



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**CARACTERIZACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE *XANTHOMONAS ARBORICOLA*  
PV. *JUGLANDIS* EN NOGAL EUROPEO (*JUGLANS REGIA*) EN LA REGIÓN  
CENTRO DE LA REPUBLICA ARGENTINA.**

**SILVANA ANDREA SETA**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS**

**DIRECTOR:** Mirian del Pilar Gonzalez

**CO- DIRECTOR:** Mirta Rossini

**2019**

**CARACTERIZACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DE *XANTHOMONAS ARBORICOLA*  
PV. *JUGLANDIS* EN NOGAL EUROPEO (*JUGLANS REGIA*) EN LA REGIÓN  
CENTRO DE LA REPUBLICA ARGENTINA.**

Silvana Andrea Seta

Ingeniera Agrónoma – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Facultad de Ciencias Agrarias, UNR, durante el período comprendido entre 2010 y 2018 bajo la dirección de Mirian del Pilar Gonzalez.

Nombre y firma del Doctorando

Silvana Andrea Seta

Nombre y firma del Director

Mirian del Pilar Gonzalez

Nombre y firma del Co – Director

Mirta Rossini

Defendida: .....de 20\_\_.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los integrantes de la Comisión Asesora de Tesis, especialmente a la Dra. Mirian del Pilar González, por los aportes y el tiempo dedicado a este trabajo.

Al Dr. Ing. Agr. Ricardo Moschini (INTA Castelar) por su desinteresada colaboración en el desarrollo de un modelo epidemiológico.

A mis compañeros del Equipo de Gestión (2011-2019) por su acompañamiento permanente.

A mis compañeros de la Cátedra de Fruticultura de la Facultad de Ciencias Agrarias, quienes me iniciaron en la investigación del cultivo del nogal.

A los compañeros de la Cátedra de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias, quienes me facilitaron las herramientas para posibilitar este estudio.

A los productores de las localidades involucradas en el muestreo, por permitirme la recolección de los materiales utilizados.

# DEDICATORIA

A mis hijos Priscila, Sebastián, Micaela y Mateo

A mi papá

A las coincidencias que dan luz a mi vida

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

### Publicaciones:

**Seta, S., Gonzalez, M. , Rossini M. 2011.** Incidence of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and *Fusarium* spp. in buds and shoots in different varieties of *Juglans regia* in south of Santa Fe province. Argentina. BIOCELL, 35(2) A185

### Presentaciones a Congresos:

**Seta, S., Gonzalez, M. y Rossini, M. 2010.** Presencia de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* y *Fusarium* spp. en yemas en reposo de diferentes variedades de *Juglans regia* en el sur de la provincia de Santa Fe. XXIII Congreso Argentino de Horticultura. ASAGO . 28 de setiembre – 1 de octubre. p 155.

**Seta, S., Gonzalez, M. y Rossini, M. 2010.** Presencia de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* y *Fusarium* spp. en yemas en reposo de diferentes variedades de *Juglans regia* en el sur de la provincia de Santa Fe. XII Congreso y XXX Reunión de la Sociedad de Biología de Rosario. 2 y 3 de diciembre. p 72.

**Gonzalez, M.; Seta, S.; Rossini, M. 2011.** Curvas de progreso de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* en diferentes variedades de *Juglans regia* en el sur de la provincia de Santa Fe (Argentina). 2° Congreso Argentino de Fitopatología. Mar de Plata. 1 al 3 de junio. p 302.

**Gonzalez, M.; Seta, S.; Rossini, M. 2011.** Curvas de progreso de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* en diferentes variedades de *Juglans regia* en el sur de la provincia de Santa Fe (Argentina). XIII Congreso y XXXI Reunión de la Sociedad de la Biología de Rosario. 1 y 2 de diciembre. p 157.

**Seta, S; Gonzalez, M.; Rossini, M. 2012.** Incidencia de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* y *Fusarium* spp. en yemas de diferentes variedades de *Juglans regia* en Zavalla, Santa Fe. Argentina. XXXV Congreso Argentino de Horticultura. ASAGO. Corrientes. Argentina.

**Seta, S.; Gonzalez, M.; Rossini, M.** 2012. Desarrollo de *xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en cuatro variedades de *Juglans regia* en el sur de la provincia de SANTA FE (ARGENTINA). Congreso. XXXV Congreso Argentino de Horticultura. Corrientes.

**Seta, S.; Gonzalez, M.** 2012. Primer reporte de cancro en nogal causado por *Fusarium oxysporum* y *Fusarium graminearum* en Argentina. Argentina. Rosario. XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. SBR p168-169.

**Seta, S. ; Gonzalez, M. y Rossini, M.** 2013. Incidencia de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en yemas de diferentes variedades de *Juglans regia* en el sur de la provincia de santa fe. 3 años de evaluación. Congreso de Horticultura ASAHO. Tucumán 24 al 26 de setiembre.

**Seta, S. ; Gonzalez, M. y Rossini, M.** 2013. Incidencia de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en yemas de diferentes variedades de *Juglans regia* en el sur de la provincia de Santa Fe. 3 años de evaluación. XV Congreso y XXXIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario. 28 y 29 de noviembre.

**Seta, S. ; Gonzalez, M.; Rossini, M.** 2013. Severidad de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en diferentes variedades de *Juglans regia* en el sur de la provincia de Santa Fe (Argentina). 3 años de evaluación. Congreso de Horticultura ASAHO. Tucumán 24 al 26 de setiembre.

**Seta, S. ; Gonzalez, M.; Rossini, M.** 2013. Severidad de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en diferentes variedades de *Juglans regia* en el sur de la provincia de Santa Fe (Argentina). 3 años de evaluación XV Congreso y XXXIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario. 28 y 29 de noviembre.

**Seta S., Moschini R. Gonzalez M.** 2014. Estimación del progreso epidémico de la bacteriosis del nogal en variedades de distinto comportamiento mediante modelos basados en variables meteorológicas .Congreso Argentino de Horticultura ASAHO: Mendoza. 23 al 26 de setiembre.

**Seta S., Moschini R.; Gonzalez M.** 2014. Estimación del progreso epidémico de la bacteriosis del nogal en variedades de distinto comportamiento mediante modelos basados en

variables metereológicas .XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual Sociedad de Biología. 4 y 5 de diciembre .

**Seta, S. y Gonzalez, M.** 2015. Variabilidad molecular de aislamientos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en la zona centro argentina XVII Congreso y XXXV Reunión Anual Sociedad de Biología de Rosario. 30 de noviembre y 1 de diciembre. p157.

## ÍNDICE:

	Página
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
HIPOTESIS.....	35
OBJETIVOS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
RESULTADOS.....	46
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS:

%	porcentaje
°C	grado centígrado
μl	microlito millonésima parte del litro
μm	micrón (milésima de mm)
aC	antes de Cristo
AFLP	Amplified Fragment Length polymorphism Polimorfismo del largo del fragmento amplificado
ANOVA	Análisis de la Variancia
Bo	boro
BOX	Enterobacterial Repetitive Sequences
BS	Brilliant cresyl Blue Starch
Ca	calcio
Cl	cloro
cm	centímetro
csp	cantidad suficiente para
DBCA	Diseño en Bloques completamente aleatorizado
DHR	días con humedad relativa del aire > a 81%
DMojpr	días con precipitaciones $\geq 0,2$ mm
DMojro	días sn lluvia (<0,2 mm) con mojado atribuible al rocío por ocurrencia de HR del aire > al 82%
DMojt	suma de DMjro + DMojpr
dNTPs	desoxiribonucleotidotrifosfato
DPr>9	total de días con $p < 24^{\circ}\text{C}$ y $T_n > 11^{\circ}\text{C}$
ERIC	enterobacterial repetitive intergenic consensus
<i>et al</i>	y otros

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAOSTAT	datos sobre alimentación y agricultura de la FAO
Fe	hierro
g/L	gramos por litro
Ha	hectárea
HR	humedad relativa
$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	fosfato diácido de potasio trihidratado
K	potasio
Kg	kilogramo
$KH_2PO_4$	fosfato diácido de potasio
M	Moderada a nula
Mg	magnesio
MLST	Multilocus Sequence Typing
Mm	milímetros
Min	minuto
Na	sodio
$NH_4_2SO_4$	disulfato de amonio
PCR	polimerasa chain reaction Reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de Hidrógeno
Pr	precipitaciones
Prac	total de precipitaciones diarias acumuladas
PrS	probabilidad de observar un nivel de Tid% severo (S)
Proc GLM	procedimiento para modelos lineales generales
Proc Freq	procedimiento de frecuencias
RAPDS	Random Amplificaded of Polymorphic ADN Amplificación aleatoria del ADN polimórfico
REP	Repetitive element palindromic

RFLP	Restriction Fragment Length Plymorphism Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
rK	coeficiente de correlación de Kendall
RPM	revoluciones por minuto
S	severa
SAS	empresa desarrolladora de software
Se	selenio
Seg	segundo
Sev%	severidad en porcentaje
SRAP	Sequence related Amplified Polymorphism Polimorfismo amplificado de la secuencia relacionada
SUS	susceptibilidad
T	tiempo
T-1	tiempo menos 1
Taq Pol	polimerasa de ADN originada por la bacteria <i>Thermo aquaticus</i>
TBE	tris borato ácido etilen diamino tetra acético
Tid%	tasa de crecimiento epidémico diaria Tipicación multilocus de secuencia
Tm	temperatura media diaria
TM	Trade Mark- Marca registrada
Tn	temperatura mínima
Tnm	media de las temperaturas mínimas
Ton	tonelada
Tx	temperatura máxima
Txm	media de las temperaturas máximas
UE	Unión Europea
V	voltio
Zn	zinc

## RESUMEN

La producción de nueces en Argentina se desarrolló en zonas tradicionales como Catamarca, Mendoza y La Rioja, sumando actualmente nuevas plantaciones en Río Negro, San Juan, Salta, Córdoba, San Luis, Entre Ríos y Santa Fe, como alternativa de diversificación productiva. Siendo el sur de la provincia de Santa Fe una zona con alta humedad relativa, el Tizón Bacteriano o Bacteriosis del nogal es una enfermedad de gran impacto. Su agente causal es *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*. Prácticamente todos los órganos aéreos de la planta pueden ser afectados por la bacteriosis, y su control, de carácter preventivo, consiste en la aplicación de bactericidas. Todas las variedades comerciales son susceptibles, pero aquellas de brotación tardía pueden evitar la enfermedad en climas mediterráneos. El estudio epidemiológico es una herramienta para la prevención de la enfermedad, sin el uso abusivo de productos químicos. En nuestro país no se ha desarrollado aún ningún modelo para el manejo de la misma, realizándose aplicaciones sin considerar el patosistema específico *Xanthomonas-Juglans*. El conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad, el desarrollo de la misma en el tiempo, su relación con las condiciones climáticas y la variabilidad de las cepas existentes permitirían el establecimiento de pautas generales para su manejo efectivo. El objetivo general de este estudio fue caracterizar el comportamiento de *X. arboricola* pv. *juglandis* en nogal (*Juglans regia*) en la región centro de la República Argentina, y desarrollar un modelo epidemiológico para su manejo. Como objetivos específicos se fijaron: 1. Corroborar la identidad de *X. arboricola* pv. *juglandis* en nogal europeo. 2. Determinar variabilidad molecular de aislamientos de *X. arboricola*.pv. *juglandis* procedentes de diferentes localidades de la región húmeda de Argentina. 3. Evaluar la severidad de la bacteriosis a través del tiempo en las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis. 4. Relacionar la severidad de la bacteriosis con los factores climáticos para desarrollar un modelo epidemiológico que tenga en cuenta las condiciones ambientales de la zona en estudio. 5. Analizar las estrategias de hibernación y dispersión del patógeno en yemas productivas y granos de polen. Para lograr estos objetivos se trabajó en el Campo Experimental José Villarino perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNR (Zavalla, Santa Fe) sobre una colección de nogales compuesta por las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis (6 a 11 plantas por variedad) y en el Laboratorio de la misma institución. Las plantas presentaban síntomas de manchas necróticas en hojas y en frutos, con diferentes niveles de severidad. Teniendo como diagnóstico presuntivo la presencia de *X. arboricola* pv *juglandis* y con el fin de corroborar dicho diagnóstico se recogieron trozos de hojas y se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio BS (Brilliant Cresyl Blue Starch).

También se recolectó material foliar en las localidades de Inrville, Corral de Bustos y Oliveros. Los aislamientos se realizaron en medio BS y se repicaron a medio agar tripteina de soja, a partir de ellos se realizó la extracción del ADN y fueron genotipificados aplicando dos reacciones de PCRs diferentes utilizando los cebadores que hibridan con elementos repetitivos presentes en algunos genomas bacterianos (REP-PCR y ERIC-PCR). Durante las campañas 2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013 se tomaron datos de severidad en hojas (área foliar afectada /área total evaluada X 100) a partir del mes de noviembre (inicio de expansión foliar) y hasta febrero (caída de hojas). Las mediciones se realizaron semanalmente en cada ejemplar promediándose los datos para cada variedad. Con los datos se construyeron curvas de progreso de la enfermedad para cada variedad, con valores para cada año y comparando las 3 campañas. Utilizando las mediciones climáticas obtenidas durante el experimento y considerando la severidad de las variedades, se desarrolló un modelo predictivo. Durante los períodos otoño -invernales de 2010, 2011 y 2012 se extrajeron 60 yemas de cada variedad, y en cada año de experimento. Se sembraron en medio BS, registrándose a las 72 hs, la incidencia como número de yemas que desarrollaron colonias/ total de yemas sembradas x 100. Durante el primer año de evaluación se recolectó polen de 50 amentos de cada variedad, mediante bolsas de papel colocadas sobre los mismos, sujetas a las plantas. El mismo se llevó al Laboratorio y se suspendió en 2 ml de agua destilada estéril. Dicha suspensión se sembró por medio de un hansa en cajas de Petri conteniendo medio BS. A las 72 hs se realizó la observación, y el conteo de las colonias desarrolladas. Los trozos de hojas desarrollaron colonias de color amarillento, de consistencia mucosa. El análisis de PCR mostró que los aislamientos de cada localidad fueron similares entre si y diferentes a los de las otras localidades. En cuanto a severidad, se presentaron diferencias entre años, entre variedades e interacción año x variedad. La variedad de menor severidad en los 3 años fue Franquette (19,51%), las restantes variaron año a año. La campaña que presentó menores valores promedio fue 2011/12 (17.43%) y la más severa 2012/13 (79.58%). Mediante el procedimiento Proc *Logistic* del SAS se seleccionó el modelo con mejor ajuste ( $E_{c1} = -2,189 + 1,024 * DP_r > 9 + 0,609 * DMojro + 1,7147 * sus$ ) que incluye, además de dos variables meteorológicas, una variable discreta binaria que considera el efecto del comportamiento varietal ( $sus=1$  y  $sus=0$ ). Los resultados de incidencia en yemas tuvieron valores entre 76% y 96%, sin diferencias significativas entre variedades ni entre años. El alto nivel de infección en yemas permite mantener el inóculo de la enfermedad para el próximo ciclo. Las colonias desarrolladas a partir de granos de polen mostraron 100% de incidencia de la infección.

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION AND EPIDEMIOLOGY OF *XANTHOMONAS ARBORICOLA* PV. *JUGLANDIS* IN WALNUT (*JUGLANS REGIA*) IN THE CENTER REGION OF ARGENTINA

The purpose of this research was to characterize the performance of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in the Argentine central region and to develop an epidemiological model to its management. The specific objectives were: 1. To corroborate the identity of *X. arboricola* pv. *juglandis* in Walnut. 2. To determinate molecular variability of *X. arboricola* pv. *juglandis* isolations from different locations of Argentine humid region 3. To evaluate the severity of Walnut Blight through time on Franquette, Tulare, Chandler and Davis varieties. 4. To relation to link severity with meteorological factors to develop an epidemiological model. 5. To study hibernation strategies and pathogen dispersion through buds and pollen grains. The essay was performed in the Field of FCA UNR (Zavalla, Santa Fe) on Franquette, Chandler, Tulare and Davis varieties (6 11 plants per variety) with injuries on leaves and fruits, and also leaves from Inriville, Corral de Bustos and Oliveros. Leaves pieces were cultivated on Petri dishes with BS medium (Brilliant Cresyl Blue Starch). The bacterial isolations were cultivated on agar tripteina soya médium. Of this culture DNA was extracted. Two reactions of PCRs (REP-PCR and ERIC PCR) were used for the DNAs typification. Foliar severity dates was recorded since November to February of 2010-2011, 2011-2012 and 2012-2013, and progress curves were made. With values of severity and the meteorological conditions a predictive model was developed. In Autumn- Winter 2010-2011 and 2012 buds of each variety were collected and cultivated in BS medium and incidence was evaluated. Also pollen grains of 50 catkins of each variety were collected and studied in Laboratory to count number of colonies. Pieces of leaves developed yellowish and mucous colonies on Petri plates. PCR analysis showed similar DNA patterns for each location and different patterns between locations. Franquette variety showed the lower severity values during the 3 years (19,51%). The period with lowest severity value was 2011/12 (17.43%) and the highest severity value was in 2012/13 (79.58%). Proc Logistic of SAS program adjusted the predictive model ( $E_c = -2,189 + 1,024 * DP_r > 9 + 0,609 * DM_{ojro} + 1,7147 * sus$ ) that includes two meteorological variables and one discrete binary variable that explains variety performance ( $sus = 1$  y  $sus = 0$ ). The bud incidence of disease was between 76% y 96%. High level of infection in buds is the inoculum for the next cycle. Pollen grains showed 100% of bacterial infection.

## INTRODUCCIÓN

El nogal es una especie dicotiledónea que está incluida dentro del orden *Juglandales*, familia *Juglandáceas*. En esta familia se encuentran los géneros *Juglans*, *Carya* y *Pterocarya*. Dentro del género *Juglans* existen al menos 21 especies procedentes de América, Asia y Europa, las cuales se pueden englobar en tres grupos: nogales comunes o blancos, nogales negros y nogales grises. Todas las especies del género *Juglans* tienen fruto comestible. Sin embargo *Juglans regia* es la especie más difundida y conocida por sus frutos, y la que tiene mayor extensión de cultivo (Lemus *et al.*, 2001).

El origen del nogal común es incierto. La hipótesis más probable menciona como su centro de origen Asia Central, difundiéndose hacia Europa, especialmente a Grecia 300 años a.C. De allí se difundió a toda Europa y posteriormente a América.

Esta especie se comercializa fundamentalmente por sus semillas o nueces, apreciadas por su agradable sabor y aroma, utilizadas en numerosas comidas y postres. También es habitual que se las consuma en fresco, al igual que las almendras, avellanas y otros frutos secos. La nuez extraída del nogal es rica en Omega 3 y contribuye a reducir los niveles de colesterol en el organismo. El consumo de nueces en la dieta cotidiana reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Las semillas, junto con sus hojas, poseen propiedades medicinales. También es de gran valor su madera, la que se utiliza especialmente como laminado (Lemus *et al.*, 2001).

La producción mundial de nueces entre los años 2005 y 2014, pasó de más de 1.7 millones de toneladas a casi 4 millones de toneladas. Este aumento en la producción se debe entre otras causas a la modificación en los hábitos de consumo de alimentos, y a cambios en la adopción de nuevas tecnologías de producción, cosecha y poscosecha (Errecart, 2015).

En la mayoría de los países productores se consolida la tendencia de un aumento de la escala de producción para reducir la incidencia de los costos fijos. Simultáneamente, hubo preferencia a la adopción de prácticas tecnológicas propias de la fruticultura moderna, como la elección de variedades californianas (precoces, de carga lateral, con alto potencial productivo y mejor calidad de fruta que las tradicionales), mayor densidad de plantación (de 200 a 250 plantas por hectárea), riego presurizado, el manejo de la copa (a partir del

recambio varietal), la poda (conducción en eje central), manejo óptimo de la fertilización y el control de plagas y enfermedades, que permiten reducir los plazos de retorno de las inversiones, los costos operativos y mejorar los márgenes de la actividad. El mejoramiento de los sistemas de cosecha y poscosecha (procesamiento en fresco e industrialización) ha significado, además, una mayor durabilidad y una mejor presentación y tipificación de los productos.

