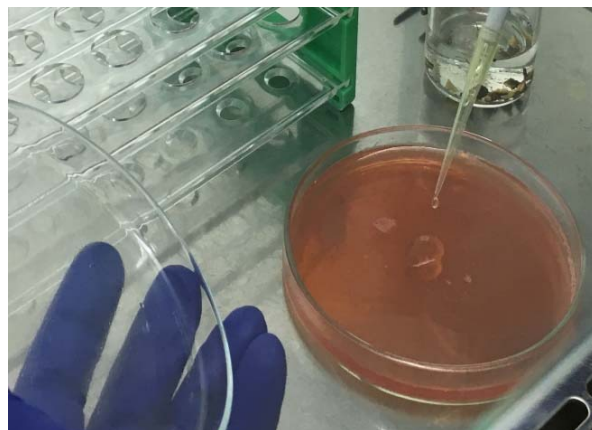
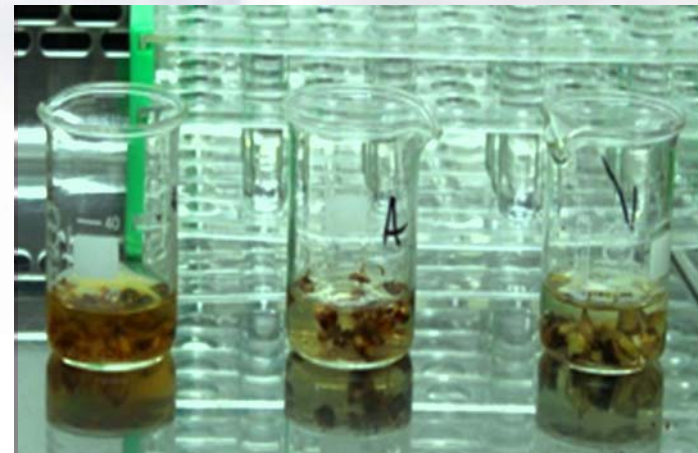


Estudio determinación de especies



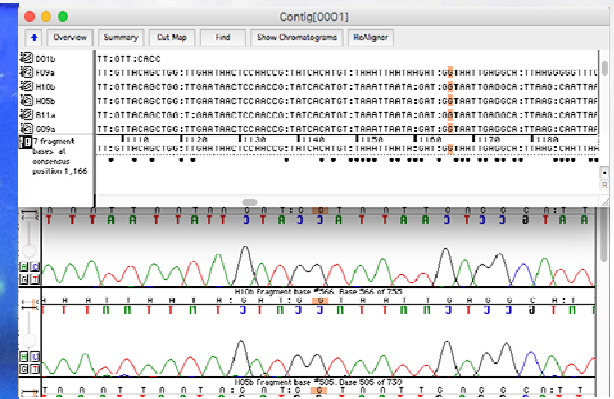
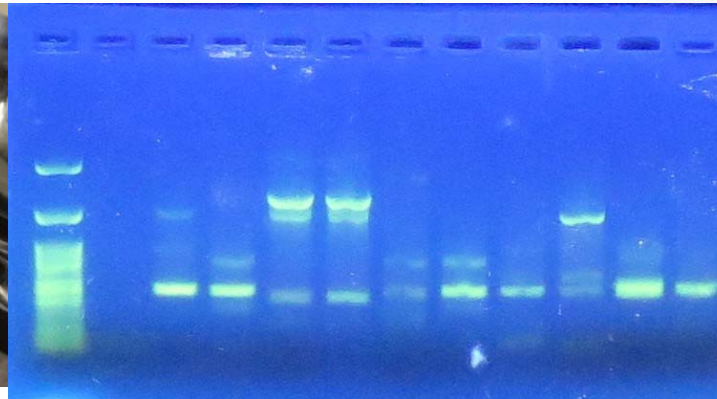
Tesis de grado

Metodología





Identificación molecular



Pruebas de patogenicidad

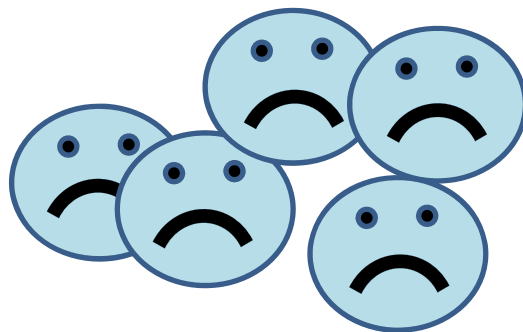


Manejo de la enfermedad

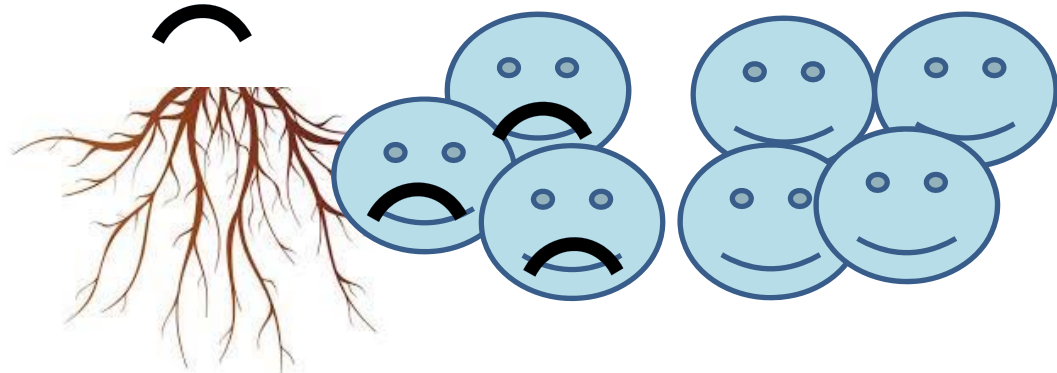


Control es sólo preventivo

- Utilizar sustratos fumigados en las camas de propagación
- Eliminar plantas que presenten agallas
- Evitar el daño de las raíces, por insectos o al trasplantar
- Uso de antibióticos
- Desinfectar materiales (macetas, herramientas, agua, etc)
- Sumergir las raíces en una solución de *Agrobacterium radiobacter*



Agrobacterium sp.



