



Revista Industrial
y Agrícola de
Tucumán

ISSN 0370-5404

En línea
1851-3018

Tomo 101 (1):
23-32; 2024



ESTACION EXPERIMENTAL
AGROINDUSTRIAL
OBISPO COLOMBRES
Tucumán | Argentina

Av. William Cross 3150
T4101XAC - Las Talitas.
Tucumán, Argentina.

Ausencia de la bacteria *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*, causante de la cancrrosis tipo B, en frutos cítricos del Noroeste Argentino

M. Eugenia Acosta*, C. Valeria Martínez*, José E. Galindez* y Gabriela M. Fogliata*

*Sección Fitopatología, EEAOC. Email: meacosta@eeaoc.org.ar

RESUMEN

La cancrrosis tipo B (*Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*) se reportó en la región del litoral, Argentina, en 1927, donde -con infecciones esporádicas- sólo fue importante en frutos de limón. La introducción de la cancrrosis tipo A (1974), causada por *Xanthomonas citri* pv. *citri*, patotipo más agresivo de la bacteria, hizo que el tipo B desapareciera entre los años 1978 y 1990. En el Noroeste Argentino (NOA), se detectó la cancrrosis tipo A en el año 2002 y no se encontraron reportes que evidenciaron la presencia de la cancrrosis tipo B. La Dirección de Información Estratégica Fitosanitaria (DIEF), perteneciente al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (Senasa), considera que la cancrrosis B está ausente en el país y así lo reconocen los principales países adonde se exportan frutos cítricos argentinos, excepto China, que la incluyó entre las plagas de preocupación para el comercio de cítricos. Debido a la presencia de cancrrosis tipo A en el NOA y a que ambos patotipos producen síntomas similares, nuestros objetivos fueron determinar la condición de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* (cancrrosis tipo B) en el NOA y validar técnicas moleculares de alta especificidad y sensibilidad que permitan diferenciar ambos patotipos. Para el patotipo B, se ajustó y validó la PCR convencional con una sensibilidad de 1×10^5 UFC/ml, a partir de colonias puras. Para el patotipo A, se ajustó y validó la PCR en tiempo real (qPCR) con una sensibilidad de 1×10^2 UFC/ml, utilizando colonias puras de la bacteria. Se analizaron 839 muestras de frutos cítricos de Tucumán, Salta y Jujuy para el patotipo B. El 20% de las mismas fueron analizadas además para el patotipo A. No se detectó la presencia del patotipo B en la totalidad de las muestras cítricas analizadas, y el 20% analizado con qPCRs resultó positivo para el patotipo A. Los resultados del presente estudio son una evidencia de la ausencia de la cancrrosis tipo B en frutos cítricos del NOA y confirman que la cancrrosis presente corresponde al patotipo A. Las técnicas moleculares ajustadas y validadas constituyen una herramienta para el diagnóstico específico, sensible y rápido de cancrrosis, ante la presencia de síntomas sospechosos de la enfermedad en frutos cítricos destinados a la exportación hacia países con restricciones cuarentenarias.

Palabras clave: enfermedad bacteriana, diagnóstico molecular, patotipo.

ABSTRACT

Absence of *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*, causing B-type citrus canker, in citrus fruits from Northwestern Argentina

The B-type citrus canker was reported in 1927 in the Northeast of Argentina and it was important only in lemon fruit with sporadic infections. In 1974 the introduction of the more aggressive A-type citrus canker (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) caused the disappearance of the B-type between 1978 and 1990. In the Northwest of Argentina, the A-type citrus canker was detected in 2002 and no reports were found that prove the presence of the B-type citrus canker. The Dirección de Información Estratégica Fitosanitaria (DIEF), belonging to the Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria of Argentina (Senasa) considers that canker B is absent in the country and this is recognized by the main countries to which Argentine citrus fruits are exported, except China, which included it among the pests of concern for the citrus trade. Due to the presence of canker A in the NOA and that both pathotypes produce similar symptoms, our objectives were to determine *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* (canker B) condition in the NOA region, and to

Fecha de
recepción:
10/04/2024

Fecha de
aceptación:
22/07/2024

validate highly specific and sensitive molecular techniques that allow the differentiation of both pathotypes. For pathotype B, conventional PCR was adjusted and validated with a sensitivity of 1×10^5 CFU/ml from the pure colonies. For pathotype A, real-time PCR (qPCR) was adjusted and validated with a sensitivity of 1×10^2 CFU/ml, using colonies. A total of 839 samples of citrus fruits from Tucumán, Salta and Jujuy were analyzed for pathotype B, and the 20% of them were also analyzed for pathotype A. The presence of pathotype B was not detected in all of the citrus samples analyzed, and the 20% analyzed with qPCRs were positive for pathotype A. The results of the present study are evidence of the absence of type B canker in citrus fruits from the NOA and confirm that the canker present corresponds to pathotype A. The adjusted and validated molecular techniques constitute a tool for the specific, sensitive and rapid diagnosis of canker in the presence of suspicious symptoms of the disease in citrus fruits destined for export to countries with quarantine restrictions.

Key words: bacterial disease, molecular diagnostic, pathotype.

■ INTRODUCCIÓN

La cancrrosis de los cítricos es una enfermedad causada por la bacteria *Xanthomonas citri*, la cual presenta diferentes patotipos. Las cepas de *Xanthomonas* patógenas para los cítricos se han reclasificado como especies distintas y difieren en rango de hospedantes e importancia económica. El patotipo A causa la cancrrosis tipo A o asiática, que es la más agresiva y ampliamente distribuida a nivel mundial. Este patógeno ha sido reclasificado como *X. citri* pv. *citri* (sinónimos *X. citri* subsp. *citri* o *X. axonopodis* pv. *citri*) (Stall *et al.*, 1981; Vauterin *et al.*, 1990; 1995). Se han identificado cepas atípicas de *X. citri* subsp. *citri*, denominadas cepas A* y A^v, reportadas en Asia y en Florida, EE.UU., respectivamente (Vernière *et al.*, 1998; EFSA PLH Panel, 2014). El patotipo B corresponde a *X. citri* pv. *aurantifolii* (sinónimo *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*), agente causal de la cancrrosis tipo B o sudamericana, que fue descrita en Argentina como falsa cancrrosis en 1927-1929 en la región del Noreste Argentino (NEA), en las provincias de Corrientes y Entre Ríos (Schaad *et al.*, 2005). El patotipo B también fue reportado en Paraguay y Uruguay (Gottwald, 2000) y comparte el mismo nombre con el patotipo C, agente causal de la cancrrosis tipo C o de lima, que sólo fue reportada en Brasil (Stall *et al.*, 1981; Stall and Civerolo, 1991).

