

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *XANTHOMONAS***  
***ARBORICOLA* PV. *JUGLANDIS*, AGENTE CAUSAL DE LA PESTE NEGRA**  
**DEL NOGAL**

**POR**

**DANIELA MARLENE DÍAZ CEA**

**MEMORIA PRESENTADA A LA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA**  
**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**  
**PARA OPTAR AL TÍTULO DE**  
**INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE**  
**2022**

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *XANTHOMONAS  
ARBORICOLA PV. JUGLANDIS*, AGENTE CAUSAL DE LA PESTE NEGRA  
DEL NOGAL**

**POR**

**DANIELA MARLENE DÍAZ CEA**

**MEMORIA PRESENTADA A LA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE  
2022**

Aprobada por:

Profesor Asociado, Ernesto Moya E.  
Ing. Agrónomo, Ph. D

---

Guía

Profesor Asociado, Macarena Gerding G.  
Ing. Agrónomo, Ph. D

---

Asesor

Profesor Asociado, Marisol Vargas C.  
Ing. Agrónomo, Dr.

---

Asesor

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

---

Decano

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Página</b>
Resumen .....	1
Summary.....	1
Introducción .....	2
Materiales y Métodos.....	4
Resultados y Discusión .....	9
Conclusiones .....	20
Referencias .....	21
Anexos .....	25

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Patrones moleculares de aislados de bacterias <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> obtenidos desde el Fundo los Barriales en la Región de Ñuble, luego de haber realizado un BOX-PCR, en dónde se observan aislados que presentan misma huella genética (líneas blancas superiores).	10
Figura 2	Patrones moleculares obtenidos mediante BOX PCR de bacterias <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> obtenidas desde el Fundo Paso Alejo, Región de Ñuble (PAS1.4) y Fundo Bureo, Región del Biobío (N2S1.1), en dónde se observan aislados que presentan una misma huella genética (Línea blanca superior).	11
Figura 3	Ensayo de resistencia a antibióticos de 91 cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> aisladas a partir de yemas de seis nocedales entre la Región de Ñuble y el Biobío, creciendo en medio Luria Bertani (LB) y medios con diferentes antibióticos.	14
Tabla 1	Cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> obtenidos desde yemas de nogal y utilizadas en el ensayo <i>in vitro</i> de resistencia a antibióticos por cada huerto luego de haber realizado el análisis de “fingerprint molecular” o huella genética mediante BOX-PCR.	12
Tabla 2	Cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> obtenidas de yemas en seis nocedales muestreados que fueron agrupadas en los diferentes conglomerados de acuerdo a los antibióticos al cual presentaron resistencia utilizando el coeficiente de asociación Jaccard.	17
Tabla 3	Número de cepas de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> obtenidas de yemas de nogal que presentaron resistencia a los distintos antibióticos evaluados de acuerdo al huerto de nogal desde donde fueron obtenidas.	19

## **EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *JUGLANDIS*, AGENTE CAUSAL DE LA PESTE NEGRA DEL NOGAL**

ASSESSMENT OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *JUGLANDIS*, CAUSAL AGENT OF WALNUT BLIGHT

**Palabras índice adicionales: Peste negra, resistencia a antibióticos, nogal.**

### **RESUMEN**

El cultivo del nogal (*Juglans regia* L.), es el segundo frutal más cultivado en Chile, concentrándose alrededor del 25 % de superficie plantada entre las regiones del Maule y la Araucanía, donde este frutal es afectado severamente por la enfermedad Peste negra, causada por la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*). En el control de esta enfermedad se utilizan antibióticos, los cuales pueden generar resistencia en las cepas bacterianas. En esta investigación se evaluó la diversidad genética presente en 124 aislados bacterianos provenientes de yemas de seis huertos ubicados entre las regiones de Ñuble y Biobío, mediante el estudio de la huella genética molecular usando BOX PCR. Se observó una gran variabilidad genética de los aislados bacterianos de *Xaj* obtenidos desde los seis huertos evaluados, identificando la presencia y ausencia de bandas de tamaños moleculares específicos. Además, se evaluó *in vitro* la resistencia de los aislados a distintos antibióticos utilizados para el control de esta enfermedad a base de: Clorhidrato de Tetraciclina, Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Kasugamicina. El 78 % de las cepas de *Xaj* presentaron resistencia a algún antibiótico, en donde el mayor número de cepas resistentes se presentó al utilizar Clorhidrato de Kasugamicina, siendo menor al utilizar Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Tetraciclina o su mezcla.

### **SUMMARY**

Walnut (*Juglans regia* L.) is the second most cultivated fruit tree in Chile, concentrating around 25 % of the planted area between the Maule and Araucanía regions, where this fruit tree is severely affected by the Black Plague disease, caused by the bacterium *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*). Antibiotics are used to control this disease, which can generate resistance in bacterial strains. In this research, the genetic diversity of 124 bacterial isolates from buds of six orchards located between the Ñuble and Biobío regions was evaluated through molecular fingerprinting using BOX PCR. A great genetic variability of the *Xaj* bacterial isolates obtained from the six evaluated orchards was observed. In addition, the antibiotic resistance of the strains to different antibiotics used for the control of this disease was assessed *in vitro*. The antibiotics were Tetracycline Hydrochloride, Streptomycin Sulfate and Kasugamycin Hydrochloride. 78 % of the *Xaj* strains showed resistance to some antibiotic, where the highest number of strains were resistant to Kasugamycin Hydrochloride, and the lowest number of resistant strains were observed when using Streptomycin Sulfate and Tetracycline Hydrochloride or their mixture.

## INTRODUCCIÓN

En Chile el cultivo del nogal (*Juglans regia* L.) se extiende desde la región de Atacama hasta la región de Los Ríos, abarcando aproximadamente una superficie comercial de 40.800 ha plantadas al año 2019, y en donde predomina el cultivar Chandler (Larragaña, 2019). El cultivo del nogal ha tenido un crecimiento importante desde el año 2016 pasando de 33.894 ha plantadas a la superficie ya mencionada. Desde la región del Maule a la región de la Araucanía se reporta una superficie comercial de 10.338 ha al año 2019 cifra superior a las 6.362 ha existentes al año 2016, esto implica un aumento del 61,5 % en el área de producción del nogal en estas regiones (Larragaña, 2019).

El cultivo del nogal en Chile, presenta limitantes importantes asociadas a la latitud, que incluye precipitaciones primaverales y alta humedad relativa. Estos fenómenos aumentan la incidencia de enfermedades, entre ellas, la enfermedad conocida como peste negra (Lamichhane, 2014; Moya-Elizondo *et al.*, 2018) causada por la bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Pierce) (Vauterin *et al.*, 1995) (*Xaj*).

Esta enfermedad es la más importante del nogal (Muncharaz, 2000), siendo descrita por primera vez en Savastano (Península de Sorrento), en Italia, en 1884, y reportada luego en ese mismo país por Ferraris (1938) y Ercolani (1962) (Flores *et al.*, 2004). En Chile, la primera referencia de esta enfermedad la hizo el profesor Marcial Espinoza, en Molina, Región del Maule en el año 1917 (Pinto y Carreño, 1988; Auil, 2016).