A. radiobacter K-84

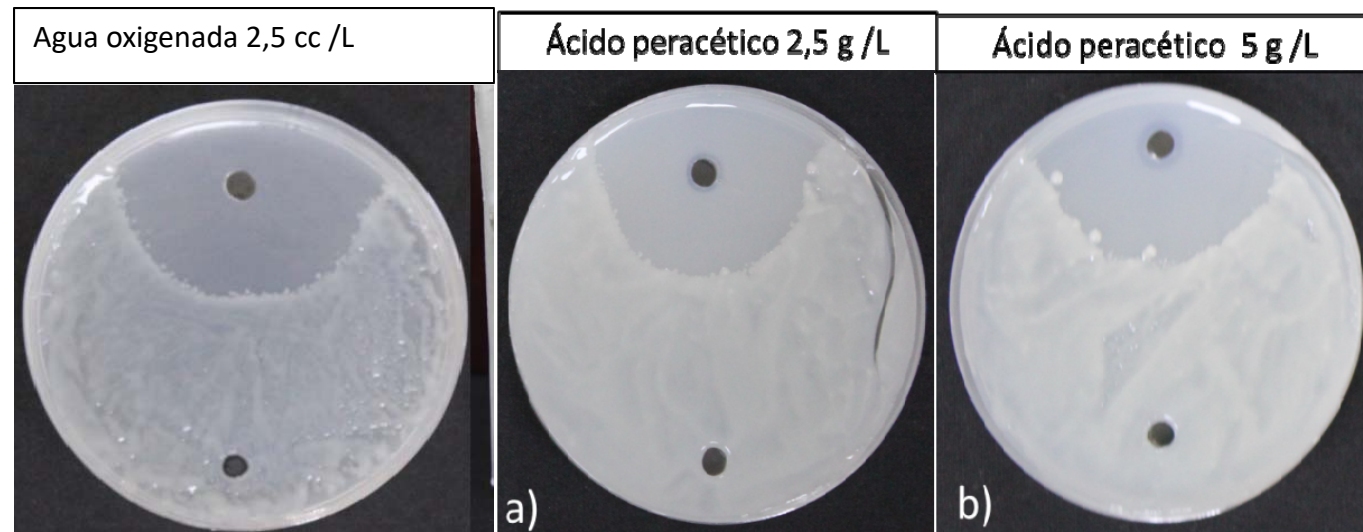
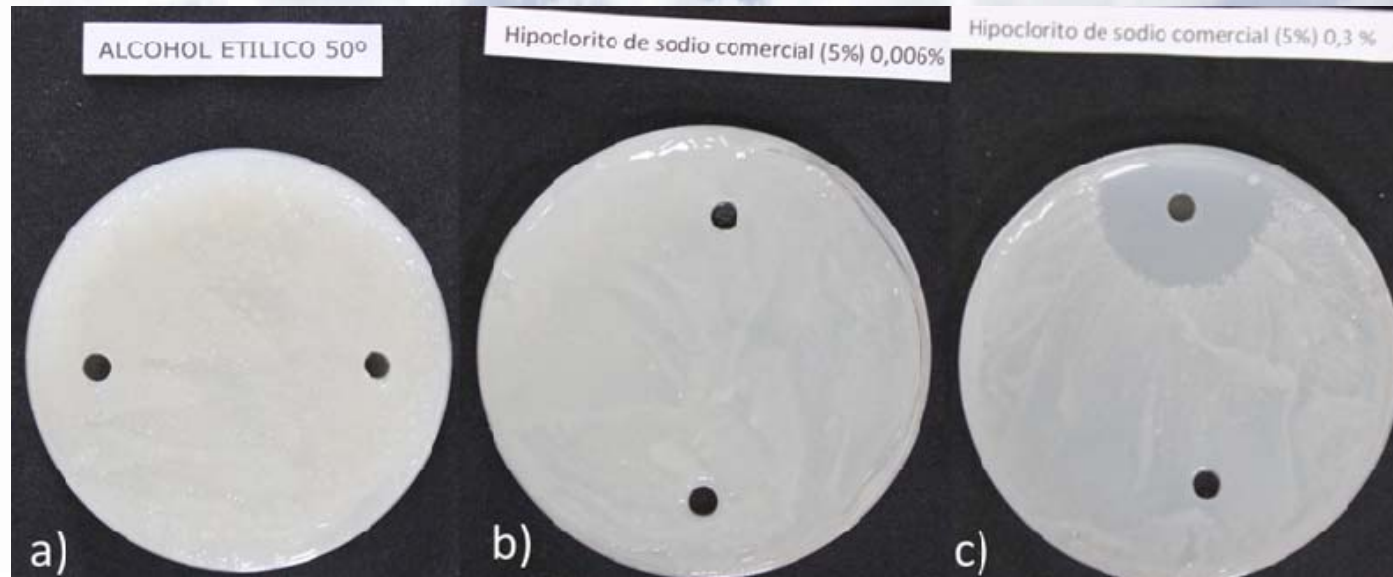
Evaluación efecto antimicrobiano

Antibiograma en medio sólido:

Se sembró 100 μl de una solución de 1×10^7 , de *Agrobacterium* sp. En cada placa se realizaron dos pocillos con un sacabocados de 1 mm. Control y producto (50 μL) Las placas fueron incubadas a 30 °C por 24 h y luego de ese periodo se midieron los radios de inhibición generados.



Evaluación efecto antimicrobiano

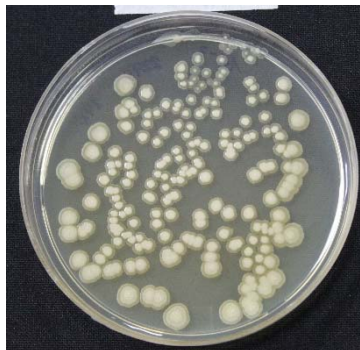


Evaluación efecto antimicrobiano

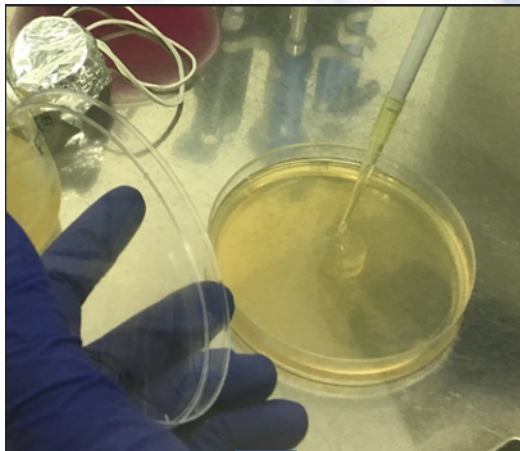
Antibiograma en medio sólido (radio de inhibición promedio mm) generado por distintos productos y dosis			
Producto	Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3
Ácido periacético	15 mm	20 mm	-
Sulfato de Gentamicina Clorhidrato de Oxitetraciclina	20 mm	18 mm	18 mm
Alcohol etílico	Sin control	-	-
Agua oxigenada	20 mm	-	-
Hipoclorito de Sodio dosis comercial (5%)	Sin control	15 mm	-
Sesquisulfato de estreptomicina Clorhidrato de oxitetraciclina	15 mm	15 mm	-

Selección de biocontroladores

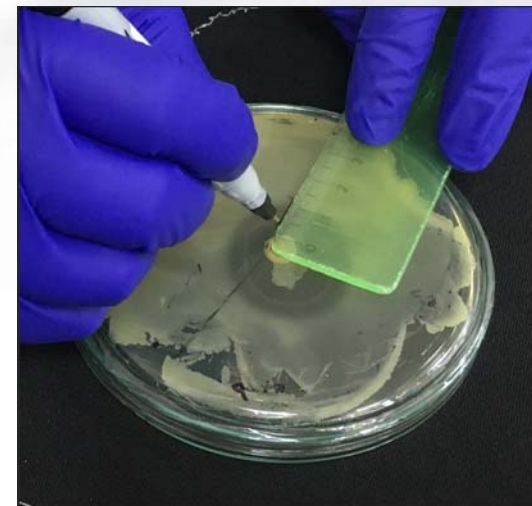
Colección de *Bacillus* conservada en el Banco de Recursos Genéticos Microbianos