La nogalicultura actual es operada por empresas de mayor envergadura que en el pasado, con ventajas en los sistemas tecnológicos, gerenciales y operativos, que han mejorado la previsibilidad de las cosechas (volumen y fechas), la competitividad y la capacidad de negociación con eficiente penetración en los mercados (Jaldo Alvaro, 2014).

La oferta de nueces es liderada principalmente por tres países (China, Estados Unidos e Irán), que concentran el 70% de la producción mundial, con comportamientos diferentes en el comercio internacional. China tuvo como estrategia de negocio la reconversión varietal, junto a cambios tecnológicos en técnicas de cultivo, cosecha y acondicionamiento, impactando sobre la productividad por hectárea y calidad final de nueces. Estados Unidos logró su crecimiento apoyándose en la agrupación de productores, donde se establecieron estándares de calidad, publicidades y promociones en diferentes mercados internacionales. Irán experimentó ciertos altibajos en la producción como consecuencias de problemas climáticos (Errecart, 2015). Siguen en importancia Turquía y Ucrania. Dentro de la Unión Europea, los principales productores son Rumania, Francia, Grecia, Austria, Alemania, Italia y España, en orden decreciente de toneladas producidas (Muncharaz Pou, 2012). Las estadísticas de la FAO concuerdan con la información precedente (Figura 1).

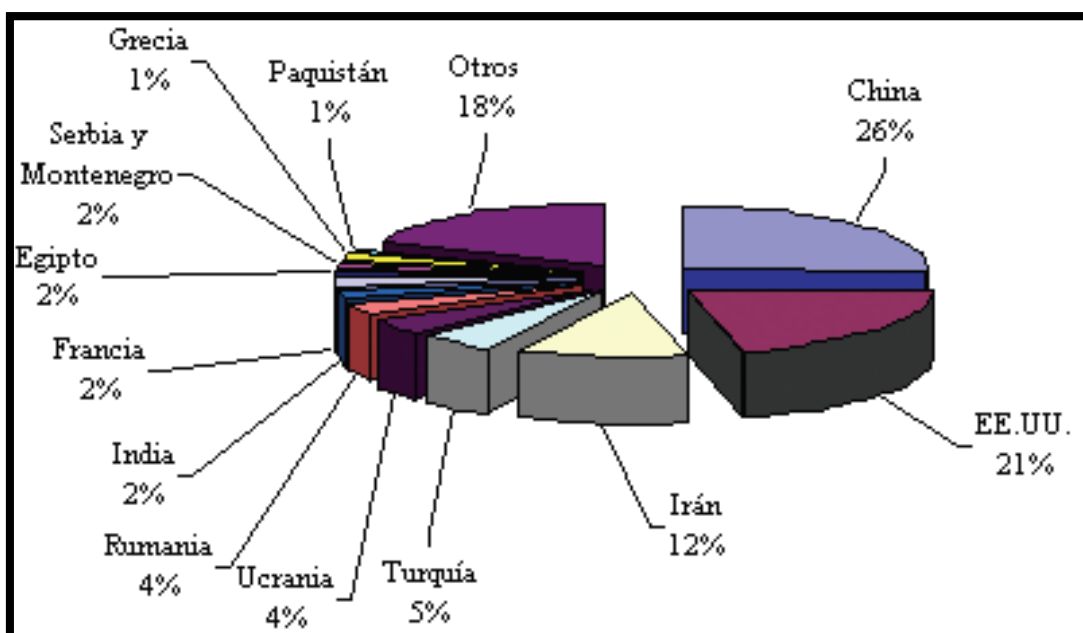


Figura 1- Principales países productores de nueces (2003). Fuente: FAOSTAT / International Tree Nut Council. Agronomía y Forestal UC Soler y Dominguez. Exportación de la nuez Chilena. Análisis del mercado mundial.

El mayor exportador de nueces mundial es EEUU con un 40%, le sigue Francia con un 11% y México con un 10% (FAO) (Figura 2).

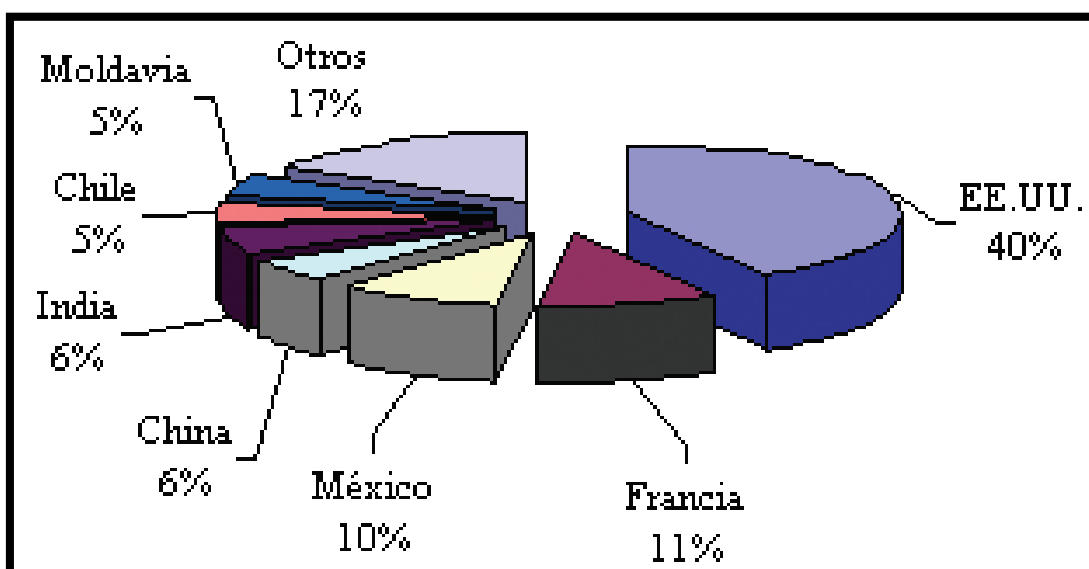


Figura 2- Importancia en el valor de las exportaciones de nueces de los principales países exportadores (2000-2002). Fuente: FAOSTAT Agronomía y Forestal UC Soler y Dominguez. Exportación de la nuez Chilena. Análisis del mercado mundial.

Si se considera el valor de las importaciones, los mayores países importadores son España y Alemania con un 12% y Japón con un 11% (FAO) (Figura 3).

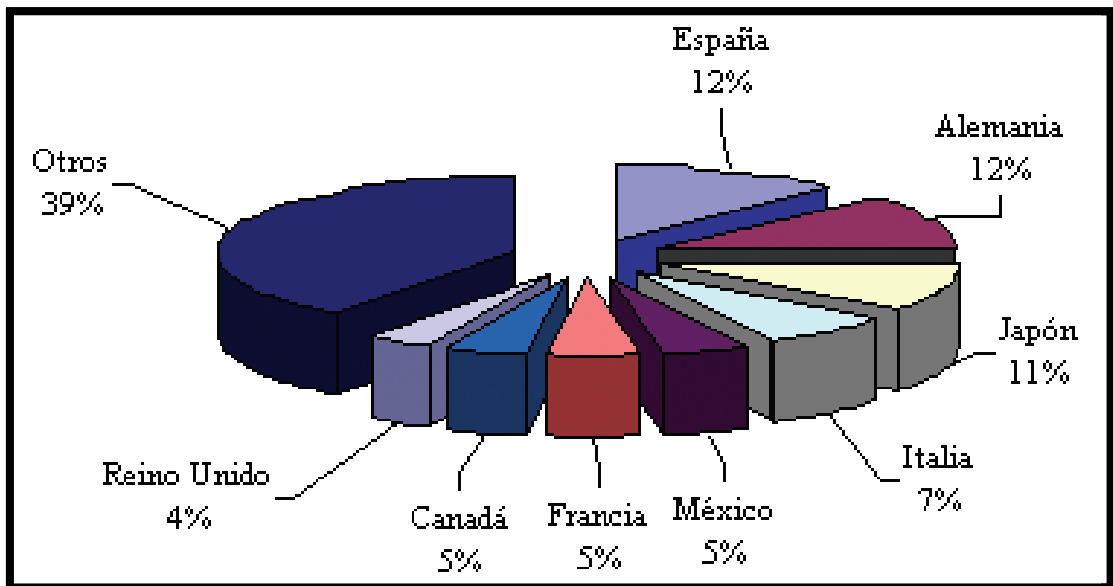


Figura 3- Importancia en el valor de las importaciones de nueces de los países importadores (2000-2002). Fuente: FAOSTAT Agronomía y Forestal UC Claudia Soler. Exportación de la nuez Chilena. Análisis del mercado mundial.

Según USDA (2017) la producción mundial de nueces y el pronóstico de consumo alcanzaron un pico en 2016-2017 y se pronostica una leve baja para el período 2017-2018 (2,1 millones de ton) (Figura 4).

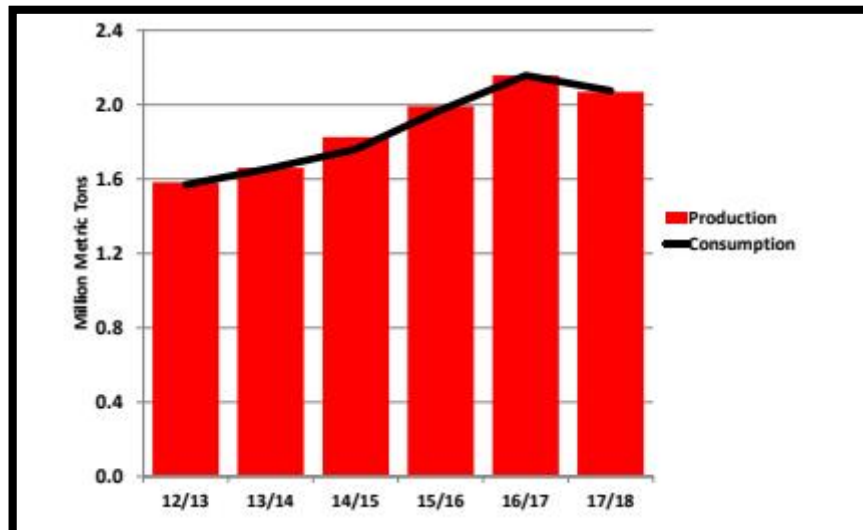


Figura 4- Producción mundial de nueces y pronóstico de consumo en millones de toneladas por campaña. (USDA, 2017).

### Situación del cultivo en Argentina

El cultivo del nogal en la Argentina fue introducido al país por los religiosos de la Compañía de Jesús en la época colonial. Se extendió principalmente en las provincias

andinas, en los valles intermontanos de altura donde las plantas se desarrollaron en las mejores condiciones, junto a la vid y el olivo, colaborando con el crecimiento de varias economías regionales.

A mediados de la década del 90 y hasta el año 2000, el sector emprendió un marcado proceso de reconversión orientado a reemplazar las variedades criollas por las denominadas finas (Franquette, Howard y Chandler), y otras variedades californianas como Sunland, Serr, Chico y Davis. Las variedades criollas eran originadas de semillas, en las que no se consideraban aspectos vinculados con la rentabilidad, pronto inicio de cosecha o calidad del fruto. Sus frutos son de tamaño pequeño o mediano y una coloración de pulpa ámbar a ámbar oscuro, baja relación pulpa-cáscara, con cáscara dura, que dificulta el pelado. El proceso de reconversión consistió básicamente en el replantado en la provincia de Mendoza, el reinjertado escalonado en el tiempo en las provincias de Catamarca y La Rioja, y en el aumento de la densidad de los montes mediante el intercalado de plantas, pasándose de 50 a 200 plantas/ha, con rápida entrada en producción. Los primeros montes reconvertidos comenzaron a producir, con rendimientos de 3.500 Kg./ha (SINAVIMO. Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. SENASA, 2017).

La producción de nueces en Argentina actualmente se desarrolla en zonas tradicionales de las provincias de Catamarca, Mendoza y La Rioja. Dichas provincias producen el 81% de la producción nacional. En los últimos años se han desarrollado nuevas plantaciones en las provincias de Río Negro, San Juan, Salta, Córdoba, San Luis, Entre Ríos y Santa Fe. En éstas, el cultivo se realiza como alternativa a otras actividades, favoreciendo la diversificación productiva o reemplazando los cultivos de baja rentabilidad (Figura 5).

Los últimos años de la producción nacional se caracterizaron por un notable incremento tanto de la superficie nogalera (total nacional 16.834 ha) como de la producción de nueces (16.840 Ton). La principal provincia productora es Catamarca, que en 2014 logró alcanzar 5.850 Ton. La provincia de Mendoza es la segunda productora nacional, con un volumen de 4.500 Ton (Cólica, 2015).

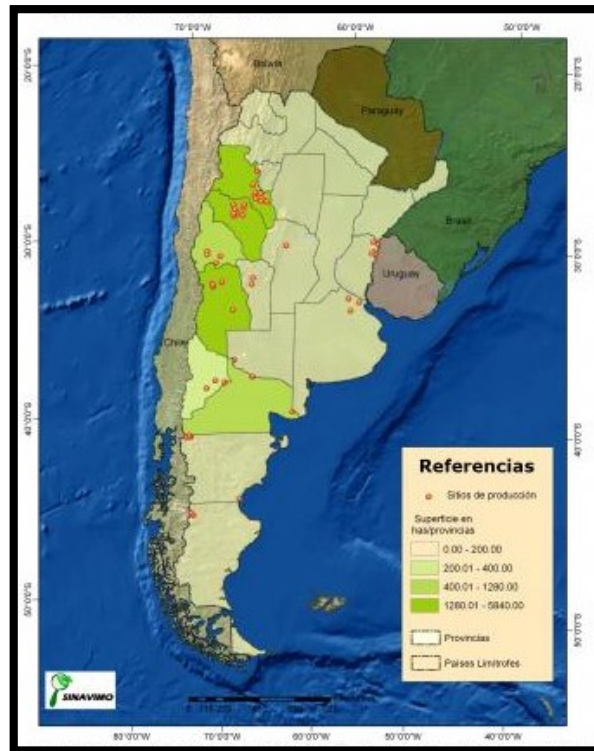


Figura 5- Áreas de producción del cultivo de *Juglans regia* en la Argentina (2015). Fuente: SENASA.

Argentina, junto a Chile, es uno de los principales países productores de nueces del Hemisferio Sur. En el año 2005 Argentina ocupaba el puesto 24 de la producción mundial, con 9000 Ton anuales aportando al 0.5% de la producción mundial, siendo su superficie cultivada de 3600 ha. Actualmente la producción nacional abastece parcialmente la demanda del mercado interno, aunque una gran proporción carece de estandarización y presenta calidad variable (Seta *et al.*, 2004).

### Comercio internacional. Exportaciones e importaciones

El volumen de nuez negociado por Argentina presentó tendencia positiva y las presentaciones del producto exportado (con cáscara, sin cáscara, a granel o no) y los mercados de destino fueron variables. Si bien durante el año 2000 más del 90% de lo exportado se destinó a Uruguay, en los años siguientes los destinos preponderantes fueron Italia, España y Chile.

La Argentina exportó nueces, con un volumen de 3.020 Ton en el año 2014 y 3.025 Ton en el año 2015. El principal país de destino, como se mencionó anteriormente, fue Italia, que en 2014 y 2015 importó 4.727 Ton (78% del total exportado por Argentina), seguido por Turquía que importó 831 Ton (14%) en el mismo período (Figura 6) (SINAVIMO Sistema

Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. SENASA. 2017). Los volúmenes de importación y exportación anual se observan en las figuras 7, 8, 9 y 10 ( USDA, 2017).