En la Argentina, la cancrrosis de los cítricos fue reportada por primera vez en 1928 en el litoral, correspondiendo al tipo B, que debido a su baja agresividad no se dispersó a otras áreas y desapareció entre los años 1978 y 1990 con la introducción en 1974 de la cancrrosis tipo A, que es más agresiva (Goto *et al.*, 1980; Canteros de Eche- nique *et al.*, 1985). A partir de ese momento la enfermedad se volvió endémica en la región del NEA, luego de que fallaran los intentos de erradicación (Canteros *et al.*, 2017).

En el Noroeste Argentino (NOA), se reportó la cancrrosis tipo A en el año 2002, inicialmente en dos focos, uno al norte de Salta y otro en la provincia de Tucumán (Ramallo *et al.*, 2005); y no se encontraron reportes que mencionen la presencia del patotipo B.

La Dirección de Información Estratégica Fitosanitaria (DIEF), perteneciente al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Argentina (Senasa), considera que la cancrrosis A está presente en el país y que la cancrrosis B está ausente, tal como lo informa en su portal del

Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SI-NAVIMO) y así lo reconocen los principales países adonde se exportan frutos cítricos argentinos, excepto China, que incluyó a la cancrrosis B entre las plagas de preocupación para el comercio de cítricos.

La importancia de la cancrrosis para la Argentina es la restricción a la exportación de frutas cítricas hacia los principales mercados de destino, como ser la Unión Europea (UE), donde está ausente, y los EE.UU., donde está presente aunque bajo control oficial. Para estos mercados, en caso de detectar síntomas sospechosos en etapas previas a la exportación, existen procedimientos a seguir que incluyen análisis para identificar la bacteria causante de la enfermedad. Estos análisis no diferencian los patotipos de la bacteria, lo cual no es un inconveniente ya que todos ellos son cuarentenarios en dichos territorios.

Para la exportación de fruta cítrica a China, mercado de reciente apertura y con potencial de crecimiento, los frutos deben estar libres de cancrrosis tipo B, ya que para dicho mercado solo es cuarentenario el patotipo B (Senasa, 2004). A tal efecto se requiere disponer de un procedimiento que pueda diferenciar el patotipo B del patotipo A.

La observación de sintomatología no contribuye a la diferenciación de los patotipos presentes, ya que estos producen síntomas similares, visualmente indistinguibles.

Si bien se han desarrollado varias técnicas de diagnóstico basadas en PCR para la identificación de cepas de cancrrosis de los cítricos aisladas en medio de cultivo y de extractos de lesiones en hojas y frutos (Egel *et al.*, 1991; Cubero and Graham, 2002, 2005; Cubero *et al.*, 2001; Rademaker *et al.*, 2005; Coletta-Filho *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2015), sus cebadores no permiten distinguir o detectar todos los patotipos de *Xanthomonas* que afectan a los cítricos. Los análisis para patotipos específicos son escasos, como ser los desarrollados por Hartung *et al.* (1993) que sólo detecta el patotipo A; y Fonseca *et al.* (2019), que permitiría diferenciar el patotipo A del B.

En este escenario de restricciones a la exportación de fruta cítrica argentina hacia China -la falta de estudios del patotipo B en el NOA, y el hecho de no disponer hasta el presente de un procedimiento que diferen-

cie ambos patotipos-, nuestro objetivo fue determinar la condición de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* (cancrosis B) en el NOA, previo al ajuste y validación de técnicas moleculares específicas para diferenciar los patotipos A y B.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras cítricas

Personal de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) recolectaron muestras de frutos de limón en la provincia de Tucumán. La distribución porcentual de las mismas por departamento fue establecida según la superficie implantada en cada uno. Para ello, se tuvieron en cuenta los datos de la campaña 2022, que indican un total de 47.310 ha, distribuidas en 11 departamentos, siendo Burruyacú el de mayor cantidad cultivada de la provincia con un 34,2%; seguido de Tafí Viejo con 10,9%; Famaillá y Monteros con 9,6% y 9,1% respectivamente; luego Chicligasta con 8,1%; La Cocha con 7,4% y finalmente Lules, Cruz Alta, Juan Bautista Alberdi, Río Chico y Yerba Buena, con porcentajes menores entre 5,3% a 2,9% (Carreras Baldrés *et al.*, 2022).

Además, en el Laboratorio de la Sección Fitopatología de la EEAOC se recibieron muestras cítricas remitidas por Senasa que provenían de las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy. El número de muestras a analizar fue establecido por la DIFEF según el programa RiBESS+ en EFSA statistical models.

Todas las muestras de frutos cítricos recolectadas y recibidas presentaban síntomas característicos de cancrrosis.

Extracción de ADN

Previo al procesamiento de las muestras, se realizó la extracción de ADN de aislados de *Xanthomonas* spp., que fueron usados como testigos para el ajuste de las técnicas moleculares (Tabla 1).

Para la extracción de ADN de los aislados bacterianos, se siguieron las metodologías descriptas por Robène *et al.* (2020) con algunas modificaciones:

• **Shock térmico de suspensión bacteriana:** se preparó una suspensión bacteriana (1×10^8 UFC/ml) mi-

diendo la densidad óptica (DO) a 600 nm en espectrofotómetro (GeneQuant pro) a partir de un cultivo puro de la bacteria, de 24 h de crecimiento en medio líquido Luria Bertani (LB) cuya composición es: bacto triptona 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l. En un microtubo de 1,5 ml se colocó 1 ml de la suspensión 1×10^8 UFC/ml y se incubó durante 2 min a 95°C en baño térmico y posteriormente se almacenó en el freezer.

• **Extracción con kit de comercial de suspensión bacteriana mezclada con tejido vegetal cítrico:** se pesó 0,1 g de cáscara sana de limón, previamente desinfectado con etanol 96°. Se colocó en una bolsa de extracción de ADN (Bioreba) y se agregaron 10 ml de buffer TRIS-HCl (10 mM pH 7,2). Se maceró el material vegetal con homogeneizador de tejidos (Homex 6, Bioreba AG) y posteriormente se recuperó el macerado de tejido vegetal que fue utilizado para preparar la mezcla con la suspensión bacteriana.

A partir de un cultivo puro de la bacteria de 24 h de crecimiento en LB líquido, se preparó una suspensión bacteriana (1×10^9 UFC/ml) a una DO a 600 nm. A partir de la suspensión concentrada y utilizando el macerado de tejido vegetal, se preparó otra suspensión de concentración 1×10^8 UFC/ml, la cual fue identificada como XccT 10^8 . Posteriormente, para la extracción de ADN se siguieron las instrucciones del manual de uso del kit de extracción comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega).