La peste negra puede causar grandes pérdidas económicas en el mundo (Shami *et al.*, 2013), llegando incluso al 80 % de pérdida en la producción de nuez si no es controlada (Retamales *et al.*, 2017b). En cuanto a los factores climáticos, la infección se ve favorecida por heladas, ya que generan micro heridas en los tejidos de la planta facilitando el ingreso de la bacteria (Millas y France, 2017). Además, se desarrolla adecuadamente con temperaturas entre 15 °C y 25 °C (Soto y Rebufel, 2021). Otros factores que favorecen la propagación e infección de la enfermedad es el polen infectado (Retamales, 2017a).

La fuente de inóculo principal para *Xaj* son las yemas infectadas, ya que es el sitio en donde inverna la bacteria (Flores *et al.*, 2004). Además de otras partes infectadas como son los canchales de las ramas (Muncharaz, 2000). La bacteria infecta a su huésped a través de los estomas, heridas y tricomas dañados (Adaskaveg *et al.*, 2011). Esta infección puede ocurrir en amentos, flores femeninas, brotes verdes, hojas, brotes y frutos. Los daños se pueden extender a todos los órganos aéreos del árbol en crecimiento. En los amentos infectados produce ennegrecimiento y pueden quedar totalmente destruidos. Las flores femeninas se arrugan, ennegrecen y finalmente se produce la caída de las flores (Muncharaz, 2000). En hojas aparecen manchas circulares a irregulares, de color verde pálido y translúcido, que se tornan de un color amarillo verdoso y finalmente marrón (Flores, 2004). En frutos se producen manchas acuosas que cambian a café oscuro, a medida que la enfermedad avanza, las heridas se vuelven necróticas produciendo depresiones en los frutos. Las lesiones van aumentando su tamaño, se juntan se hunden y a menudo se agrietan (Lemus *et al.*, 2010).

El control de esta enfermedad se basa en el uso de productos en base a sales de cobre, tales como: caldo bordelés, óxido de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato de cobre pentahidratado e hidróxido de cobre. Sin embargo, la repetición e



tratamientos cúpricos ha generado la aparición de cepas bacterianas resistentes al ion cobre (Moya-Elizondo *et al.*, 2018). Además de generar resistencia en cepas bacterianas, el uso excesivo de cobre, conlleva la acumulación del mismo en el ambiente pudiendo desarrollar problemas en la floración y polinización asociados a fitotoxicidad, llevando a una disminución de la producción de frutos (Retamales, 2017a). A su vez de generar efectos tóxicos gastrointestinales y/o neurodegenerativos en diferentes tipos de organismos (Retamales, 2017a).

En este sentido, una alternativa para el control de peste negra y otras bacteriosis es el uso de antibióticos, siendo utilizados en Chile el Clorhidrato de Kasugamicina, Clorhidrato de Tetraciclina, Sulfato de Estreptomina o su mezcla y Sulfato de Gentamicina en conjunto con Clorhidrato de Oxitetraciclina. Sin embargo, el uso de los antibióticos es cuestionado debido al surgimiento a corto plazo de poblaciones bacterianas resistentes, por su efecto residual extremadamente corto y por su posible efecto en la salud animal y humana (Retamales, 2017a). No obstante, lo anterior, no existen mayores antecedentes de resistencia de *Xaj* a estos antibióticos en Chile.

La diversidad genética en bacterias es estudiada mediante rep - PCR (secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas- PCR), Box-PCR (amplificación de secuencias distribuidas aleatoriamente a través del genoma), ERIC (secuencias consenso intergénicas repetidas en las enterobacterias), REP con juegos de iniciadores y AFLP (amplificación de fragmentos polimórficos largos) (Scortichini *et al.*, 2001). Por otro lado, para mejorar la detección de *Xanthomonas* en material propagativo de nogal, se debe tener en cuenta la diversidad genética relevante del patógeno.

Por lo anterior, esta investigación buscó determinar la diversidad genética presente en aislados de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* obtenidos desde yemas en huertos comerciales de las Regiones de Ñuble y Biobío y sus posibles respuestas de resistencia a distintos antibióticos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio**

El muestreo del material vegetal fue realizado en cinco huertos comerciales con manejo convencional de control de enfermedades y un huerto casero en donde no se realizaba ningún manejo de enfermedades. Todos estos huertos corresponden al cv. Chandler. Dos de los huertos muestreados se encuentran ubicados en la Región del Biobío: Negrete, Fundo Bureo (GPS 37°35'04.5"S 72°28'24.2" O) de propiedad de Agrícola Sutil S.A., y un huerto en el sector aeropuerto María Dolores en la ciudad de Los Ángeles; Fundo Corralco de propiedad de Agrícola Costanera S.A. (GPS 37°22'24.5"S 72°25'40.0" O). En la Región de Ñuble se muestreó un huerto en la comuna de Coihueco, correspondiendo a la Hacienda Pullami, (GPS 36°34'47.3"S 71°48'43.0"O) y los tres huertos restantes están ubicados en la ciudad de Chillán: Fundo los Barriales, de propiedad de don Jorge Pérez (GPS 36°39'07.8"S 71°57'12.2"W); Huerto Sector Paso Alejo de propiedad de don Miguel Cortés (GPS 36°, 37' S; 71°, 57' O) y un huerto casero de propiedad de don Hernán Rodríguez (GPS 36°34'59.1"S 72°03'16.9"O). Se muestrearon dos sectores por cada huerto en estudio, a excepción de los huertos Fundo Corralco y el huerto sin manejo, donde se muestreó sólo un sector. El muestreo fue realizado en época de invierno, entre el 25 de julio y 01 de agosto de 2019.

El procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Campus Chillán.

### **Obtención material vegetal y aislamiento bacteriano**

Yemas de nogal en el estado af<sub>2</sub> (caída de escamas duras: La yema queda protegida por otras escamas poco diferenciadas y semi membranosas) (Reginato *et al.*, 2005) fueron recolectadas desde tres árboles, elegidos al azar, en cada sector muestreado. Por cada árbol seleccionado se eligieron al azar 20 yemas dormantes y se juntaron un total de 60 yemas por sector, estas fueron mezcladas y al azar se obtuvieron 30 yemas para realizar la aislación de bacterias. Las 30 yemas fueron molidas en un mortero con 10 mL de agua destilada estéril (ADE), posteriormente el material molido fue depositado dentro de un tubo centrifuga de 15 mL, agitado en un vórtex durante 30 s e incubado durante 30 min. Luego se realizaron tres

diluciones seriadas de cada muestra y, de forma separada, se sembraron 150  $\mu$ L en forma de césped dentro de una placa Petri conteniendo medio de cultivo semi diferencial agar Luria Bertani (LB). Las placas fueron incubadas a 24 °C en oscuridad durante cuatro días. Transcurrido este periodo de tiempo y a partir de la placa con la tercera dilución, de cada huerto muestreado, se reaislaron 10 colonias bacterianas que presentaron coloración amarilla en medio LB. Estas colonias bacterianas fueron sembradas, en forma de estrías, dentro de placas conteniendo medio de cultivo diferencial agar con levadura, dextrosa y carbonato de calcio (YDC), en este medio las colonias bacterianas del género *Xanthomonas* presentan coloración amarilla (Ninot *et al.*, 2002). Luego de tener las bacterias diferenciadas en base a su color, cada colonia aislada fue crecida en un tubo de centrifuga de 15 mL conteniendo 5 mL de medio líquido LB, dejándose en agitación constante a 150 rpm, a una temperatura de 25°C durante 48 horas. A partir de cada tubo de centrifuga se extrajo 1 mL de la suspensión bacteriana, la cual fue mezclada con 300  $\mu$ L de glicerol al 80 % en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Los tubos Eppendorf fueron agitados por unos segundos para homogeneizar la suspensión bacteriana y se guardaron rotulados en un refrigerador a -21°C.