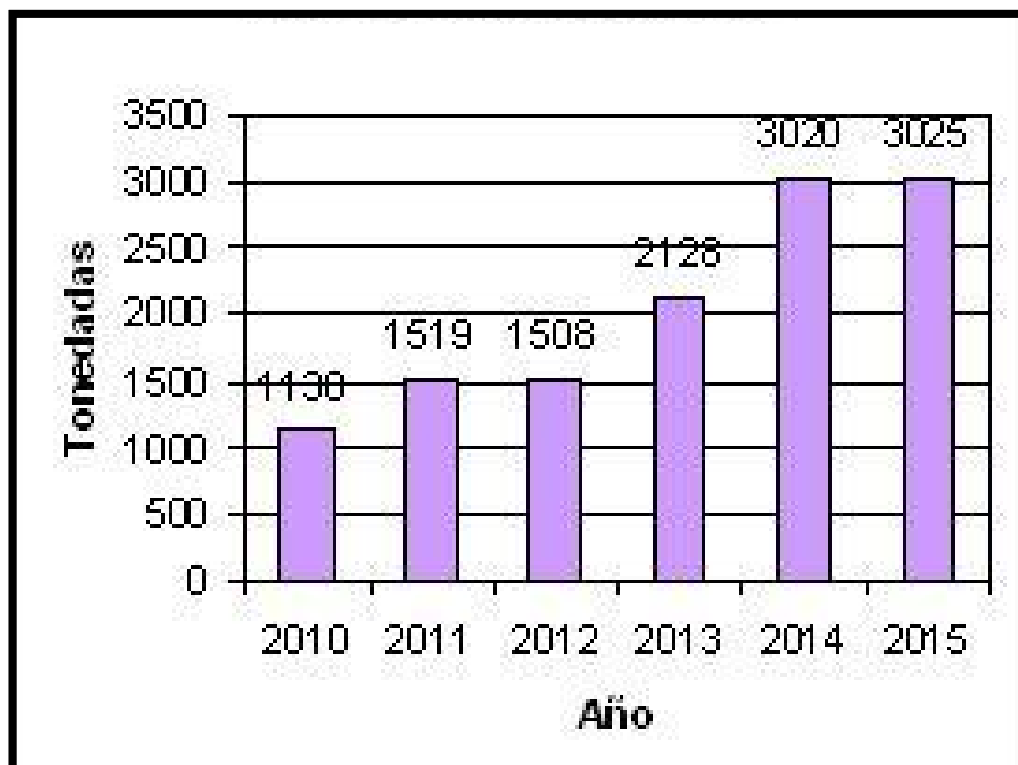
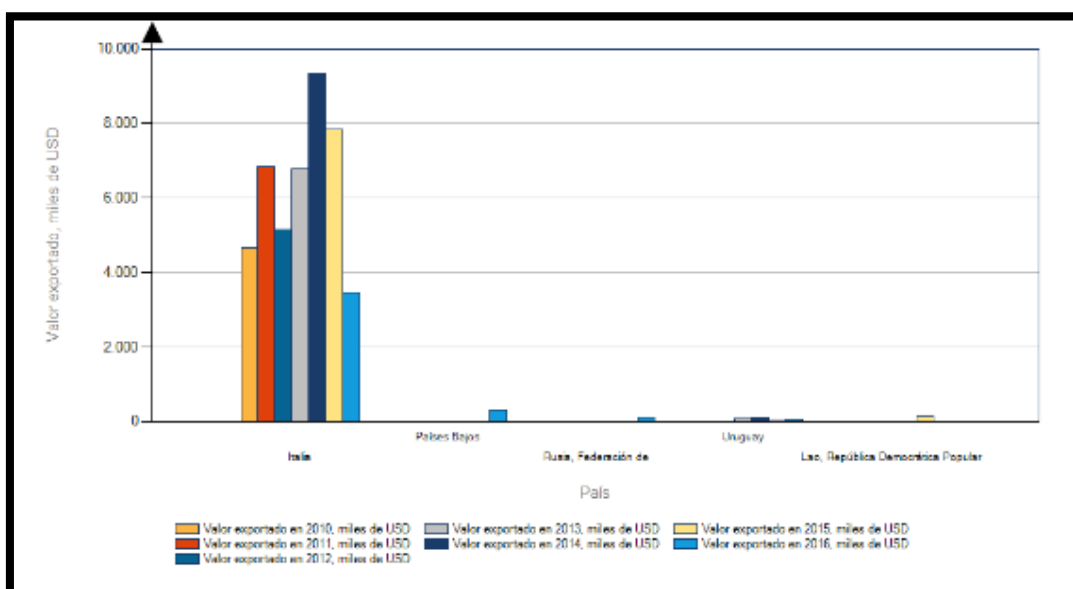
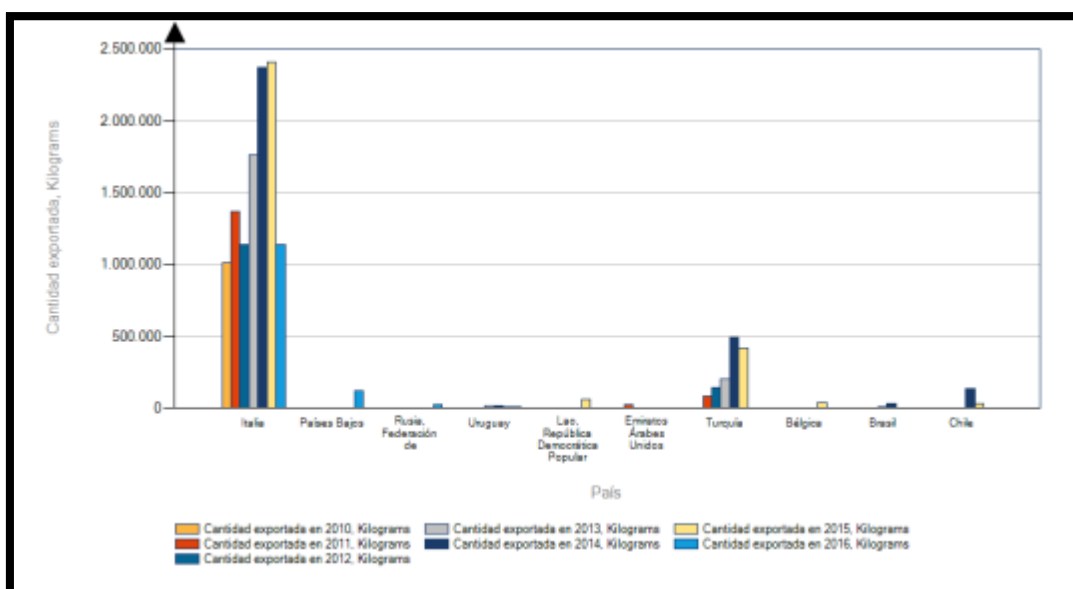
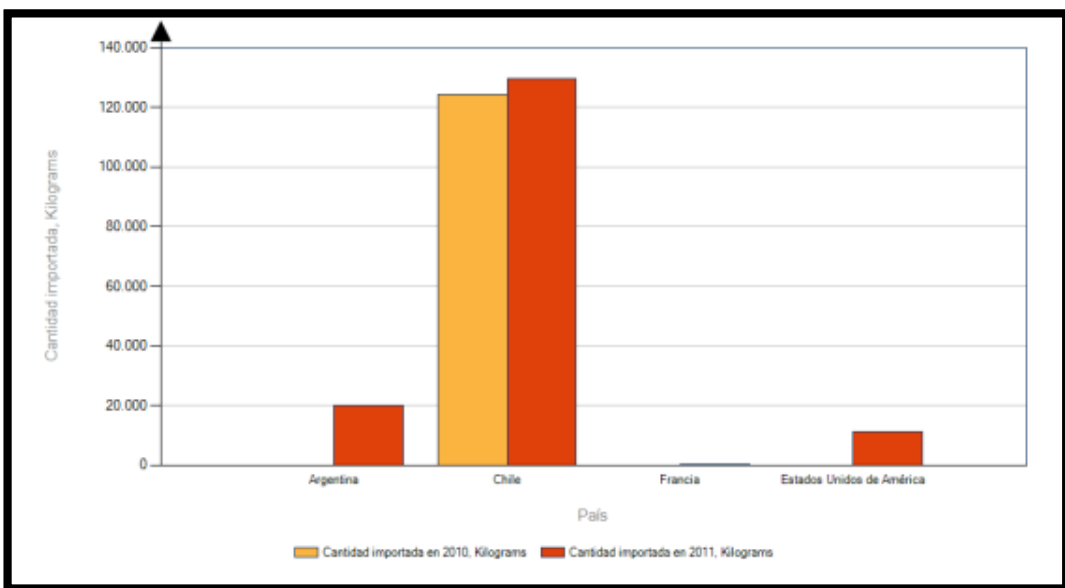
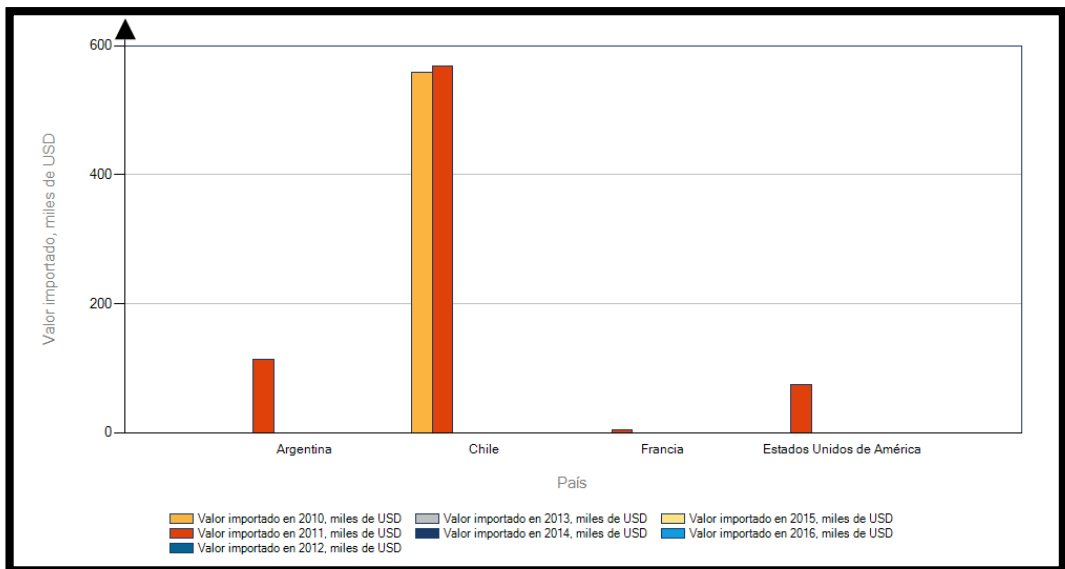


Figura 6-Exportación anual argentina de nueces desde 2010 a 2015 en toneladas (SINAVIMO).



Figuras 7 y 8- Países que importan nueces con cáscara de Argentina, en miles de dólares y en kilogramos, según años.

Chile ha sido el país origen de la mayoría de nuestras importaciones de nuez. Otros países proveedores son EE.UU e India (Lemus *et al*, 2001 y 2010).



Figuras 9 y 10- Países que proveen a Argentina de nueces con cáscara, en miles de dólares y en kilogramos, según años.

## **Consumo y utilidades de la nuez**

El consumo mundial de nuez se hallaba fuertemente vinculado a ciertos períodos del año, relacionados con las festividades religiosas, pero esta tendencia se modificó en los últimos años ya que sus propiedades alimenticias la convirtieron en un alimento de consumo frecuente (Doreste, 2011).

El consumo actual de nuez en la UE es de unas 180.000 Ton, de las cuales 130.000 son de consumo directo, y 50.000 ya descascaradas.

La nuez puede ser consumida también en forma indirecta, en productos manufacturados, entre ellos, el aceite de nuez con notables características dietéticas debido a la calidad de sus ácidos grasos, bebidas, harinas, y como componente de algunos alimentos como vinagres, mostazas, cremas, quesos, chocolates, confituras y otros. Se conocen además otras utilidades no alimenticias del nogal, ya que su aprovechamiento es completo y variado de acuerdo a cada una de las partes de la planta, como por ejemplo, el uso medicinal y cosmético del pericarpio y de las hojas, el uso como combustible y material abrasivo del endocarpio o cáscara, y el uso en ebanistería y fabricación de muebles, de la raíz y tronco.

Las características organolépticas del fruto son muy bien aceptadas por los consumidores, si bien podría argumentarse su exceso en el contenido de grasas. El contenido lipídico es muy alto, del orden del 65%, siendo su principal componente el ácido linoleico, que al ser insaturado proporciona beneficios cardiovasculares notables, como ser bajo en colesterol y propiedades anti arterioescleróticas. A su vez, la presencia del  $\gamma$  tocoferol, protege a los ácidos insaturados de la oxidación.

En la composición de la nuez, un 13% son proteínas fácilmente digestibles, y un 8% de fibras, que colaboran con el funcionamiento intestinal. Contiene además vitamina B, minerales, oligoelementos como Fe, Zn; Se; Ca, K y Mg, y polifenoles con efectos antioxidantes.

## **Desafíos de la producción argentina**

Un desafío prioritario para la producción argentina es la diversificación de mercados. Las nueces pueden contribuir a esa diversificación favoreciendo las exportaciones.

Argentina tiene algunos otros desafíos a mediano plazo, como:

- Abastecer plenamente la demanda local. Si bien algunas plantaciones nuevas se han realizado con criterios de trazabilidad e incluso han certificado normas de calidad, aún existen muchos montes manejados de manera tradicional que no están preparados para competir en los mercados internacionales.
- Mejorar la situación de los pequeños productores, que no pueden adquirir la tecnología necesaria para obtener producciones estandarizadas y de alta calidad.
- Realizar tareas de marketing para dar a conocer la calidad de la nuez argentina y ganar nuevos mercados.
- Realizar exportaciones de producto envasado, destacando su origen argentino.

Aunque existan algunas temáticas a mejorar, la producción nogalera argentina ha crecido ostensiblemente, puesto que se están realizando plantaciones con estándares de primer nivel que dentro de algunos años podrán competir no sólo con cantidad sino también por calidad. Se suman a ello las excelentes condiciones agroecológicas de las regiones productoras, y el hecho de que la oferta doméstica se registra en contra estación respecto de los principales países productores. Como además se han expandido las superficies implantadas con variedades nuevas, la producción de nueces se afirma como oportunidad de negocio en varias regiones argentinas (Doreste, 2011).

## **Características botánicas**

El nogal es un árbol de gran porte, que puede sobrepasar los 25 o 30 metros de altura, de copa globosa, ramificada, con tronco de corteza grisácea y de diferentes rugosidades según edad, especie y variedad. Su madera es de excelente calidad para carpintería y ebanistería. Las raíces conforman un sistema de gran desarrollo, y de importante crecimiento vertical. Aunque naturalmente la raíz es pivotante y puede llegar en suelos muy profundos a los 6 metros o más, en los cultivos comerciales, por efecto de la rotura de la raíz principal en el vivero, el sistema radicular es más ramificado y equilibrado,

explorando perfiles menores, de 2 a 4 metros, con una fuerte presencia de raíces absorbentes activas entre los 20 y 120 cm de profundidad. El crecimiento horizontal es muy importante y sobrepasa siempre la proyección de la copa del árbol. Las hojas son compuestas imparipinnadas, con folíolos glabros, no dentados, de forma oval a oval lanceolados, de color verde algo más oscuro en el haz que en el envés. El número de folíolos, así como el tamaño, diferencian a *Juglans regia* (7 a 9) de otras especies. Por ejemplo, *J. hinsii* posee de 15 a 21 folíolos dentados y más pequeños, mientras que *J. nigra* posee de 13 a 23 folíolos, de tamaño intermedio.

En relación a la biología floral, el nogal es una planta diclino monoica, es decir que posee flores masculinas y femeninas en una misma planta. Las masculinas se encuentran agrupadas en inflorescencias denominadas amentos, de 6 a 12 cm de longitud, con entre 100 y 160 flores apétalas, con 30-40 estambres, y que pueden liberar entre 1,5 a 2 millones de granos de polen. Las flores femeninas se presentan generalmente de 2 o 3, aunque pueden ser solitarias también. No tienen pétalos y tienen un ovario unilocular y bicarpelado, con 2 estigmas bien desarrollados, de forma plumosa.

Todas las variedades de *J. regia* son autofértiles, es decir, sin incompatibilidad polínica. Sin embargo, la apertura de flores de distinto sexo, no es coincidente en tiempo (dicogamia), presentando procesos de protandria y protoginia. Dada esa dicogamia existente en casi todas las variedades cultivadas, y el corto período de vida del grano de polen y de la receptividad de los estigmas para que haya un buen nivel de productividad en un monte frutal, es importante que durante la floración femenina, haya una buena emisión de polen. Otro aspecto particular del nogal, es que su polen es extremadamente liviano y su transporte es realizado por el viento (polinización anemófila), por lo cual debe tenerse en cuenta el porcentaje y la ubicación de las plantas polinizadoras. El proceso de inducción floral en Argentina tiene lugar entre fines de diciembre y mediados de enero.

Las yemas fructíferas femeninas se pueden ubicar en posición terminal o lateral de las ramas, siendo la fructificación lateral una característica de interés agronómico puesto que incrementa el número de yemas fructíferas por brote, aumentando notablemente la producción.

El fruto del nogal se define botánicamente como una drupa indehisciente, en la cual se reconocen desde el exterior al interior, pericarpio o capote, endocarpio o nuez, y semilla o porción comestible (Iannamico, 2009) (Figura 11).

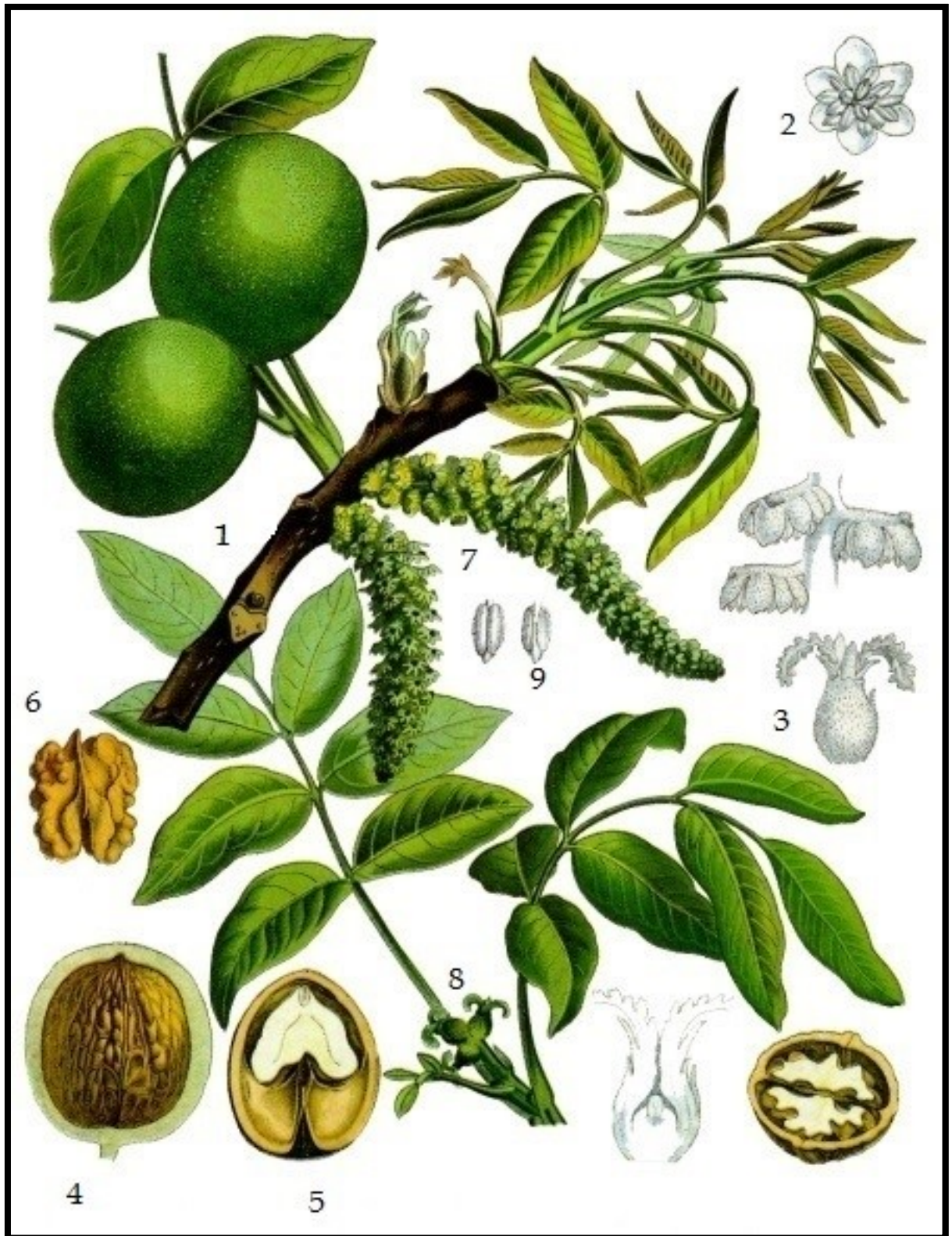


Figura 11- Descripción botánica de *Juglans regia* (L.) 1: ramita con hojas, drupas y amentos; 2: flor femenina; 3: ovario con estigmas plumosos; 4: fruto drupa: pericarpio y endocarpio; 5: endocarpio y semilla; 6: semilla; 7: amentos (flor masculina); 8: flores femeninas en racimo; 9: anteras.

## Condiciones ecológicas del cultivo

El cultivo del nogal se ve beneficiado por suelos profundos, bien drenados y de textura media, ya que cualquier limitación a la profundidad del suelo, podría modificar el vigor y tamaño de los árboles. Las texturas más favorables son las francas y franco arcillosas, que permiten una buena aireación, un nivel nutricional adecuado y una buena actividad biológica. El pH debe hallarse alrededor de la neutralidad (entre 6,5 y 8) siendo preciso utilizar el portainjerto *Juglans nigra* en terrenos más ácidos y *Juglans regia* en terrenos más calizos. Los niveles de materia orgánica en el suelo deben ser de 2 a 2,5%. Es una especie altamente sensible a la salinidad, tanto del suelo como del agua de riego. Los iones de Na, Cl y Bo provocan toxicidad específica en las plantas, causando necrosis de los bordes de las hojas o necrosis total y caída del folíolo, si es muy severa.

Es fundamental tener en cuenta el comportamiento de las variedades en función de la ocurrencia de heladas, tanto primaverales como otoñales, siendo las primaverales las que afectan el desarrollo de los brotes, ocasionando pérdida de yemas en brotación o de los crecimientos que portan flores pistiladas, con la consecuente pérdida de producción potencial y de calidad (Iannamico, 2009).

Es una especie con reposo invernal, y en el caso de falta de frío, pueden darse retrasos en la apertura de yemas, brotaciones irregulares y dispersas, desprendimiento de yemas y producciones escasas. El frío invernal se mide en horas frío por debajo de 7,2°C, sumadas desde la caída de hojas. En promedio el nogal requiere 800 horas de frío, las variedades francesas necesitan aproximadamente 1500 horas de frío, contra 300 horas de frío de algunas variedades californianas.

En condiciones de secano, el cultivo de esta especie requiere precipitaciones anuales mínimas de 600-700 mm, con buena uniformidad. En cuanto a plantaciones intensivas las exigencias de agua se elevan de 1000 a 1200 mm.

La alta humedad ambiental unida a temperaturas superiores a 15°C., especialmente en primavera, facilita el desarrollo de enfermedades, como *X.arboricola* pv *juglandis*. Las lluvias tardías de otoño pueden provocar retrasos en la recolección de los frutos y pérdidas en la calidad de los mismos.

## Aspectos sanitarios

Siendo el sur de la provincia de Santa Fe una zona con suelos de tipo argiudol vértico y con alta humedad (HR promedio 75%), las enfermedades que se presentan en el cultivo son diferentes a las que se manifiestan en las zonas nogaleras típicas. Las enfermedades más importantes en zonas húmedas son el Tizón Bacteriano, la Necrosis Apical y la Podredumbre ocasionada por *Phytophthora* (Teviotdale *et al.*, 2002).