Para las muestras cítricas de campo se realizó la extracción de ADN directamente a partir de una lesión de cancrrosis presente en el fruto. Se desinfectó la superficie del fruto con etanol 96° y se extrajo la lesión con bisturí que fue cortada en cuatro porciones y colocadas en microtubo de 1,5 ml. Se agregaron 125 µl de buffer de homogenización (buffer PBS 0,02 M: tween 20 0,5%; polivinilpirrolidona 2,0%; albúmina de suero bovina 0,2%), y se dejó difundir 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente para la extracción de ADN se siguieron las instrucciones del manual de uso del kit de extracción comercial Wizard Genomic DNA Purification.

La calidad e integridad del ADN genómico obtenido fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, seguida por tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y visualizada bajo luz UV (Sambrook *et al.*, 1989). La cantidad se estimó por comparación con un ADN de concentración conocida utilizado como patrón.

Tabla 1. Datos de los aislados de *Xanthomonas* spp. utilizados en el ajuste de las diferentes técnicas moleculares, Sección Fitopatología, EEAOC.

Especies de <i>Xanthomonas</i>	Identificación	Origen geográfico	Hospedero	Aislado por:	Conservado en:
<i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> , patotipo B	FDC 1561 (IBSBF 409)	Entre Ríos, Argentina	<i>Citrus limon</i>	D. Zagory	Fundecitrus, Araraquara, Brasil
	FDC 1565 (IBSBF 1583)	Entre Ríos, Argentina (1990)	<i>Citrus limon</i>	B.I. Canteros	
	FDC 1631 (11122)	Entre Ríos, Argentina (1994)	<i>Citrus limon</i>	Sin dato	
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> , patotipo A	Xcc 1 col	Tucumán, Argentina	<i>Citrus limon</i>	C. V. Martínez	EEAOC, Tucumán, Argentina
	Xcc 2 col	Tucumán, Argentina	<i>Citrus limon</i>	C. V. Martínez	
	XccT 10^8	Tucumán, Argentina	<i>Citrus limon</i>	C. V. Martínez	
<i>X. albilineans</i>	2 y 3	Tucumán, Argentina	<i>Saccharum officinarum</i>	R. P. Bertani	EEAOC, Tucumán, Argentina
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	510-2	Tucumán, Argentina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	S. Mamani	

Identificación del patotipo de *Xanthomonas citri* por técnicas moleculares

• PCR para el patotipo B

Para la puesta a punto de la PCR específica de *X. citri* pv. *aurantifolia* se siguió el trabajo de Fonseca *et al.* (2019). Se llevaron a cabo reacciones en un volumen final de 25 µl, conteniendo 2,0 mM de MgCl₂; 1x buffer Taq (Invitrogen); 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada cebador; 1,25 U/µl de Taq polimerasa; 1 µl de ADN genómico (entre 50 y 100 ng) y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final. La amplificación fue realizada con los cebadores XauBm F (5'-TCGATCGCACGGACTACTTG-3') y XauBm R (5'-AAAATGCGGCTCTCCCTCTC-3') que amplifican parte de un gen de una proteína hipotética (434 pb). El programa de amplificación empleado en el equipo MiniAmp Plus Thermal Cyclor (Applied Biosystems) fue: 3 min de desnaturalización inicial a 94°C; seguida de 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 59°C, 45 s a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. Como controles positivos se utilizaron muestras de ADN de *X. citri* pv. *aurantifolia*, identificados como FDC 1561, FDC 1565 y FDC 1631. Como controles negativos se utilizaron la mezcla de reactivos sin la adición de ADN "NTC" (*No Template Control*, por sus siglas en inglés) y ADN extraído de suspensión bacteriana del patotipo A (Xcc 1 col.).

Para evaluar la especificidad de la técnica se utilizaron muestras de ADN de diferentes patógenos aislados de cítricos pertenecientes al Laboratorio de Fitopatología, como así también de otras especies de *Xanthomonas* que afectan a otros cultivos: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (HLB), *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (CVC), *Phomopsis citri* (melanosis), *Elsinoe* sp. (sarna de los cítricos), *Phyllosticta citricarpa* (mancha negra de los cítricos) y *Colletotrichum* sp. (antracnosis), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (bacteriosis común del poroto) y *X. albilineans* (escaldadura de la hoja en caña de azúcar).

Se determinó el límite de detección (LD) a partir de ADN bacteriano del patotipo B; para ello, se realizaron diluciones seriales 1:10, de 1x10⁸ UFC/ml hasta 1 UFC/ml del control positivo (FDC 1565).

• PCR cuantitativo en tiempo real para el patotipo A

Para la detección específica de *X. citri* pv. *citri*, patotipo A, se realizó la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) con los cebadores J-RTp3 (5'-ACCGTCCCTACTTCAACTCAA-3'), J-RTp4 (5'-CGCACCTC-GAACGATTGC-3') y sonda TaqMan J-Taqp2 (5'-6-FAM/ATGCGCCAGCCCAACGC-/TAMRA-3') (sonda Xcc) según Cubero and Graham (2005) con algunas modificaciones. Se agregó un juego de cebador-sonda, COXf (5'-GTATGCCACGTCGCATTCCAGA-3'), COXr (5'-GCCA-AACTGCTAAGGGCATTC-3') y COXp (5'-HEX/ATCCA-GATGCTTACGCTGG/BHQ-2A-3') que amplifica para la citocromo oxidasa vegetal (COX, por sus siglas en inglés) como control interno para evaluar la calidad y cantidad de los ADN extraídos (Li *et al.*, 2006). Para la optimización de la qPCR se evaluaron diferentes concentraciones de: sondas Xcc y COXp a 100, 120, 140, 160, 180 y 200 nM; cebadores J-RTp3/J-RTp4 y COXf/COXr a 150, 200, 250, 300, 350 y 400 nM. Asimismo, diferentes cantidades de ADN (1 µl, 2 µl y 5 µl de ADN puro) y diferentes

temperaturas de "annealing" fueron consideradas usando el termociclador C1000 Thermal Cyclor/CFX96 Real Time System (Bio Rad).

Se llevaron a cabo reacciones en un volumen final de 25 µl, conteniendo Premix Ex Taq (Takara) (1x), sondas, cebadores, ADN y agua libre de nucleasas, hasta completar el volumen final. Como controles positivos se utilizaron muestras de ADN de *X. citri* pv. *citri*, patotipo A, identificadas como Xcc 1 col., Xcc 2 col. y XccT 10⁸. Como controles negativos se utilizaron la mezcla de reactivos sin la adición de ADN "NTC" y ADN extraído de tejido vegetal cítrico sano.