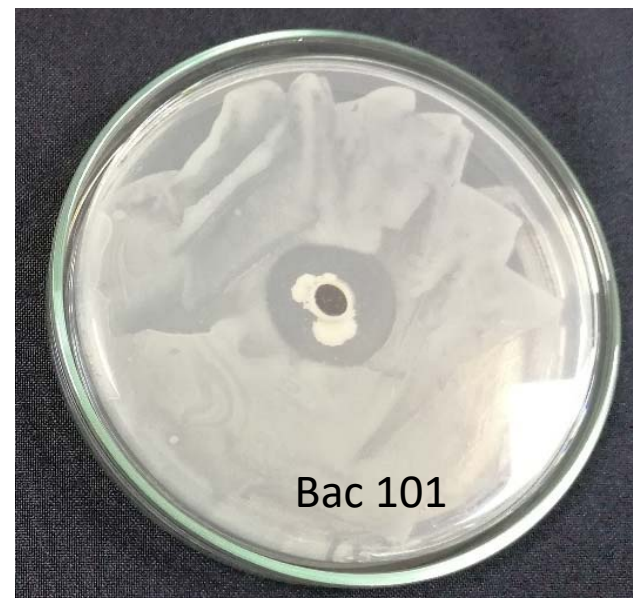
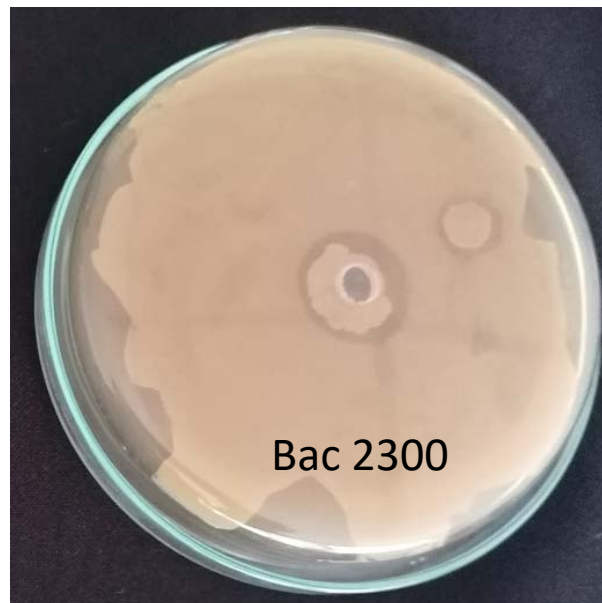
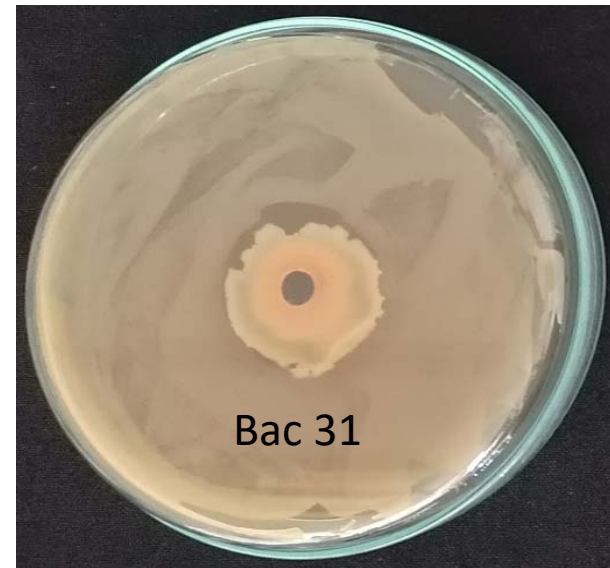
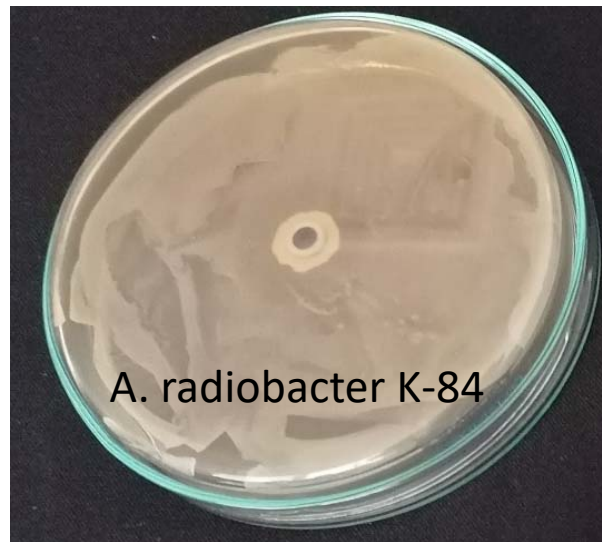
Selección de biocontroladores



Incubación



Selección de biocontroladores



Selección de biocontroladores

Trabajo a futuro





SEMANA DE LA SANIDAD VEGETAL Y MEDIO AMBIENTE 2021

Innovaciones para una agricultura sostenible



del 27 septiembre
al 1 de octubre



zoom

INSCRIPCIÓN GRATUITA



Gracias por su atención!



pmillas@inia.cl





Situación actual y regulaciones del género *Agrobacterium* en la producción en plantas, materiales de propagación y en huertos comerciales.

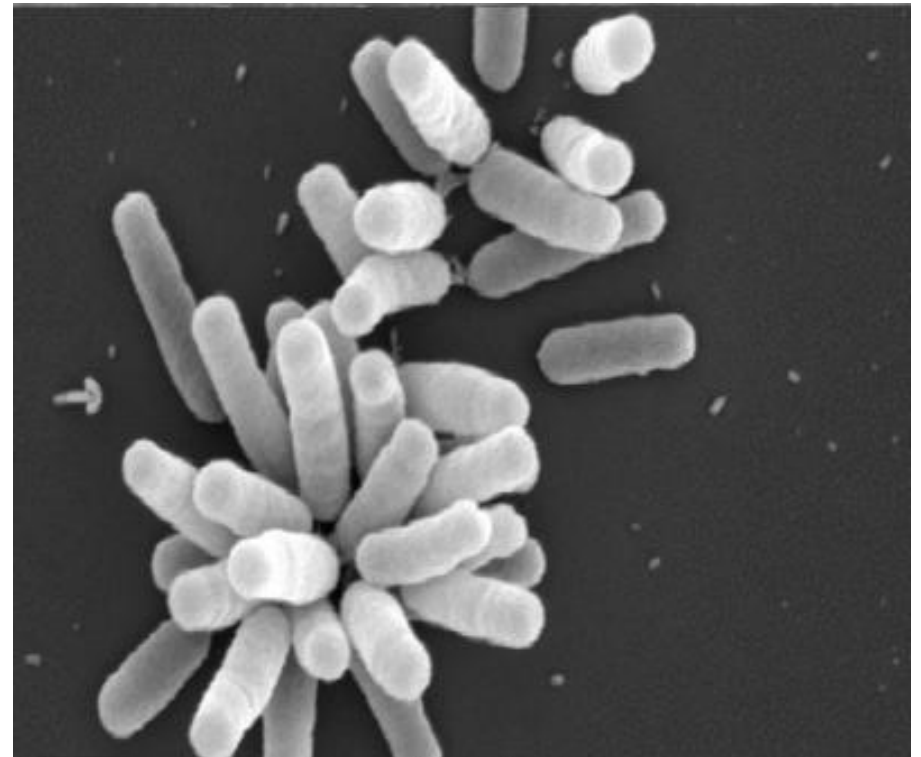


Fuente: Siva Sabaratnam, BCAGRI

Gloria Cuevas Cerda
Encargada Lab. Fitopatología
SAG Ñuble

Agrobacterium

- Es una agrobacteria habitante natural del suelo
- Saprofitas y/o fitopatógenas
- En el mundo existen más de 600 especies de plantas susceptibles a la enfermedad, ubicadas dentro de 90 familias de dicotiledóneas que incluyen cultivos de importancia económica como frutales, hortícolas, industriales, ornamentales y forestales.