### **Preparación de células bacterianas para PCR**

A partir de los aislados bacterianos conservados en frío, se extrajo 50  $\mu$ L de bacteria y se inoculó en un tubo Eppendorf conteniendo 1 mL de medio líquido LB para activarlos y luego realizar un “fingerprint” o huella genética de cada uno (124 aislados en total).

Una vez colonizado el caldo LB, cada aislado bacteriano fue sometido a un lavado celular, el cual se repitió tres veces. Este lavado consistió en: i) Centrifugar los cultivos a 5.000 rpm durante 3 min, ii) eliminar el sobrenadante de cada aislado, y iii) rellenar cada tubo con 1 mL de solución salina. Después de realizado el lavado celular, se extrajeron 100  $\mu$ L del aislado bacteriano a un nuevo tubo Eppendorf conteniendo 900  $\mu$ L de solución salina y se agitó durante 30 segundos. Luego, por medio de una micropipeta, se extrajo todo el contenido del aislado bacteriano para ser depositado en una cubeta y analizar su densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro y ajustar esta densidad a un valor de 2,0 para tener una similar concentración de células bacterianas.

### **Determinación de diversidad genética Box - PCR**

El aislado bacteriano ajustado en su densidad, se llevó a un Thermomixer confort, que tiene la particularidad de mezclar, atemperar la muestra y realizar aislamientos de fragmentos de ADN en geles de agarosa, se colocaron los tubos Eppendorf a 65 °C, durante 5 min, luego fueron refrigerados a -20°C durante 5 min y por último se dejaron en un refrigerador a -4°C durante 5 min. La diversidad genética de los aislados se evaluó mediante “fingerprint” o huella genética molecular, usando el partidor BOX A1R (5'- CTA CAA CGG GCT GAC GGC GAC G-3') (Versalovic *et al.* 1994), de acuerdo a la metodología reportada por Guiñazú *et al.* (2013), con modificaciones.

Para la amplificación de esta zona, en cada reacción se utilizaron 5 U de ADN polimerasa *Taq* Platinum™ (Invitrogen, Thermo Scientific™), solución tampón para ADN polimerasa Platinum™ 1x, 1,5 mM Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 0,2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 2 µM del partidor BOX A1R, 5 µL de preparación celular y agua para completar un volumen final de 25 µL. Todos estos componentes de la reacción fueron mezclados en un vórtex durante 2-3 segundos.

Las amplificaciones se realizaron colocando todas las muestras en un termociclador MaxyGene™ II (Axygen®) donde se realizaron ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión utilizando el siguiente programa de PCR: 95 °C por 7 min, luego 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 52 °C por 1 min y 72 °C por 8 min, finalmente 72 °C por 16 min y 4 °C hasta retirar las muestras.

Los productos de PCR fueron observados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % (p v<sup>-1</sup>), utilizando Buffer TAE 1x (40 mM de sal Tris, 20 mM de ácido acético y 1 mM de EDTA). El gel fue vertido en una cubeta y antes que solidificara, en cada extremo superior e inferior se colocó un peine para moldear el gel, dejando pequeños pocillos donde se cargó el producto de PCR (25 µL de cada muestra con 4 µL de solución tampón de carga). Esta solución contenía 500 µL de BlueJuice™ (Invitrogen, Thermo Scientific™), 5 µL de agente de visualización GelRed® nucleic acid gel stain (Biotium) y 50 µL de agua libre de nucleasas. Se utilizó 5 µL de marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific™). Finalmente, la cubeta se llevó a una cámara de electroforesis

horizontal utilizando la fuente de poder Enduro™ 300V (Labnet international INC.) en donde el gel fue corrido por 3,5 h a 75 V. El resultado de la electroforesis fueron bandas de moléculas de ADN que fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta horizontal TCP-20 MX (Vilber Lourmat), y se analizaron identificando la presencia y ausencia de bandas de tamaños moleculares específicos.

### **Ensayo de resistencia a antibióticos**

Las cepas bacterianas que presentaron huellas genéticas distintivas fueron incubadas en una placa multipocillo de 96 celdas, cada celda contenía 10  $\mu\text{L}$  del aislado bacteriano, por separado, y 200  $\mu\text{L}$  de medio líquido LB, mantenida en agitación constante a 150 rpm, a una temperatura de 25°C durante 48 horas.

Posteriormente las cepas fueron sometidas a distintos antibióticos, para ello, se preparó medio agar LB con los diferentes antibióticos por separado. Cuatro antibióticos fueron utilizados para evaluar la presencia de bacterias resistentes. Dos productos comerciales: uno a base de sulfato de estreptomicina 25 % p/p y Clorhidrato de Tetraciclina 3,2 % p p<sup>-1</sup> WP (Strepto plus®, Anasac S.A, Chile) en dosis de 500 mg L<sup>-1</sup>, que corresponde a la concentración comercial utilizada para el control de *Xaj* (50 g P.C. hL<sup>-1</sup>) y que corresponde a una concentración de 124 mg L<sup>-1</sup> de Sulfato de Estreptomicina y 16 mg L<sup>-1</sup> de Clorhidrato de Tetraciclina y un antibiótico comercial en base a Clorhidrato de Kasugamicina hidratado (Kasumin®, Arysta Life Science Chile S.A., Chile) en una concentración de 3,5 mL L<sup>-1</sup>, que corresponde a la concentración comercial utilizada para el control de *Xaj* (350 mL P.C. hL<sup>-1</sup>) y que corresponde a una concentración de 0,0805 mL L<sup>-1</sup> de Clorhidrato de Kasugamicina hidratado y dos antibióticos puros: Clorhidrato de Tetraciclina (Winkler) en concentración de 16 mg L<sup>-1</sup>, y Sulfato de Estreptomicina (Calbiochem®) en concentración de 124 mg L<sup>-1</sup>. Además, se consideró un tratamiento control que solo contenía medio de cultivo Agar LB. Veinte mL de medio de cultivo agar LB con la concentración del respectivo antibiótico o producto comercial fue depositado dentro de placas Petri utilizando una jeringa estéril con un volumen de 20 mL. Después las cepas seleccionadas fueron inoculadas en las placas Petri conteniendo los tratamientos ya descritos, en grupos de 24 cepas por placa en alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  cada uno. Por cada cepa se consideraron tres repeticiones en cada tratamiento

antibiótico. Las placas fueron incubadas a 24 °C en oscuridad. La evaluación consistió en observar presencia o ausencia de crecimiento de la cepa bacteriana sobre el medio de cultivo con el antibiótico y fue realizada a las 48 horas posteriores a la inoculación.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en la huella genética de los aislados bacterianos, provenientes de los seis huertos en estudio, se analizó manualmente comparando su huella genética una con otra de acuerdo a la presencia y ausencia de bandas de tamaños moleculares específicos. Aquellos aislados que tuvieron huellas genéticas idénticas constituyeron una cepa.

La evaluación del resultado del ensayo de resistencia a antibióticos fue realizada por medio de técnica multivariada mediante análisis de conglomerados utilizando el coeficiente de asociación Jaccard, en donde, se agrupó cada cepa de los distintos huertos muestreados de acuerdo a los antibióticos a los cuales presentaban resistencia utilizando el software estadístico infoStat 2008 (Balzarini *et al.*, 2008).