Para determinar la especificidad de la qPCR se utilizaron como controles negativos ADN de *X. citri* pv. *aurantifolia* (patotipo B) y ADN de diferentes patógenos aislados de cítricos, incluyendo otras especies de *Xanthomonas* que afectan otros cultivos: *Ca. L. asiaticus* (HLB), *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (CVC), *P. citri* (melanosis), *Elsinoe* sp. (sarna de los cítricos), *P. citricarpa* (mancha negra de los cítricos), *Colletotrichum* sp. (antracnosis), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (bacteriosis común del poroto) y *X. albilineans* (escaldadura de la hoja en caña de azúcar).

• Curva de calibración de qPCR con sonda TaqMan

Para determinar si las condiciones de la qPCR fueron las óptimas, se realizó una curva de calibración a partir de ADN patotipo A (XccT 10⁸). Se realizaron diluciones seriales 1:10, de 1x10⁸ UFC/ml hasta 1 UFC/ml, y se calculó la eficiencia de la reacción. Cada dilución fue sembrada por triplicado.

Asimismo, para determinar el límite de detección (LD) de la qPCR, se realizaron diluciones seriadas 1/10 de una muestra de ADN extraído a partir de una lesión (1x10⁸ UFC/ml) previamente cuantificada. Cada dilución fue sembrada por triplicado.

• Análisis de muestras de campo

Para poder identificar el patotipo de *Xanthomonas citri* presente en las muestras de frutos cítricos de las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy, se analizaron los ADN extraídos mediante PCR específica para la detección de *X. citri* pv. *aurantifolia*, patotipo B.

En cada reacción se utilizó como control positivo de amplificación ADN de *X. citri* pv. *aurantifolia* (FDC 1565); como controles negativos se utilizaron un "NTC", ADN del patotipo A (Xcc 2 col.) y de *X. albilineans* 3. Los resultados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y se visualizaron con luz UV luego de la tinción con bromuro de etidio. Finalmente, se seleccionaron al azar el 20% de las muestras, con resultado negativo para el patotipo B, que fueron analizadas por qPCR para confirmar la presencia del patotipo A.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recolección de muestras cítricas

Durante el monitoreo correspondiente a la campaña 2022 se recolectaron 155 muestras de frutos de limón, provenientes de 11 departamentos de la provincia de Tucumán. De las cuales 41 muestras pertenecían al

departamento Burruyacú, 18 a Tafí Viejo, 14 a Famaillá, 14 a Monteros, 14 a Cruz Alta, 11 a J. B. Alberdi, 10 a Chicligasta, 10 a La Cocha, 10 a Lules, 9 a Yerba Buena y 4 a Río Chico.

Adicionalmente, 684 muestras cítricas fueron remitidas por Senasa (que incluyeron frutos de limón, naranja, mandarina y pomelo). De ellas, 507 pertenecieron a la provincia de Tucumán, 268 muestras del departamento Burruyacú, 56 de Tafí Viejo, 55 de Juan Bautista Alberdi, 40 de Famaillá, 36 de Chicligasta, 16 de La Cocha, 12 de Lules, 9 de Yerba Buena, 8 de Río Chico, 5 de Cruz Alta y 2 de San Miguel de Tucumán. De Salta, 169 muestras cítricas donde 99 pertenecían al departamento Anta, 65 de Orán, 5 de Metán; y 8 muestras de la provincia de Jujuy, 5 del departamento Santa Bárbara y 3 de Ledesma.

Los frutos cítricos presentaban lesiones de cancrrosis de 2 a 5 mm de diámetro, consistencia corchosa,

algunas con presencia de un halo aceitoso, con apariencia característica de la enfermedad (Figura 1).

Extracción de ADN

Con las dos metodologías empleadas se logró obtener ADN a partir de la suspensión bacteriana de tres aislados del patotipo B, tres aislados del patotipo A, dos aislados de *X. albilineans* y uno de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Se obtuvieron muestras de ADN de un total de 839 lesiones de cancrrosis extraídas de los frutos cítricos. El ADN extraído, usando el kit de extracción comercial, resultó de buena calidad e integridad, según los fragmentos visualizados en gel de agarosa al 1% (Figura 2). Las cantidades de ADN obtenidas oscilaron entre 100 y 500 ng/μl.

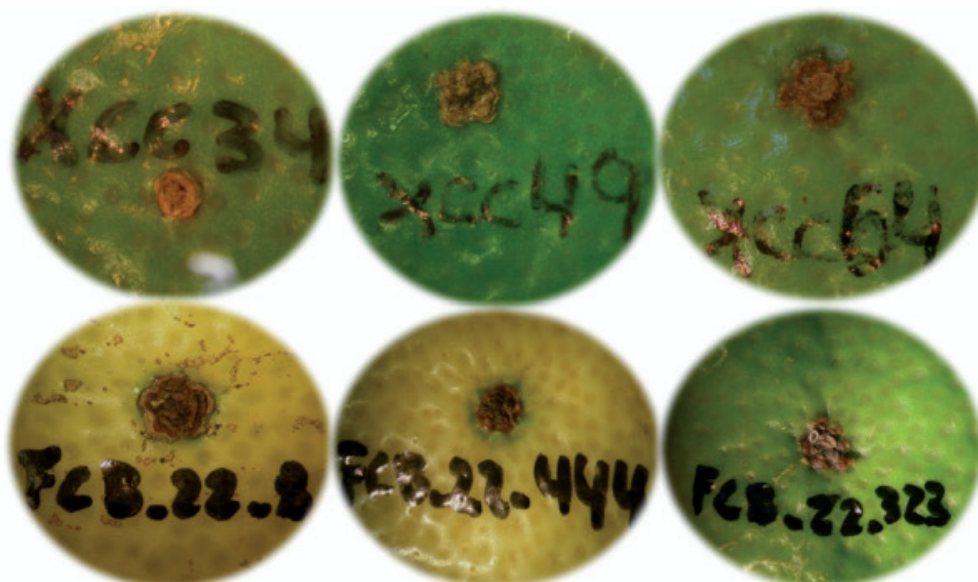


Figura 1. Síntomas de cancrrosis en frutos cítricos provenientes de las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy, campaña 2022. Sección Fitopatología, EEAOC.