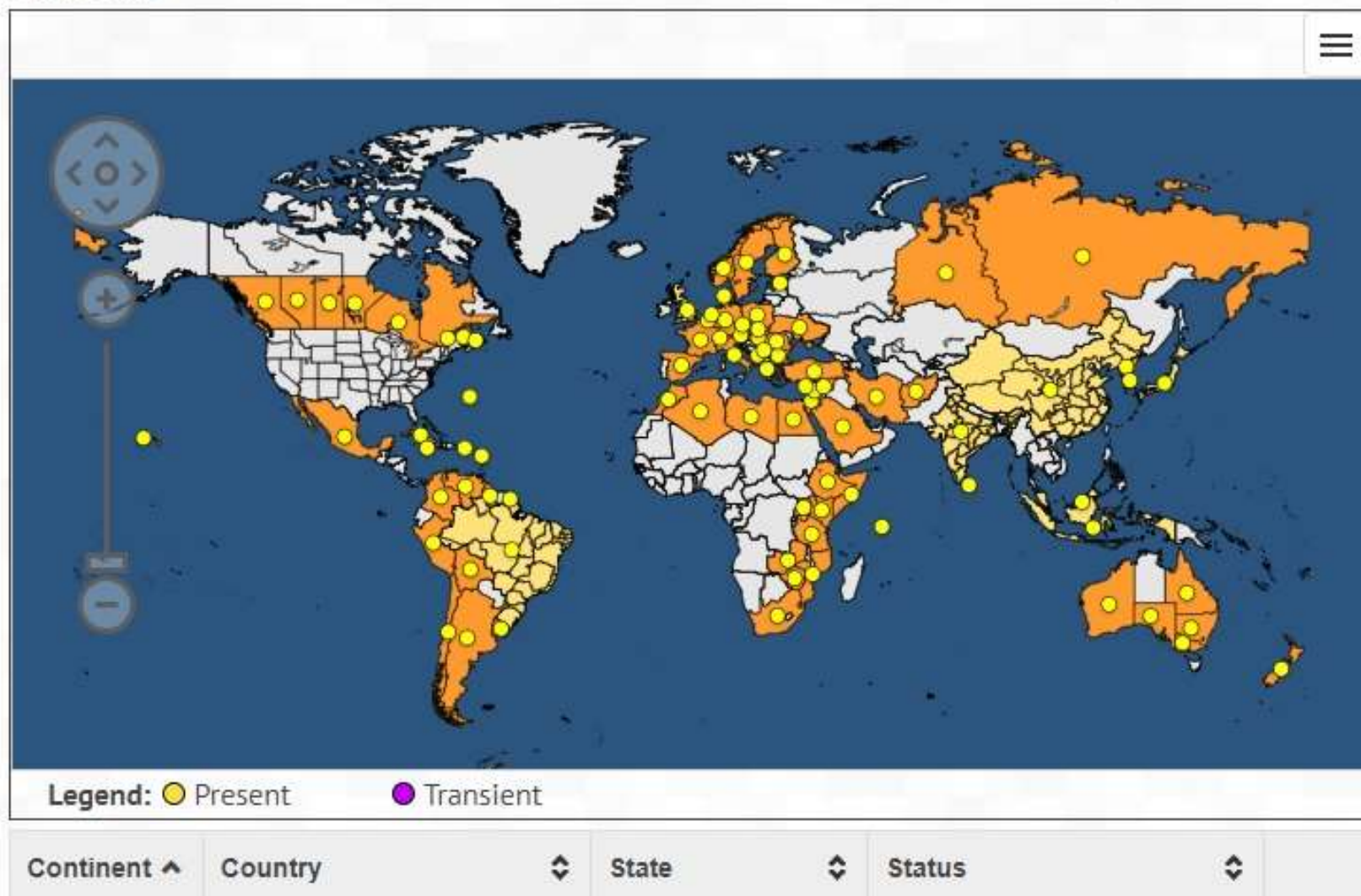
- Capaces de inducir agallas en cuello, corona, aéreas, plásmido Ti (tumor-inducing) o proliferación de raíces en cabellera, o Ri (root-inducing).
- La bacteria solo ingresa por heridas a las plantas.
- Pueden transferir de forma horizontal el ADN (diversidad), por lo cual bacterias patógenas se pueden convertir en saprobias y viceversa.
- Dentro del Genero la mas conocida es *Agrobacterium tumefaciens*, actualmente denominada *Rhizobium radiobacter*.
- Nombre común: agalla de la corona.



Distribución de *Agrobacterium tumefaciens*

Distribution

Last updated: 2016-08-03



Fuente: EPPO, 2021

Categorización según la EPPO de *A. tumefaciens*

The screenshot shows the EPPO Global Database interface. The header includes the EPPO logo, a search bar with the text "Search by name or EPPO Code...", and links for "Login" and "Register". The main navigation bar contains links for "Home", "Standards", "Photos", "Reporting Service", "Explore by", "EPPO GD Desktop", and "Download user guide".

The main content area displays the title "Agrobacterium tumefaciens (AGRBTU)" with social media icons. A left sidebar contains a "MENU" with links to "Overview", "Distribution", "Host plants", "Categorization" (highlighted), and "Documents", as well as "TOOLS" with buttons for "Save list as excel file" and "Save list as csv file".

The "Categorization" section features a table with the following columns: "Country/NPPO", "List", "Year addition", "Year transfer", and "Year deletion". The table is organized by region, with rows for Africa, Asia, and RPP0/EU.

Country/NPPO	List	Year addition	Year transfer	Year deletion
Africa				
Egypt	Regulated non-quarantine pest	2018		
Asia				
Bahrain	A2 list	2003		
Jordan	A2 list	2013		
RPP0/EU				
EU	RNQP (Annex IV)	2019		

The footer contains links for "Contact EPPO", "EPPO Website", "EPPO Data Services", "EPPO Codes categories", and "Sitemap". A small text at the bottom mentions "European Union funding: EPPO has been awarded EU grant agreements for the further development of the EPPO Code system (agreement nb: EPPO 2021)".

Fuente: EPPO, 2021



El SAG clasifica como plagas cuarentenarias no presente en el país, a todos aquellos organismos capaces de producir daños de importancia económica y/o ambiental y que no han sido detectados en el territorio nacional (insular y continental).

Chile **No** tiene especies del género *Agrobacterium* en el listado de Plagas Cuarentenarias.

Agrobacterium se encuentra dentro de las plagas reglamentadas en Vivero.



Plagas Reglamentadas en Viveros frutales

- Son aquellas plagas no cuarentenarias que están sometidas a una reglamentación oficial, por material de propagación y tener importancia económica en los viveros y en los huertos en donde se establecerán esas plantas, afectando el uso para el cual han sido producidas. Su control es obligatorio. Se incluyen las plagas cuarentenarias bajo control oficial.
- La Ley Orgánica del Servicio Agrícola y Ganadero; N° 18.755, en el Decreto Ley N° 3.557 de 1980, sobre Protección Agrícola; y las Resoluciones N° 981 del 2011, N° 2.151 del 2013, N° 2.152 del 2013, todas del Servicio Agrícola y Ganadero.



Principal Objetivo de la Fiscalización:
Conocer el estado sanitario de sus plantas y venderlas libres de las plagas reglamentadas.

- Revise periódicamente la condición de sus plantas y adopte medidas preventivas.
- El SAG hará fiscalizaciones durante el desarrollo de las plantas y tomará muestras para verificar la ausencia de las plagas.
- Ante la presencia de plagas reglamentadas, siga las indicaciones del SAG. Es posible que las partidas queden retenidas y con prohibición de venta hasta que se demuestre que las plagas detectadas fueron controladas.



Dentro del genero *Agrobacterium*, la especie regulada en viveros de berries es *A. tumefaciens*

Plagas Reglamentadas en Viveros Frutales

ESPECIE

Bacteria

Arándano

Agrobacterium tumefaciens

Frambueso

Agrobacterium tumefaciens

Mora Híbrida

Agrobacterium tumefaciens

Zarza parrilla y Grosella

Agrobacterium tumefaciens

Sinonimias:

Agrobacterium radiobacter (Beijerinck & van Delden 1902) Conn 1942

Agrobacterium radiobacter subsp. *tumefaciens* (Smith & Townsend) De Ley et al. 1966

Rhizobium radiobacter (Beijerinck & van Delden 1902) Young et al. 2001



Fuente: G. Cuevas, SAG



Fuente: G. Cuevas, SAG



Situación actual

Agrobacterium detectados en Chile en Viveros de berries

Agrobacterium tumefaciens: Frambuesa, Arándano

Agrobacterium rhizogenes : Arándano

Agrobacterium sp.

Agrobacterium rubi detectado solo 1 vez 2002.

Durante los últimos años con el aumento de huertos de frutales menores y la mayor necesidad de plantas, también ha incrementado la sintomatología asociada a *Agrobacterium*. Por este motivo es relevante poner énfasis en como prevenir los problemas.