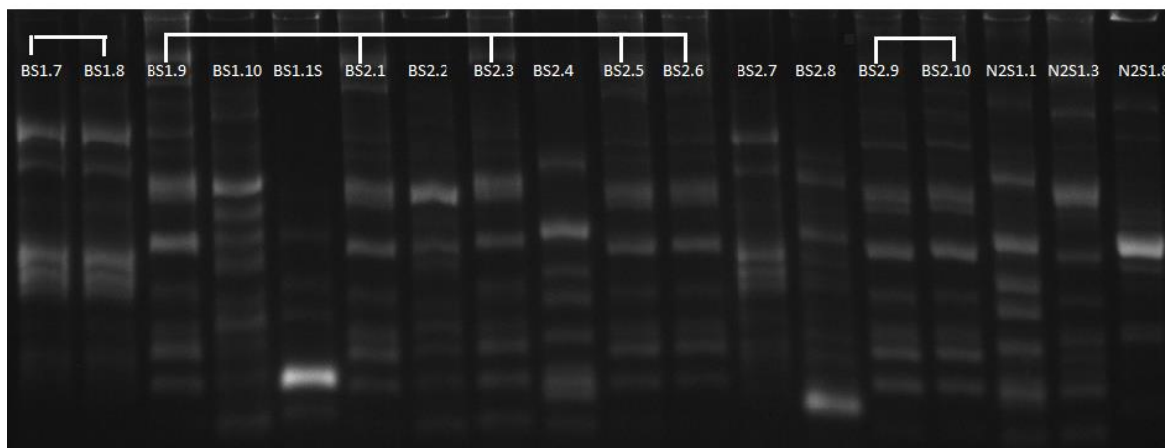
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se obtuvieron 124 aislados, los que presentaron coloración amarilla en medio LB y al ser sembrados en medio YDC mantuvieron su coloración siendo consideradas estas colonias como *Xaj*, ya que Moragrega (2012) indica que el medio agar YDC es un medio selectivo para el género *Xanthomonas* dado que se desarrollan colonias mucoides, convexas y amarillas.

El resultado de la huella genética mostró que de los 124 aislados, 91 presentaron patrones genómicos diferentes, considerando las bandas moleculares de ADN visualizadas en el transiluminador de luz ultra violeta. De acuerdo a estos resultados los 33 aislados que presentaron patrones genéticos iguales fueron descartados para las pruebas de resistencia. En la Figura 1 y a modo de ejemplo se observa a algunos de los aislados que presentaron los mismos patrones de bandas pertenecientes al Fundo los Barriales, Chillán donde el aislado identificado como BS1.7 fue igual a BS1.8, así como BS1.9 lo fue de BS2.1, BS2.3, BS2.5 y BS2.6; o BS2.9 lo fue de BS2.10.

Se observó que en algunos sectores como por ejemplo en el fundo Los Barriales los aislados bacterianos obtenidos correspondían a una misma cepa de *Xaj*. Por otro lado, se observó que en una misma región se encontraron cepas genéticamente idénticas, como es el caso del Fundo Bureo ubicado en la Región del Biobío donde se obtuvieron dos aislados de *Xaj* y cuatro aislados de *Xaj* del Fundo Corralco ubicado en la misma Región pertenecientes a una misma cepa. Así también, hubo aislados que mostraban la misma huella de bandas de ADN obtenidas de diferentes regiones, como es el caso del huerto sector Paso Alejo, ubicado en la Región de Ñuble, encontrándose dos aislados bacterianos con la misma huella genética a un aislado del Fundo Bureo, constituyendo una sola cepa bacteriana de *Xaj* (Figura 2). También se observó que en el huerto sector Paso Alejo se encontraba una cepa con la misma huella genética de una cepa aislada del Fundo Corralco ubicado en la Región del Biobío. Estos hallazgos sugieren que algunos haplotipos de *Xaj* persisten durante muchos años e infectan nogales en diferentes regiones, mientras que la ocurrencia del intercambio de material genético dentro de las cepas de *Xaj* podría explicar en parte la diversidad genética observada (Marcelletti *et al.*, 2010).

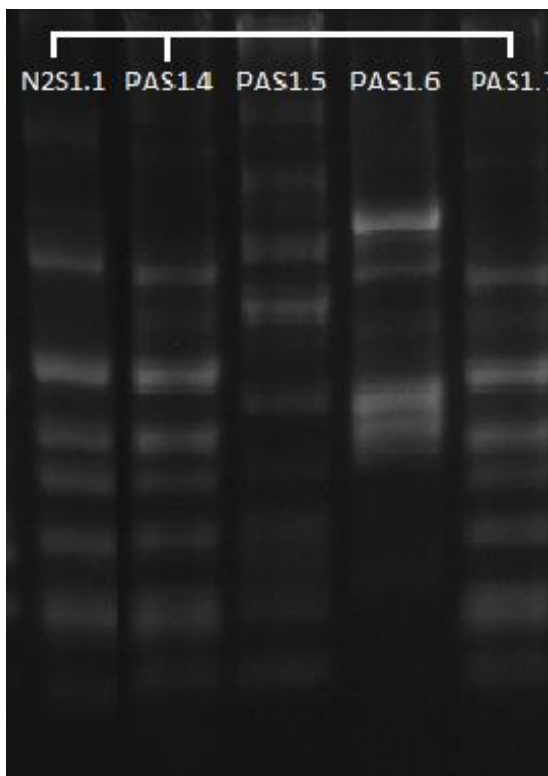
Figura 1. Patrones moleculares de aislados de bacterias *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* obtenidos desde el Fundo los Barriales en la Región de Ñuble, luego de haber realizado un BOX-PCR, en dónde se observan aislados que presentan misma huella genética (líneas blancas superiores).



La diversidad genética observada en los aislados bacterianos puede estar dada por varios mecanismos que promueven variaciones genéticas dentro de las poblaciones

bacterianas, como lo son las mutaciones espontáneas que surgen de las fallas durante la replicación del ADN, la transposición, la recombinación específica de sitio y la adquisición horizontal del ADN (Scortichini *et al.*, 2001). La transposición se va adquiriendo a través de transposones (Tn) que son segmentos de ADN que además de portar la información necesaria para la transposición, contienen genes que pueden codificar diferentes propiedades fenotípicas. Dentro de éstas se destaca la resistencia a ciertos antibióticos. Algunos plásmidos poseen uno o más Tn que portan determinantes de resistencia a antibióticos; la capacidad de estos elementos para transponerse de un plásmido a otro, proporciona a la bacteria gran flexibilidad para desarrollar resistencia (Betancor *et al.*, 2006).

Figura 2. Patrones moleculares obtenidos mediante BOX PCR de aislados de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* obtenidos desde el Fundo Paso Alejo, Región de Ñuble (PAS1.4) y Fundo Bureo, Región del Biobío (N2S1.1), en donde se observan aislados que presentan una misma huella genética (Línea blanca superior).





De los 124 aislados evaluados sólo 33 mostraron similitud y se consideraron haplotipos persistentes dentro de poblaciones de *Xaj* obtenidas de diferentes huertos, mientras dentro de cada huerto se observaron entre 20 y 71 % de aislados con una marcada similitud de bandas de ADN en su huella genética.