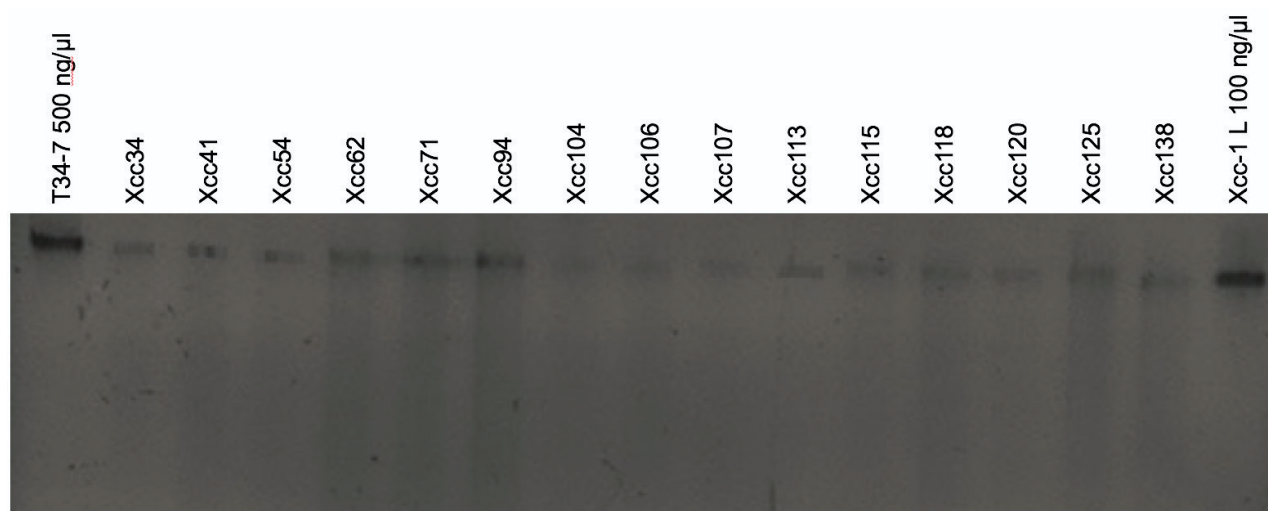


Figura 2. Fragmentos de ADN extraídos de las lesiones de cancrrosis visualizados en gel de agarosa 1%, Sección Fitopatología, EEAOC.

Identificación del patotipo de *Xanthomonas citri* por técnicas moleculares

• PCR para el patotipo B

Las reacciones de PCR específica de Fonseca *et al.* (2019) lograron amplificar un único fragmento de ADN de aproximadamente 434 pb en el control positivo de *X. citri* pv. *aurantifolii*. El LD de la PCR para identificar el patotipo B fue de 1×10^5 UFC/ml (Figura 3). La técnica mostró especificidad al no amplificar fragmentos de ADN en la muestra del patotipo A (Xcc 1 col.), ni en los controles negativos como ser *Ca. L. asiaticus* (HLB), *X. fastidiosa* subsp. *paucis* (CVC), *P. citri* (melanosis), *Elsinoe* sp. (sarna), *P. citricarpa* (M negra), *Phomopsis citri* y *Colletotrichum* sp., *X. axonopodis* pv. *phaseoli* y *X. albilineans* 2, ni en el NTC (Figura 3).

La técnica de PCR desarrollada por Fonseca *et al.* (2019) resultó accesible y económica, y permitió obtener buena calidad de análisis. El ajuste y validación de la técnica de PCR para diferenciar el patotipo B del A se realizó sin mayores inconvenientes. La sensibilidad de la PCR con un LD de 1×10^5 UFC/ml fue similar al obtenido por Fonseca *et al.* (2019), donde su LD fue de $1,5 \times 10^5$ UFC/ml. Otra ventaja de la técnica es que permite la detección de todos los patotipos en la misma reacción de PCR (PCR multiplex), donde una muestra puede ser sometida a una reacción de PCR con todos los cebadores, reduciendo el tiempo de obtención del resultado, lo cual no fue evaluado en el presente trabajo.

• PCR cuantitativo en tiempo real para el patotipo A

El ajuste, optimización y validación de la qPCR desarrollada por Cubero and Graham (2005) permitió detectar en forma específica al patotipo A. Las condiciones óptimas de la reacción fueron logradas al adicionar 1 μ l de ADN a la mezcla constituida por la solución de Premix Ex Taq (Takara) (1x); cebadores J-RTph3, J-RTph4 y

COXf/r (400 nM); sondas Xcc (160 nM) y COXp (140 nM) y agua libre de nucleasas, con un volumen final de 25 μ l. El programa de amplificación ajustado consistió de un ciclo inicial a 95°C por 10 min, seguido de 41 ciclos a 95°C por 15 s y 58,6°C a 30 s (hibridación y extensión).

La eficiencia de la reacción fue de 98% con una pendiente de -3,370. La precisión del ensayo fue alta ($R^2=0,999$) en las diluciones del control positivo estándar realizadas basadas en el análisis de regresión lineal. El valor de fluorescencia fue de 10.998, con un umbral de 864,518 (Figura 4). La técnica de qPCR mostró ser específica para detectar *X. citri* pv. *citri* (patotipo A) ya que no hubo amplificación en ninguno de los controles negativos utilizados. Según el trabajo de Cubero and Graham (2005), el diseño de los cebadores fue a partir del gen *pth*, el cual está presente en otras *Xanthomonas* spp, pero se basaron en resultados previos obtenidos con cepas de los patotipos A, A^w, A*, B y C; y también con *X. axonopodis* pv. *citrumelo* (Cubero and Graham, 2002). Si bien los autores reportaron que la técnica es específica para detectar la bacteria causante de la canchro de los cítricos, cualquiera fuese su patotipo, en el presente trabajo solo se pudo detectar al patotipo A, los controles correspondientes al patotipo B no produjeron curvas de amplificación.

La reacción usando diluciones del ADN de la lesión cuantificada mostró alta sensibilidad. El LD de la qPCR fue de 1×10^2 UFC/ml, correspondiendo a un ciclo umbral Ct (por sus siglas en inglés-cycle threshold) promedio de 34,98. El valor de fluorescencia fue de 9.901, con un umbral de 554,667 (Figura 5).