Situación en Viveros y Huertos

- Detectar la presencia de *Agrobacterium* es difícil, los síntomas en un comienzo no son visibles y la única forma de poder detectar que existe un problema es cuando se produce en el transplante.
- Los síntomas aéreos no son específicos, pueden confundirse con deficiencias nutricionales o con daños por enfermedades radicales provocadas por hongos del suelo.



Las plantas afectadas presentan un menor desarrollo, con hojas más pequeñas y cloróticas y una mayor susceptibilidad a otros patógenos y a condiciones ambientales adversas, especialmente a las bajas temperaturas en invierno.



Fuente W. Bertram, Cornell



- Las infecciones latentes son asintomáticas y generalmente ocurren cuando los suelos están fríos. Las agallas se desarrollan en la herida infectada la temporada siguiente.
- Las agallas pequeñas requieren un diagnóstico cuidadoso porque pueden confundirse con un exceso de callos en la herida.



- Las células de *Agrobacterium* no patógenas suelen prevalecer en estos mismos tejidos y pueden alcanzar grandes poblaciones. Eso dificulta el diagnóstico, especialmente en agallas en manzanas, arándanos y vides, donde los **no patógenos** pueden constituir más del 99% de la población de *Agrobacterium*.
- En estos últimos años se ha producido un aumento de problemas en los viveros especialmente de arándano, donde se puede observar una especie de agalla justo en el lugar de formación del callo, pero estas no son patógenas.



Agrobacterium rhizogenes nombre actual *Rhizobium rhizogenes*

Sinonimia / Otros nombres científicos / Acrónimos:

Agrobacterium biovar 2, Agrobacterium rhizogenes, Agrobacterium tumefaciens biotype 2, Agrobacterium tumefaciens biovar 2, Bacterium rhizogenes, Erwinia rhizogenes, Phytomonas rhizogenes, Pseudomonas rhizogenes

Distribución:

- *Presente en algunos estados de Estados Unidos*
- *Japón*
- *Bulgaria*
- *Francia*
- *Italia*
- *Algunas partes de Australia*
- *En Chile*





Huéspedes: Manzano, Rubus, Prunus y Vaccinum

R. rhizogenes es una bacteria que habita el suelo.

Crecimiento óptimo, ocurre a pH superior a 4 y temperatura entre 20 y 28 °C. Muchas cepas viven como saprófitas (no patógenas) o como biofilms en la superficie radicular, sin causar daño a las plantas.

Las cepas que contienen plásmidos Ri con genes de virulencia, se consideran patógenas. Sin embargo, debido a la facilidad de transferencia horizontal de plásmidos vía conjugación, es difícil distinguir entre estos dos tipos de cepas.

Las cepas patógenas pueden inducir el crecimiento de raíces pilosas en sus hospedantes.



Signos y síntomas / Daños:

Los síntomas de esta enfermedad se dividen en dos categorías: “raíz pilosa simple o fibrosa” y “raíz pilosa forma lanudo-nudosa”.

Primer síntoma, se caracteriza por una proliferación de raíces adventicias, en el sitio de infección

Segundo síntoma se caracteriza por la formación inicial de tumores en las raíces y en el tallo, bajo la superficie del suelo, en la corona de la planta e incluso sobre la superficie, seguido por un brote de raíces adventicias a partir de la superficie de los tumores



Categorización según la EPPO de *R. rhizogenes*

 Database

Home

Standards ▾

Photos ▾

Reporting Service

Explore by ▾

EPPO GD Desktop

Download user guide

<

Fuente: EPPO, 2021

- *Rhizobium rubi*

Otros nombres syn *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium radiobacter* biotype 2, *Agrobacterium radiobacter* pv. *tumefaciens*, *Phytomonas rubi*, *Pseudomonas rubi*

Distribución: Algunos países de Europa, Argentina y NorteAmerica

Cultivos / Órgano afectado:
Ramas, Raíces y Tallos.





Signos y síntomas / Daños:

Se manifiestan en primavera como pequeñas protuberancias esféricas, blancas sobre los tallos, que aumentan progresivamente en número y tamaño (hasta alrededor de 2,5 cm), pudiendo quebrar la rama. Posteriormente, las agallas se tornan marrones y se desintegran. Pequeñas agallas pueden desarrollarse en la raíz, aunque este patógeno no se asoció originalmente con un daño significativo en este órgano. También se visualiza marchitamiento en hojas.



Las agallas se dan principalmente en la porción inferior de los tallos, pero pueden ubicarse también en ramas terminales. Su desarrollo puede interrumpir el sistema vascular, ocasionando marchitamiento foliar y disminución de la cosecha.







Recomendaciones Generales



Recomendaciones

- Utilizar material de propagación sano y sin heridas.
- En el momento de la cosecha, deje las plantas notablemente agrietadas en el campo para su posterior recolección y destrucción.
- Deseche todo el material de vivero que presente síntomas para evitar contaminar las plantas sanas y las instalaciones de almacenamiento
- Plante cuando el suelo esté por debajo de los 10°C.
- Las buenas prácticas sanitarias y culturales, desinfecte el equipo de poda entre los frutales son importantes elementos disuasorios para la agalla de la corona.





- Evite los sitios de plantación muy infestados por insectos y nematodos que atacan las raíces,
- Adopte prácticas de manejo que minimicen las heridas.
- Evite plantar en suelos pesados y húmedos.
- No plante árboles más profundo de lo que crecieron en el vivero.
- Si es posible, incube las raíces de las plántulas latentes a 22°C a 25°C durante 10 a 14 días para curar las heridas y reducir la susceptibilidad a las agrobacterias tumorígenas antes de plantarlas en suelo húmedo.



Recomendaciones

- Use agua de riego de pozos, si es posible.
- Evite el alto contenido de nitrógeno y el riego al final del período de crecimiento.
- Evite plantar donde hayan crecido plantas con problemas en los últimos 4 a 5 años.
- Elija campos que se hayan plantado recientemente con hortalizas o cereales.
- En resumen, piense en la prevención: evite exponer las plantas a agrobacterias tumorigénicas en cualquier etapa de la producción de la planta
- Una buena limpieza y sanitización, son componentes importantes del control de la enfermedad. El equipo utilizado para podar plantas o para tomar esquejes, estacas debe desinfectarse completamente.



www.sag.cl



Nota de prensa:

Llaman a adoptar medidas preventivas para evitar peligrosa enfermedad en huertos de berries

Aquí van las apariciones de portales electrónicos y medios de comunicación

1) Minagri

<https://www.minagri.gob.cl/noticia/llaman-a-adoptar-medidas-preventivas-para-evitar-enfermedad-en-huertos-de-berries/>

2) Séptima página noticias

<https://www.septimapaginanoticias.cl/post/llaman-a-adoptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries>

3) Portal del Campo

https://portaldelcampo.cl/Noticias/83255_Llaman-a-adoptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries.html

4) EL Maule Informa

<https://elmauleinforma.cl/llaman-a-adoptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries/>

5) Canal 2 Linares

<https://www.canal2linares.cl/2021/07/llaman-adoptar-medidas-preventivas-para.html>

6) Opia

<https://www.opia.cl/601/w3-article-116908.html>

7) Mundo Agropecuario

<https://www.mundoagropecuario.cl/new/llaman-a-adoptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries/>

**MUNDO
AGROPECUARIO**

GANADERÍA AGRICULTURA FRUTAS LÁCTEOS

“ Realización de masivo seminario internacional organizado por INIA Raihuén y FIA, contó con referente mundial de enfermedades bacterianas en frutales.

Gran interés y alta participación logró la realización del seminario internacional “Agalla de la corona en berries: antecedentes de una enfermedad compleja” que de manera gratuita organizó INIA en el marco del Programa de Extensión Berries Maule que apoya la Fundación para la Innovación Agraria.