En la Tabla 1 se indican el número de cepas bacterianas de *Xaj* obtenidos desde los seis huertos evaluados, que fueron utilizadas en los ensayos de resistencia a antibióticos. La cantidad de cepas utilizadas por huerto en nuestro ensayo fue distinta debido a la cantidad de aislados recolectados por huerto y por la diversidad genética presente en cada huerto muestreado. La mayor diversidad genética se observó en un huerto ubicado en la ciudad de Chillán perteneciente a don Hernán Rodríguez, obteniéndose un 90 % de diversidad genética en los aislados recolectados desde este huerto, en el Fundo Los Barriales se obtuvo la menor diversidad genética de todos los huertos muestreados, obteniéndose un 47 % de diversidad genética en los aislados bacterianos.

Tabla 1. Cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* obtenidas desde yemas de nogal y utilizadas en el ensayo *in vitro* de resistencia a antibióticos por cada huerto luego de haber realizado el análisis de “fingerprint molecular” o huella genética mediante BOX-PCR.

Localidad	Huerto muestreado	Total de cepas	Porcentaje total diversidad genética
Negrete	Fundo Bureo	35	83
Los Angeles	Fundo Corralco	6	54
Coihueco	Hacienda Pullami	16	80
Chillán	Fundo Los Barriales	10	47
Chillán	Sector Paso Alejo	15	75
Chillán	Huerto Hernán Rodríguez	9	90
Total	6 huertos	91	

### Ensayo de resistencia a antibióticos

En la prueba de resistencia a antibióticos se observó diferencias en el desarrollo de las distintas cepas dependiendo del antibiótico evaluado. En la Figura 3 se muestra

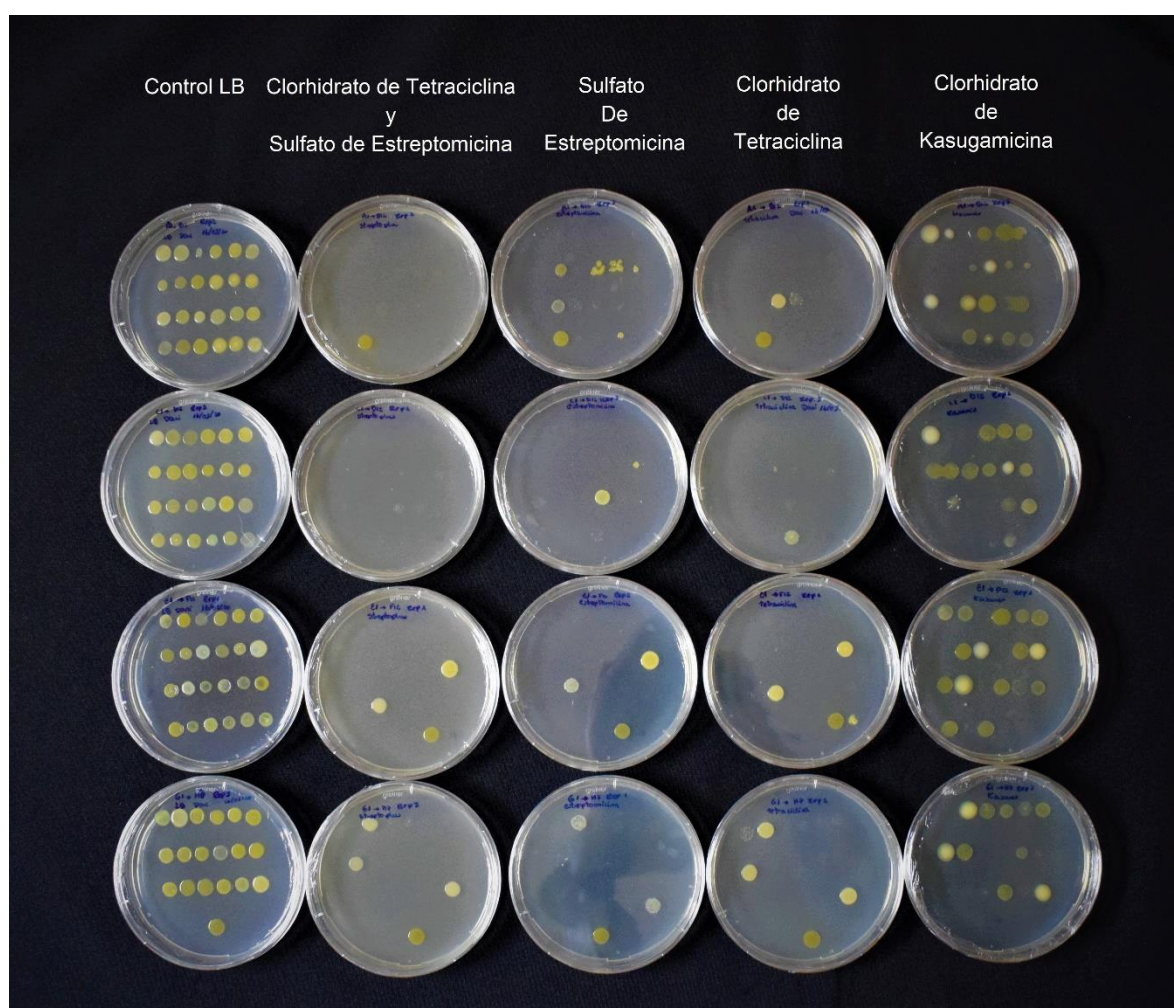
el crecimiento de colonias de las cepas bacterianas expuestas a los distintos antibióticos. Luego que las bacterias se mantuvieran en incubación durante 48 horas, el 100 % de las cepas bacterianas formaron colonia en el tratamiento control (Agar LB), presentando 59 cepas una coloración amarillo intenso característico del género de *Xanthomonas* y otras 32 cepas presentaron un color amarillo menos intenso a las 48 h luego de haber sido incubadas. La coloración de la colonia entre las cepas de los diferentes huertos no fue homogénea, esta heterogeneidad posiblemente se deba a una variabilidad genética reportada por Pérez (2005) en cepas de *Xaj* provenientes de diferentes localidades del valle central de Chile, quien determinó que bacterias expuestas con mayor frecuencia a productos cúpricos modifican su patrón fenotípico en respuesta a la condición de estrés que están sometidas (Auil, 2016). Las cepas aisladas desde los huertos muestreados reciben recurrentes aplicaciones de productos cúpricos (10 a 15 aplicaciones por temporada de crecimiento vegetativo), excepto el huerto de Don Hernán Rodríguez que no recibe ningún tipo de tratamiento para el control de *Xaj*.

En el caso de los tratamientos con antibióticos se observó que el 10,9 % de las cepas crecieron sobre el medio de cultivo suplementado con un producto comercial a base de Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Tetraciclina; un 29,6 % en el medio de cultivo suplementado con Estreptomicina; un 37,3 % en el medio de cultivo suplementado con Tetraciclina y un 67 % en el medio suplementado con el antibiótico comercial a base de Clorhidrato de Kasugamicina del total de las 91 cepas inoculadas.