Los coeficientes de correlación de la curva de calibración indicaron una fuerte relación entre la concentración de la bacteria y el Ct en la reacción. Además, la eficiencia de amplificación fue alta en un amplio rango de concentración de la bacteria, arrojando un LD de 1×10^2 UFC/ml, demostrando su alta sensibilidad. El agregado de un juego de cebador-sonda que amplifica para el COX, permitió una ventaja adicional para poder evaluar la cali-

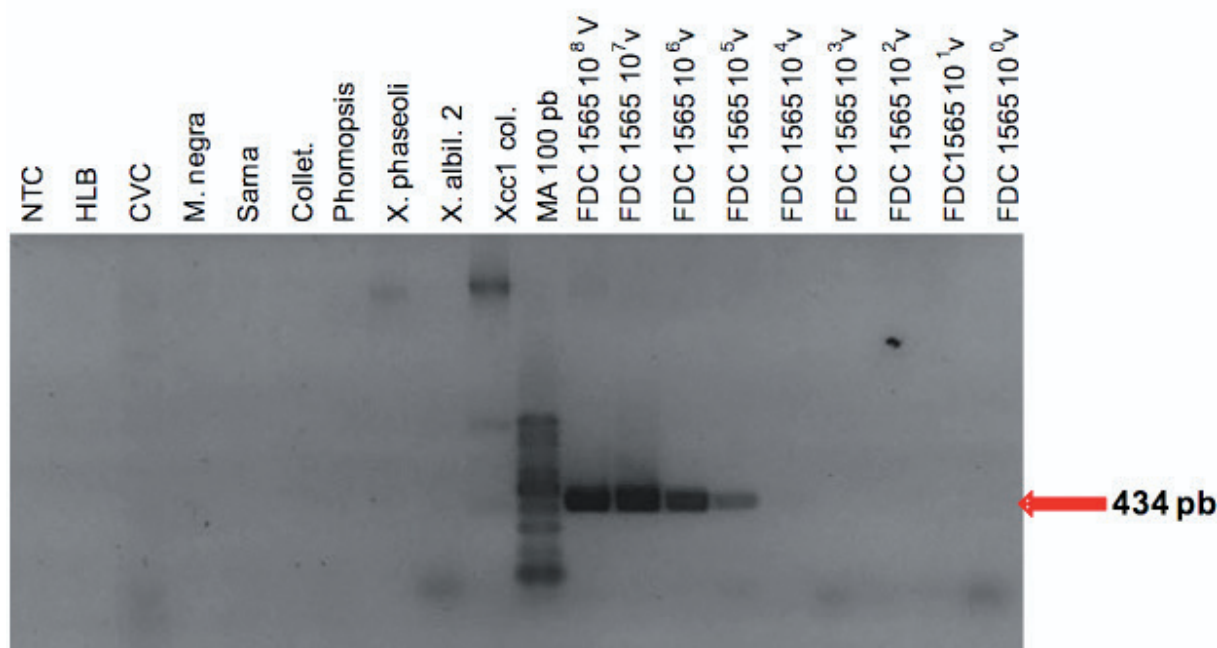


Figura 3. Fragmentos de ADN obtenidos con los cebadores XauBm F/XauBm R en gel de agarosa 1,5%. LD de *X. citri* pv. *aurantifolii* y controles negativos, Sección Fitopatología, EEAOC.

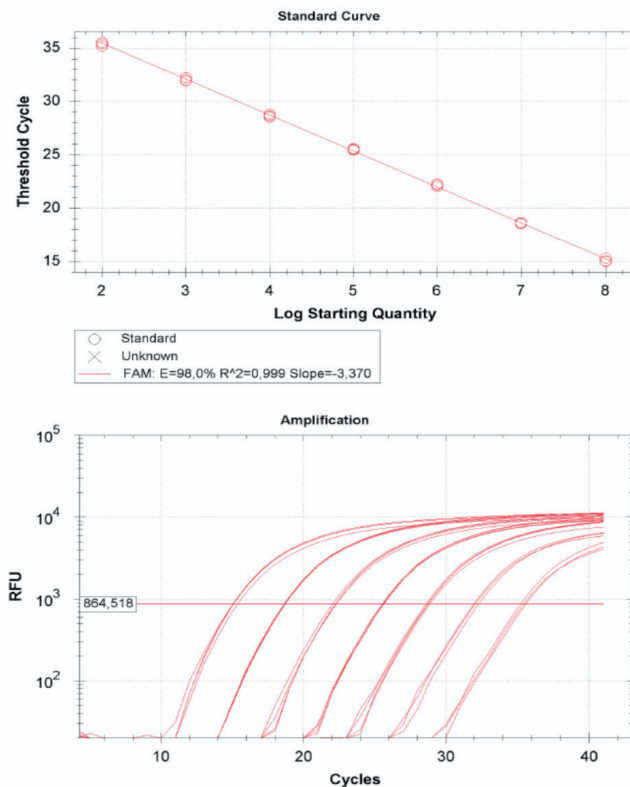


Figura 4. Curva de calibración con sonda TaqMan, para *X. citri* pv. *citri* (patotipo A) a partir de diluciones seriales de ADN de XccT 10⁸ (Standard: O), Sección Fitopatología, EEAOC.

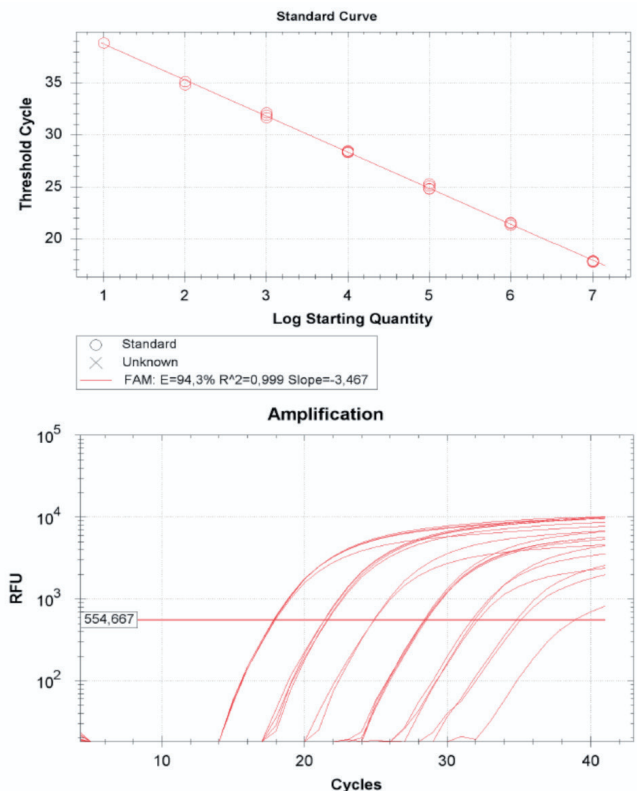


Figura 5. Determinación del LD mediante curva de amplificación con sonda TaqMan para *X. citri* pv. *citri* (patotipo A) a partir de diluciones seriales del ADN extraído de una lesión cuantificada, Sección Fitopatología, EEAOC.

dad y cantidad de los ADN extraídos (Li *et al.*, 2006).

- **Análisis de muestras de frutos cítricos**

No se detectó la presencia de la bacteria *X. citri*

pv. *aurantifolii*, patotipo B en las 839 muestras analizadas de las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy. El control positivo FDC 1565 amplificó un fragmento de 434 pb, no así los controles negativos utilizados (Figura 6).