Más de 260 personas, entre ellos 71 extranjeros de 12 países, siguieron la transmisión zoom, motivados por acceder a los más recientes antecedentes de la enfermedad agalla de la corona presente en huertos frutales de todo el mundo.



- 8) Portal del Agro
<https://www.portaldelagro.cl/2021/07/06/llaman-a-adaptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries/>
- 9) El Heraldo
https://issuu.com/diarioelheraldodelinres/docs/miercoles_07_de_julio_2021
- 10) Socabio
<https://socabio.cl/noticias.php?idnoticia=4579>
- 11) Sobredosis CL
<https://sobredosis.cl/noticia.php?i=bW9rGY3kj3>
- 12) Chillán on line
<https://www.chillanonline.cl/V5/llaman-a-adaptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries/>
- 13) Mundo Agro
<https://www.mundoagro.cl/llaman-a-adaptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries/>
- 14) Diario Vox Populi
<http://www.diariovoxpopuli.cl/2021/07/llaman-adaptar-medidas-preventivas-para.html>
- 15) AgroChile Peru
<https://agrochileperu.com/2021/07/07/llaman-a-adaptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries/>
- 16) Portal AgroChile
<https://www.portalagrochile.cl/2021/07/07/llaman-a-adaptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries/>
- 17) Vgrafico CL
<https://vgrafico.cl/2021/07/09/agricultura-2/>
- 18) Maule Hoy
<https://maulehoy.cl/2021/07/11/llaman-a-adaptar-medidas-preventivas-para-evitar-peligrosa-enfermedad-en-huertos-de-berries/>
- 19) La Discusión
<http://papel.ladiscusion.cl/papeldigital/2021/julio/170721/>



Consolidación información del Taller “Actualizaciones en detección molecular de Agrobacterium/Rhizobium”

PROGRAMA

Taller diagnóstico molecular		
09:25	Inicio	Saludo y presentación
09:30	“Diversity and identification of tumorigenic agrobacteria” (traducción simultánea inglés-español)	Nemanja Kusmanovic Consultor independiente Serbia
10:15	Presentación métodos diagnóstico laboratorio Universidad de Chile	Nicola Fiore Profesor Univ. de Chile
10:25	Presentación métodos diagnóstico laboratorio fitopatología SAG, Ñuble	Gloria Cuevas Encargada laboratorio SAG, Ñuble
10:35	Presentación métodos diagnóstico laboratorio INIA-Quilamapu	Paz Millas Encargado laboratorio Identificación molecular, INIA Quilamapu
11:15	Discusión y acuerdos	

INTRODUCCIÓN

Las agallas o tumores formados por bacterias pertenecientes al género *Agrobacterium/Rhizobium* a nivel general corresponden a estructuras que pueden estar presentes en plantas o árboles a nivel de raíces, corona y tallo. Poseen una textura porosa acorchada, con una tonalidad blanca en una etapa inicial y a medida que van aumentando de tamaño y envejeciendo adquieren una tonalidad café/negro (Figura 1 A y B).

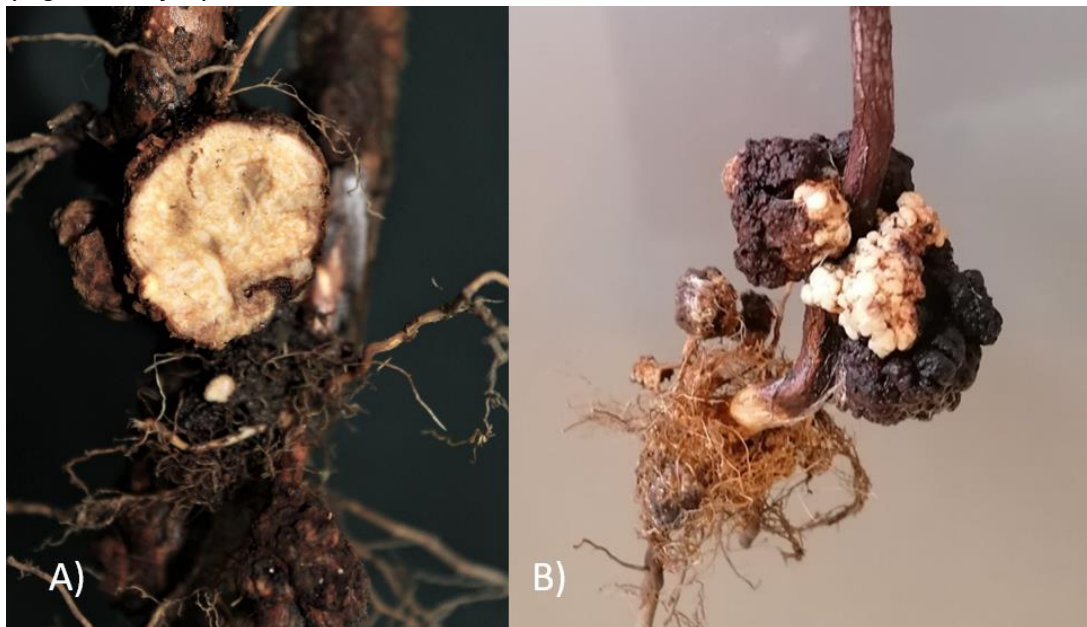


Figura 1. Tumores causados por agrobacterium. A) Corte transversal del tumor donde se observa tejido corchoso. B) Vista externa donde se observa el cambio de coloración en tejido más antiguo

METODOLOGÍAS

- 1) **Metodologías aislamiento de cepas *Agrobacterium/Rhizobium* en tejido tumoral.**
 - a) Lavar tejido tumoral con agua potable, procurando eliminar restos de suelo pegados al tejido y secar con papel nova u otro papel absorbente. Se recomienda realizar los siguientes pasos en cámara de flujo laminar.
 - b) Colocar en un vaso precipitado el tumor y agregar una solución de hipoclorito al 10% durante 10 min (el volumen del vaso precipitado estará condicionado por el tamaño del tumor y el volumen de hipoclorito por agregar debe permitir que el tumor pueda



sumergirse y así cubrir completamente su superficie). Una alternativa de esterilización superficial del tumor, es la de flamear dicho tejido en un mechero por algunos segundos.

- c) Transferir el tumor a un vaso precipitado limpio y agregar agua destilada para remover el hipoclorito de su superficie (el volumen de agua destilada por agregar debe permitir que el tumor pueda ser sumergido y remover restos de hipoclorito de su superficie). Repetir el paso c) en dos ocasiones.
- d) Lavar el tumor a un vaso precipitado o frasco estéril y agregar agua destilada estéril para dejar reposando durante 1 min.
- e) Secar el tumor en papel nova estéril y cortar fragmentos de tejido tumoral, agregándolos en un nuevo vaso precipitado con agua destilada estéril. (Como proporción estimada; por cada 5 fragmentos se deben agregar 30 ml de agua). Esperar 60 min de tal manera que las bacterias presentes en tejido interno del tumor puedan quedar libres en solución.
- f) Realizar diluciones seriadas transfiriendo inicialmente 1 mL de la solución del paso f) a un tubo con 9 mL de agua destilada estéril (10^{-1}), y así sucesivamente hasta obtener las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} .
- g) Extraer una alícuota de 80 μ l de cada dilución y agregarlas en placas individuales con medio de cultivo YEM rojo congo + telurito de potasio o YMA + telurito de potasio. Y dispersar la alícuota con un asa de Drigalski u otro artefacto estéril que permita su correcta dispersión en la placa.
- h) Sellar las placas con aluza y dejar incubando a 25°C durante 5 días, monitoreando la aparición de colonias con tonalidad negra (por la incorporación del telurito de potasio) y aspecto mucoso brillante.
- i) Transcurrido el tiempo de incubación seleccionar colonias aisladas y repicarlas individualmente en placas de Petri con medio de cultivo sólido (Trypticase de soya agar o YEM agar)

2) Metodologías aislamiento de cepas *Agrobacterium/Rhizobium* en plantas asintomáticas.