El Tizón Bacteriano o Bacteriosis del nogal es una enfermedad de gran impacto en el cultivo por los daños que produce en el fruto y el follaje. El agente causal es *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* (Teviotdale *et al.*, 2002); (Giraud *et al.*, 2010); (Scortichini, 2010); (Frutos y Lopez, 2012); (Lamichhane, 2014). Esta enfermedad se presenta en Australia, Canadá, Chile, Francia, Gran Bretaña, Holanda, Italia, México, Nueva Zelanda, Rumania, Rusia, Sudáfrica, Suiza, EEUU e India. Su presencia es principalmente severa en la costa oeste de Norteamérica.

Lamichhane en 2014, considera a dicha enfermedad como responsable de importantes pérdidas económicas a nivel mundial y menciona diferentes epidemias en Irán, Lituania, Turquía y Francia. También señala, que debido a su relativamente largo ciclo de vida, los frutales de carozo y nueces, proveen un nicho constante para la supervivencia y multiplicación de los patógenos bacterianos. *X. arboricola* se detalla en el listado de organismos cuarentenarios de la Legislación Cuarentenaria de la Unión Europea.

En Argentina, la enfermedad fue mencionada originariamente por Marchionatto en 1928 (González Vera y Seleme, 2018) y en 1944, y adquirió cierta importancia en los nogales ubicados en la provincia de Buenos Aires, como también en Mendoza (Feldman y Pontis, 1960), La Rioja, Río Negro y Chubut (Fernandez Valiela, 1975). Pozzo Ardizzi, en 2005, menciona la presencia de dicha enfermedad, reportada básicamente en zonas productoras donde las condiciones ambientales son favorables a la presencia de la misma, como ocurre en el Valle Inferior del Río Negro.

Prácticamente todos los órganos aéreos de la planta pueden ser afectados, pero los daños más importantes son los que se producen en los frutos. La infección en brotes usualmente comienza en la punta de los mismos, durante un corto período en la primavera, cuando se

encuentran suculentos. Las lesiones pueden ser desde unos pocos centímetros hasta 2,5 cm o más, pudiendo involucrar sólo la corteza o extenderse hacia el interior, formando canchales.

En hojas, sus síntomas son lesiones marrones con perímetros verde amarillento y generalmente de unos pocos milímetros de diámetro. Sin embargo, muchas lesiones cercanas pueden unirse formando grandes áreas necróticas de color bronceado. Los tejidos muertos frecuentemente causan malformaciones. Las hojas infectadas permanecen dañadas y raramente abscionan.

Las flores son infectadas apenas aparecen en la primavera, tan pronto como los estigmas se hacen receptivos al polen. Muchas flores pequeñas y frutos recién cuajados, estando infectados, caen prematuramente.

Los amentos infectados se tornan oscuros y las flores individuales marchitas distorsionan la forma del amento. El patógeno se expande de flor a flor rápidamente e internamente dentro del raquis, pudiendo contaminarse el polen.

La localización de las infecciones en el fruto varía de año en año, y refleja el estadio del fruto en el momento de la infección. Esporádicamente, las infecciones pueden ocurrir cuando el fruto ya está próximo a la cosecha. Las lesiones superficiales en estados inmaduros comienzan como pequeñas manchas acuosas, que luego se oscurecen y se agrandan rápidamente. Los exudados bacterianos pueden ocurrir en condiciones de humedad y ruptura de la epidermis sobre la lesión.

Para la medición de la enfermedad se pueden utilizar escalas o porcentajes de severidad, tanto en hojas como en frutos. Bandi *et al.* en 2010 evaluaron frutos de diferentes variedades de nogal infectados con *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*, a través de una escala de susceptibilidad entre 0 y 4, mientras que Vagelas *et al.* en 2012 estudiaron el comportamiento de diferentes variedades de nogales frente a *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*, utilizando una escala de severidad de A a E con 5 clases de susceptibilidades.

### ***Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Pierce)**

Es una bacteria baciliforme con un tamaño de 0.3-0.5 x 1.5- 3.0 µm, que se moviliza por medio de un flagelo polar. Produce un pigmento amarillo distintivo, en la mayoría de los

medios de cultivo estándar. El crecimiento óptimo *in vitro* ocurre entre 28 y 32°C, siendo la máxima temperatura de crecimiento 37°C, y la mínima entre 5°C. El nogal es su hospedante específico, así la bacteria infecta solamente a especies del género *Juglans*. El patovar *juglandis* se diferencia del resto de los patovares de *X. arboricola* y de otros patógenos de plantas, por su habilidad para producir ácido gálico y sustancias de coloración oscura (Teviotdale *et al.*, 2002).

*X. arboricola* pv *juglandis* inverna en forma primaria en yemas dormidas. El nivel de infección de las yemas es variable y puede oscilar desde cantidades indetectables de bacterias hasta  $1 \times 10^7$  células por yema (Teviotdale. *et al.*, 2002) (Lindow, 2003). La incidencia en yemas puede diferir entre montes frutales, afectando prácticamente a todas las yemas en algunos montes, y a unas pocas yemas en otros. Bajo condiciones favorables *X. arboricola* pv *juglandis* se multiplica en yemas, en hojas y frutos jóvenes a los cuales se dispersa. La bacteria es transportada por la lluvia, por insectos y polen. El polen, llevado por el viento, traslada la bacteria desde flores estaminadas infectadas a largas distancias (Teviotdale *et al.*, 2002) (Lindow, 2006). La caída de lluvia es el mayor factor de contribución a las infecciones. La enfermedad aparece mucho más frecuentemente en primaveras húmedas. Otras formas de precipitaciones, como humedad causada por niebla, rocío y riego por aspersión en partes susceptibles de la planta, facilita también la infección.

Existe una alta probabilidad de aparición de la enfermedad cuando la presencia de la población bacteriana es de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células por órgano. El patógeno puede entrar a la planta a través de los estomas en presencia de agua libre. Las heridas producidas por insectos como la mosca de la nuez *Rhagoletis completa* (Cresson) o la polilla de la manzana (*Cydia pomonella* L.) y los tricomas quebrados, también permiten la invasión.

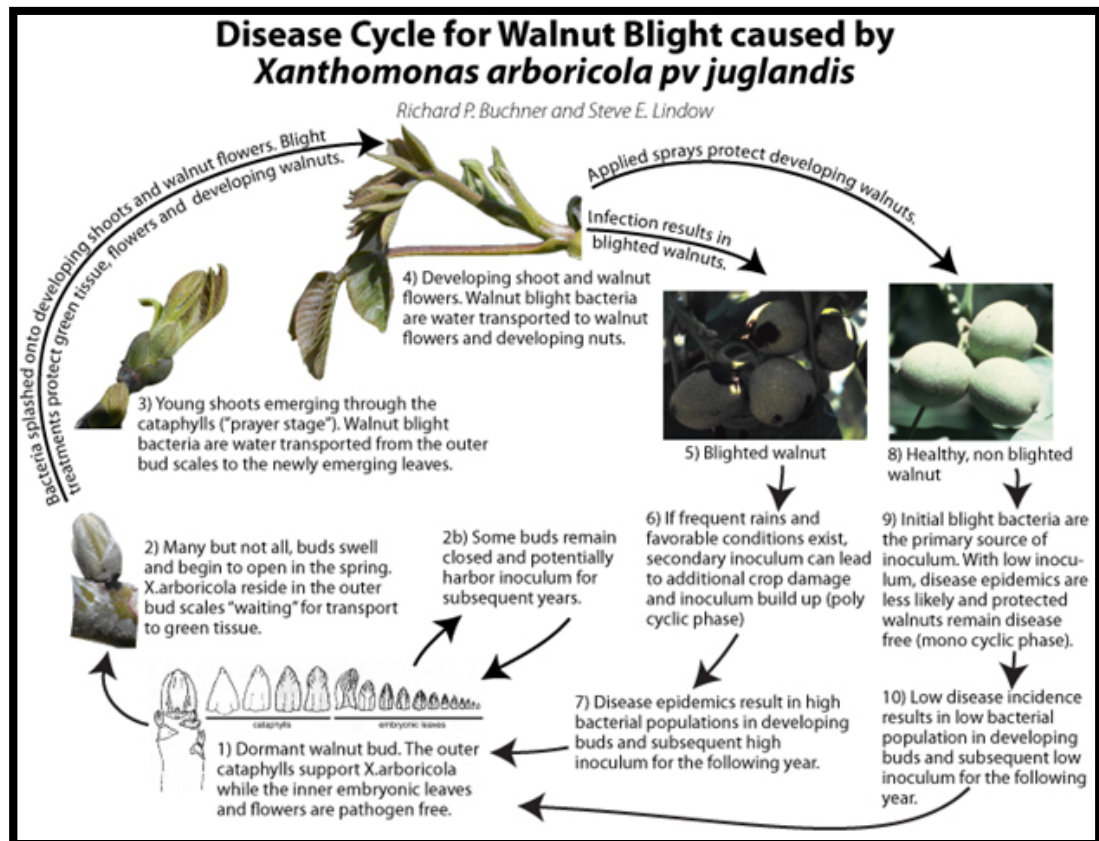


Figura 12- Ciclo de la Bacteriosis del nogal causada por *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* 1-Yema dormida: las catáfilas albergan *X.arboricola* mientras que las hojas y flores embrionarias son libres del patógeno. 2- Primavera: las yemas empiezan a abrir, *X. arboricola* reside en las catáfilas exteriores esperando ser transportada a tejidos verdes o bien quedando como inóculo para años posteriores. 3- La bacteria es transportada por el agua desde las catáfilas de las yemas a las hojas emergentes. 4- Brotes y flores en desarrollo. El agua transporta la bacteria hasta flores y frutos en formación. 5- frutos infectados. 6- si continúan las lluvias y las condiciones favorables, el inóculo secundario causa daños adicionales (fase policíclica). 7- por la epidemia ocurre un aumento en la población bacteriana en yemas lo que origina gran incremento del inóculo para el siguiente año. 8- Frutos no infectados. 9- La primera fuente de inóculo es el tizón bacteriano inicial. Con poco nivel de inóculo la epidemia es baja mientras que las nueces estén libres de enfermedad (fase monocíclica). 10- una incidencia baja resulta en un bajo nivel poblacional en yemas en desarrollo y por lo tanto bajo nivel de inóculo para el siguiente año (Tomado de Buchner *et al.*, 2013).

Para el aislamiento de la bacteria se puede utilizar un medio de cultivo semi selectivo denominado Brilliant Cresyl Blue Starch (BS) (Mulrean y Schroth, 1981). La bacteria se identifica en base a la morfología de la colonia y su habilidad para hidrolizar el almidón, en este medio (Schaad *et al.*, 2001) (Lindquist, 2001). Otro medio semiselectivo que contiene antibióticos ha sido propuesto por Gironde *et al.*, 2009.

Se ha detectado variabilidad en *Xanthomonas* en diferentes localidades en el mundo. A nivel molecular se han utilizado diferentes técnicas como MultiLocus Sequence Typing (MLST) (Marceletti *et al.*, 2010), (Burokiene, 2009), Random Amplified of polymorphic ADN (RAPDS) (Esterio *et al.*, 2007) (Kishun y Gupta, 2008), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Loretti *et al.*, 2001) (Barinovi *et al.*, 2008) y Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Berthier *et al.*, 1993). Estas técnicas son ampliamente utilizadas para generar información a nivel de variabilidad del ADN. La técnica Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) ofrece las ventajas similares a la técnica de RAPDS, como por ejemplo su sencillez y rapidez y además no presenta variabilidad en los resultados entre laboratorios. Los SRAP se han utilizado hasta el presente para detectar variabilidad entre materiales vegetales. La técnica de PCR repetitiva (rep-PCR) descrita por Louws *et al.* (1994), utilizando los iniciadores correspondientes a los elementos ERIC, REP y BOX se usa comúnmente para diferenciar a nivel molecular bacterias, específicamente para *Xanthomonas* (Louws *et al.*, 1994); (Pooler *et al.*, 1996); (Tushemereirwe *et al.*, 2004); (Kaluzna *et al.*, 2014), (Burokiene, 2009).

En 2012, Burokiene y Pulawska caracterizaron a través de rep PCR y MLST diferentes aislamientos de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* de Lituania y Polonia. Al no existir altas diferencias entre ellas, los autores sugirieron que la diversidad genética de las razas puede no responder básicamente a aislamientos geográficos. La importancia de esta patología fundamenta la necesidad de realizar estudios epidemiológicos para manejarla eficazmente y reducir la aplicación de productos fitosanitarios y favorecer la sustentabilidad del ecosistema. En el mismo año, Ivanović *et al.* en Serbia utilizaron la técnica de ERIC PCR para determinar diferencias genéticas entre biotipos de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*.

El control de la bacteriosis es de carácter preventivo y consiste en la aplicación de bactericidas (Turíni y Teviotdale, 1994) (Belisario, 2005) (Prichard *et al.*, 2006). Todas las variedades comerciales son susceptibles, pero aquellas de brotación tardía como Hartley y

Franquette pueden evitar la enfermedad en climas mediterráneos, en los cuales las lluvias terminan abruptamente a fines de primavera (Adaskaveg *et al.*, 2006, 2007, 2016). Arquero *et al.* (2005) evaluaron el efecto de diversos factores en la incidencia de la enfermedad, encontrando diferencias en relación a la susceptibilidad entre variedades, y en relación al ambiente.

Flores *et al.* (2004) demostraron que para la localidad de Zavalla, las variedades californianas Davis y Tulare y la variedad francesa Franquette fueron las de mejor comportamiento frente a la enfermedad, siendo la variedad Chandler, también californiana, altamente susceptible. Estos resultados concuerdan con lo observado por Tamponi (1988), quien afirma que las variedades de brotación temprana muestran elevados valores de susceptibilidad, llegando al 90% de frutos afectados.

A partir del año 2000 en California, se aplicó un modelo de pronóstico de la bacteriosis del nogal denominado XanthoCast™ desarrollado en la Universidad de California (Adaskaveg *et al.*, 2006). Este sistema considera todos los componentes del triángulo de la enfermedad (hospedante, patógeno y ambiente). El componente hospedante está definido por el estado fenológico y por la resistencia diferencial entre las variedades. En el componente patógeno, el inóculo aparece como el parámetro más predecible para estimar ya que la enfermedad es endémica en plantaciones de nogales a lo largo de toda California. La incidencia de la enfermedad del año anterior es un excelente indicador del inóculo potencial de un monte para la siguiente estación porque la bacteria tiene una alta potencialidad reproductiva bajo condiciones ambientales favorables (Giraud *et al.*, 2010). Para la caracterización del componente ambiental del triángulo de la enfermedad, se considera que el período húmedo y las temperaturas favorables son críticas para el desarrollo de epidemias. Así, el modelo utiliza la duración del período húmedo y las temperaturas, como parámetros ambientales que se muestran críticos para el desarrollo de la enfermedad en laboratorio y a campo. En estudios comparativos de campo la utilización del modelo Xantho Cast permitió la reducción del número de aplicaciones de bactericidas en montes en producción haciendo el manejo más amigable con el ambiente. El modelo fue validado en diferentes condiciones climáticas, por ejemplo, Scortichini (2010) considera dicho modelo como referente para las condiciones predisponentes en Italia. En 2002, Costa y otros, también fundamentaron el uso de modelos epidemiológicos, como herramienta eficiente para el estudio de enfermedades a nivel de poblaciones y comunidades.

Moschini *et al.*, en 2010 trabajaron en la identificación de variables meteorológicas para la Cancrosis de los cítricos en la localidad de Bella Vista (Corrientes, Argentina), mientras que en 2012, Bombelli *et al.*, consideraron modelos predictivos que evaluaban severidad de manchas foliares causadas por *Alternaria tenuissima* en plantaciones de arándano en tres localidades argentinas: San Pedro, Concordia y Gualeguaychu.

Por su parte, Lang y Evans (2010), Frutos y Lopez (2012) y Lamichhane (2014) proponen también el estudio epidemiológico como una herramienta para la prevención de la enfermedad, sin el uso abusivo de productos químicos.

En nuestro país no había sido desarrollado, hasta el presente, ningún modelo para el manejo de esta enfermedad, realizándose aplicaciones de bactericidas cada 15 días sin considerar el patosistema específico *Xanthomonas-Juglans*.

El conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad, su desarrollo en el tiempo, la relación con las condiciones climáticas y la variabilidad de las cepas existentes, permitirían el establecimiento de pautas generales para el manejo efectivo de la enfermedad.

## HIPÓTESIS

Los aislamientos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* procedentes de diferentes localidades argentinas muestran variabilidad a nivel molecular. Las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis presentan curvas de desarrollo de la enfermedad diferentes que se pueden relacionar con los factores climáticos, y con los datos obtenidos se puede desarrollar un modelo epidemiológico. De acuerdo al nivel de infección en yemas y granos de polen se podría predecir el nivel de inóculo inicial en la próxima campaña.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el comportamiento de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nogal (*Juglans regia*) en la región centro de la República Argentina, determinar su variabilidad a nivel molecular y desarrollar un modelo epidemiológico para su manejo.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Corroborar la identidad de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nogal europeo, en la región centro de la República Argentina.
2. Determinar variabilidad a nivel molecular de aislamientos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* procedentes de diferentes localidades de la región húmeda de Argentina.
3. Evaluar la severidad de la bacteriosis a través del tiempo en las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis.
4. Relacionar la severidad de la bacteriosis con los factores climáticos para desarrollar un modelo epidemiológico que tenga en cuenta las condiciones ambientales de la zona en estudio.
5. Analizar las estrategias de hibernación y dispersión del patógeno en yemas productivas y granos de polen.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **1- Corroborar la identidad de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nogal europeo.**

Se trabajó en el Campo Experimental José Villarino perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (Zavalla, Santa Fe, Lat. S 33° 01 Long. O 60° 53'), sobre una colección de nogales implantada en el año 1998.

Dicha colección está compuesta por las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis, con un total de 6 a 11 plantas por variedad. El total de plantas presentaba síntomas de manchas necróticas en hojas y en frutos, con diferentes niveles de severidad.

Teniendo como diagnóstico presuntivo la presencia de *X. arboricola* pv *juglandis* y con el fin de corroborar dicho diagnóstico se recogieron trozos de hojas que incluían parte enferma y parte sana del tejido. Se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio BS (Brilliant Cresyl Blue Starch, Mulrean y Schroth, 1981) cuya composición en g/L fue:

Almidón de papa: 10.0

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3 H<sub>2</sub>O: 3.0,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.5,

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2.0,

L-metionina: 0.25,

Ácido nicotínico: 0.25

L-glutamato: 0.25 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO 69178),

Cresilo de azul brillante: 0.01 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ 08865, 55% contenido total seco),

Verde de metileno: 0.01 (Allied Chemical and Dye Corporation, New York, NY)

Bacto Agar (Difco): 15.

Previo a la siembra, los tejidos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 1 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Luego de la siembra, se incubaron en estufa a 25-27°C por 72 hs. El medio BS es semiselectivo para *X. arboricola* pv *juglandis* y la identificación se basó en la morfología de la colonia y su habilidad para hidrolizar el almidón. Con posterioridad a la aparición de las colonias, se agregó lugol (disolución acuosa de yoduro potásico y yodo) para comprobar la hidrolización del almidón.

## **2- Determinar variabilidad a nivel molecular de aislamientos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* procedentes de diferentes localidades de la región húmeda de Argentina.**

Se recolectó material foliar de nogales de campo con síntomas de bacteriosis en 4 localidades productoras de la región centro de Argentina, 2 ubicadas en la provincia de Córdoba (Inrville y Corral de Bustos), y 2 en la provincia de Santa Fe (Oliveros y Zavalla)

Inrville 32°56' S 62°14' O

Corral de Bustos, 33°17' S 62°12' O

Oliveros 32°34' S 60°51' O

Zavalla, 33° 01' S 60° 53' O

De cada localidad se tomaron muestras de las que se obtuvieron 4 aislamientos diferentes designados como I1, I2, I3, I4 (Inrville), C1, C2, C3, C4 (Corral de Bustos), O1, O2, O3, O4 (Oliveros) Z1, Z2, Z3, Z4 (Zavalla), totalizando 16 aislamientos. El medio de cultivo utilizado fue BS (Brilliant cresyl blue Starch) y se realizaron repiques al mismo medio hasta obtener cultivos puros. Estos cultivos puros fueron repicados individualmente a medio sólido agar tripteina soja (Britania) (Figura 13) cuya composición (g/L) fue:

Tripteina de soja: 15

Peptona de soja: 5

Cloruro de sodio: 5

Agar: 15

pH final:  $7,3 \pm 0,2$

Para la preparación del ADN molde, por la técnica de lisis de colonias, se tomaron las colonias obtenidas en medio sólido agar tripteina de soja y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de agua ultrapura (milliQ) estéril. Esta suspensión se llevó a ebullición durante 10 min y luego se centrifugó durante 2 min a máxima velocidad (15000 RPM) con centrifuga (Beckman). Se separó el sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano, el cual se utilizó para las reacciones de PCR.