Algunas cepas disminuyeron su coloración amarillo intenso, a amarillo más claro, esto estaría asociado a que las bacterias ante situaciones de presión selectiva como puede ser la presión a antibióticos, sufren un proceso conocido en inglés como “fitness penalty” o “ajuste de penalidad” que es la penalización de aptitud debida a la pérdida de la función de genes de avirulencia que puede compensarse adquiriendo una nueva capacidad genética que le entrega alguna habilidad adaptativa de supervivencia o reproducción (Leach *et al.*, 2001). Posiblemente, el ajuste de penalidad de las cepas de *Xaj* obtenidos en los distintos huertos estaría asociado a una disminución en la síntesis de pigmento en pos de desarrollar

procesos metabólicos que le permitan sobrevivir en un ambiente con antibióticos al que fueron sometidas. El crecimiento de distintas cepas en los medios con antibióticos demuestra la gran variabilidad de resistencia de las bacterias a los distintos antibióticos evaluados. La resistencia bacteriana, en este caso, sería adquirida ya que aparece en algunas cepas, pudiendo esta resistencia estar dada por mutaciones o por la adquisición de nuevos genes (Oromí, 2000).

Figura 3. Ensayo de resistencia a antibióticos de 91 cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* aisladas a partir de yemas de seis nocedales entre la Región de Ñuble y el Biobío, creciendo en medio Luria Bertani (LB) y medios con diferentes antibióticos.



Las bacterias tienen diferentes mecanismos de acción de sistemas de transferencia de ADN eficaces a un espectro de huéspedes muy amplio y tiene lugar por diferentes mecanismos: la conjugación, implica un contacto físico directo entre bacteria donante y bacteria receptora y por lo cual el plásmido o una secuencia del cromosoma pasa de una a otra; la transformación, por la cual una bacteria llamada «competente» incorpora ADN desnudo, presente en el medio; y la transducción, durante la cual el ADN es transferido a través de un bacteriófago (Embid,1999).

En el Anexo 1 se observa el análisis de conglomerados de resistencia a antibióticos *in vitro*, a partir de este análisis se logró identificar 10 grupos estadísticamente diferentes, de acuerdo a los antibióticos a los cuales presentaron resistencia, agrupando cada cepa bacteriana por el antibiótico en común al cual resultaron ser resistentes, el conglomerado 1 (color negro) incluye todas las cepas bacterianas resistentes a Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Kasugamicina; conglomerado 2 (color rojo) cepas bacterianas resistentes a Clorhidrato de Tetraciclina; conglomerado 3 (color rosado) cepas bacterianas resistentes Sulfato de Estreptomicina, Clorhidrato de Tetraciclina, Clorhidrato de Kasugamicina; conglomerado 4 (color gris) cepas bacterianas resistentes a Sulfato de Estreptomicina, Clorhidrato de Tetraciclina; conglomerado 5 (color amarillo) cepas bacterianas resistentes a Clorhidrato de Tetraciclina, Clorhidrato de Kasugamicina; conglomerado 6 (color azul) cepas bacterianas resistentes a Sulfato de Estreptomicina en conjunto con Clorhidrato de Tetraciclina, Sulfato de Estreptomicina, Clorhidrato de Tetraciclina, Clorhidrato de Kasugamicina; conglomerado 7 (color celeste) cepas bacterianas resistentes a Sulfato de Estreptomicina, Clorhidrato de Tetraciclina y a Sulfato de Estreptomicina en conjunto con Clorhidrato de Tetraciclina; conglomerado 8 (color naranja) cepas bacterianas resistentes a Clorhidrato de Tetraciclina; conglomerado 9 (color morado) cepas bacterianas resistentes a Clorhidrato de Kasugamicina; conglomerado 10 (color verde) cepas bacterianas que no presentaron resistencia a ningún antibiótico utilizado en nuestro ensayo.

En la Tabla 2 se observan los resultados del análisis de conglomerados de las cepas agrupadas en los diferentes conglomerados de acuerdo a los antibióticos al

cual presentaron resistencia. A partir de este análisis se demostró que 20 cepas no presentaron resistencia a ningún antibiótico, siendo solo el 21 % del total de las cepas aisladas. El antibiótico comercial a base de Clorhidrato de Kasugamicina usado en una concentración de  $3,5 \text{ mL L}^{-1}$ , mostró que las cepas bacterianas de *Xaj* fueron menos susceptibles a este antibiótico, obteniéndose un 36 % de resistencia en las cepas aisladas. Cabe recalcar que esta prueba de ensayo de resistencia a antibióticos se realizó con una muestra de producto comercial facilitada por un productor, que pudo estar sometida a condiciones no adecuadas de manejo; como lo es el exceso de calor, contacto directo con radiación solar, periodo de tiempo de almacenaje prolongado, etc. Este antibiótico pertenece al grupo de los aminoglucósidos. Los aminoglucósidos se unen a la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria y pueden bloquear la síntesis de proteínas de dos maneras diferentes: i) se pueden adherir a la subunidad 30S del ribosoma y prevenir que la subunidad 30S se adhiera al RNA mensajero (mRNA), o ii) la presencia del aminoglucósido en el ribosoma podría provocar la lectura errada del mRNA (Cavaliere, 2005).

Un estudio similar realizado con 111 aislamientos bacterianos asociados a bacteriosis en Galupa (*Passiflora edulis* Sims.) y Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg.), incluyendo entre ellos aislados de *Xanthomonas* spp., evaluó la sensibilidad a distintos antibióticos *in vitro*, observándose que el 27,7 % de los aislados de *Xanthomonas* fueron resistentes a Sulfato de Estreptomicina ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), el 57,9 % de los aislados fue resistente a Kasugamicina ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), y el 20 % de los aislados al antibiótico Oxitetraciclina ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Farfán *et al.*, 2014). En nuestro estudio los niveles porcentuales de resistencia a estos antibióticos fueron inferiores a lo reportado, obteniéndose un 3,3 % de resistencia para el antibiótico Sulfato de Estreptomicina, un 36,3 % para el antibiótico Clorhidrato de Kasugamicina y un 2,2 % para el antibiótico Clorhidrato de Tetraciclina.

El antibiótico comercial a base de Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Tetraciclina fue el más susceptible para el control de cepas de *Xaj* y sólo se observó el crecimiento de 10 cepas de 91 sobre las placas que contenían esta mezcla de antibiótico. Sin embargo, hubo 28 cepas que presentaron resistencia a Sulfato de Estreptomicina o al Clorhidrato de Tetraciclina, pero no a la mezcla de ambos

compuestos antibióticos. Esto estaría asociado a que al combinar los dos antibióticos se genera una mayor eficiencia de ambos productos y se potencian dando así como resultado un menor porcentaje de resistencia al ser utilizados en conjunto, ya que el Sulfato de Estreptomicina es un bactericida aminoglucósido que actúa igual que el Clorhidrato de Kasugamicina, inhibiendo la síntesis de proteínas, mientras que el Clorhidrato de Tetraciclina actúa uniéndose a la subunidad 30S del ribosoma, bloqueando la adherencia del RNA de transferencia (tRNA) y su acción es bacteriostática es decir detiene el crecimiento de la población bacteriana (Cavalieri, 2005).

Tabla 2. Cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* obtenidas desde yemas en seis nucedales muestreados que fueron agrupadas en los diferentes conglomerados de acuerdo a los antibióticos al cual presentaron resistencia utilizando el coeficiente de asociación Jaccard.

Conglomerados	Nº de cepas	ET	TT	KS	ET+TT	Porcentaje de resistencia
1	1	X		X		1,1%
2	3	X				3,3%
3	12	X	X	X		13,2%
4	1	X	X			1,0%
5	9		X	X		9,8%
6	6	X	X	X	X	6,6%
7	4	X	X		X	4,3%
8	2		X			2,2%
9	33			X		36,3%
10	20					21,9%
Total	91					100%

\* ET: Sulfato de Estreptomicina (124 mg L<sup>-1</sup>); TT: Clorhidrato de Tetraciclina (16 mg L<sup>-1</sup>); KS: Clorhidrato de Kasugamicina (3,5 mL L<sup>-1</sup>); (ET+TT): Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Tetraciclina (500 mg L<sup>-1</sup>).