- En una planta vascular efectuar el corte en uno de sus tallos e inmediatamente coleccionar con un tubo falcón estéril la sabia que se desprende del corte, de tal manera de aislar en laboratorio posibles cepas patogénicas presentes en la sabia.
- Extraer suelo rizosférico de una planta y efectuar diluciones seriadas en placas con medios de cultivo selectivos (YEM rojo congo + telurito de potasio o YMA + Telurito de Potasio)(Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente)

3) Medios de cultivo selectivos para el aislamiento de cepas *Agrobacterium/Rhizobium*.



Tabla 1: Composición medio de cultivo YEM Rojo Congo + Telurito de Potasio

Extracto de levadura	0.5 g/L
Manitol	5 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.2 g/L
NaCl	0.1 g/L
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
Rojo Congo	0.025 g/L
K ₂ TeO ₃	70 mg/L
Agua destilada	1 L

Tabla 2: Composición medio de cultivo YMA + Telurito de Potasio

Extracto de levadura	1 g/L
Manitol	10 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.2 g/L
NaCl	0.1 g/L
K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
CaCO ₃	1 g/L
K ₂ TeO ₃	70 mg/L
Agua destilada	1 L

4) Metodologías para el almacenamiento de muestras de tumor y cepas patogénicas de *Agrobacterium/Rhizobium*.

- Criopreservación: Una vez que se ha limpiado, desinfectado y fragmentado un tumor. Es factible almacenar fragmentos de tumor para posibles análisis posteriores, como la detección directa de tejido tumoral para genes de virulencia o incluso el aislamiento de bacterias patógenas. Esto se lleva a cabo en criotubos con glicerol al 20% y almacenados a -80°C.

Para el caso de bacterias aisladas que se pretendan conservar, se debe extraer una muestra de cultivo bacteriano presente en placa solida de *Agrobacterium/Rhizobium* y con un asa microbiológica extraer una porción del cultivo y depositarla en un criotubo el cual contiene medio liquido compuesto por caldo nutritivo al 1%, glucosa al 1%, extracto de levadura al 1%, más glicerol al 20%.

- Liofilización: A partir de un cultivo puro en medio liquido con tripticasa de soya o caldo YEM extraer una alícuota de 1 mL y centrifugar en un tubo de eppendorf a 8000 g.



Resuspender el Pellet en solución de leche descremada al 10% (previamente esterilizado).

Transferir la mezcla a un vial el cual debe ser llevado a -20°C durante 2 h.

Traspasar los viales a un liofilizador de acuerdo a parámetros establecidos por las características propias del equipo.

Finalizada la liofilización efectuar pruebas de viabilidad con diluciones seriadas en medio de cultivo sólido para determinar si el proceso de liofilización fue óptimo o deficiente a través de la obtención de un rango de células viables, considerando como óptimo una reducción máxima de dos veces el logaritmo de la concentración inicial.

5) Metodologías para la detección de cepas patogénicas de *Agrobacterium/Rhizobium* en tejido tumoral.

La extracción de ADN se puede llevar a cabo a través de un protocolo convencional con un buffer de extracción, siendo un ejemplo el reactivo CTAB. U otra alternativa es con un protocolo provisto por el fabricante de un kit comercial para la extracción de ADN bacteriano.

6) Obtención de pellet bacteriano para análisis molecular

A partir del cultivo de una cepa libre de contaminación en placa con medio de cultivo sólido de una cepa de *Agrobacterium/Rhizobium*, repicar con un asa microbiológica estéril y llevar dicha muestra bacteriana a un frasco hermético o matraz con medio de cultivo tripticasa de soya o caldo YEM previamente esterilizado. Mantener dicho matraz en agitación a 120 rpm a 25°C durante 48 horas.

Completado el tiempo de incubación centrifugar una alícuota de 1 mL del cultivo bacteriano en un tubo de Eppendorf de 2 μL . Eliminar el sobrenadante, procurando obtener un pellet bacteriano en el fondo del tubo el cual puede ser guardado a -20°C o inmediatamente utilizado para la extracción de ADN.

7) Protocolo convencional de extracción de ADN para bacterias.

Buffer de extracción CTAB-SDS:

- 250 mM Tris-HCL (pH 8.0)



- 20 mM EDTA (pH 8.0)
 - 1M NaCL
 - 2% CTAB
 - 0.15% SDS
- 1) Añadir 600 µl de buffer de extracción y calentar a 80°C durante 10 min en baño María, procurando que los tubos hagan contacto con el agua hirviendo.
 - 2) Moler con pistilo estéril la muestra en el interior del tubo.
(Opcional: agregar 10 µl de β-mercaptoetanol).
 - 3) Agregar en el tubo 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 23:2 y centrifugar a 12,000 g durante 5 min. Extraer la fase líquida 400 µl a un nuevo tubo estéril.
 - 4) Agregar isopropanol en proporción 0.7 y adicionar 30 µl de acetato de sodio 3M dejando el tubo en posición vertical a -20°C durante aproximadamente 10 min.
 - 5) Centrifugar a 10,000 rpm y eliminar el líquido sobrenadante del tubo. Para luego dejar el tubo boca abajo sobre papel para eliminar residuos de isopropanol.
 - 6) Agregar 500 µl de etanol al 80% y centrifugar a 12,000 g durante 2 min.
 - 7) Eliminar el sobrenadante y repetir el paso 5). Dejando boca abajo el tubo para eliminar cualquier residuo de etanol.
 - 8) Si no se visualizan gotas de etanol en el fondo del tubo, agregar 30 µl de buffer de elución.
 - 9) Cuantificar el ADN, mediante espectrofotometría 260/280 nm y almacenar los tubos a -20°C.
- 8) **Protocolo amplificación en cadena de la polimerasa para regiones de ADN plasmídico en cepas de *Agrobacterium* / *Rhizobium*.**

Tabla 3: Componentes reacción de PCR.

Componente	Volumen y concentración por reacción
Taq polimerasa	0.2 (25 unit/ml)
PCR buffer 10X	2 µL
dNTPs	2 µL (200 µM)
MgCl ₂	1 µL (10 mM)
Primer F	1 (10 µM)
Primer R	1 µL (10 µM)
ADN bacteriano	2 µL (≥100 y ≤150 ng/µL)
H ₂ O dd	10,8 µL
	Total 20 µL



Tabla 4: Los cebadores seleccionados para la detección de genes de virulencia presentes en el plásmido de cepas patógenas de *Agrobacterium/Rhizobium* (Tabla X).

Región	Nombre cebadores	Secuencia cebadores	Bibliografía
<i>virD2</i>	A y C'	5'-ATGCCCCGATCGAGCTCAAGT-3' 5'-TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA-3'	Haas et al., 1995
<i>virC</i>	VCF3 y VCR3	5'-GGCGGGCGYGCYGAAAGRAARACYT-3' 5'-AAGAACGYGGNATGTTGCATCTYAC-3'	Suzaki et al., 2004

** Los cebadores A y C' permiten detectar la mayoría de las cepas patógenas, ya que solo con *A. vitis* se obtiene una banda tenue.

** Los cebadores VCF3 y VCR3 permiten detectar la mayoría de las cepas patógenas, pero en algunos casos no es posible detectar algunas cepas de *Rhizobium*.

9) Metodologías para la caracterización de cepas patógenas de *Agrobacterium/Rhizobium*.

Existen distintas metodologías para clasificar e identificar cepas aisladas de tumores. Esto cual permite agrupar dichas cepas a un respectivo Biovar o aportar información para la descripción del patógeno.