Los aislamientos fueron genotipificados aplicando dos reacciones de PCRs diferentes utilizando los cebadores descritos previamente que hibridan con elementos repetitivos presentes en algunos genomas bacterianos (REP-PCR y ERIC-PCR).

Los Cebadores utilizados para ERIC-PCR: fueron:

ERIC1: CAC TTA GGG GTC CTC AAT GTA

ERIC2: AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G

Los cebadores para REP-PCR que se utilizaron fueron

REP1: III GCG CCG ICA TCA GGC

REP2: ACG TCT TAT CAG GCC TAC

En ambas reacciones se utilizaron las mismas condiciones:

Agua milliQ csp 25 $\mu$ l

Buffer 1x

Cl<sub>2</sub>Mg 5mM

dNTPs 1mM

Cebador 1 $\mu$ M cada uno

ADN 50 ng

Taq Pol 0.1U

Se realizaron 35 ciclos de la siguiente secuencia:

94°C--- 2 min

94°C--- 30 seg

50°C--- 1 min 35

72°C--- 4 min

72°C--- 10 min

Los fragmentos de ADN amplificados se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa de concentración 1,5% en buffer TBE 0.5X, durante 60 minutos, 60V. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 15 min y fotografiado con luz ultravioleta.



Figura 13 a-Colonias amarillas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* creciendo en medio Agar tripteína de soja.



Figura 13 b- Tubos Eppendorf con aislamientos de *X. arboricola* pv *juglandis* en medio Agar tripteina de soja.

### **3- Evaluar la severidad de la bacteriosis a través del tiempo en las variedades Franquette, Tulare, Chandler y Davis.**

Durante las campañas 2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013, se realizaron recorridas a campo en el monte frutal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario a partir del mes de noviembre, coincidente con el momento de inicio de expansión foliar de las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis, y hasta caída de hojas (aproximadamente en el mes de febrero). Se tomaron datos de severidad en hojas (área foliar afectada /área foliar evaluada X 100). La evaluación se realizó a campo, en forma visual sobre el total del follaje de la planta.

Las mediciones se realizaron una vez por semana en cada ejemplar individualmente, promediándose los datos para cada variedad. Con los datos obtenidos se construyeron las curvas de progreso de la enfermedad correspondientes a cada variedad, con datos de cada año y comparando las 3 campañas.

Se aplicó un Diseño en Bloques Completos Aleatorizados (DBCA) con 6 repeticiones, siendo cada repetición un árbol.

Para analizar los datos se utilizó un ANOVA y la separación de medias se realizó mediante el Test de Duncan, con un  $\alpha=0,05\%$ . En el análisis conjunto para las 3 campañas, se utilizó el programa Proc GLM del SAS.

#### **4-Relacionar la severidad de la bacteriosis con los factores climáticos para desarrollar un modelo epidemiológico que tenga en cuenta las condiciones ambientales de la zona en estudio.**

Utilizando las mediciones climáticas obtenidas durante el experimento y considerando la severidad de las variedades, se desarrolló un modelo predictivo.

Durante tres estaciones de crecimiento (2010/11, 2011/12, 2012/13), en plantas de nogal de las variedades susceptibles Chandler, Davis y Tulare (susceptibilidad,  $\text{sus}=1$ ) y de buen comportamiento (Franquette:  $\text{sus}=0$ ) del monte frutal del Campo Experimental de la Facultad de Cs. Agrarias de la UNR, se realizaron observaciones de severidad de la bacteriosis (área foliar afectada/área foliar evaluada x 100). En cada fecha se tomó el valor mediana de las observaciones realizadas en el total de plantas. Cada 7 días, desde fines de primavera a los últimos días de febrero se registró la severidad en hojas. Los valores acumulados de severidad (Sev %) por fecha de monitoreo se consideraron en días julianos a lo largo de cada curva de progreso epidémico. Para el desarrollo de modelos logísticos predictivos (N=76) se utilizaron las tasas de incremento diarias (Tid%), para las tres campañas. En el caso de las variedades susceptibles se calculó la media de las tres observaciones de Tid% correspondientes a cada variedad.

#### **Desarrollo de modelos de regresión logística**

La Variable dependiente fue la probabilidad de ocurrencia de niveles categorizados de tasa de incremento de severidad de la enfermedad.

La tasa de incremento epidémico diario (Tid %) surgió de la diferencia entre el valor acumulado (Sev %) en el tiempo  $t$  y el valor en  $t-1$ , dividido el número de días entre las dos observaciones (7 días).

Para la Categorización de las variables, se ordenaron en forma ascendente los 76 valores de tasa de incremento epidémico diario disponibles para las tres curvas epidémicas obtenidas por tipo de variedad y el percentil 40 % alcanzó el valor 0,1367 %.

Este umbral fue utilizado para categorizar binariamente las observaciones de Tid % en:

severa (S):  $Tid > 0,1367\%$  y

moderada a nula (M):  $Tid \leq 0,1367\%$ .

#### Variables meteorológicas

La Estación meteorológica de Zavalla proveyó los datos siguientes

Temperatura máxima (Tx: °C)

Temperatura mínima (Tn: °C)

Precipitación (Pr: mm)

Humedad relativa (HR: %).

La temperatura media diaria (Tm) fue calculada como la semisuma de las temperaturas máxima y mínima.

Basados en estos elementos se construyeron las siguientes variables meteorológicas simples:

**DPr > 9:** total de días con precipitación > 9 mm;

**Prac:** total de precipitaciones diarias acumuladas en mm;

**DMojro** días sin lluvia (<0,2mm), con mojado atribuible al rocío por ocurrencia de humedad relativa del aire mayor a 82%;

**DMojpr:** días con precipitación ( $\geq 0,2$ mm);

**DMojt:** suma de DMojro y DMojpr;

**DHR:** días con humedad relativa del aire mayor a 81%;

**TxM:** media de las temperaturas máximas;

**TnM:** media de las temperaturas mínimas;

**DT:** total de días con  $Tx < 24^{\circ}\text{C}$  y  $Tn > 11^{\circ}\text{C}$ .

La variable discreta binaria tuvo en cuenta el efecto del comportamiento varietal respecto a la bacteriosis:

sum=1 para las variedades susceptibles (N=38) y

sus=0 para la variedad de mejor comportamiento: Franquette

Las variables fueron procesadas en el lapso de 15 días previos a cada observación de Tid % a lo largo de cada curva de progreso epidémico.

### **Análisis estadístico**

Se calcularon los coeficientes de correlación de Kendall (rK) Tau-b (Proc Freq del SAS) entre los niveles epidémicos (categorías de acuerdo a Tid%) y las variables meteorológicas descriptas.

Mediante el procedimiento *Logistic* del SAS se ajustaron modelos de regresión logística a los datos de respuesta binaria (Método de Máxima Verosimilitud).

Si se asume que PrS es la probabilidad de observar un nivel de Tid% severo (S), el modelo logístico, con  $X_1$  y  $IX_1X_2$  (interacción) como predictores, puede ser escrito como:

$$\ln (\text{PrS}/1-\text{PrS})= \beta_0 + \beta_1 X_1+ \beta_2 IX_1X_2,$$

en el cual  $\beta_0$  a  $\beta_2$  son parámetros y ln es el logaritmo natural.

Resolviendo la expresión  $\text{Exp} (\ln (\text{PrS} / 1-\text{PrS})) / (1+\text{Exp} (\ln (\text{PrS} / 1-\text{PrS})))$  se obtiene el valor de PrS.  $\text{PrL}=1-\text{PrS}$  (respuesta binaria).

El método de selección de variables Stepwise del Proc *Logistic* fue usado para obtener el modelo más apropiado, haciendo jugar las variables meteorológicas y discreta, fijando niveles de significancia de 0,25 para entrar (NSE) y permanecer (NSP) en el modelo.

Mediante el procedimiento Freq del SAS se confeccionaron tablas de contingencia para calcular el número de casos en los cuales coincide el nivel de Tid % observado (S o M) con el predicho. La precisión de predicción (Prec %) representa el porcentaje de casos analizados (N=76) correctamente clasificados con nivel de Tid % S o M.

Tanto el coeficiente de correlación de Kendall Tau-b como la precisión de predicción de los modelos logísticos desarrollados fueron tomados en cuenta para la selección final de la longitud del período en el cual se procesan las variables meteorológicas, de los umbrales de dichas variables y del valor percentil utilizado en la categorización de la variable respuesta.

## 5. Analizar las estrategias de hibernación y dispersión del patógeno en yemas productivas y granos de polen.

Durante los períodos otoño -invernales de los años 2010-2011 y 2012 se extrajeron 60 yemas de cada una de las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis de la colección, y en cada año de experimento. Las mismas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2% y se sembraron en mitades en cajas de Petri con medio selectivo para *X. arboricola* pv. *juglandis*, Brilliant Cresyl Blue Starch (BS). incubándose a 28°C por 72 hs.

La composición de BS en g/L es

almidón de papa: 10.0,

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3 H<sub>2</sub>O: 3.0,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,5,

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2.0,

L-metionina: 0.25,

Ácido nicotínico: 0.25

L-glutamato: 0.25),

azul brillante de Cresilo: 0.01 (55%),

Verde de metileno: 0.01 y

Agar 15g.

Se utilizó para el experimento un DBCA con 3 repeticiones de 20 yemas cada una.

Se consideraron infectadas aquellas yemas que desarrollaron a su alrededor colonias bacterianas opalescentes que hidrolizaron el almidón del medio, registrándose la incidencia como número de yemas que desarrollaron colonias/ total de yemas sembradas x 100.

Para evaluar estadísticamente los 3 años, se utilizó el Proc GLM de SAS.

Durante el primer año de evaluación se recolectó polen de 50 amentos de cada variedad, mediante bolsas de papel colocadas sobre los mismos, sujetas a las plantas. (Figuras 14 y 15)

El polen recogido se llevó al Laboratorio y se suspendió en 2 ml de agua destilada estéril. Dicha suspensión se sembró por medio de un ansa en cajas de Petri conteniendo

medio de cultivo BS. A las 72 hs se realizó la observación y conteo de las colonias de *X. arboricola* pv *juglandis*. Se determinó el número de colonias desarrolladas.



Figura 14- Amento de *Juglans regia* totalmente desarrollado previo a la recolección de polen. Zavalla 2010



Figura 15- Recolección de polen con bolsa de papel. Zavalla 2010

## RESULTADOS

### 1- Corroborar la identidad de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nogal europeo.

Los trozos de hojas de las plantas procedentes del Campo Experimental Villarino (Figuras 16 y 17), de las localidades de Inrville, Corral de Bustos y Oliveros, con síntomas de manchas necróticas en hojas que fueron sembrados en medio BS (Mulrean y Schroth, 1981) (Figura 18), desarrollaron a las 72 hs de incubación, colonias de color amarillento, de consistencia mucosa. Dichas colonias utilizaron como fuente carbonada el almidón contenido en el medio de cultivo, diluyendo el color azul característico del mismo. Con el fin de observar con mayor claridad la degradación del almidón se aplicaron sobre las colonias, gotas de solución de lugol, tiñendo el medio de color azul intenso, lo que indica que las colonias bacterianas degradan el almidón resaltando aún más el color blanquecino de la zona de la misma. (Figura 19 y 20)





Figuras 16 y 17- Plantas de nogal europeo con síntomas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* con síntomas en folíolos. Zavalla- 2013



Figura 18 Preparación del medio BS, visualizándose su color azul característico.



Figura 19- Trozos de hojas sembrados en medio BS

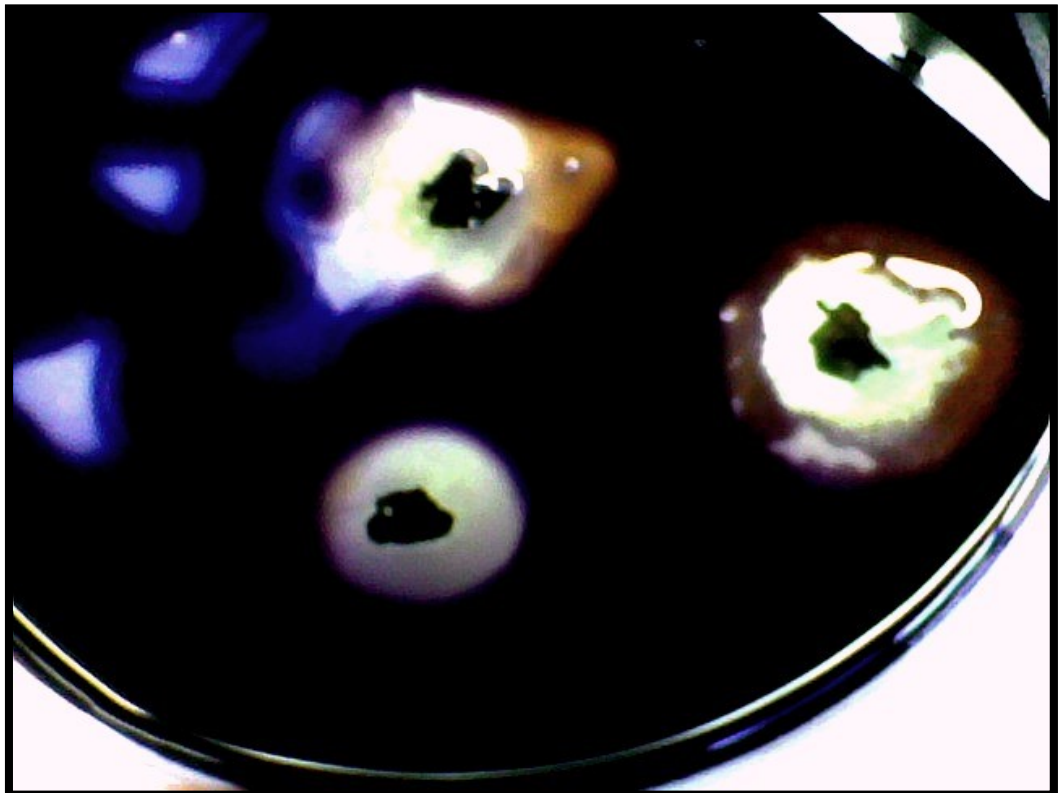


Figura 20- Desarrollo de colonias de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* a partir de trozos de hojas de nogal, sembradas en medio BS. La tinción con lugol muestra la degradación del almidón en el medio.

**2- Determinar variabilidad a nivel molecular de aislamientos de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* procedentes de diferentes localidades de la región húmeda de Argentina.**

Con los materiales obtenidos a partir de las distintas localidades, se realizaron 4 aislamientos de la bacteria a partir de trozos de hojas en medio BS luego de 72 hs a 25-27°C, y luego repicados a medio sólido agar tripteína de soja.

Los aislamientos fueron identificados como:

Inriville (I1, I2, I3, I4)

Corral de Bustos (C1, C2, C3, C4)

Oliveros (O1, O2, O3, O4)

Zavalla (Z1, Z2, Z3, Z4)

De acuerdo a las bandas obtenidas (Figura 21 y 22) en el gel a partir de los distintos aislamientos se puede observar que los dos métodos utilizados permitieron agrupar los aislamientos de manera concordante. Mediante análisis visual del perfil de bandas se pudieron definir 6 grupos (del A al F) que se correspondieron con 6 patrones de ERIC-PCR y REP-PCR:

Grupo A: aislamientos Z1, Z2, Z3 y Z4;

Grupo B: aislamientos O1, O2 y O3;

Grupo C: aislamiento O4;

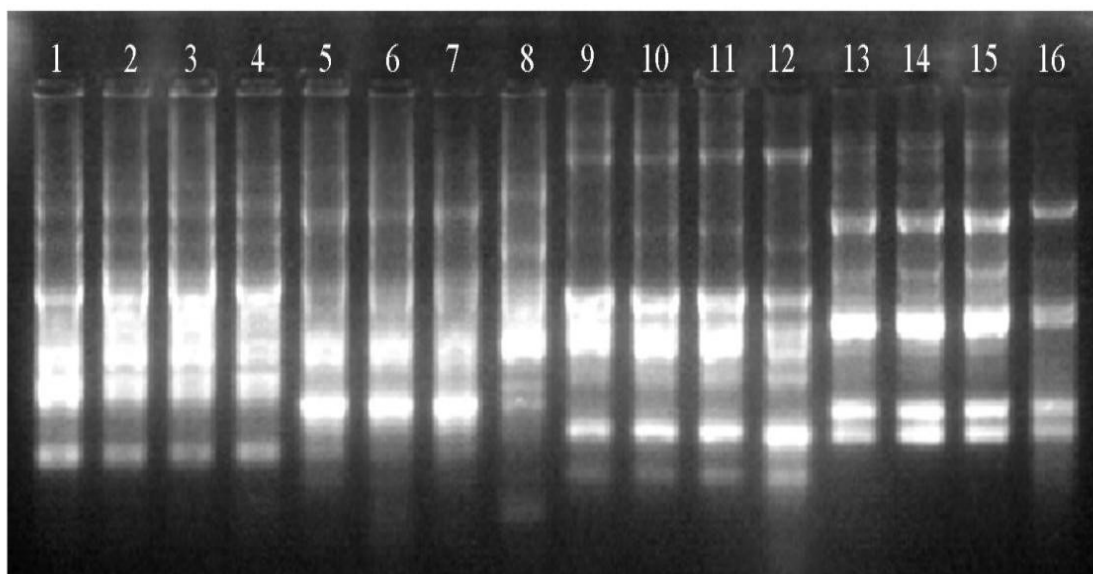
Grupo D: aislamiento I1, I2, I3 y I4;

Grupo E: aislamientos C1, C2 y C3;

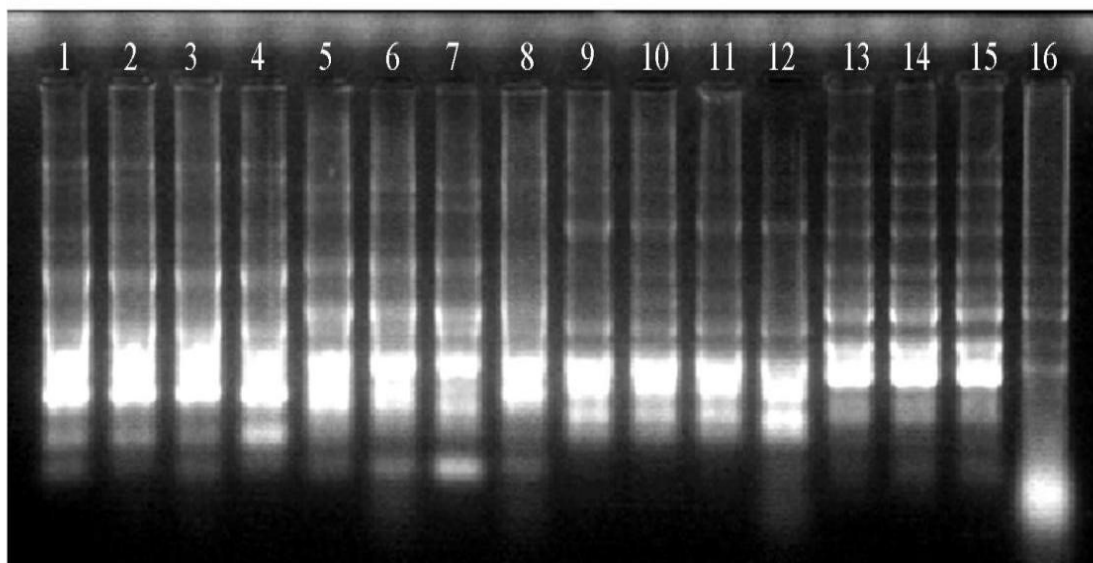
Grupo F: aislamiento C4.