En la Tabla 3 se observa la cantidad de cepas bacterianas de cada huerto por separado agrupadas en los distintos antibióticos evaluados al cual presentaron resistencia, dando como resultado que el huerto que presentó mayor resistencia a los antibióticos fue el Fundo Los Barriales (100 %), y además las cepas obtenidas de este huerto presentaron un mayor porcentaje de resistencia al antibiótico Clorhidrato de Kasugamicina de todos los huertos muestreados. En todos se demostró que más de una cepa bacteriana presentó resistencia al antibiótico Clorhidrato de Kasugamicina, incluso el huerto de Don Hernán Rodríguez el cual no recibe aplicaciones en base a productos cúpricos ni en base a antibióticos para el control de la peste negra en nogal. Este hecho sugiere que en Chile habría poblaciones de bacterias con resistencia natural a este antibiótico de reciente ingreso al mercado nacional.

Se observó que la mayor cantidad de cepas bacterianas de *Xaj* fueron susceptibles a la mezcla de antibióticos como el uso de Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Tetraciclina, incluso en huertos que para su control reciben varias aplicaciones de productos cúpricos durante la temporada de producción (12 a 14 aplicaciones) y en ocasiones aplican esta mezcla de antibióticos, lo cual podría estar favoreciendo la selección y aparición de razas resistentes de *Xaj* a cobre (Moya-Elizondo *et al.*, 2018) y también a estos dos antibióticos. Esto es importante, considerando que el uso de esta mezcla logró inhibir al 100 % las bacterias evaluadas (9 cepas) en el huerto que nunca ha utilizado algún tipo de antibiótico y productos cúpricos para su control, como lo es el huerto de Don Hernán Rodríguez. El Sulfato de Estreptomicina, por sí sólo, presentó un adecuado control sobre el crecimiento de cepas de *Xaj*; sin embargo, Polito *et al.* (2002) señalan que la aplicación de estreptomicina durante el periodo de la floración pistilada del nogal aumenta significativamente la caída de los frutos varias semanas después del haber recibido el tratamiento inhibiendo el desarrollo de endospermo y embrión en los óvulos produciendo una reducción de los tubos polínicos en el período de floración. Esta situación implica que el uso del Sulfato de Estreptomicina debe hacerse antes o posterior a la floración del nogal.

Tabla 3. Número de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* obtenidas de yemas de nogal que presentaron resistencia a los distintos antibióticos evaluados de acuerdo al huerto de nogal desde donde fueron obtenidas.

	Fundo Bureo	Fundo Corralco	Huerto Pullami	F. Los Barriales	Paso Alejo	H. Hernán Rodríguez
ET	2	0	1	0	0	0
TT	0	2	0	0	0	0
KS	12	1	5	6	8	1
ET, TT	0	0	1	0	0	0
ET,KS	1	0	0	0	0	0
TT,KS	4	0	1	2	1	1
ET,TT,KS	7	0	2	0	3	0
(ET + TT), ET,TT	2	1	1	0	0	0
(ET + TT),ET,TT,KS	2	1	0	2	1	0
Sin Resistencia	5	1	5	0	2	7
Total cepas	35	6	16	10	15	9

\* ET: Sulfato de Estreptomicina (124 mg L<sup>-1</sup>); TT: Clorhidrato de Tetraciclina (16 mg L<sup>-1</sup>); KS: Clorhidrato de Kasugamicina (3,5 mL L<sup>-1</sup>); (ET+TT): Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Tetraciclina (500 mg L<sup>-1</sup>).

De acuerdo a la lista del código Fungicide Resistance Action Committee (2020), que incluye agentes de control de fitopatógenos ordenados por el patrón de resistencia cruzada y modo de acción, se informa que el Clorhidrato de Kasugamicina tiene un menor potencial de resistencia que el Sulfato de Estreptomicina y el Clorhidrato de Tetraciclina (FRAC, 2022). En este ensayo se observó lo contrario, obteniéndose un mayor potencial de resistencia frente a las cepas de *Xaj*. Cabe recalcar que en



Chile no existe antecedentes de resistencia a los antibióticos utilizados para controlar *Xaj* en el cultivo del nogal, pero en Uruguay hay un reporte asociado a la enfermedad conocida como mancha bacteriana del tomate causada por *Xanthomonas* spp. donde se evaluaron los antibióticos Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Kasugamicina y se determinó que el 35 % de los aislados presentaron resistencia *in vitro* a 100 ppm de Sulfato de Estreptomicina y 23 % a 200 ppm de Clorhidrato de Kasugamicina (Montelongo, 2012). En 1984 un estudio para el control de peste negra del nogal en la comuna de Requínoa evaluó la aplicación de un antibiótico a base de Clorhidrato de Kasugamicina (Kasumin® 2 %) durante tres años donde se observó una posible fitotoxicidad de este producto en nogales apareciendo una pequeña necrosis apical de la hoja en tratamientos con dosis de 400 mL hL<sup>-1</sup> de agua (Pinto de Torres, 1984). Este producto recientemente fue registrado en Chile y está autorizado para el control de esta enfermedad en nogales. Existe la posibilidad que su uso en la década de los 80 haya seleccionado poblaciones resistentes a este ingrediente activo, por lo que su uso debería ser con precaución.

Basado en estos resultados, el productor de nogal debería considerar la realización de un manejo adecuado y racional de los antibióticos para el control de la Peste negra del nogal, teniendo que ser utilizado en instancias puntuales y mezclado con otros bactericidas como por ejemplo sales de cobre para reducir la aparición de cepas resistentes. En el caso del Sulfato de Estreptomicina, debe considerarse que produce aborto de flores, por lo que se necesita elegir los momentos fenológicos adecuados donde hacer la aplicación e ir haciendo una rotación de los ingredientes activos de cada producto utilizado para así evitar la resistencia en el control de *Xaj*. Además, se requiere incorporar nuevas estrategias para el control de la peste negra en nogal, tales como la utilización de bacteriófagos, biocontroladores o inductores de resistencia (Becker *et al.*, 2020), que permitan disminuir la presencia de cepas de *Xaj* con resistencia a antibióticos en huertos que presenten esta problemática.

## **CONCLUSIONES**

1. Poblaciones de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* que habitan las yemas de nogal presentan una marcada diversidad genética y existen haplotipos recurrentes entre huertos de distintas localidades.
2. Cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* presentan resistencia a Clorhidrato de Tetraciclina, Sulfato de Estreptomicina y Clorhidrato de Kasugamicina o la mezclas de estos en poblaciones obtenidas desde yemas de huertos de nogal.
3. Cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* presentan mayor susceptibilidad al uso de mezclas de Clorhidrato de Tetraciclina y Sulfato de Estreptomicina que su uso individual bajo condiciones *in vitro*.