Test 3-ketoquetalosa: A partir de cultivos puros sólido o líquido, traspasar una alícuota o muestra con asa microbiológica en placas de Petri con medio de cultivo M1, las cuales son incubadas durante 24 h a 25°C. Completado el tiempo de incubación se deben transferir la o las colonias a placas de Petri con medio de cultivo M2 e incubarlas por 24 h a 25°C. Completado el último periodo de incubación agregar sobre la o las placas una solución con reactivo de Benedic, de tal manera que las colonias semi sumergidas en la solución y esperar por 1 hora. En caso de visualizar un halo amarillo alrededor de una colonia se asume una actividad positiva, y que correspondería a una cepa del Biovar1.

Test de movilidad: Es realizado en placas de Petri con medio de cultivo mínimo M9 a pH 7. En dicho medio se transfieren colonias de cepas puras las cuales dependiendo de su capacidad de movilidad difunden por el medio visualizándose un aumento en el halo que conforma la colonia. O de lo contrario se mantienen en una misma posición, visualizándose un halo pequeño de la colonia. Siendo la no movilidad una característica de las especies *Agrobacterium vitis* y *Agrobacterium rubi*.



10) Identificación molecular por secuenciación: Para llevar a cabo la identificación molecular de un microorganismo, existen genes microbianos específicos, los cuales se han descrito como funcionalmente constantes y comunes, además de ser flanqueados por regiones altamente variables. Las regiones conservadas en estos fragmentos son responsables de la universalidad del gen objetivo y mediante la PCR se genera un fragmento de ADN (o amplicón) que sirve como “huella digital” para diferentes géneros o especies (Castro et al. 2020).

Tabla 5: Marcadores moleculares más usados para la identificación de bacterias.

Nombre del marcador	Aplicación	Referencia
Ácido ribonucleico ribosómico ARNr (5S-16S-23S)	Universal para bacteria	Eden et al., 1991; Weidner et al., 1996; Frank et al., 2008.
ADN girasa (<i>gyrA gyrB</i>)	Universal para bacteria	Onodera & Sato, 1999.
ARN polimerasa (<i>rpoA-rpoB-rpoC-rpoD</i>)	Universal para bacteria	Fujita et al., 1995; Ventura et al., 2005; Rigouts et al., 2007
Gen de la proteína recombinante de ADN homólogo (recA)	Recomendado para cepas de los géneros <i>Agrobacterium</i> / <i>Rhizobium</i> .	Costechareyre et al., 2010; Shams et al., 2013

Obtenidas las secuencias de la secuenciación en ambos sentidos del amplicón, como paso siguiente se deben utilizar para la comparación contra una base de datos de secuencias de genes de microorganismos conocidos. La base de datos recomendada para secuencias relacionadas a los géneros *Agrobacterium/Rhizobium* es NCBI con su herramienta BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> y activando la opción “Sequences from type material” es posible determinar la relación filogenética que posee una secuencia obtenidas con los partidores señalados en la tabla X.

En el caso que se pretenda alcanzar la identificación a nivel de especie, es necesario realizar un análisis filogenético MLSA el cual consiste en un procedimiento destinado a caracterizar especies microbianas empleando secuencias de ADN provenientes de genes específicos las cuales son alineadas con secuencias de cepas que se pretenda comparar (idealmente se debe emplear secuencias de cepas tipo) y luego ensambladas para finalmente efectuar el análisis filogenético empleando modelos como máxima verosimilitud o un modelo bayesiano. El número de genes por utilizar dependerá del tipo de



microorganismo, en el caso de cepas relacionadas a *Agrobacterium* / *Rhizobium* se recomienda utilizar las regiones *atpD*, *recA* y *rpoB* (Kuzmanović et al., 2018).

Otra alternativa de identificación molecular es la de secuenciación del genoma completo de la bacteria en estudio como servicio externo. En la actualidad existen métodos de secuenciación, basados en la pirosecuenciación y plataformas denominadas como *Next Generation Sequencing* (NGS). Además de las nuevas generaciones de secuenciadores que aplican tecnologías de secuenciación en paralelo, como la secuenciación por ligación (*Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*), secuenciación por síntesis y semiconducción del Ion Torrent y la secuenciación por síntesis en *clusters*. Por lo que existe una diversidad de posibles servicios y opciones secuenciación de genomas bacterianos.

11) Metodología para la evaluación de la patogenicidad de cepas *Agrobacterium/Rhizobium*.

Una vez que se han aislado cepas de los géneros *Agrobacterium/Rhizobium* y a su vez se ha detectado la presencia de genes de virulencia en ellas es posible utilizar dichas cepas para infectar plantas sanas de tal manera de corroborar su capacidad patogénica y formación de tumores.

- a) A partir de un cultivo puro en medio sólido y libre de contaminación se toma una muestra bacteriana con un asa microbiológica y se lleva la muestra a un matraz con 30 mL de medio de cultivo líquido (tripticasa de soya o caldo YEM). Dejar en agitación a 120 rpm durante 48°C.
- b) Completada la incubación, extraer una alícuota de 5 mL e ingresarla en un tubo falcón, el que debe ser centrifugado a 7000 g. Obteniéndose un pellet bacteriano en el fondo del tubo.
- c) Diluir el pellet bacteriano con 5 a 10 mL de una solución de NaCl (0.9% p/v) previamente esterilizada y aplicar vortex hasta ver disuelto todo el pellet bacteriano.
- d) Efectuar cortes con bisturí en la raíz o tallo de plantas sanas de tomate de 3 a 4 semanas de vida (los cortes deben ser superficiales para no provocar la muerte de la planta). * Es factible utilizar plantas de la misma especie de la cual fueron aisladas las cepas patógenas.
- e) Con una jeringa, inyectar en la zona de la herida una alícuota de la solución en la que fue diluido el pellet bacteriano. Y cubrir la herida con alusa plast para cubrir la herida.



- f) Monitorear la zona del tejido que ha sido inoculada en los próximos 2 meses en adelante, de tal manera de corroborar la presencia de tejido tumoral.

Bibliografía

Castro, J. F. (2020). Conformación de colecciones de cultivos microbianos. *Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*.

Costechareyre, D., A. Rhouma, C. Lavire, P. Portier, D. Chapulliot, F. Bertolla, A. Boubaker, Y. Dessaux, X. Nesme (2010) Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis: *Agrobacterium recA* diversity. *Microb. Ecol.* 60, 862-872.

Eden, P. A., Schmidt, T. M., Blakemore, R. P., & Pace, N. R. (1991). Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 324-325.

Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2461-2470.

Fujita, M., Hanaura, Y., & Amemura, A. (1995). Analysis of the *rpoD* gene encoding the principal sigma factor of *Pseudomonas putida*. *Gene*, 167(1-2), 93-98.

Haas, J. H., Moore, L. W., Ream, W., & Manulis, S. (1995). Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2879-2884.

Kuzmanović, N., Smalla, K., Gronow, S., & Puławska, J. (2018). *Rhizobium tumorigenes* sp. nov., a novel plant tumorigenic bacterium isolated from cane gall tumors on thornless blackberry. *Scientific reports*, 8(1), 1-8.

Onodera, Y., & Sato, K. (1999). Molecular cloning of the *gyrA* and *gyrB* genes of *Bacteroides fragilis* encoding DNA gyrase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(10), 2423-2429.

Rigouts, L., Nolasco, O., de Rijk, P., Nduwamahoro, E., Van Deun, A., Ramsay, A., ... & Portaels, F. (2007). Newly developed primers for comprehensive amplification of the *rpoB* gene and detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*, 45(1), 252-254.



Shams, M., L. Vial, D. Chapulliot, X. Nesme, C. Lavire (2013) Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using recA-based PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 351-358.

Suzaki, K., Yoshida, K., & Sawada, H. (2004). Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *Journal of General Plant Pathology*, 70(6), 342-347.

Ventura, M., Canchaya, C., Bernini, V., Del Casale, A., Dellaglio, F., Neviani, E. & van Sinderen, D. (2005). Genetic characterization of the *Bifidobacterium breve* UCC 2003 *hrcA* locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8998-9007.

Weidner, S., Arnold, W., & Puhler, A. (1996). Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 766-771.