Las cepas dentro de cada perfil son indistinguibles y diferentes de las cepas de otros perfiles. Se puede, por lo tanto concluir, que la variabilidad dentro de cada localidad es baja. Los aislamientos de cada localidad son similares entre si y diferentes a los de las otras localidades. En solo dos de ellas, Oliveros y Corral de Bustos, se encontraron dos variantes diferentes.

### ERIC-PCR



### REP-PCR



Figuras 21 y 22- Bandas obtenidas a partir de los aislamientos en ERIC- PCR y REP- PCR. Los números en la parte superior corresponden a: 1= Z1, 2=Z2, 3=Z3, 4=Z4, 5= O1, 6=O2, 7=O3, 8=O4, 9=I1, 10= I2, 11=I3, 12=I4, 13=C1, 14=C2, 15=C3, 16=C4

### 3-Evaluar la severidad de la bacteriosis a través del tiempo en las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis.

Con los datos obtenidos de la severidad a campo de cada una de las variedades se graficaron las curvas de progreso de la enfermedad, para cada campaña. (Figuras 23,24 y 25)

#### Severidad en diferentes variedades de nogal europeo

##### Campaña 2010-11

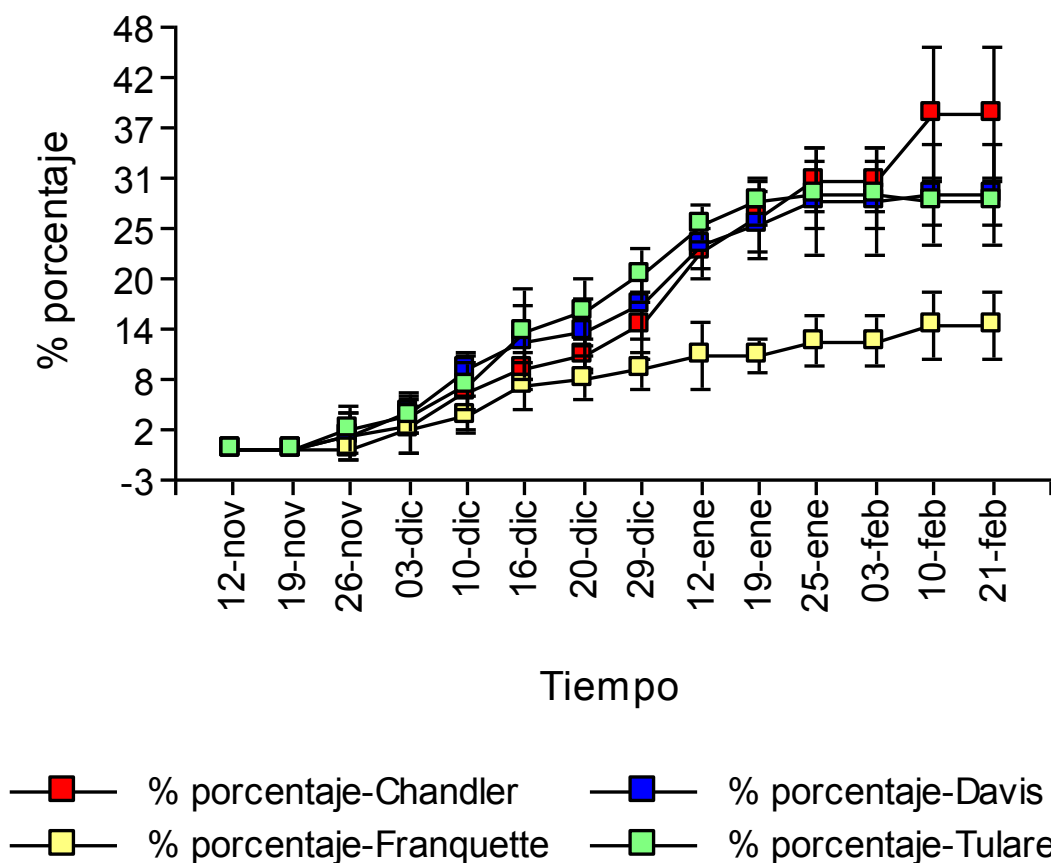


Figura 23- Datos de severidad (%) ( área foliar afectada/área foliar evaluada x 100) semanales para cada variedad.. Zavalla 2010- 2011.

**Severidad en diferentes variedades de nogal europeo  
Campaña 2011-12**

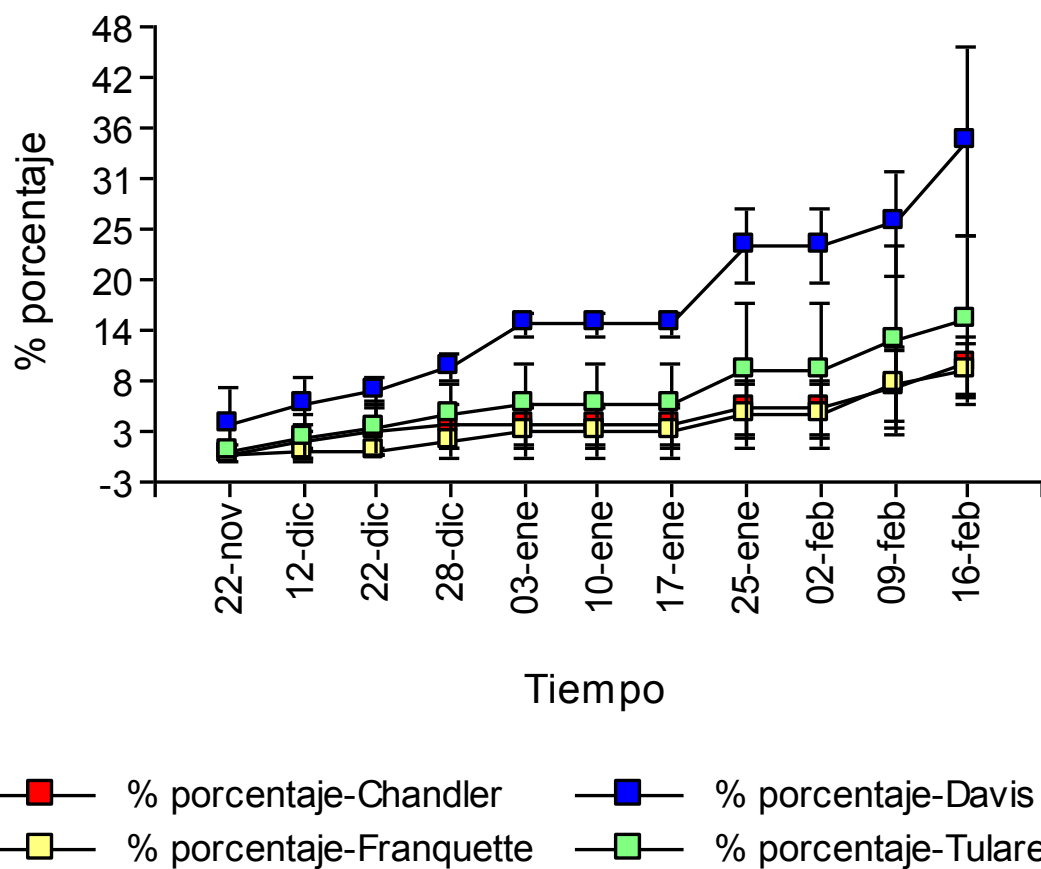


Figura 24- Datos de severidad (%) ( área foliar afectada/área foliar evaluada x 100) semanales para cada variedad. Zavalla 2011- 2012.

**Severidad en diferentes variedades de nogal europeo  
Campaña 2012-13**

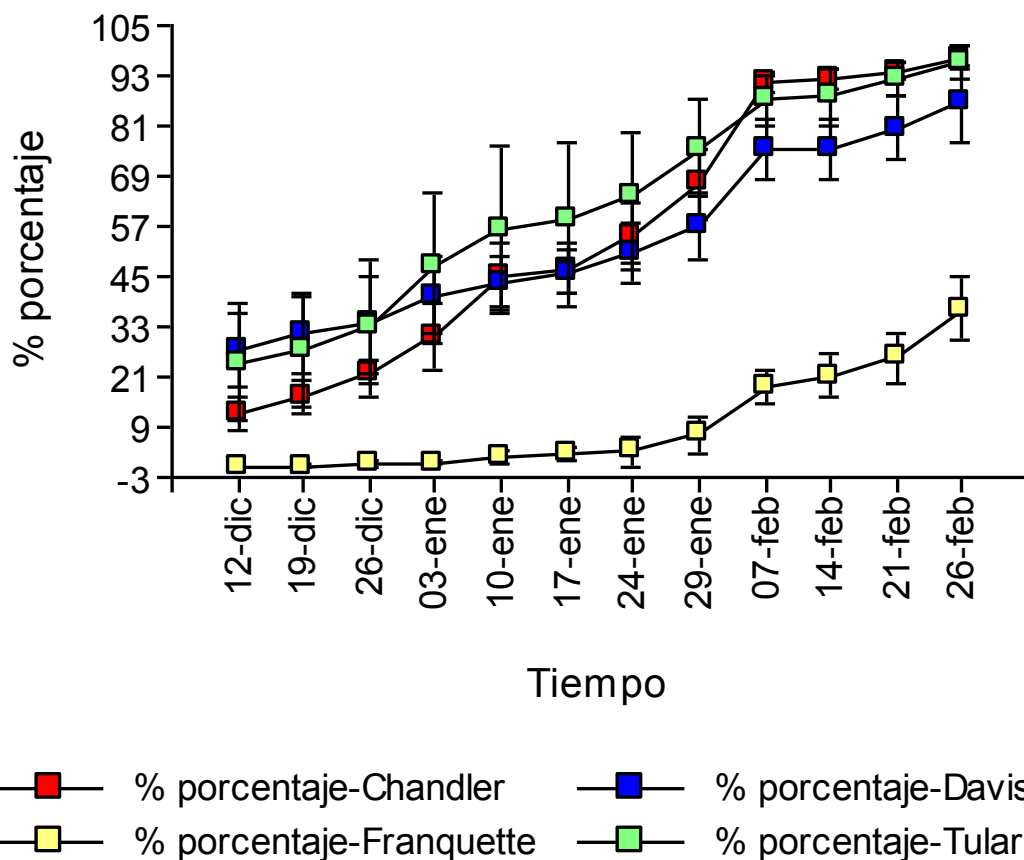


Figura 25- Datos de severidad (%) (área foliar afectada/área foliar evaluada x 100) semanales para cada variedad. Zavalla 2012- 2013.

El análisis de la variancia mostró diferencias entre variedades en cada campaña.

La prueba de separación de medias se realizó por Duncan.

Los resultados del Proc.GLM del SAS presentaron diferencias en la variable severidad (%) entre años, entre variedades e interacción año x variedad. (Tabla 1)

Campaña	Variedad	Media Severidad (%)	
2010-2011	Franquette	14,62	a
	Chandler	38,33	c
	Tulare	29,17	b
	Davis	28,33	b
2011-2012	Franquette	8,20	a
	Chandler	10	a
	Tulare	35	bc
	Davis	15	a
2012-2013	Franquette	37,50	c
	Chandler	97,50	e
	Tulare	86,67	d
	Davis	96,67	e

Letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan  $\alpha = 0.05\%$ )

Tabla 1- Comparación de medias para severidad (%) ( área foliar afectada/área foliar evaluada x 100) por *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* en las campañas 2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013 para cada variedad con el nivel de significancia.

La variedad de menor severidad en los 3 años fue Franquette (valor promedio: 19,51%), las restantes variaron año a año. (Tabla 2)

Variedad	Promedio de severidad (%) de las 3 campañas	
Franquette	19.51	a
Chandler	48.61	b
Tulare	50.28	b
Davis	46.66	b

Letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan  $\alpha = 0.05\%$ )

Tabla 2- Comparación de medias de severidad (%) ( área foliar afectada/área foliar evaluada x 100) entre las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis. Promedio de las campañas 2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013.

La campaña donde se registraron menores valores promedio de severidad fue 2011/12 (17.43%) y la más severa 2012/13 (79.58%) (Tabla 3)

Campaña	Medias de severidad (%)	significancia
2010-2011	27.61	b
2011-2012	17,43	a
2012-2013	79,58	c

Letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan  $\alpha = 0.05\%$ )

Tabla 3- Comparación de medias para severidad (%) (área foliar afectada/área foliar evaluada x 100) de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* para las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis en cada campaña con el nivel de significancia.

#### 4- Relacionar la severidad de la bacteriosis con los factores climáticos para desarrollar un modelo epidemiológico que tenga en cuenta las condiciones ambientales de la zona en estudio

En la Tabla 4 se presentan los coeficientes de correlación de Kendall (rK) Tau-b obtenidos entre las variables meteorológicas analizadas y los niveles epidémicos de la bacteriosis. El valor máximo de rK (0,4342) correspondió a la variable DPr > 9 que cuenta el número de días totales con precipitación > 9mm. Las variables son calculadas en el lapso de 15 días previos a cada observación de Tid% a lo largo de cada curva epidémica.

Variable	rK
DPr > 9	0,434
DMojro	0,326
DMojt	0,344
TnM	0,169
DT	0,159
Prac	0,277
DMojpr	0,296
DHR	0,336
TxM	0,04

Tabla 4. Coeficientes de correlación (rK) de Kendall Tau-b de variables meteorológicas en relación a los niveles epidémicos (severo y moderado a nulo). **DPr > 9**: total de días con precipitación > 9 mm. **Prac**: total acumulado en mm de precipitaciones diarias; **DMojro** días sin lluvia (< 0,2mm), con mojado atribuible al rocío por ocurrencia de humedad relativa del aire mayor a 82%. **DMojpr**: días con precipitación (> = 0,2mm). **DMojt**: se suman los días de las variables DMojro y DMojpr. **DHR**: días con humedad relativa del aire mayor a 81%. **TxM**: Tx media; **TnM**: Tn media; **DT**: total de días con Tx < 24°C y Tn > 11°C.

Mediante el procedimiento Proc *Logistic* del SAS se ajustó el modelo I que incluye, además de dos variables meteorológicas, una variable discreta binaria que tiene en cuenta el efecto del comportamiento varietal respecto a la bacteriosis (sus=1 y sus=0) (Tabla 5).

Este modelo resultó el más apropiado de acuerdo al método de selección de variables Stepwise del Proc *Logistic* corrido con todas las variables meteorológicas y la variable discreta (sus), con un nivel de significancia para entrar al modelo de 0,25. Cuando se desechó el efecto de la variable 'sus' que tiene en cuenta el comportamiento varietal, la precisión de predicción del modelo logístico decreció a 69,7% (53 observaciones clasificadas

correctamente). El modelo II que integra a  $DPr > 9$  y  $DMojt$  permitió clasificar correctamente 61 casos, de los 76 observados. Este modelo incluye el efecto de lluvias con un mínimo milimetraje ( $> 9\text{mm}$ ) para favorecer la dispersión bacteriana, más los días donde se dispondría de agua libre originada en el rocío ( $DMojro$ ) y por ocurrencia de precipitaciones ( $> 0.2\text{mm}$ ) ( $DMojpr$ ).

Modelo	Ecuaciones del Modelo	Precisión de predicción %
<b>I</b>	$Ec1 = -2,189 + 1,024 * DPr > 9 + 0,609 * DMojro + 1,7147 * sus$	81,5 (62/76*100)
<b>II</b>	$Ec1 = -2,3282 + 0,9499 * DPr > 9 + 0,1833 * DMojt + 1,6786 * sus$	80,0 (61/76*100)

Tabla 5. Modelos logísticos para estimar la probabilidad de ocurrencia de cada categoría epidémica: severa (S) y moderada a nula (M), en base a variables meteorológicas simples y una variable discreta que fija el comportamiento varietal (sus). Se presenta por modelo la precisión de predicción: % de casos (76) correctamente clasificados.

En la  $Ec1 = \ln(\text{PrS} / 1 - \text{PrS})$ , resolviendo la expresión  $\text{Exp}(\ln(\text{PrS}/1 - \text{PrS}) / (1 + \text{Exp}(\ln(\text{PrS}/1 - \text{PrS})))$  se obtiene el valor de PrS (probabilidad de observar una tasa epidémica severa (S)).

Ln es el logaritmo natural.

PrM es la probabilidad de observar una epidemia moderada a nula (M) =  $1 - \text{PrS}$ .

## 5. Analizar las estrategias de hibernación y dispersión del patógeno en yemas productivas y granos de polen.

Las yemas sembradas en medio BS (Figura 26) desarrollaron colonias mucosas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* que hidrolizaron el almidón del medio (Figura 27) . Con el fin de corroborar la hidrólisis del almidón se agregó sobre las colonias gotas de lugol (Figura 28).

Los resultados de la evaluación de la infección de las yemas mostraron incidencias elevadas con valores entre 76% y 96% (Figura 29).

La infección se mantuvo con altos niveles, no presentándose diferencias significativas entre las variedades Franquette, Chandler, Tulare ni Davis, ni entre las campañas 2010, 2011 y 2012. Aplicando el Proc GLM del SAS, para las variedades y años, se demostró que no hubo interacción año x variedad (Tabla 6).

Ese nivel de infección en yemas permite mantener el nivel de inóculo elevado de un ciclo para el otro, del cultivo.