## REFERENCIAS

1. Adaskaveg, J.E., H. Förster, D. Thompson, G. Driver, J. Connell, R. Buchner, T. Prichard, J. Hasey and J. Grant. 2011. Epidemiology and management of walnut blight [en línea]. University of California Cooperative Extension, USA. <<http://ceking.s.ucanr.edu/files/19076.pdf>>. [Consulta: 12 febrero 2019].
2. Auil, P.A. 2016. Determinación de resistencia de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* al ión cobre en huertos comerciales de la Región del Bío-bío y evaluación de nuevas alternativas de control. Memoria de título, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Chillán, Chile.
3. Balzarini, M.G., L. González, E.M. Tablada, F. Casanoves, J.A. Di Rienzo y C.W. Robledo. 2008. InfoStat: software estadístico. Manual del usuario. Versión 2008. Brujas. Córdoba, Argentina.
4. Becker, F.J., C.A. Lopes, M. Rossato, E.A. Moya-Elizondo, D. Sand, S.E. Lindow and J.L. Vanneste. 2020. The plant health, a view from the plant bacteriology. Universidad de Concepción. Chillán, Chile.
5. Betancor, L., M. Gadea y K. Flores. 2006. Genética bacteriana [en línea]. Universidad Pública de Navarra. <<http://cmap.unavarra.es/rid=1NQMWD86S-1N93KN5-R6/GeneticaBacteriana.pdf>>. [Consulta: 12 febrero 2019].
6. Cavalieri, S. 2005. Modos de acción de los antimicrobianos. pp: 3-11 En: M. Coyle (Ed.). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. OPS. Washington D.C., USA.

7. Embid, A. 1999. Resistencia de las bacterias a los antibióticos. *Rev. Med. Complement. Med. Holíst.* (53): 45-59.
8. Farfán, L.M., S.V. Benítez y L.M. Hoyos-Carvajal. 2014. Sensibilidad de bacterias procedentes de pasifloras a antibióticos y productos cúpricos. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 8(1): 20-33.
9. Flores, C.P., S. Seta, M. González, R. Coniglio, S. Sferco y A. Trevizán. 2004. Manejo químico y varietal de nogales frente a bacteriosis del nogal. *Rev. Investig. Fac. Cienc. Agrar. Univ. Nac. Rosario* 4(5): 25-31.
10. FRAC (Switzerland) 2022. Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels) [en línea]. Fungicide Resistance Action Committee, Switzerland. <[https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a_2)>. [Consulta: 14 junio 2022].
11. Guiñazú, L.B., J.A. Andrés, M. Rovera, M. Balzarini and S.B. Rosas. 2013. Evaluation of rhizobacterial isolates from Argentina, Uruguay and Chile for plant growth-promoting characteristics and antagonistic activity towards *Rhizoctonia* sp. and *Macrophomina* sp. *in vitro*. *Eur. J. Soil Biol.* 54: 69-77.
12. Lamichhane, J.R. 2014. *Xanthomonas arboricola* diseases of stone fruit, almond, and walnut trees: progress toward understanding and management. *Plant Dis.* 98(12): 1600-1610.
13. Larragaña, P. y M.A. Osoreo. 2019. Catastro frutícola: Región del Ñuble. Principales resultados / Julio 2019. ODEPA. CIREN. Santiago, Chile.
14. Leach, J.E., C.M. Vera, J. Bai and H. Leung. 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 187-224.
15. Lemus, G. A. Ibacache, B. Pinilla, F. Riveros, G. Sallés, R. Ferreira E., L. Martínez, R. Ruiz, C. Sierra, V. Bianchini, C. Rojas, G. Reginato, A. Albornoz, M. Marin, B. Latorre, E. Gratacos, T. Zaviezo, G. Valdés y J.L. Vial. 2010. Producción de nueces de nogal: para profesionales y técnicos del área agropecuaria. FIA. Santiago, Chile.
16. Marcelletti, S., P. Ferrante y M. Scortichini. 2010. Multilocus sequence typing reveals relevant genetic variation and different evolutionary dynamics among strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Diversity* 2(11): 1205-1222.

17. Millas, P. y A. France. 2017. Peste negra del nogal. Fitopatología - Enfermedades en frutales. Ficha Técnica N°62. INIA Quilamapu. Chillán, Chile.
18. Montelongo, M.J. 2012. Caracterización de *Xanthomonas* spp. causantes de la mancha bacteriana del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Uruguay. Tesis, Magister en Ciencias Agrarias opción Ciencias Vegetales. Universidad de la República, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
19. Moragrega, C. 2012. Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts: *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. J. Plant Pathol. 94(Suppl.1): S1.155-S1.159.
20. Moya-Elizondo, E., P. Auil, P. Oyarzúa y M. Gerding. 2018. Resistencia al ión cobre de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nokedales de la Región del Biobío. Chilean J. Agric. Anim. Sci. 34(1): 3-11.
21. Muncharaz, M. 2000. El nogal: Técnicas de cultivo para la producción frutal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
22. Ninot, A., N. Aletà, C. Moragrega and E. Montesinos. 2002. Evaluation of a reduced copper spraying program to control bacterial blight of walnut. Plant Dis. 86(6): 583-587.
23. Oromí Durich, J. 2000. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Med. Integral 36(10): 367-369.
24. Pérez, I.E. 2005. Determinación de la variabilidad genética de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tesis, Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Escuela de Agronomía. Santiago, Chile.
25. Pinto de Torres, A., I. Carreño y L. Romero. 1984. Kasumin: Un nuevo producto para el control de la <<peste negra>> en nogales. Investigación y Progreso Agropecuario La Platina N°23. INIA La Platina. Santiago, Chile.
26. Pinto de Torres, A. e I. Carreño. 1988. Control químico de peste negra del nogal. Agric. Téc. (Chile) 48(3): 258-261.
27. Polito, V.S., K. Pinney, R. Buchner and W. Olson. 2002. Streptomycin applications to control walnut blight disease can prevent fertilization and increase fruit drop. HortScience 37(6): 940-942.

28. Reginato, G., A. Albornoz y K. Mesa. 2005. Evaluación fenológica del nogal en la zona central de Chile: Temporada 2004 - 2005. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile.
29. Retamales, J., R. Alvarado y P. Núñez. 2017a. Consideraciones en el control de enfermedades infecciosas: Manejo biológico de peste negra del nogal [en línea]. RedAgrícola, Chile. <<http://www.redagricola.com/cl/manejo-biologico-pestes-negra-del-nogal-consideraciones-control-enfermedades-infecciosas/>>. [Consulta: 14 febrero 2022].
30. Retamales, J., C. Segovia, R. Alvarado, P. Nuñez and J. Santander. 2017b. Draft genome sequence of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* J303, isolated from infected walnut trees in southern Chile. Genome Announcements 5(39). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01085-17> [en línea].
31. Scortichini, M., U. Marches and P. Di Prospero. 2001. Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *juglandis*; *X. juglandis* pv. *juglandis*) strains from different geographical areas shown by repetitive polymerase chain reaction genomic fingerprinting. J. Phytopathol.149(6): 325-332.
32. Shami, M., A. Ghasemi, A.A. Ali-Abadi and A. Eskandari. 2013. Genetic diversity and phylogenetic study of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* the causal agent of walnut bacterial blight disease. J. Nuts 4(4): 57-62.
33. Soto, S. y P. Rebufel. 2021. Peste negra en nogal orgánico. Ficha Técnica N°158. INIA La Cruz. La Cruz, Chile.
34. Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45(3): 472-489.
35. Versalovic, J., M. Schneider, F.J. de Bruijn and J.R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Mol. Cell. Biol. 5(1): 25-40.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis de conglomerados de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en base a los antibióticos a los cuales presentaron resistencia, de acuerdo al coeficiente de asociación de Jaccard.