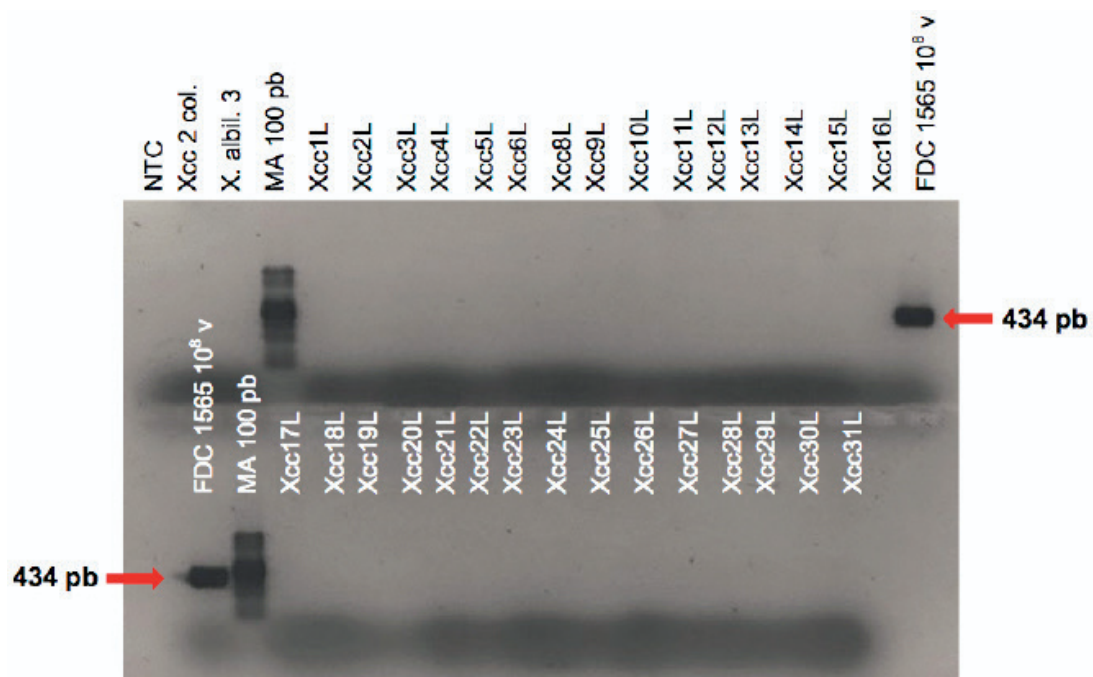


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de PCR con los cebadores XauBm F/XauBm R usando ADN extraídos de lesiones de canchros en frutos cítricos, Sección Fitopatología, EEAOC.

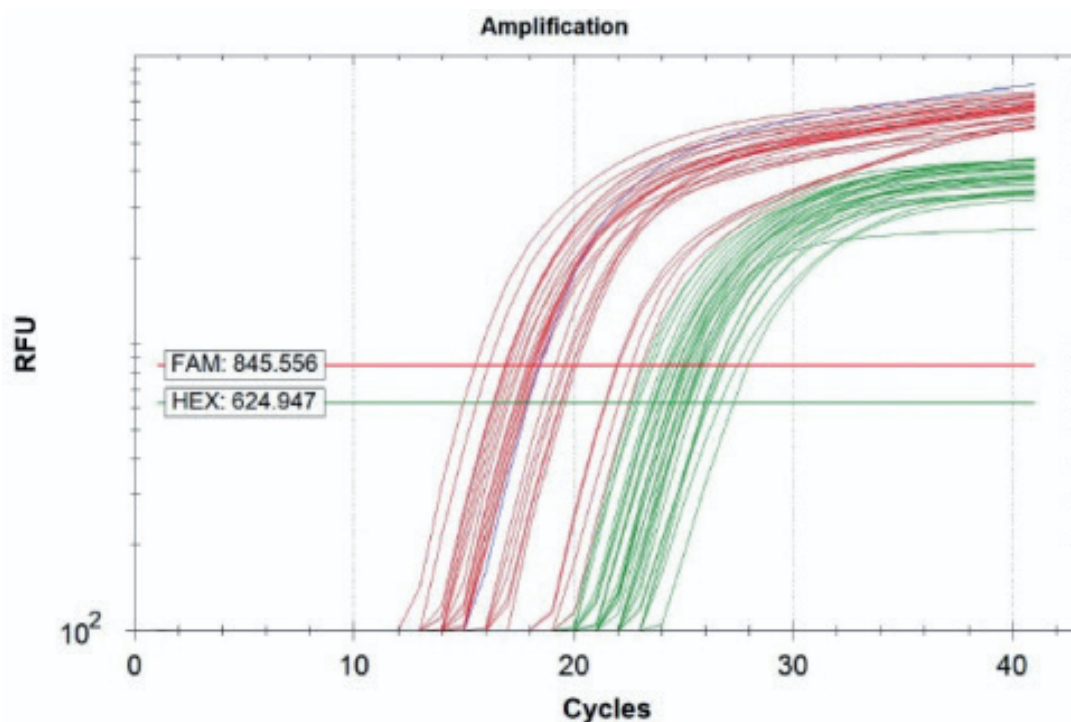


Figura 7. Curvas de amplificación de muestras de ADN extraído de frutos cítricos con síntomas de cancrrosis (curvas rojas) y de ADN vegetal utilizado como control interno (curvas verdes), resultados de la técnica de qPCR para *X. citri* pv. *citri* (patotipo A). Sección Fitopatología, EEAOC.

Las 168 muestras de ADN de lesiones de cancrrosis, que representan el 20% de la totalidad de muestras analizadas y que resultaron negativas para el patotipo B, produjeron curvas de amplificación para el patotipo A con la técnica de qPCR (Cubero and Graham, 2005) (Figura 7). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Ramallo *et al.* (2005), basados solamente en muestras de frutos de limón de Tucumán; sin embargo, en el presente estudio se logró ampliar las variedades cítricas y las zonas productoras monitoreadas, confirmando que la bacteria causante de la cancrrosis de los cítricos del NOA es *Xanthomonas citri* pv. *citri*, patotipo A.

CONCLUSIONES

Ninguna de las muestras de frutos cítricos analizadas resultó positiva para *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* (cancrosis tipo B). Las muestras a su vez resultaron positivas para *Xanthomonas citri* pv. *citri* (cancrosis tipo A). Estos resultados, sumado a la falta de reportes de cancrrosis tipo B en la región, sugieren la ausencia del patotipo B en la región NOA y confirman que los síntomas de cancrrosis presentes corresponden al patotipo A.