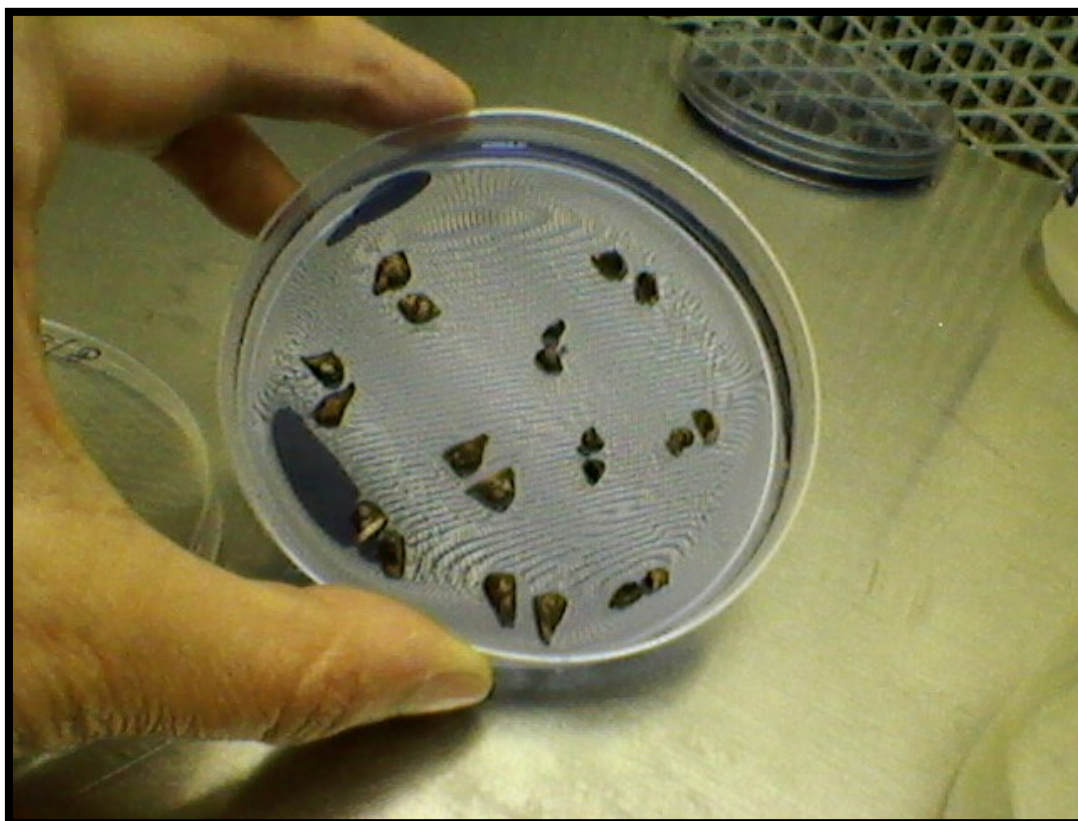


Figura 26- Yemas sembradas en cajas de Petri en medio BS

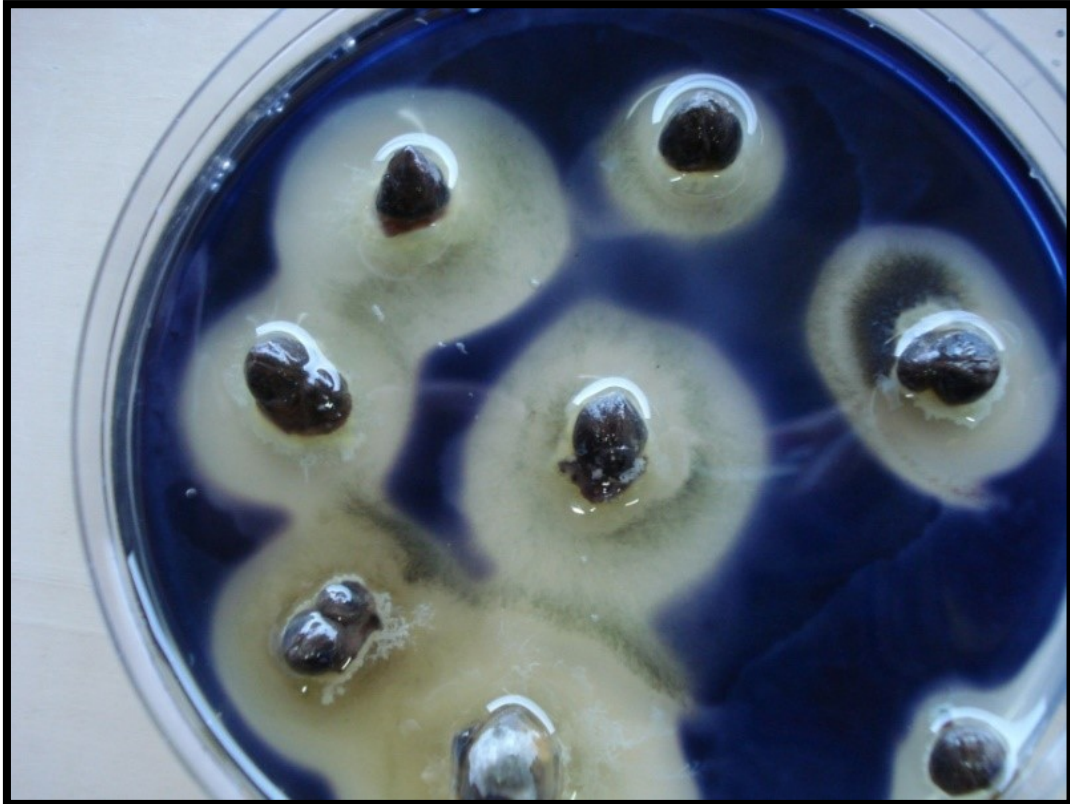


Figura 27- Desarrollo de colonias de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* luego de 72 hs de incubación a 28°C. Se observa la degradación del almidón.



Figura 28- Tinción con solución de lugol sobre las colonias de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* originadas

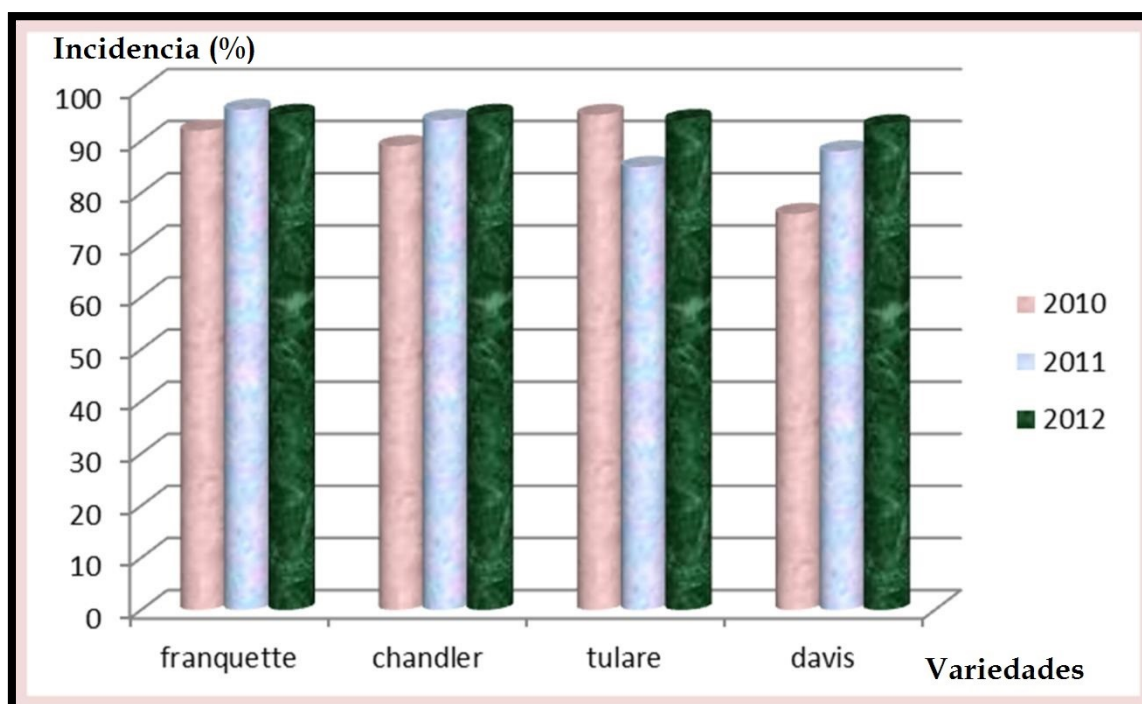


Figura29- Promedio de incidencia (%) (número de yemas infectadas/ total de yemas evaluadas x 100) de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en yemas de 4 variedades de nogal (*Juglans regia*) . Zavalla- 2010-2011-2012

Variación	Franquette	Chandler	Tulare	Davis	Promedio
Año	Incidencia (%)	Incidencia (%)	Incidencia (%)	Incidencia (%)	por año (%)
2010	92 a	89 a	95 a	76 a	88 a
2011	96 a	94 a	85 a	88 a	90,75 a
2012	95 a	95 a	94 a	93 a	94,25 a
Promedio por variedad (%)	94,33 a	92,66 a	91,33 a	85,66 a	90,99

Tabla 6- Incidencia (%) (número de yemas infectadas/ total de yemas evaluadas x 100) de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en yemas de 4 variedades de nogal (*Juglans regia*) durante 3 años de experimentos y promedios por variedad y por años. Zavalla- 2010-2011-2012

Las colonias desarrolladas a partir de granos de polen demostraron el 100% de incidencia de la infección de los mismos. Las colonias consumieron el almidón presente como fuente carbonada en el medio BS, y mostraron una apariencia brillante. El polen obtenido de cada una de las muestras se comportó en forma similar.

# DISCUSIÓN

## 1. Corroborar la identidad de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en nogal europeo.

*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* y su epidemiología ha sido estudiada en diferentes países y por diferentes autores.

Ya en el año 2005, en el I Seminario Internacional de nogalicultura en la Patagonia, en Argentina, Pozzo Ardizzi mencionó a *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* como causante del Tizón bacteriano del nogal, sobre numerosas especies del género *Juglans*. La enfermedad fue reportada en países de varios continentes con mayor importancia en las regiones productoras donde las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la misma (primaveras lluviosas, abundante rocío y neblina, y temperaturas moderadas), como ocurre en el Valle Inferior de Río Negro en Argentina, o en zonas innovadoras en la producción del nogal. Se considera que, si bien en algunos países se implementan sistemas predictivos que orientan sobre los momentos para realizar tratamientos, reduciendo así el número de aplicaciones con su consiguiente beneficio, es difícil realizar la implementación de dichos sistemas, porque implican una importante inversión, una imprescindible organización de los productores y una necesaria modernización del manejo global de las explotaciones.

En 2010, Lang y Evans, en Australia, concluyeron que la incidencia de la bacteriosis del nogal varía marcadamente entre cultivares, localidades y años de producción, ocasionándose epifitias cuando las condiciones ambientales son favorables. Una estrategia viable diferente a las aplicaciones preventivas, consistiría en identificar y cuantificar los factores claves como humedad ambiental para poder asociarlos con el desarrollo de la enfermedad. Una vez armados y validados los modelos basados en condiciones ambientales, se procedería a orientar la investigación a sistemas más económicos de control químico y con niveles más sustentables para el ambiente.

En Francia, Giraud *et al.* desde 2006 a 2008, determinaron también a *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* como causante del tizón bacteriano del nogal, responsable de la necrosis y caída temprana de frutos previo a la cosecha. Se estudió la dinámica poblacional comparando montes en producción durante 3 años en el suroeste francés, evaluando tamaño

de la población epifítica en yemas, hojas, flores, polen y frutos recolectados en los momentos de producción, y sugirieron que la expresión de la enfermedad responde en mayor medida a la condiciones edafo climáticas que al nivel poblacional del patógeno.

Scortichini en 2010, mencionó también a *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* como el agente causal de la bacteriosis del nogal y de la necrosis apical del fruto en nogales en todo el mundo, indicando a *Juglans regia* L. como la única especie hospedante. Si la severidad de la enfermedad es muy elevada, produce una reducción de la producción mundial de frutos comercializables. Concuera con otros autores en que el desarrollo de la patogénesis es altamente dependiente de las condiciones ambientales: duración del periodo húmedo, temperaturas, y precipitaciones durante la primavera, y recurrió al modelo epidemiológico XanthoCast desarrollado por la Universidad de Davis en California, como alerta para los productores al momento de la pulverización con productos a base de cobre. Scortichini además incluyó otros factores que desarrollan un rol importante en la aparición de la enfermedad, como son el ciclo de producción de cada variedad, (siendo las más tempranas las más susceptibles), y la composición del suelo (siendo los arenosos y los ácidos deficientes en P, Ca y Mg los más susceptibles).

Frutos y Lopez en 2012, en España, indicaron también a *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* como causante del Tizón Bacteriano en nogal, y remarcaron la importancia de desarrollar un sistema de alarma que prediga el máximo riesgo de infección en función de los datos climáticos para disminuir la aplicación de pulverizaciones cúpricas. Ellos incluyen una nueva posibilidad de control de la enfermedad a través de pulverizaciones con bacterias antagónicas a *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* sobre la superficie foliar también para reducir el número de aplicaciones cúpricas. Consideraron una compleja interacción entre condiciones del medio, genética del hospedante, adaptación del patógeno a ciclos epifíticos y endofíticos de vida, controles químicos disponibles en el hospedante y bacterias patogénicas que contribuyen a la comprensión de la enfermedad en sí. También expresaron la posible tolerancia o resistencia a la enfermedad de los genotipos más antiguos que crecen en forma nativa en áreas con condiciones ambientales igualmente favorables para la ocurrencia de la infección.

Por otra parte, en 2014, Lamichhane en Francia, determinó a *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* como causante del Tizón Bacteriano en nogales en la mayoría de las regiones nogaleras, ya que ha sido reportado en Francia, Irán, Lituania y Turquía en los últimos años,

lo que sugiere en poco tiempo la aparición de focos epidemiológicos, para lo cual el autor considera la importancia inminente del estudio de la epidemiología de dicha enfermedad, para implementar prácticas culturales, controles biológicos y resistencia en plantas, para su control. En cuanto a la epidemiología de la enfermedad, en este estudio se menciona también a la aparición de un patrón de inicio y finalización de la misma, cuya severidad depende mayormente de las condiciones ambientales primaverales, como además de las diferentes características de virulencia de las bacterias, susceptibilidad varietal de las distintas especies y/o variedades y condiciones del cultivo como ser riego, fertilización, momento y frecuencia de poda. Asimismo, en el aspecto económico, menciona a la Bacteriosis o Tizón del nogal como probable causante de pérdidas económicas aproximadas del 70% de los rendimientos a campo, ya que el patógeno ataca todos los órganos de la planta, ya sean herbáceos o leñosos.

En este trabajo se ha corroborado la presencia de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* tanto en el campo experimental de la Facultad de Ciencias de Agrarias de la UNR, sito en la localidad de Zavalla, como en campos de productores de otras localidades de la región centro húmedas de nuestro país.

## **2. Determinar variabilidad a nivel molecular de aislamientos de *Xanthomonas arboricola*.pv. *juglandis* procedentes de diferentes localidades de la región húmeda de Argentina**

Con el fin de determinar la variabilidad de aislamientos de *Xanthomonas arboricola*.pv. *juglandis* distintos autores utilizaron diferentes técnicas moleculares.

Louws, *et al* en 1994, utilizaron la técnica rep-PCR como una técnica rápida, simple y fácilmente reproducible para identificar y clasificar razas de 46 aislamientos de diferentes especies de *Xanthomonas* y *Pseudomonas* y demostraron que puede ser una herramienta de diagnóstico útil para estas bacterias patógenas.

En 2001, Loretto *et al.* y Scortichini, *et al.* en nogales de Italia, investigaron también la variabilidad genética de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*, por análisis AFLP. En el primer estudio, el análisis AFLP demostró ser fácilmente reproducible, confiable, y sensible para revelar la variabilidad genómica individual de los aislamientos de *Xanthomonas*

*arboricola* pv *juglandis* utilizados. Los resultados obtenidos mostraron que la ubicación geográfica puede ser parcialmente responsable de la heterogeneidad genética hallada.

Por su parte, Marcelletti *et al.* (2010) utilizó la técnica de MLST para tipificar cadenas de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* de cultivos de distintos países (Italia, Turquía, Nueva Zelandia, Reino Unido, Holanda, Francia y España) ya que consideró este método como una técnica para inferir las relaciones filogenéticas a nivel inter e intraespecífico. También, con el uso de MLST se pueden identificar nuevas especies y patovares de *Xanthomonas* y permite investigar si existen recombinaciones o mutaciones que provoquen variabilidad genética.

En 2012, Burokiene y Pulawska caracterizaron a través de rep PCR y MLST diferentes aislamientos de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* de Lituania y Polonia, países vecinos, que no mostraron altas diferencias entre ellas, con lo cual los autores sugirieron que no se sustenta la idea de que la diversidad genética de las razas responde básicamente a aislamientos geográficos, ya que los aislamientos de *Xanthomonas* obtenidos en Lituania deberían estudiarse en mayor medida para diferenciarse de aislamientos obtenidos en Polonia. Los estudios en estos países demuestran que los nogales son vulnerables a esta enfermedad, y que los estudios epidemiológicos son importantes para monitorear la expansión de esta patología en toda Europa. Conocer la estructura y la dinámica de las poblaciones bacterianas podrían estimular el desarrollo de medidas de control más efectivas y avanzar en protocolos de diagnóstico específicos.

En 2012, Ivanović *et al.* en Serbia determinaron también diferencias genéticas entre 3 biotipos de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* por la técnica ERIC PCR.

Por otro lado, en Polonia, Kaluzna *et al.* (2014), también utilizaron PCR para identificar aislamientos de 6 localidades, confirmando que todos los aislamientos provenían del mismo genotipo. A través del análisis por MLSA también se revelaron trazas de recombinaciones intergénicas.

En nuestro trabajo, coincidente con Louws *et al.* (1994), Burokiene y Pulawska (2012) e Ivanović *et al.* (2012), utilizando REP-PCR y ERIC-PCR se encontraron sólo 6 biotipos diferentes de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* y como se reporta en varios de los trabajos citados anteriormente, existiría poca variabilidad entre aislamientos de la misma

localidad y en general se distinguen entre diferentes localidades (Loretti *et al.*, 2001 y Scortichini *et al.*, 2001).

### **3. Evaluar la severidad de la bacteriosis a través del tiempo en las variedades Franquette, Chandler, Tulare y Davis**

Bandi *et al.* en 2010 evaluaron frutos de diferentes variedades de nogal infectados con *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*, a través de una escala de susceptibilidad entre 0 y 4, siendo. 0 – sin síntomas; 1 – menos de 2.0 mm de manchas superficiales; 2 - 2.1 mm a 2.6 mm; 3 - 2.7 mm a 3.1 mm; 4 – mayores a 3.2 mm. Las variedades utilizadas fueron selecciones de Transylvania, siendo Milotai muy susceptible y Bonifác moderadamente susceptible.

Vagelas *et al.* en 2012 estudiaron el comportamiento de diferentes variedades de nogales frente a *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*, utilizando una escala de severidad de A a E con 5 clases de susceptibilidades A: menor susceptibilidad, E: alta Susceptibilidad. Determinaron a la variedad. Franquette como resistente (clase A), y a la variedad Chandler como levemente susceptible (clase B). Los autores determinaron que los datos obtenidos no pueden ser extrapolados directamente a cualquier condición natural de campo, ya que la infección depende de muchos factores bióticos y abióticos. Por lo tanto, los resultados obtenidos pueden tomarse sólo como potenciales, ya que una variedad puede ser más o menos infectada de acuerdo a las condiciones propias de la región.

En nuestro estudio, las tres campañas estudiadas mostraron valores de severidad diferentes de acuerdo a las condiciones climáticas propias de cada año, siendo en todas el inóculo inicial suficiente como para garantizar la infección, como se confirma en el estudio de incidencia en yemas productivas. De todos modos, en todas las campañas los comportamientos de cada una de las variedades fueron similares, siendo siempre Franquette la menos susceptible y Chandler, Tulare y Davis mostraron mayor susceptibilidad.

Estos resultados concuerdan con los de Vagelas *et al.* (2012) que muestra a la variedad Franquette como resistente y a la variedad Chandler como levemente susceptible. Si bien las variedades son susceptibles o resistentes *per se*, su comportamiento se va a ver afectado por la virulencia de la cepa del patógeno con la que se enfrente.

Si bien el experimento fue realizado midiendo severidad en hojas, se muestra el comportamiento esperado de las variedades en estudio.

#### **4. Relacionar la severidad de la bacteriosis con los factores climáticos y desarrollar un modelo epidemiológico teniendo en cuenta las condiciones ambientales de la zona en estudio.**

Numerosos autores, entre ellos los ya citados, Lang y Evans (2010), Giraud *et al.* (2010) y otros, sugieren el desarrollo de modelos de predicción de epifitias del nogal para lograr que el manejo de esta especie sea más sustentable y cuidadoso del ambiente.

En el presente trabajo se desarrolló un nuevo modelo predictivo para la enfermedad Bacteriosis del nogal causada por el patógeno *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*, lo cual resulta novedoso en base al objetivo planteado originalmente, que consistía en validar un modelo ya vigente para esta enfermedad. Este modelo predictivo, ya vigente, fue desarrollado teniendo en cuenta los componentes del triángulo de la enfermedad. El componente hospedante está afectado por el estado fenológico de desarrollo y por los diferentes niveles de resistencia de cada variedad. Para el componente patógeno, el inóculo inicial parece ser el parámetro más predecible en montes comerciales, ya que el patógeno es endémico en todos los montes comerciales de California, donde se desarrolló este modelo. Como componente ambiental, se considera la interacción entre duración del período húmedo, y la temperatura. Otros autores suman también a la lluvia como encargada de la diseminación, el viento y la humedad relativa.

El modelo XanthoCast <sup>TM</sup> fue iniciado en el año 2000 como un modelo de pronóstico para el tizón bacteriano en cultivares Vina y Ashley de nogales, en California, EEUU. Dicho modelo incluía duración del período húmedo y temperatura, los dos parámetros microambientales críticos para el desarrollo de la enfermedad, tanto en cámaras de crecimiento como en estudios a campo. El modelo fue validado en 2004, 2005 y 2006 con su sitio web correspondiente. Con el uso de dicho modelo se redujo el número de aplicaciones con bactericidas comparándose con las aplicaciones calendarias tradicionalmente utilizadas. Con el correr de los años dicho modelo se ha ido validando en diferentes condiciones climáticas y se ha adaptado a otros factores climáticos como precipitaciones, en lugar de follaje mojado (Adaskaveg *et al.*, 2016).

En 2002, Costa y otros, fundamentaron el uso de modelos epidemiológicos, como herramienta eficiente para el estudio de enfermedades a nivel de poblaciones y comunidades. En cuanto a prevención de epifitias éstos cuantifican el probable inicio o desarrollo futuro de enfermedades a partir de información del clima, del hospedante y del patógeno. Según este autor los modelos cumplen con algunos objetivos básicos como la reducción del número de aplicaciones de productos químicos, un manejo más eficiente de la enfermedad, disminución del riesgo de ocurrencia de epidemias severas y reducción de la polución ambiental, por el menor uso de químicos.

Por su parte Moschini *et al.*, en 2010 trabajaron en la identificación de variables meteorológicas durante la primavera en la localidad de Bella Vista (Corrientes, Argentina) en un modelo en relación a la intensidad de la Cancrosis de los cítricos. Para este mismo modelo, aplicado luego en la región citrícola de España, también para Cancrosis, se debieron agregar otras variables para explicar la intensidad de la enfermedad.

En 2012, Bombelli *et al.*, consideró modelos predictivos que evaluaban severidad de manchas foliares causadas por *Alternaria tenuissima* en plantaciones de arándano en tres localidades argentinas: San Pedro, Concordia y Gualguaychu. La ecuación integró la interacción de días con precipitaciones y de días con temperaturas entre 16°C y 36°C. Un adecuado ajuste y validación de los modelos predictivos obtenidos de esta investigación, permitieron el desarrollo de verdaderos sistemas de pronóstico para la correcta gestión de la enfermedad, desde el punto de vista técnico, económico y ambiental. En 2013 se construyeron modelos matemáticos para predecir la severidad de diferentes enfermedades en cultivos de alto valor comercial, utilizando parámetros meteorológicos (Bombelli *et al.*, 2013).

Los distintos modelos epidemiológicos se relacionan estrechamente con las características del patosistema correspondiente. Cada modelo mencionado anteriormente posee características propias que lo definen.

En forma similar al modelo de pronóstico de la bacteriosis del nogal denominado XanthoCast™ de la Universidad de California, que considera los componentes del triángulo de la enfermedad (hospedante, patógeno y ambiente), el modelo desarrollado en este trabajo, considera también variables meteorológicas y hace referencia a la susceptibilidad o no del hospedante, como forma de predecir futuras epifitias.

Para elaborar el modelo predictivo que resultó de este trabajo se midió la severidad (%) considerada en días julianos en relación con las variables tomadas en el campo: temperatura máxima, temperatura mínima, temperatura media, humedad relativa y horas de follaje mojado. En el modelo elaborado, que ajusta en un 81%, se muestra la importancia de la presencia de agua para la epidemia, ya que los días con precipitaciones mayores a 9 mm, los días de rocío y la susceptibilidad de la variedad, definen el modelo.

De acuerdo a esa predicción, se podrán reducir las aplicaciones químicas disminuyendo además el impacto ambiental de las mismas, como aporte a la sustentabilidad del sistema.

## **5. Analizar las estrategias de hibernación y dispersión del patógeno en yemas productivas y granos de polen.**

En 2005, Bock *et al.*, simularon la dispersión de la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* a través de lluvia arrastrada por el viento, con generadores eléctricos de turbulencias, comprobándose que el cancro bacteriano del citrus es dispersado por la lluvia y el viento. Esta dispersión posee una alta concentración de inóculo y el viento la favorece notablemente por un periodo largo de tiempo a grandes distancias.

En 2014, Lamichhane mencionó que los frutales de carozo y los nogales, son un nicho constante para la supervivencia y multiplicación de las bacterias patógenas. Las mismas pueden sobrevivir en tejidos leñosos los cuales les proveen protección contra condiciones climáticas o tratamientos de control. Las infecciones latentes incrementan el riesgo de diseminación a través de la propagación vegetativa. Por lo que es importante la obtención de plantas libres de enfermedades en viveros.

Por su parte, Lindow *et al.*, en el mismo año consideraron que el inóculo de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* presente en yemas dormidas es el primer determinante de la infección en nogales, y el riesgo de la enfermedad podría ser predicho tanto por el número de infecciones presentes en yemas, como por la incidencia de lluvias en la primavera temprana. El inóculo de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* en o sobre yemas de nogal, juega un rol importante en la epidemiología de la enfermedad. Las hojas y los frutos son tejidos relativamente efímeros, no siendo así las yemas, que permanecen, aunque latentes, en todas las etapas del cultivo. La colonización de las yemas por *Xanthomonas arboricola* pv

*juglandis* pareciera ocurrir tan pronto como se forman en la primavera, siendo entonces un sitio de residencia permanente. No se ha comprobado aún si la presencia de *Xanthomonas* en yemas se da solamente en forma superficial, o si también ocurre en el interior de las mismas.

El hallazgo de una correlación altamente positiva entre el tamaño poblacional de *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* en yemas dormidas y la subsecuente incidencia de la infección en nueces, hacen promisorio el estudio de la distribución de la abundancia del patógeno en yemas como predictivo para el potencial de la enfermedad en un monte determinado, siempre que se de la frecuencia necesaria de lluvias por su alta incidencia en el desarrollo de la enfermedad, dado un tamaño poblacional del patógeno.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, los niveles de infección tanto en yemas como en granos de polen, son lo suficientemente altos como para asegurar la presencia de la bacteria de un año a otro.

Además si estos resultados se relacionan con lo demostrado en cuanto al desarrollo epidémico para *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, se observa que no siendo limitante el nivel de inóculo para el desarrollo de la epifitía, ésta se ve afectada notablemente por el comportamiento de la variedad en cuanto a resistencia y por los factores ambientales condicionantes.

## CONCLUSIONES

- La bacteria identificada a partir tejidos foliares con manchas necróticas en nogal europeo (*Juglans regia*) es *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*.
- La variabilidad molecular detectada dentro de cada localidad estudiada en la región húmeda de la República Argentina, fue baja. Existieron diferencias entre localidades, encontrándose 6 genotipos diferentes.
- Con respecto a la severidad evaluada en hojas, en las tres campañas consideradas, con diferentes situaciones climáticas, la variedad Franquette fue la menos afectada, debido probablemente a su brotación tardía lo que le confiere una condición de escape a la enfermedad.
- El modelo predictivo con mejor ajuste a los datos obtenidos tiene en cuenta las variables meteorológicas precipitaciones mayores a 9 mm, y días sin lluvias con mojado atribuible al rocío por ocurrencia de HR del aire mayor a 82%; y la variable discreta binaria susceptibilidad (0-1).
- La alta infección en los sitios de hibernación (yemas dormidas y granos de polen) asegura un nivel importante de inóculo inicial para la campaña siguiente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaskaveg, J. E ; Förster, H., Thompson, D., Driever, G., Connell, J. and Buchner R.** 2006. Epidemiology and management of walnut blight. Walnut research report. 181-191.
- Adaskaveg, J.; Förster, H.; Thompson, D.; Driever, G.; Connell, J. and Buchner; R.; Grant, J. and Wade, L.** 2007. Epidemiology and management of walnut blight. pp185-201. Agriculture and Natural Resources, University of California. Online Walnut Research Report Project IV(6):051-054.
- Adaskaveg, J. ; Förster, H.; Nguyen, K.; Thompson, D.; Cary, D.; Wade, L.; Leslie, C.; R. Buchner, R. and Grant, J.** 2016. Epidemiology and management of Walnut Blight. Walnut Research Reports 1-19.
- Arquero, O.; Lovera, M.; Rodríguez R. y Trapero, A.** 2005. Walnut Blight (*Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis*): factors influencing disease incidence. ISHS Acta Horticulturae 705: V International Walnut Symposium.
- Bandi, A.; Tóth M.; Hevesi, M. Thiesz, R.** 2010. Walnut selections susceptibility to *xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis*. Preliminary results Hungary Lucrări științifice USAMVB, Seria B, vol. LIV, 366-371.
- Barinovi, D. y Scortichini, M.** 2008. Integron variability in *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* strains. FEMS Microbiol.Lett. 288, 19-24.
- Belisario, A.** 2005. Aspetti di eziologia, epidemiologia e difusa delle principali avversità patologiche del noce in Italia. Informatore Fitopatologico 7-8, 51-57.
- Berthier Y., Verdier V., Guesdon J.L., Chevrier D., Denis J.P., Decoux G., Lemattre M.** 1993. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. Applied and Environmental Microbiology: 851-59.

**Bock, C.; Parker, P. and Gottwald, T.R.** 2005. Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from canker infected citrus trees. Plant disease . Vol. 89.N° 171-80.

**Bombelli, E., Wright, E., Moschini, R., López, M., Fabrizio, M., Barberis, J., Rivera, M.** 2012 Modelado computacional de datos epidemiológicos para predecir enfermedades de cultivos con base meteorológica 41JAIIO - SSI 2012 - ISSN: 1850-2830- Página 322 10° Simposio sobre la Sociedad de la Información, SSI .

**Bombelli, E.; Moschini, R. ; Wright, E. ; López, M. , Fabrizio, M.** 2013 Modelado para la predicción de enfermedades en cultivos de alto valor comercial Proyecciones, Vol.11 No. 1.

**Buchner, R.; Lindow, S.; Adaskaveg, J.; Gilles, C.; Koutsoukis, R.** 2013. Walnut Blight management using *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* dormant bud population sampling. Walnut Research Reports. 313- 321.

**Burokiene D.** 2009. Identification and molecular characterization of bacterial agents of stone fruits and walnuts in Lithuania. *Annual Cost 873 Meeting, Cetara, Italy*.  
[http://www.cost873.ch/\\_uploads/\\_files/DBurokiene\\_lithuania\\_Italy.pdf](http://www.cost873.ch/_uploads/_files/DBurokiene_lithuania_Italy.pdf)

**Burokiene, D. and Pulawska,J.** 2012 Characterization of *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* isolated from walnuts in lithuania. Journal of Plant Pathology 94 (1, Supplement),S1.23- S1.27.

**Cólica,J.** 2015. Producción de nueces en Argentina y Catamarca. Resúmenes de las ponencias del III Simposio Internacional de Nogalicultura del Noroeste Argentino.

**Costa, L.; Junior, W. y Ribeiro de Vale, F.** 2002 Modelos aplicados en fitopatología. Rev. FCA UNCuyo. Too XXXIV N°1 81-92.

**Doreste P.,** 2011. El nogal y sus perspectivas. . Revista Alimentos Argentinos, pp 28-32

**Errecart, V.** 2015. El contexto internacional del negocio de la nuez de nogal. Resúmenes de las ponencias del III Simposio Internacional de Nogalicultura del Noroeste Argentino.

**Esterio, M., Pérez, I. y Auger, J.** 2007. Análisis de la variabilidad genética de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* en Chile. Fitopatología 42(3): 111-122.

**Feldman, J.M. y Pontis, R.E.** 1960. Enfermedades parasitarias de las plantas cultivadas, señaladas para la provincia de Mendoza (Argentina). Serie: Revista argentina de agronomía (Buenos Aires- Argentina). v. 27(1-2) p.27-50.

**Fernández Valiela, M.** 1975. Introducción a la Fitopatología. Vol.II. Bacterias. Fisiogénicas. Fungicidas. Nemátodos. (3ra Edición) INTA. Buenos Aires. Argentina. Pp 821.

**Flores, P.; Seta, S.; Gonzalez, M.; Coniglio, R.; Sferco, S.; Trevizán, A.** 2004. Manejo químico y varietal de nogales frente a bacteriosis del nogal. Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNR | Año IV - Nº 5. Pp 25-31.

**Frutos D, and Lopez G.** 2012. Search for *Juglans regia* genotypes resistant/tolerant to *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* in the framework of cost action 873. Journal of Plant Pathology) 94 (1. Supplement) S1 37-S1 46.

**Giraud, M.; Prunet, J.; Chevallier, A.; Romain, S. ; Thiriaud, V.; I. Santrac, I.; O. Bray, O.** 2010. Study of *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* population dynamics in French Walnut orchards over three years. VI International Walnut Symposium. 10.17660/ActaHortic.2010.861.61.

**Gironde, S.; Guillaumes, J. and Manceau, Ch.** 2009. Specific detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* pathogen on walnut. EPPO Conference on Diagnostics. INRA. France.

**Giovanardi, D.; Bonneau, S.; Gironde, S.; Fischer-Le Saux, M. ; Manceau, Ch.and & Stefan, E.** 2015. Morphological and genotypic features of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* populations from walnut groves in Romagna region, Italy. European Journal of Plant Pathology 145(1).

**González Vera, C. y Seleme, F.** 2018. Enfermedades de *Juglans regia* L. (nogal, nogal europeo) en: ATLAS FITOPATOLOGICO ARGENTINO Vol. 4 N° 4. Ed. Nome, S.; DocampoD.,Conci,L.[URL:http://fitopatoatlas.inta.gob.ar/inicio.aspx#/consultageneral?Id=756](http://fitopatoatlas.inta.gob.ar/inicio.aspx#/consultageneral?Id=756)

**Iannamico, L.** 2009. El cultivo del nogal en climas templado-fríos I. Material Vegetal. 1era edición. Buenos Aires. Ediciones INTA. 116 pp. ISBN 978-987-521-343-2.

**Ivanović, Ž; Popović, T.; Živković, S.; Oro, V.; Trkulja, N.; Milosavljević, A.;Gavrilović, V.** 2012. ERIC PCR as a method for determining diversity of *xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis*. Book chapter; Conference paper: 336-340 ref.15 e.

**Jaldo Alvaro, D.** 2014. Situación actual, potencial y perspectivas de la nogalicultura en Argentina. Asociación Argentina de Economía Agraria.

**Kaluzna, M.; Pulawska, J.; Waleron, M. and Sobiczewski, P.** 2014. The genetic characterization of *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*, the causal agent of Walnut Blight in Poland. Plant Pathology 63, 1404-1416.

**Kishun, R. and Gupta, V.** 2008. Detection of genetic diversity among Indian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* using PCR-RAPD. Available from Nature Precedings -<http://hdl.handle.net/10101/npre.2008.2403.1>

**Lamichhane, J.** 2014. *Xanthomonas arboricola* .diseases of stone fruit, almond and walnut trees: progress toward understanding and management. Plant Disease Vol.98 No12.1600-1610.

**Lang M. and Evans K.** 2010. Epidemiology and status of Walnut Blight in Australia. Journal of Plant Pathology, 92 (1,Supplement), S1.49\_S1.55.

**Lemus, G.; Valenzuela, J. y Lobato, A.** 2001. El nogal en Chile. Capítulo 1: Origen y Botánica. INIA. Chile. Pp 224.

**Lemus G.; Ibacache, A.; Pinilla, B.; Riveros, F.; Sellés, G.; Ferreira., R.; Martinez, L.; Ruiz, R.; Sierra, C.; Bianchini, V.; Rojas, C.; Reginato, G.; Albornoz, A.; Marin,M.; Latorre,B.; Gratacos, E.; Zaviezo, T.; Valdés G., Vial, J.** Manual Producción de nueces de

nogal. Manuales FIA de Apoyo a la Formación de Recursos Humanos para la Innovación Agraria. Chile. Pp 102.

**Lindow, S.; Buchner, R.; Olson, B.; Teviotdale, B.; Koutsoukis, R.** 2003. Epidemiological approaches to the control of walnut Blight disease. Walnut Research Reports <http://walnutresearch.ucdavis.edu/>.

**Lindow, S. Rick Buchner, Renee Koutsoukis.** 2006. Epidemiological Approaches To The Control Of Walnut Blight Disease. <http://walnutresearch.ucdavis.edu/>.

**Lindquist, J.** 2001. An introduction to bacterial identification. Department of Bacteriology University of Wisconsin. Madison. USA.

**Loreti, S.; Gallelli, A.; Belisario, A.; Wajnberg, E. and Corazza, L.** 2001. Investigation of genomin variability of *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* by AFLP analysis. European Journal of Plant Pathology 107, 583-591.

**Louws, F.; Fulbright, D.; Taylor Stephens, C. and De Bruijn, F.** 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* Pathovars and strains generated with Repetitive Sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology. 2286-2295

**Marchionatto, J. B.** 1944. Manual de las enfermedades de las plantas. Ed. Sudamericana. Buenos Aires. Pp368.

**Marcelletti, S.; Ferrante, P. and Scortichini, M.** 2010 Multilocus sequence typing reveals relevant genetic variation and different evolutionary dynamics among strains of *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis*. Diversity 2, 1205-1222; doi:10.3390/d2111205.

**Moschini, R.; Canteros, B.; Marcó, G. y Cazenave, G.** 2010. Modelos logísticos predictivos de la Cancrosis de los Citricos en Bella Vista y su uso en el área citrícola española. VI Congreso Argentino de Citricultura. Pp 79-86.

**Mulrean, E. y Schroth, M.** 1981. A semiselective médium for the isolation of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* from walnut buds and catkins. *Phytopathology*. Vol.71, No.3. Pp 336-339.

**Muncharaz Pou M.** 2012. El nogal. Técnicas de producción de fruto y madera. Ediciones Mundi Prensa.

**Pozzo Ardizzi, M.C.** 2005. CONFERENCIA: BACTERIOSIS DEL NOGAL. 1er Seminario Internacional de Nogalicultura en la Patagonia. 29, 30 y 1 de diciembre. Viedma- Río Negro. p 22.

**Prichard T., GranJ. t, and Wade L.** 2006. Epidemiology and management of walnut blight. Walnut Research Reports web site: <http://walnutresearch.ucdavis.edu/>.

**Pooler, M.; Ritchie, D. and Hartung J.** 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR Data and Generation of Multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen . *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 62, No. 9 3121–3127.

**SAS/STAT<sup>®</sup> Statistical Analysis Software.**

**Schaad, N.; Jones, J. y LAcy, G.** 2001. *Xanthomonas* En: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, 175-200.

**Scortichini, M.; Marchesi, U. and Prospero, P.** 2001 Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv *juglandis* (synonyms: *campestris* pv *juglandis*; *X.juglandis* pv *juglandis*) strains from different geographical areas shown by repetitive polymerase chain reaction genomic fingerprinting. *Journal Phytopathology* 149, 325-332.

**Scortichini M.** 2010. Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and nut fruit trees species. *Journal of Plant Pathology* (2010), 92 (1, Supplement) S1.3-S1.78.

**SENASA.** 2015 Áreas de producción del cultivo de *Juglans regia* en la Argentina.

**Seta, S.; González, M.; Moyano, M.I.** 2004. Calidad en poscosecha del nogal (*Juglans regia* L.). Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNR, [S.l.], n. 06, 051-054.

**SINAVIMO.** Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. SENASA. 2017. (<http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/juglans-regia>)

**Soler, C. y Dominguez, J.** 2011. Exportación de la nuez chilena. Análisis del Mercado mundial. Voz Académica. Agronomía y Forestal. UC. FAOSTAT.

**Tamponi, G.** 1988. Fruit sensitivity to *Xanthomonas juglandis* of Walnut cultivars. Istituto Sperimentale per la Frutticoltura. Roma. Italia

**Teviotdale, B. ; Michailides, T. and Pscheidt, J.** 2002. Compendium of nut crop diseases in temperate zones. The American Phytopathological Society Press. U.S.A. 81-82.

**USDA.** Tree Nuts: World Markets and Trade United States Department of Agriculture USDA. Foreign Agricultural Service. 2017.

**Turini, T. and Teviotdale, B.** 1994. Epidemiological approaches to the control of Walnut Blight. Experiments of Kearney Agricultural Center 1994. Walnut Research Reports <http://walnutresearch.ucdavis.edu/>.

**Tushemereirwe, W.; Kangire, F.; Ssekiwoko, L.; Offord, J.; Crozier, E. Boa, M. Rutherford, J. and Smith, J.** 2004 First report of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* on banana in Uganda **First published:** 14.

**USDA.** 2017. Tree Nuts: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service. Office of Global Analysis.

**Vagelas, I. ; Rumbos C. and. Tsiantos J.** 2012. Variation in disease development among persian walnut cultivars, selections and crosses when inoculated with *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in Greece Journal of Plant Pathology (2012), **94** (1, Supplement), S1.57-S1.61 7.