Las técnicas moleculares ajustadas y validas de PCR convencional para el diagnóstico *X. citri* pv. *aurantifolii*, patotipo B, y la qPCR para la detección de *X. citri* pv. *citri*, patotipo A, mostraron una especificidad y sensibilidad adecuadas para realizar un diagnóstico confiable y específico en frutos cítricos que puede ser utilizada en los programas de exportación que lo requieran.

El presente estudio aporta información sobre el patotipo de *Xanthomonas citri* que afecta al cultivo de cí-

tricos en el NOA, y contribuirá a las actividades realizadas en el marco de los programas de exportación de fruta cítrica fresca a China, donde el patotipo A está presente, y requiere que la fruta argentina que se exporte a dicho país esté libre del patotipo B. Además, brindará una herramienta de diagnóstico de rutina para analizar las muestras con destino a otros mercados, donde se considere cuarentenario a uno o ambos tipos de cancrrosis.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Canteros, B. I.; A. M. Gochez and R. C. Moschini. 2017. Management of Citrus Canker in Argentina, a Success Story. *Plant Pathology Journal* 33 (5): 441-449.
- Canteros de Echenique, B. I.; D. Zagory and R. E. Stall. 1985. A medium for cultivation of the B-strain of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, cause of cancrrosis B in Argentina and Uruguay. *Plant Disease* 69: 122-123.
- Carreras Baldrés, J. I.; C. Fandos; F. J. Soria; P. Scandaliaris; D. Figueroa; N. Aranda y H. Salas. 2022. Estimación del área implantada con cítricos en Tucumán en 2022 y comparación con años precedentes. *Reporte Agroindustrial* 257, ISSN 2346-9102.
- Coletta-Filho, H. D.; M. A. Takita; A. A. de Souza; J. R. Neto; S. A. Destefano; J. S. Hartung and M. A. Machado. 2006. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *Journal of Applied Microbiology* 100: 279-285.

- Cubero, J. and J. H. Graham. 2005.** Quantitative Real-Time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology* 95: 1333-1340.
- Cubero, J. and J. H. Graham. 2002.** Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1257-1264.
- Cubero, J.; J. H. Graham and T. R. Gottwald. 2001.** Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2849-2852.
- EFSA, PLH Panel. 2014.** Panel (EFSA Panel on Plant Health) Scientific opinion on the risk to plant health of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* for the EU territory. *EFSA Journal* 12 (2): 3556.
- Egel, D. S.; J. H. Graham and R. E. Stall. 1991.** Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of Citrus. *Applied and Environmental Microbiology* 57 (9): 2724-2730.
- Fonseca, N. P.; E. B. Felestrino; W. L. Caneschi; A. B. Sanchez; I. F. Cordeiro and C. G. C. Lemes et al. 2019.** Detection and identification of *Xanthomonas* pathotypes associated with citrus diseases using comparative genomics and multiplex PCR. *PeerJ* 7: e7676.
- Goto, M.; T. Takahashi and M. A. Messina. 1980.** A comparative study of the strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* isolated from citrus canker in Japan and cancris B in Argentina. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 46: 329-338.
- Gottwald, T. R. 2000.** Citrus canker. The Plant Health Instructor. Sociedad Americana de Fitopatología. Actualizado 2005. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/CitrusCanker.aspx>.
- Gottwald, T. R.; J. H. Graham y J. E. Cardoso. 2013.** Cancro cítrico. The Plant Health Instructor. Sociedad Americana de Fitopatología. [En Línea] DOI 10.1094/PHI-I-2013-0507-01. Disponible en <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/CitrusCankerPort.aspx> (consultado junio 13 2023).
- Hartung, J. S.; J. F. Daniel and O. P. Pruvost. 1993.** Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1143-1148.
- Li, W.; J. S. Hartung and L. Levy. 2006.** Quantitative real-time PCR detection and quantification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *J. Microbiol. Methods* 66: 104-115.
- Ibrahim, Y. E.; A. A. Saleh; M. H. El-Komy and M. A. Al-Saleh. 2015.** Detection of viable *Xanthomonas citri* pv. *citri*, the causal agent of citrus canker, in commercial fruits by isolation and PCR-based methods. *Journal of Phytopathology and Pest Management* 2: 55-66.
- Park, D. S.; J. W. Hyun; Y. J. Park; J. S. Kim; H. W. Kang; J. H. Hahn and S. J. Go. 2006.** Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on hrpW gene sequences. *Microbiology Research* 161: 145-149.
- Ramallo, J.; N. E. Vázquez de Ramallo y L. D. Ploper. 2005.** En: Resumen XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología (pp. 216), Córdoba, Argentina.
- Rademaker, J. L. W.; F. J. Louws, M. H. Schultz; U. Rossbach; L. Vauterin; J. Swings and F. J. Brujin. 2005.** A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95: 1098-1111.
- Robène, I.; V. Maillot-Lebon; A. Chabirand; A. Moreau; N. Becker y A. Moumène et al. 2020.** Development and comparative validation of genomic-driven PCR-based assays to detect *Xanthomonas citri* pv. *citri* in citrus plants. *BMC Microbiology*: 1-13.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual (2° Ed.). Cold spring harbor laboratory press.
- Schaad, N. W.; E. Postnikova; G. H. Lacy; A. Sechler; I. Agarkova; P. E. Stromberg; V. K. Stromberg and A. K. Vidaver. 2005.** Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse, 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel, 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and —var. “fuscans” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 494-518.
- Senasa. 2004.** Protocolo de requisitos fitosanitarios para la exportación de fruta fresca cítrica entre la secretaria de agricultura, ganadería, pesca y alimentos de la republica argentina y la administración general de supervisión de calidad, inspección y cuarentena de la república popular China. [En Línea] Disponible en http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENasa/INFORMACION/PORTAL_CERTI/china_2_citricos-china.pdf (consultado junio 13 2023).
- Stall, R. E. and E. L. Civerolo. 1991.** Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 399-420.
- Stall, R. E.; G. M. Marcó and B. I. Canteros. 1981.** Pathogenicity of three strains of the citrus canker organism on grapefruit. En *Proc. 5th Int. Conf. Plant Pathog. Bact.* (pp. 334-340). Cali, Colombia.
- Vauterin, L.; B. Hoste; K. Kersters and J. Swings. 1995.** Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
- Vauterin, L.; J. Swings; K. Kersters; M. Gillis; T. W. Mew and M. N. Schroth et al. 1990.** Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 40 (3): 312-316.

**Vernière, C; J. S. Hartung; O. P. Pruvost; E. L. Civero-
lo; A. M. Alvarez; P. Maestri and J. Luisetti. 1998.**
Characterization of phenotypically distinct strains of
Xanthomonas axonopodis pv. *citri* from Southwest
Asia. European Journal of Plant Pathology 104: 477-
487.

A decorative graphic consisting of several small, overlapping squares in shades of blue and grey.